

Aus dem Institut für Neuropathologie
(Prof. Dr. med. W. Brück)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Die Funktion von CX₃CR1 in einem spontanen Modell der
experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Heiko Hollasch
aus
Osnabrück

Göttingen 2015

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
I. Berichterstatterin:	Prof. Dr. Christine Stadelmann-Nessler
II. Berichterstatter:	Prof. Dr. Alexander Flügel
III. Berichterstatter:	Prof. Dr. Martin Oppermann
Tag der mündlichen Prüfung:	27.09.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Multiple Sklerose	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Ätiologie	2
1.1.3	Klinik und Verlaufsformen	3
1.1.4	Histologie	5
1.1.5	Diagnose	6
1.1.6	Therapie	6
1.2	Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis (EAE) als Tiermodell für MS	9
1.3	Tiermodelle MOG-spezifischer T- und B-Zellen	11
1.4	Chemokine und ihre Rezeptoren	12
1.4.1	CX ₃ CL1 und sein Rezeptor CX ₃ CR1	13
1.4.2	CX ₃ CR1 und seine Bedeutung für die EAE	15
1.4.3	Funktionen von CX ₃ CR1 außerhalb des ZNS	16
1.4.4	CX ₃ CR1-Polymorphismen im Menschen	17
1.5	Fragestellung der vorliegenden Arbeit	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Versuchstiere	19
2.2	Klinische Einteilung der EAE	19
2.3	Genotypisierung	20
2.3.1	Materialien	24
2.4	Quantitative PCR aus Gewebe	25
2.4.1	Materialien	28
2.5	Perfusion und Präparation der Versuchstiere	28
2.5.1	Materialien	29
2.6	Grundlagen und Durchführung einer Hämatoxilin-Eosin-Färbung	29
2.7	Grundlagen und Durchführung einer LFB/ PAS-Färbung (Luxol-Fast-Blue/ Perjodsäure-Schiff-Reaktion)	30
2.8	Grundlagen und Durchführung einer Bielschowsky-Färbung	31

2.9	Durchführung einer immunhistochemischen Färbung.....	31
2.9.1	Materialien	32
2.9.2	Verwendete Antikörper	34
2.10	Histologische Auswertung	34
3	Ergebnisse	37
3.1	CX ₃ CR1-defiziente OSE-Mäuse erkranken signifikant häufiger spontan an EAE	37
3.2	CX ₃ CR1-defiziente OSE-Mäuse erkranken signifikant weniger schwer an EAE	38
3.3	CX ₃ CR1-defiziente OSE-Mäuse zeigen in der akuten Krankheitsphase meningeal und intraläsional geringere entzündliche Infiltrate	39
3.4	Reduzierte entzündliche Infiltrate in der chronischen Krankheitsphase ohne signifikanten Unterschied zwischen den CX ₃ CR1-Genotypen	42
3.5	CX ₃ CR1-Wildtyp-OSE-Mäuse weisen in der akuten Krankheitsphase signifikant ausgeprägtere spinale Demyelinisierungen auf	46
3.6	CX ₃ CR1-heterozygote OSE-Mäuse zeigen in der chronischen Krankheitsphase signifikant ausgeprägtere spinale Demyelinisierungen	47
3.7	Kein signifikanter Unterschied hinsichtlich spinaler axonaler Schädigung in akuter und chronischer Krankheitsphase	49
3.8	CX ₃ CR1-defiziente OSE-Mäuse weisen in der akuten Krankheitsphase spinal eine geringere neuronale Schädigung auf	52
3.9	Heterogene Expression inflammatorischer Moleküle in den CX ₃ CR1-Genotypen	53
4	Diskussion	55
4.1	Erhöhte Inzidenz einer spontanen EAE bei CX ₃ CR1-Defizienz	55
4.2	Die CX ₃ CR1-Defizienz reduziert die Erkrankungsschwere im spontanen EAE-Modell.....	56
4.3	Regulation von Th17-Zellen durch CX ₃ CR1	60
4.4	Ausblick und mögliche Relevanz für die Multiple Sklerose	61
5	Zusammenfassung.....	63
6	Literaturverzeichnis	65

Abkürzungsverzeichnis

Bp	Basenpaare
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CFA	<i>complete Freund's adjuvant</i>
CIS	<i>clinically isolated syndrome</i>
Ct	<i>cycle threshold</i>
DAB	3-3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>
EAE	experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EU	Europäische Union
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KI	<i>knock-In</i>
LFB	<i>luxol-fast-blue</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MBP	Myelin-basisches Protein
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NaCl	Natriumchlorid
OSE	optico-spinale EAE
PAS	<i>periodic acid schiff</i>

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Proteolipid-Protein
PML	Progressive multifokale Leukenzephalopathie
PP-MS	<i>primary progressive multiple sclerosis</i>
PR-MS	<i>progressive relapsing multiple sclerosis</i>
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RIS	<i>radiologically isolated syndrome</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
Rpm	<i>revolutions per minute</i>
RR-MS	<i>relapsing remitting multiple sclerosis</i>
RT	Reverse Transkriptase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SPF	spezifisch pathogenfrei
SP-MS	<i>secondary progressive multiple sclerosis</i>
TCR	T-Cell-Rezeptor
tdRFP	Tandem-Dimer rot fluoreszierendes Protein
Tg	transgen
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
UV	Ultraviolett
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VLA	<i>very late antigen</i>
Wt	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung des Zentralnervensystems, die zu einer Demyelinisierung von Axonen und axonalem Verlust führt. Für die in ihrer Klinik sehr heterogene Erkrankung ist die Ätiologie bislang unklar. Man geht davon aus, dass die MS aus einem Zusammenspiel von multiplen prädisponierenden genetischen Risikofaktoren mit Umweltfaktoren entsteht. Als Umweltfaktoren kommen aktuell vor allem virale Erreger sowie Vitamin D in Frage. Die genetischen Risikofaktoren sind hauptsächlich immunologisch relevante Gene.

1.1.1 Epidemiologie

MS kommt gehäuft in der kaukasischen Bevölkerung vor. Eine erhöhte Prävalenz ist in Nordamerika und Nordeuropa zu finden, während sie in Bevölkerungen in der Nähe des Äquators besonders niedrig ist. In Europa ist vor allem die skandinavische Bevölkerung betroffen, wohingegen MS in südlicheren Ländern Europas zunehmend seltener wird. Aufgrund dieser Verteilung spricht man auch von einem Nord-Süd-Gefälle. Auf der Südhalbkugel nimmt die Prävalenz ebenso mit der Entfernung vom Äquator zu. So ist MS in tropischen und subtropischen Gebieten besonders selten. Dennoch finden sich auch auf der Südhalbkugel in Ländern wie Australien oder Neuseeland Nord-Süd-Gefälle in der Prävalenz. Auffällig ist, dass die geographische Lage auch einen Einfluss auf den Phänotyp der Erkrankung hat. In Japan manifestiert sich MS besonders häufig im Nervus opticus und im Rückenmark, während das übrige Zentralnervensystem seltener betroffen ist [Hogancamp et al. 1997]. Unklar ist, ob diese geographische Verteilung mit unterschiedlichen Lebens- und Ernährungsweisen oder einem unterschiedlichen Genpool in Zusammenhang steht. Für die erste Theorie sprechen Befunde von Migrationsstudien, wonach Kinder, die vor dem 15. Lebensjahr in eine andere Region ziehen, das Erkrankungsrisiko ihrer neuen Heimat übernehmen [Marrie 2004].

Charakteristisch ist eine erhöhte Inzidenz bei Frauen. Die höchste Inzidenz liegt dabei im mittleren Alter zwischen 20 und 40 Jahren. Dennoch ist eine

Neuerkrankung auch im Kindesalter oder im höheren Lebensalter (60 Jahre und älter) möglich. In Deutschland wird die Zahl der Betroffenen auf 122.000 geschätzt, was einer Prävalenz von 149,1 Erkrankten auf 100.000 Einwohner entspricht [Hein und Hopfenmüller 2000]. Die weltweite Prävalenz wird auf circa 2,5 Millionen Betroffene geschätzt [Compston und Coles 2002].

1.1.2 Ätiologie

Die MS ist durch multifaktorielle Ursachen bedingt, wobei eine polygenetische Disposition und Umweltfaktoren für eine Erkrankung verantwortlich zu sein scheinen. Auf einen genetischen Einfluss weisen mehreren Fakten hin: Verwandte eines Erkrankten haben ein höheres Erkrankungsrisiko als die Allgemeinbevölkerung. So erkranken Halbgeschwister eines Betroffenen seltener als Geschwister [Sadovnick et al. 1996]. Zwillingsstudien ergaben eine Konkordanz von circa 30 % bei monozygoten und circa 5% bei dizygoten Zwillingen [Sadovnick et al. 1993]. Das am stärksten für die MS prädisponierende Gen ist HLA-DRB1*15:01. Dieses ist mit einem jüngeren Erkrankungsalter des Genträgers assoziiert. Etwa 90 % der Gene, die ebenfalls mit MS assoziiert sind, sind Gene des Immunsystems [International Multiple Sclerosis Genetics Consortium et al. 2011]. Für viele Jahre war die HLA-Region der einzige bekannte Genort, der mit einer Prädisposition für MS assoziiert war. In jüngerer Zeit konnten jedoch weitere Genorte wie IL2-RA außerhalb der HLA-Region erkannt werden. Einige mit MS assoziierte Allelvarianten spielen auch bei anderen Autoimmunerkrankungen eine Rolle. So steht ein Polymorphismus im Gen für IL2-RA in Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen wie MS, Diabetes mellitus Typ 1, Morbus Basedow und rheumatoider Arthritis [Baranzini 2011]. Dabei ist beispielsweise ein bestimmter IL2-RA-Polymorphismus bei MS mit einer Autoimmunuveitis assoziiert [Lindner et al. 2011].

Diese vorwiegend immunologischen Risikofaktoren zusammen mit dem Ansprechen der Krankheitssymptome auf immunsuppressive/ immunmodulatorische Therapien sprechen dafür, dass MS eine Autoimmunerkrankung ist. Insbesondere die Ergebnisse der Zwillingsstudien weisen aber daraufhin, dass für eine Erkrankung weitere nichtgenetische Faktoren verantwortlich sein müssen. Als Umweltfaktoren werden Infektionen mit dem Epstein-Barr-Virus oder dem Bakterium *Chlamydia pneumoniae*, der Vitamin-D-Status oder der Einfluss von Sonnenlicht diskutiert. Der

Einfluss von Umweltfaktoren wird durch Migrationsstudien gestützt, wonach sich das Erkrankungsrisiko von Migranten verringert, die aus Ländern mit häufigem Vorkommen von MS stammen und in Gebiete mit geringerer Prävalenz einwandern [Gale und Martyn 1995].

Zur Auslösung einer Autoimmunität im ZNS werden verschiedene Theorien diskutiert. Die Theorie der molekularen Mimikry sieht die Ursache in der Kreuzreaktion des Immunsystems auf virale Antigene, die Peptiden des Myelins ähneln und je nach HLA-Typ aufgrund einer Infektion präsentiert werden. Im Tiermodell konnte bereits demonstriert werden, dass T-Zellen im Rahmen einer Virusinfektion aktiviert werden und durch virale, den Myelinpeptiden ähnlichen Antigenen Autoimmunität im ZNS auslösen können [Olson et al. 2001]. Eine weitere Theorie sieht bei der Entstehung die Umwelt im Vordergrund. So wird angenommen, dass durch die zu geringe Auseinandersetzung mit Erregern der Umwelt in der Kindheit eine Entstehung von Autoimmunität begünstigt wird. Die zunehmende Inzidenz von Autoimmunitätserkrankungen könnte mit den Fortschritten in der Hygiene erklärt werden [Conradi et al. 2011].

1.1.3 Klinik und Verlaufsformen

Der Verlauf der MS ist von großer Bedeutung, da er für die Wahl der Therapie und für die Prognose entscheidend ist. 1996 definierte die „United States National Multiple Sclerosis Society“ vier Verlaufsformen der Erkrankung:

1. schubförmig-remittierend (RR-MS): Die häufigste Verlaufsform ist durch in ihrem zeitlichen Auftreten nicht vorhersagbare Schübe gekennzeichnet, die sich vollständig oder nur teilweise zurückbilden können. Dazwischen liegen Perioden ohne Krankheitsprogression, die Monate oder Jahre andauern können. Circa 80 % aller an MS Erkrankten sind von diesem Typ betroffen [Lublin und Reingold 1996].
2. sekundär progressiv (SP-MS): Dieser Typ beginnt zunächst mit einem schubförmig-remittierenden Verlauf, der sekundär in einen chronischen Verlauf ohne Schübe und Rückbildung von Symptomen übergeht [Lublin und Reingold 1996].
3. primär progressiv (PP-MS): Der primär progressive Typ verläuft chronisch

progredient und zeigt keine Remissionen. Ihm gehen keine Schübe voraus. Circa 20 % der Patienten zeigen diesen Verlauf [Lublin und Reingold 1996]. Charakteristisch ist eine Manifestation um das 40. Lebensjahr und somit deutlich später als bei der schubförmig-remittierenden Form [Confavreux et al. 1980].

4. progressiv-schubförmig (PR-MS): Diese Form ist durch eine initial stetige Krankheitsprogression charakterisiert, auf die sich im Verlauf Schübe aufsetzen [Lublin und Reingold 1996].

2013 wurden diese Verläufe durch die Beschreibung zweier weiterer Situationen ergänzt. Das klinisch isolierte Syndrom (CIS) bezeichnet die erste klinische Präsentation einer Erkrankung, die mit einer inflammatorisch-demyelinisierenden Erkrankung wie MS vereinbar ist, jedoch die diagnostischen Kriterien jener zu diesem Zeitpunkt noch nicht erfüllt. Das radiologisch isolierte Syndrom (RIS) bezeichnet hingegen den neuroradiologischen Zufallsbefund einer inflammatorisch-demyelinisierenden Erkrankung ohne klinisches Korrelat [Lublin et al. 2014].

Die klinischen Symptome der Erkrankung entsprechen der Lokalisation des Entzündungsprozesses im ZNS, wobei vor allem die langen Bahnen (z.B. Tractus corticospinalis, lemniskale Bahnen) und die Sehnerven betroffen sind. Typisches Initialsymptom ist häufig eine Verschlechterung des Sehens, die durch eine Retrobulbärneuritis verursacht wird und ein bleibendes Zentralskotom hinterlassen kann. Daneben sind in vielen Fällen das motorische und sensorische System betroffen. Zentrale Paresen verursachen spastische Lähmungen der Extremitäten mit Betonung der proximalen Muskulatur. Rasche Ermüdbarkeit der Motorik und allgemeine Mattigkeit sind charakteristisch für eine MS und werden als „Fatigue“ bezeichnet. Läsionen im vegetativen Nervensystem äußern sich bei Betroffenen in Blasenstörung mit Harnretention oder Dranginkontinenz und seltener in Störungen des Mastdarms. Als Schub ist eine Symptomatik definiert, die länger als 24 Stunden anhält, einen zeitlichen Abstand zu einem vorangehenden Schub von 30 Tagen besitzt und sich nicht durch andere Ursachen wie einen Infekt erklären lässt. Die Klinik kann durch die EDSS-Skala (*Expanded Disability Status Scale*) eingestuft werden. Diese setzt den Schwerpunkt auf das eigenständige Gehen des Patienten [Kurtzke 1983].

1.1.4 Histologie

MS ist histologisch durch fokale entzündliche Läsionen im ZNS mit Demyelinisierung, den Verlust von Axonen sowie reaktive Gliose gekennzeichnet. Zu den Prädilektionsstellen zählen die weiße Substanz periventrikulär, Nervus opticus, Hirnstamm und Rückenmark [Lucchinetti et al. 1998]. Wie das klinische Bild der Erkrankung, so ist auch das Histopathologische ein heterogenes. So können in aktiv entmarkenden MS-Läsionen vier verschiedene Läsionsmuster differenziert werden [Lucchinetti et al. 2000]:

- I. Perivenöse Läsionen mit inflammatorischen Infiltraten, die durch T-Zellen und aktivierte Makrophagen dominiert werden. Es finden sich deutliche Demyelinisierungen bei eher geringem Oligodendrozytenverlust.
- II. Ähnliche Läsionen wie bei Typ I, jedoch finden sich zusätzliche Ablagerung von Immunglobulinen und Komplement an Stellen aktiven Myelinabbaus.
- III. Durch T-Zellen und Makrophagen vermittelte Entzündung. Im Gegensatz zu Typ I und II findet sich erhaltenes Myelin in direkter Umgebung entzündeter Gefäße innerhalb einer demyelinisierten Plaque. Daneben ist dieser Typ durch Apoptose von Oligodendrozyten und Demyelinisierungen gekennzeichnet.
- IV. Es kommt primär zur Oligodendrozytenschädigung mit nachfolgender Demyelinisierung bei fehlender Remyelinisierung.

Diese histologischen Muster deuten möglicherweise auf unterschiedliche pathogenetische Prozesse hin. Sofern die Patienten mehrmals biopsiert worden sind, war der histopathologische Subtyp stabil [Metz et al. 2014]. Andere Autoren unterstützen diese Hypothese der intraindividuellen immunpathologischen Homogenität und der interindividuellen immunpathologischen Heterogenität nicht. So fanden Barnett und Prineas eine intraindividuelle immunpathologische Heterogenität in Abhängigkeit von dem Krankheitsstadium [Barnett und Prineas 2004]. Breij et al. sahen ein homogenes immunpathologisches Bild in Biopsien in aktiv demyelinisierenden Läsionen bei Patienten mit manifester MS und folgerten daraus, dass die in der Frühphase der MS gefundene interindividuelle Heterogenität auf verschiedenen Mechanismen beruht, die alle in einem Mechanismus der Demyelinisierung enden [Breij et al. 2008].

Einen weiteren Hinweis auf die Existenz unterschiedlicher Pathogenesen ergab die durchflusszytometrische Untersuchung des Liquors von MS-Patienten. Hierbei wurden T-Zellen als die größte Subpopulation in allen Proben gefunden. Signifikante Unterschiede zeigten sich hingegen bei B-Zellen und Monozyten, die zu folgender Einteilung führten:

1. B-Zell-dominierender Typ: hohe Anzahl an B-Zellen und Plasmazellen, geringe Anzahl an Monozyten und NKT-Zellen
2. Monozyten-dominierender Typ: hohe Anzahl an Monozyten und NKT-Zellen, jedoch wenig B-Zellen und Plasmazellen vorhanden
3. Mischtyp mit B-Zellen und Monozyten zu gleichen Anteilen

Diese Zellkonstellation, die im Blut der Patienten nicht vorhanden ist, bleibt in allen Phasen der Erkrankung stabil. Eine hohe Anzahl an B-Zellen und geringe Monozyten-Zahlen korrelieren mit einer stärkeren Progression der Erkrankung [Cepok et al. 2001].

1.1.5 Diagnose

2001 erarbeitete ein internationales Gremium neue Kriterien zur Diagnostik der MS, die in den Folgejahren unter dem Namen „McDonald-Kriterien“ vor allem wegen ihrer im Vergleich zu anderen Kriterien höheren Sensitivität und Spezifität Eingang in die Arbeit des Neurologen fanden. Diese basieren auf dem Nachweis der Dissemination von MS-Läsionen in Raum und Zeit durch klinische Befunde, MRT-Diagnostik und weitere paraklinische Untersuchungen wie Liquoruntersuchung und evozierte Potentiale. Eine Revision der Kriterien in den Jahren 2005 und 2010 vereinfachte die Kriterien und sollte eine schnellere und frühere Diagnosestellung bei gleicher Sensitivität und Spezifität ermöglichen [Polman et al. 2005, Polman et al. 2011].

1.1.6 Therapie

Aufgrund einer noch unklaren Ätiologie der autoimmunen Erkrankung werden bei der MS immunsuppressive bzw. immunmodulatorische Medikamente eingesetzt. Die

Therapie der MS gliedert sich in eine akute Schubtherapie, sowie in eine immunmodulatorische/ immunsuppressive Therapie mit dem Ziel, Schübe zu verhindern. Die akute Schubtherapie erfolgt in der Regel mit einer hochdosierten Steroidgabe über drei bis fünf Tage intravenös. Bei schweren Verläufen oder einem Nichtansprechen auf Methylprednisolon erfolgt eine Apheresetherapie in Form einer Plasmapherese oder Immunadsorption [Weinshenker et al. 1999, Koziol et al. 2013].

Therapieentscheidend sind bei der Langzeittherapie die Entzündungsaktivität und die Verlaufsform der Erkrankung. Beim schubförmigen Verlauf bestehen die Therapieziele darin, die Frequenz der Schübe zu verringern und die Progression der Erkrankung hinauszuzögern. Als Basistherapie stehen bei der milden/ moderaten Verlaufsform der schubförmig verlaufenden MS die Substanzen Interferon-beta, Glatirameracetat, Dimethylfumarat und Teriflunomid zur Verfügung. Für die parenteral zu applizierenden Substanzen Interferon-beta und Glatirameracetat scheint kein isolierter Wirkungsmechanismus vorzuliegen. Bis 2014 waren vier Formulierungen des Interferons für die RR-MS zugelassen, die einmal wöchentlich intramuskulär bzw. dreimal wöchentlich subkutan (IFN-beta-1a) oder subkutan alle zwei Tage verabreicht werden (IFN-beta-1b) [Vosoughi und Freedman 2010]. Zuletzt wurde in der EU mit Peginterferon-beta-1a eine neue Formulierung des Interferons zugelassen, die lediglich alle zwei Wochen subkutan appliziert werden muss [Calabresi et al. 2014]. Klinisch relevant ist der Befund, dass nach Applikation von Interferon beta oder Glatirameracetat neutralisierende Antikörper gegen diese Medikamente gebildet werden können. Für Interferon-beta ist nachgewiesen, dass dessen Wirkung durch diese Antikörper reduziert wird [The IFNB Multiple Sclerosis Study Group, the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group 1996]. Im Jahr 2014 wurde in der EU die im Bereich der Dermatologie seit Jahrzehnten eingesetzte Fumarsäure (Dimethylfumarat oder BG-12) als neues orales Medikament zur Schubprophylaxe zugelassen. Zulassungsstudien konnten demonstrieren, dass Dimethylfumarat die Krankheitsaktivität verringern kann. Es verlangsamt zudem die Entwicklung neuer Schübe sowie neuer Hirnläsionen und somit die Krankheitsprogression [Gold et al. 2012]. Bereits im Herbst 2013 wurde in der EU das immunmodulatorisch wirksame orale Medikament Teriflunomid zugelassen, das ebenfalls die Schubrate und Krankheitsprogression zu verringern vermag.

Teriflunomid blockiert die Dihydroorotat-Dehydrogenase, welche ein Schlüsselenzym der De-novo-Pyrimidinsynthese ist [O'Connor et al. 2011].

Für die (hoch-) aktive Verlaufsform stehen die Substanzen Natalizumab, Fingolimod und das zuletzt zugelassene Alemtuzumab zur Verfügung. Natalizumab ist ein monoklonaler, humanisierter Antikörper. Dieser bindet an die α_4 -Kette des $\alpha_4\beta_1$ -Integrins (VLA-4), das auf allen Leukozyten außer Neutrophilen exprimiert wird. Natalizumab verhindert so die Bindung von Leukozyten an das vaskuläre Adhäsionsmolekül VCAM-1 und Fibronektin. In Phase-III-Studien kam es jedoch zu Fällen von progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML) durch JC-Virus-Infektionen. Aufgrund dessen ist Natalizumab in Europa Mittel der zweiten Wahl und nur noch für die Behandlung von hochaktiven, schubförmigen und Interferon-resistenten Verläufen zugelassen [Vosoughi und Freedman 2010]. Natalizumab vermag die Schubrate, die Krankheitsaktivität im MRT sowie die Krankheitsprogression zu verringern [Polman et al. 2006]. 2011 fand in Europa das immunmodulatorische Fingolimod Eingang in die Therapie der MS. Fingolimod bindet in phosphorylierter Form an Sphingosinphosphatrezeptoren, von denen der Sphingosin-1-phosphat-Rezeptor auf der Oberfläche von Lymphozyten exprimiert wird und für deren Emigration aus Lymphknoten notwendig ist. Durch Herunterregulierung dieses Rezeptors bewirkt Fingolimod eine deutliche Reduktion von Lymphozyten im Blut [Matloubian et al. 2004]. In der Therapie ist es als Second-Line-Medikament alternativ zu Natalizumab bei Patienten mit hochaktiver RR-MS, die nicht auf eine Therapie mit Interferon-beta ansprechen, und bei Patienten mit rasch progredientem Verlauf zugelassen. Zuletzt wurde als dritte Behandlungsoption bei (hoch-) aktivem Verlauf der monoklonale immunsuppressive anti-CD52-Antikörper Alemtuzumab in der EU zugelassen, welcher intravenös appliziert wird und zirkulierende B- und T-Zellen im Blut depletiert. Alemtuzumab ist hochwirksam in der Verringerung der Schubrate und Krankheitsprogression, geht jedoch mit einem erhöhten Nebenwirkungsrisiko wie Infektionen, Autoimmunerkrankungen und infusionsbedingten Reaktionen einher [Coles et al. 2012].

Bei der sekundär chronisch progredienten Verlaufsform der MS kommen ebenfalls immunsuppressive bzw. immunmodulatorische Substanzen zum Einsatz. In diese Gruppe ist das Anthracyclin Mitoxantron einzuordnen. Durch DNA-Interkalation, die

zu Crosslinks und Strangbrüchen führt, hat Mitoxantron zu einer immunsuppressiven Wirkung, zum anderen zeigt es durch die Senkung der Sekretion von Interferon- γ , TNF- α und IL-2 aber auch immunmodulatorische Wirkung [Vollmer et al. 2010]. Bei aufgelagerten Schüben kommen weiterhin Interferon-beta-Präparate zum Einsatz.

Der großen Bandbreite an Medikamenten, die für die schubförmige MS zugelassen sind oder sich in Entwicklung befinden, steht derzeit kein einziges wirksames Medikament für die primär progressive Form gegenüber. So zeigt Interferon-beta bei Patienten mit PP-MS keine Wirkung. Auch durch die Gabe von Glatirameracetat in Studien profitierten Patienten mit progressiver Form nicht [Vosoughi und Freedman 2010]. Zuletzt konnte 2014 in einer Phase III Studie kein Unterschied zwischen Fingolimod versus Placebo in der Behandlung der primär progressiven Form gefunden werden [Novartis 01.12.2014; <https://www.novartis.com/news/media-releases/novartis-provides-update-fingolimod-phase-iii-trial-primary-progressive-ms-ppms>]. Positivere Ergebnisse resultierten jedoch aus dem Einsatz bislang nicht in der MS-Therapie verwendeten Substanzen. So konnte durch die tägliche Einnahme von 80 mg Simvastatin das Fortschreiten der cerebralen Atrophie in Patienten mit sekundär chronisch progredienter MS signifikant reduziert werden. Erste Ergebnisse weisen in Korrelation zu diesen kernspintomographischen Befunden auch auf einen klinischen Benefit der Patienten hin [Chataway et al. 2014].

1.2 Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis (EAE) als Tiermodell für MS

Für die sehr komplexe Pathogenese der Multiplen Sklerose ist das Tiermodell der experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis (EAE) das am besten charakterisierte Modell. Das Modell geht auf die Beobachtung zurück, dass Extrakte aus humaner Rückenmark oder aus Schaf-ZNS injiziert in Hasen eine Paralyse der Extremitäten verursachten [Koritschoner und Schweinburg 1925, Stuart und Krikorian 1928]. Später fand man im ZNS von Affen, die mit Extrakten aus Hasen-ZNS immunisiert wurden, die für eine EAE typischen Demyelinisierungen und perivaskulären Infiltrate [Rivers et al. 1933]. Im weiteren Verlauf der Forschung zeigte sich, dass die Pathogenese und klinische Ausprägung der EAE durch den genetischen Hintergrund des immunisierten Tieres und durch das verwendete Peptid variiert, sodass durch

das jeweilige Modell immer nur ein Teilaspekt der MS beleuchtet wird. Die am längsten verwendeten und damit am besten untersuchten Antigene sind die aus dem Myelin stammenden Proteine Myelin-basisches Protein (MBP), Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) und das Proteolipid-Protein (PLP), bei denen die enzephalitogenen Epitope in Abhängigkeit von dem Tierstamm charakterisiert wurden. Diese unterscheiden sich je nach verwendetem Maus- oder Rattenstamm in ihrem immunogenen Potential. So induziert PLP_{139–151} eine schubförmig-remittierende EAE in der SJL-Maus [Tuohy et al. 1989], während PLP_{43–64} in der PL/J-Maus einen chronisch remittierenden Phänotyp prägt [Whitham et al. 1991]. Auch nicht myeline Antigene wie gliale oder neuronale Peptide können als Autoantigene fungieren. Ob auch Lipide, Phospholipide oder Glykolipide autoimmunes Potential besitzen, ist bislang unklar.

Enzephalitogene Peptide werden in komplettem Freund'schem Adjuvanz (CFA – Öl-in-Wasser-Emulsion, die avitales Mykobakterium tuberculosis enthält) emulgiert und dem Tier subkutan appliziert. Pertussistoxin wird den Tieren am Tag 0 und Tag 2 nach Immunisierung zur Boosterung der Immunisierung verabreicht [Bernard und Carnegie 1975]. Alternativ kann eine EAE auch durch die Gabe von myelinspezifischen T-Zellen ausgelöst werden (adoptiver Transfer) [Driscoll et al. 1975].

Histologisch ist eine EAE durch perivaskuläre und subpiale Infiltrate gekennzeichnet, die aus Lymphozyten und Monozyten bestehen und vor allem im Rückenmark und Nervus opticus lokalisiert sind. Flächige, gut demarkierte Demyelinisierungen, wie sie typisch für die MS sind, finden sich vor allem in Ratten EAE Modellen, nicht jedoch in der Peptid immunisierten C57BL6/J Maus. Der Entzündungsprozess wird ausgelöst durch enzephalitogene T-Zellen, die im ZNS restimuliert werden und Monozyten und Granulozyten rekrutieren [Flügel et al. 2001]. Dabei infiltrieren T-Zellen mit T-Helfer-1-Zytokinprofil vorwiegend das Rückenmark und die Nervi optici, während T-Helfer-17-Zellen eine Prädisposition für den Hirnstamm haben [Rothhammer et al. 2011]. Die EAE-Symptome werden nach dem Ausmaß der Extremitätenparesen von 0 (gesund) bis 5 (tot) eingeteilt (siehe Material und Methoden).

1.3 Tiermodelle MOG-spezifischer T- und B-Zellen

Bettelli et al. stellten 2003 eine transgene Maus her, deren T-Zell-Rezeptoren die variablen Domänen Valpha3.2 und Vbeta11 tragen und spezifisch für das MOG-Peptid₃₅₋₅₅ sind. Diese transgenen T-Zellen haben eine unauffällige Entwicklung und unterliegen weder der zentralen Toleranz im Thymus noch einer peripheren Toleranz und haben die Tendenz, einen TH1-Phänotyp auszubilden. Obwohl in diesen Mäusen über 95 % der T-Zellen den transgenen T-Zell-Rezeptor exprimieren, erkranken weniger als 5 % der Tiere spontan an einer EAE. Vielmehr ist dieses Modell durch die spontane Ausbildung einer klinisch und histologisch nachweisbaren Opticusneuritis bei bis zu 50 % der transgenen Tiere ohne weitere Merkmale einer EAE geprägt. Erst die Immunisierung der Mäuse mit CFA und Pertussistoxin oder mit Pertussistoxin allein führt zur Entwicklung einer EAE einschließlich einer Opticusneuritis mit schwererer Ausprägung als bei immunisierten nicht transgenen Kontrolltieren. Die Ursache des Prädispositionsortes in diesem Modell lässt sich möglicherweise auf die höhere Expression des MOG-Proteins im Nervus opticus im Vergleich zum Rückenmark zurückführen [Bettelli et al. 2003].

B-Zell-Rezeptor-transgene Tiere, die einen demyelinisierenden MOG-spezifischen Antikörper im Serum besitzen, wurden von Litzenburger et al. entwickelt. In diesem Mausmodell ersetzten Litzenburger et al. 1998 in embryonalen Stammzellen das J_H-Segment des Immunglobulin-schwere-Ketten-Gens durch ein VDJ-Gensegment, das von MOG-spezifischen, demyelinisierenden Antikörpern stammt. Die endogene leichte Kette blieb unverändert. Diese transgenen B-Zellen durchlaufen eine restriktionslose Entwicklung im Knochenmark und besiedeln dann die lymphatischen Organe. Nach Antigenkontakt kommt es zu einer normalen Differenzierung zu Plasmazellen mit einem Immunglobulin-Klassenwechsel zu IgG₁ und IgG_{2a} sowie somatischer Hypermutation. Dieses führt zu einem hohen Titer an MOG-spezifischen Immunglobulinen im Serum der Mäuse. Doch auch in diesem Modell kommt es aufgrund einer intakten Blut-Hirn-Schranke zu keiner spontanen Erkrankung. Erst die Immunisierung transgener SJL- und C57Bl/6-Mäuse mit PLP bzw. MOG führt zu einer erhöhten Inzidenz und früherem Erkrankungsbeginn einer EAE mit einem schwereren Krankheitsverlauf als bei immunisierten nicht transgenen Kontrolltieren. Im Gegensatz zum Modell der transgenen T-Zellen reicht bei diesem Modell die alleinige Gabe von Pertussistoxin für eine Krankheitsinduktion nicht aus

[Litzenburger et al. 1998].

Die Kombination beider zuvor beschriebener Modelle führte nun zu einem neuen Mausmodell, das erstmals durch eine spontane Erkrankung der Tiere an einer EAE charakterisiert war. In diesem neuen Modell wurden T-Zell-Rezeptor-transgene Mäuse mit B-Zell-Rezeptor-transgenen Mäusen gekreuzt, die dann sowohl heterozygot für den MOG-spezifischen transgenen T-Zellrezeptor als auch heterozygot für transgene MOG-spezifische B-Zellen waren. Es konnte in diesem Modell gezeigt werden, dass die Anwesenheit von MOG-spezifischen T-Zellen zu einer erhöhten Produktion von MOG-spezifischen IgG₁-Antikörper durch die transgenen B-Zellen führt und jene B-Zellen wiederum die Aktivierung und Proliferation der MOG-spezifischen T-Zellen verstärkt. MOG-spezifische Antikörper allein scheinen in diesem Modell nicht für die Initiierung einer Erkrankung verantwortlich zu sein, wurde doch im Serum gesunder und kranker doppeltransgener Tiere kein Unterschied in der Titerhöhe MOG-spezifischer Antikörper gefunden. Entsprechende Tiere erkrankten im Alter von durchschnittlich vier bis sechs Wochen mit einer Inzidenz von circa 30 – 60 %. Die Klinik der Tiere zeichnet sich durch eine höhere Inzidenz, einem früherem und fulminantem Beginn mit schwererem Krankheitsverlauf (mittlerer klinischer Score von 3) sowie einer höheren Mortalität im Vergleich zu Tieren aus, die nur transgene T-Zellen besitzen. Das Geschlecht zeigt dabei keinen Einfluss auf die Erkrankung. Histologisch finden sich bei allen erkrankten doppeltransgenen Tieren eine vermehrte Anzahl inflammatorischer Herde im Rückenmark und Nervus opticus. Nur in sehr wenigen Fällen lassen sich Läsionen auch im Cerebrum nachweisen. Die Läsionen, welche sich in den Leptomeningen und im Parenchym finden, zeichnen sich durch eine Infiltration von T-Zellen und Makrophagen/ Mikrogia aus. Im spinalen Subarachnoidalraum lassen sich bei erkrankten doppeltransgenen Tieren follikelartige Aggregationen von B-Zellen erkennen [Bettelli et al. 2006, Krishnamoorthy et al. 2006].

1.4 Chemokine und ihre Rezeptoren

Chemokine gehören zur Familie der Cytokine. Sie wirken bei einer Infektion als Botenstoffe chemotaktisch auf Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems, was eine gerichtete Wanderung zum Ort der Schädigung bewirkt.

Alle Chemokine besitzen ähnliche Primärstrukturen. Sie werden in vier Klassen eingeteilt, die sich in der Konfiguration ihrer Cysteinreste am Amino-Terminus unterscheiden. Chemokinrezeptoren sind G-Protein gekoppelte 7-Transmembran-Rezeptoren, die nach der Klasse ihrer Chemokine benannt werden. CC-Chemokine besitzen in ihrer Primärstruktur zwei benachbarte Cysteine und binden an CC-Chemokin-Rezeptoren. Bislang sind neun Rezeptoren aus dieser Gruppe bekannt. Durch diese Chemokingruppe werden besonders Monozyten angelockt. CXC-Chemokine weisen eine Aminosäuresequenz auf, in der zwei Cysteine durch eine Aminosäure getrennt sind. Sechs entsprechende CXC-Rezeptoren sind aus dieser Gruppe derzeit bekannt. CXC-Chemokine locken vor allem neutrophile Granulozyten an den Ort der Entzündung [Baggiolini et al. 1994]. Diesen beiden Gruppen lassen sich strukturell zwei Chemokine nicht zuordnen: Zum einen das ursprünglich als Lymphotactin bezeichnete C-Chemokin, das anders als Chemokine der drei anderen Klassen, die zwei Disulfidbrücken mit vier Cysteinreste aufweisen, nur eine Disulfidbrücke mit zwei Cysteinresten am Amino-Terminus besitzt. Es bindet an den XC1-Rezeptor [Kelner et al. 1994]. Dieser wird nur auf CD8⁺-dendritischen Zellen exprimiert, wodurch Lymphotactin chemoattraktiv auf diese Zellen wirkt [Dorner et al. 2009]. Zum anderen das als Fraktalkin bezeichnete Chemokin, welches sich dadurch auszeichnet, dass es zwischen zwei Cysteinen drei Aminosäuren trägt und somit formal ein CX₃C-Chemokin ist. Es existiert in membrangebundener und in löslicher Form und unterscheidet sich dadurch von allen anderen Chemokinen, die fast ausschließlich sezerniert werden [Bazan et al. 1997].

1.4.1 CX₃CL1 und sein Rezeptor CX₃CR1

Das Chemokin CX₃CL1 (Fraktalkin), der einzige Vertreter der CX₃C-Klasse, ist beim Menschen auf dem Chromosom 16q codiert. Das Gen codiert am N-terminalen Ende ein 24 Aminosäuren langes Signalpeptid, gefolgt von einer 76 Aminosäuren langen Sequenz, die das CXXXC-Motiv enthält. Im Gegensatz zu allen anderen bekannten Chemokinen, deren Gene an dieser Stelle enden, schließen sich bei Fraktalkin an dieses Stück weitere Aminosäuresequenzen an, die einen Mukopolysaccharidprotein ähnlichen Stiel (241 Aminosäuren), eine hydrophobe transmembrane Domäne (18 Aminosäuren) und abschließend eine intrazelluläre Domäne (37 Aminosäuren) codieren. Neben dieser membrangebunden Form konnte auch eine lösliche Form des Chemokinliganden identifiziert werden. Erstere konnte in humanen

Endothelzellen nachgewiesen werden, die durch inflammatorische Cytokine wie TNF- α oder IL-1 aktiviert wurden. In-vitro-Experimente zeigten, dass die membrangebundene Form auf Endothelzellen von Monozyten und T-Zellen zur Endotheladhäsion genutzt wird, während die lösliche Form eine Chemotaxis dieser Zellen bewirkt [Bazan et al. 1997]. Im ZNS wurde CX₃CL1 zunächst in Mäusen gefunden, in denen eine EAE ausgelöst wurde oder die mit Lipopolysacchariden stimuliert wurden. Hier zeigte sich eine erhöhte Proteinexpression vor allem in aktivierter Mikroglia und Kapillaren [Pan et al. 1997]. Daneben ist eine hohe CX₃CL1-mRNA-Expression vor allem in Neuronen nachzuweisen, die den Liganden konstitutiv und unabhängig von einer durch eine EAE vermittelten Entzündung exprimieren. Im Fall einer Entzündung kommt es zu keiner erhöhten Expression des Liganden [Schwaebler et al. 1998]. Auch in Astrozyten lässt sich Fraktalkin nachweisen. Dessen mRNA-Expression lässt sich im Gegensatz zu Neuronen in Astrozyten durch TNF- α und IL-1 β erhöhen. Fraktalkin bewirkt in diesen die Expression eines bislang nicht identifizierten Faktors, der eine mikrogliale Zellproliferation bewirkt [Maciejewski-Lenoir et al. 1999].

CX₃CR1 – bei der Erstbeschreibung zunächst noch V28 genannt [Raport et al. 1995] – ist auf dem humanen Chromosom 3 codiert und der einzige derzeit bekannte Rezeptor, der Fraktalkin in membrangebundener und in löslicher Form spezifisch bindet. Hierbei handelt es sich um einen hochaffinen 7-Transmembran-Domänen-Rezeptor, der G-Protein-gekoppelt ist. Dieser vermittelt sowohl die Adhäsion als auch Migration von Leukozyten durch Fraktalkin [Imai et al. 1997]. In der Maus wurde eine hohe Rezeptorexpression im ZNS und weniger stark auch in Lunge, Leber sowie im Blut auf Leukozyten gefunden [Combadiere et al. 1998]. Innerhalb des ZNS wird der Rezeptor vor allem auf Mikroglia, aber auch Neuronen exprimiert [Harrison et al. 1998, Meucci et al. 2000]. Andere Autoren konnten CX₃CR1-mRNA nur in Mikroglia und teilweise auch in Astrozyten nachweisen [Nishiyori et al. 1998, Maciejewski-Lenoir et al. 1999]. Im menschlichen Blut ist dieser Rezeptor vor allem auf CD16⁺-NK-Zellen und weniger stark auch auf CD3⁺-T-Zellen, CD14⁺-Monozyten und Granulozyten nachweisbar [Imai et al. 1997]. Bei murinen Monozyten lassen sich zwei Subtypen unterscheiden: CX₃CR1^{low}CCR2⁺Gr1⁺-Monozyten, die in entzündetes Gewebe rekrutiert werden, und CX₃CR1^{high}CCR2⁻Gr1⁻-Monozyten, die vor allem in nicht entzündetes Gewebe wandern. Beide Subtypen können sich in vivo zu

dendritischen Zellen entwickeln [Geissmann et al. 2003]. Aufgrund der unterschiedlichen CX₃CR1-Expression von Monozyten-Subtypen ist es wahrscheinlich, dass periphere Immunreaktionen wie die Monozytenextravasation in einem Peritonitismodell oder die Migration und Differenzierung dendritischer Zellen als Antwort auf mikrobielle Antigene von einer CX₃CR1-Defizienz unberührt bleiben [Jung et al. 2000].

Im ZNS wird eine Schlüsselrolle von CX₃CR1 und seinem Liganden in der Interaktion von Mikroglia mit Neuronen gesehen [Harrison et al. 1998]. So besteht die Vermutung, dass dieses Chemokin eine Hemmung der Mikroglia in ihrer Aktivität bewirkt und eine Defizienz zu mikroglialen neurotoxischen Effekten führt. Cardona et al. 2006 wiesen in Tiermodellen neurodegenerativer Erkrankungen eine erhöhte mikrogliale Neurotoxizität und neuronalen Schaden bei CX₃CR1-Defizienz nach. In vitro reduziert Fraktalkin die Produktion inflammatorischer Moleküle durch aktivierte Mikroglia, verhindert neuronalen Zellschaden durch LPS aktivierte Mikroglia [Mizuno et al. 2003] und eine FAS-vermittelte mikrogliale Apoptose [Boehme et al. 2000]. Diese Ergebnisse deuten auf eine neuroprotektive Funktion des Chemokin-Signalweges innerhalb des ZNS hin.

1.4.2 CX₃CR1 und seine Bedeutung für die EAE

Für den Chemokinrezeptor CCR2 und seinen Liganden CCL-2/ MCP-1 konnte im Mausmodell EAE bereits gezeigt werden, dass der Rezeptor für eine Monozytenmigration in das ZNS notwendig ist und eine Defizienz des Rezeptors eine EAE zu verhindern vermag [Izikson et al. 2000]. Andere Autoren führten diese von Izikson gefundene Resistenz jedoch auf die Verwendung älterer, für eine EAE weniger susceptible Tiere und auf die Methode der EAE-Induktion zurück. Vielmehr fanden sie in ihren Versuchen mit CCR2-Knockout-Tieren eine Kompensation der fehlenden Monozytenmigration durch die Einwanderung von Neutrophilen resultierend in einer EAE [Gaupp et al. 2003]. Aufgrund der beschriebenen Funktionen des Chemokinrezeptors CX₃CR1 in der Adhäsion und Migration von Monozyten und Lymphozyten sowie der postulierten neuroprotektiven Wirkung durch die Interaktion von Neuronen und Mikroglia untersuchten einige Studien dessen Rolle in einer EAE. Im Gegensatz zu CCR2 entwickeln CX₃CR1-Knockout-Mäuse eine schwerer verlaufende EAE und haben eine erhöhte Mortalität. Die Rekrutierung

von Monozyten aus dem Blut ist durch diese Chemokinrezeptordefizienz unbeeinträchtigt. Überraschenderweise ist nur die Einwanderung von CX₃CR1-positiven NK-Zellen in das ZNS während einer EAE gestört [Huang et al. 2006]. Im naiven und EAE entzündeten ZNS zeigt sich die Mikroglia als CD45^{int}CD11b^{int}CX₃CR1^{high}CCR2⁻ exprimierend. Ähnlich wie bereits von Geissmann et al. 2003 im Blut beschrieben, lassen sich während einer EAE im ZNS bei den Monozyten/ Makrophagen zwischen den Subtypen Ly6C^{high}CCR2^{high}CX₃CR1^{low} und Ly6C^{low}CCR2^{low}CX₃CR1^{high} unterscheiden, wobei erstere während einer EAE in das ZNS rekrutiert werden [Saederup et al. 2010]. Die Expression von CX₃CL1 mRNA verändert sich mit Ausnahme einer erhöhten Expression in Astrozyten im Rahmen einer EAE nicht. Der Rezeptor lässt sich während einer Inflammation durch EAE in mehreren Zellen innerhalb der entzündlichen Läsionen nachweisen, die zum größten Teil der Mikroglia-Makrophagen-Reihe angehören [Sunnemark et al. 2005]. Garcia et al. 2013 bestätigten vorherige Studien, wonach eine EAE in CX₃CR1-defizienten Mäusen einen schwereren Verlauf nimmt. Sie beobachteten auch in chimären Mäusen mit CX₃CR1-defizientem Knochenmark einen schwereren Krankheitsverlauf. Dies führten sie auf CD115⁺Ly6C^{low}CD11c⁺ exprimierende dendritische Zellen zurück, die in Abwesenheit von CX₃CR1 in das entzündete ZNS einwandern. Diese weisen eine erhöhte Antigenpräsentation auf und führen zu vermehrter T-Zell-Aktivierung. Dabei finden sich im entzündeten ZNS vor allem IL-17 produzierende Zellen [Garcia et al. 2013]. Zusammenfassend kommt nach bisheriger Studienlage vor allem dem Chemokinrezeptor CCR2 die Funktion zu, im Rahmen einer EAE inflammatorische Monozyten in das ZNS zu rekrutieren. Ob auch CX₃CR1 eine Rolle in der Monozytenmigration in das ZNS besitzt, ist unklar. Zentral wird seine Aufgabe - wie in anderen Tiermodellen für ZNS-Erkrankungen gezeigt - in einer durch Neuron-Mikroglia-Interaktion vermittelten neuroprotektiven Funktion gesehen.

1.4.3 Funktionen von CX₃CR1 außerhalb des ZNS

Außerhalb des Zentralnervensystems konnte der Rezeptor auf mehreren Zellen des Blutes nachgewiesen werden. Daneben fand man CX₃CR1 auch auf dendritischen Zellen der intestinalen Mucosa, wo sie chemokinrezeptorabhängig Antigene aus dem Lumen aufnehmen und enteroinvasive Pathogene abwehren [Niess et al. 2005]. CX₃CR1 konnte intestinal auch auf Makrophagen nachgewiesen werden. Im Tiermodell für eine Kolitis verläuft diese in CX₃CR1-Knockout-Mäusen schwerer als

bei Kontrolltieren. Eine pathogene Schlüsselfunktion kommt dabei IL-17a-produzierenden CD4⁺-T-Zellen zu [Medina-Contreras et al. 2011]. Diese Daten weisen auf eine Rolle von CX₃CR1 in der peripheren Antigenpräsentation und immunologischen Toleranz hin.

Auch für andere Erkrankungen werden Effekte von CX₃CR1 und seinem Liganden beschrieben. Bei CX₃CR1-defizienten Tieren kommt es zu einer gestörten Funktion der Betazellen des Pankreas, die zu einer pathologischen Glukosetoleranz führt [Lee et al. 2013]. In einem Tiermodell für allergisches Asthma bewirkt eine Rezeptordefizienz eine geringere Entzündung der Lunge. Dabei ist CX₃CR1 für das Überleben und die Migration der pathogenen TH2-Zellen verantwortlich [Mionnet et al. 2010]. Diese antiapoptotische Wirkung wurde für weitere Zellen und Situationen beschrieben. So bewirkt CX₃CR1 eine normale Entwicklung myeloischer Vorläufer zu dendritischen Zellen und Makrophagen im Knochenmark [Łyszkiewicz et al. 2011]. Im Tiermodell für eine Leberfibrose ist CX₃CR1 ein Überlebenssignal für hepatische Makrophagen, die im Fall einer Chemokinrezeptordefizienz einem vermehrten Zelltod unterliegen und dadurch eine Entzündung unterhalten [Karlmark et al. 2010].

1.4.4 CX₃CR1-Polymorphismen im Menschen

In der für die Transmembrandomäne kodierenden Sequenz des Fraktalkinrezeptors wurden mehrere Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) gefunden. Dabei handelt es sich unter anderem um einen Austausch von Valin durch Isoleucin (V249I) und von Threonin durch Methionin (T280M) [Faure et al. 2000]. Die Haplotypen I249/M280 und I249/T280 kommen mit einer Frequenz von circa 16 % und 12,5 % nach dem Haplotyp V249/T280, der als die Wildtyp-Form betrachtet wird, gehäuft in der kaukasischen Bevölkerung vor [Liu et al. 2003]. Eine Assoziation mit entzündlichen Erkrankungen wie Morbus Crohn oder Koronararterienerkrankungen konnte bereits nachgewiesen werden [Sabate et al. 2008, Moatti et al. 2001]. Erste Studien mit MS-Patienten weisen auf einen Effekt dieser Rezeptor-Polymorphismen auf die Verlaufsform der Erkrankung hin [Arli et al. 2013, Stojković et al. 2012].

1.5 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Eine wesentliche Rolle des Chemokinrezeptors CX₃CR1 und seines Liganden

Fraktalkin wird in der Adhäsion und Migration myeloider Zellen sowie in der Interaktion von Neuronen mit Mikroglia gesehen. Aufgrund seiner postulierten Funktion und Expression auf Monozyten erscheint CX₃CR1 als ein potentieller Kandidat, die Monozytenmigration in das ZNS zu beeinflussen. Die vorliegende Arbeit untersucht die Bedeutung des CX₃CR1 Rezeptors für die Entstehung, den Erkrankungsverlauf und die Läsionspathologie in einem spontanen EAE-Modell.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

CX₃CR₁^{GFP/GFP}-Mäuse (Jung et al. 2000) wurden über den kommerziellen Anbieter „The Jackson Laboratory“ (Bar Harbor, Maine, USA) bezogen. In diesen Mäusen ist ein Teil des zweiten Exons des Gens für CX₃CR1 durch ein Reportergen für ein grün fluoreszierendes Protein (*enhanced GFP*) ersetzt worden. Dieser Teil codiert den N-Terminus des Sieben-Transmembran-Rezeptors, der für die Interaktion mit Fraktalkin verantwortlich ist [Jung et al. 2000]. Heterozygote CX₃CR₁^{+/-GFP}-Mäuse besitzen eine normale Rezeptorfunktion. CX₃CR₁^{GFP/GFP}-Tiere wurden mit MOG-T-Zell-Rezeptor-transgenen 2D2 Tieren (Bettelli et al. 2003) und mit IgH^{Mog}-Th-Tieren (Litzenburger et al. 1998) verpaart. Th-Tiere haben die Immunglobulin-schwere Kette des demyelinisierenden Antikörper 8-18C5 als knockin. Daraus entstanden 2D2 CX₃CR₁^{GFP/GFP}- und Th/Th CX₃CR₁^{GFP/GFP} Mäuse, die miteinander gekreuzt wurden, um spontan erkrankende T- und B-Zell-Rezeptor transgene OSE-Mäuse (Referenz Krishnamoorthy et al. 2006 und Bettelli et al. 2006) zu erhalten, die CX₃CR1 defizient waren.

Die gesamte Zucht sowie die Durchführung der Experimente wurden in S1-Räumen der Zentralen Tiereinrichtung unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF) durchgeführt. Die Experimentaltiere wurden in konventionellen Käfigen gehalten und erhielten Wasser und Pressfutter ad libitum, das bei sich verschlechternder Klinik der Experimentaltiere durch leicht zu erreichendes Breifutter ersetzt wurde.

2.2 Klinische Einteilung der EAE

Die Experimentaltiere wurden über einen Zeitraum von 100 Tagen nach Geburt alle zwei Tage und bei Erkrankung täglich aufgesucht. Spontan erkrankte Tiere wurden anhand der unten aufgeführten klinischen Skala entsprechend dem Ausmaß der aufgetretenen Lähmungen beurteilt. Die Tiere wurden für 5 (*peak of disease*) und 30 Tage (chronisches Erkrankungsstadium) verlaufsbeobachtet und anschließend zur histologischen Beurteilung perfundiert. Als Abbruchkriterien waren ein klinischer Score $\geq 3,5$ und eine Gewichtsabnahme von $\geq 25\%$ definiert, bei welchen die Tiere schmerzlos getötet wurden.

Score	Klinik
0	gesund
0,5	Schwanzspitze paretisch
1	gesamter Schwanz paretisch
1,5	Schwanzlähmung und milde Hinterbeinschwäche
2	deutliche Hinterbeinschwäche
2,5	Tier kann sich aus der Seitenlage nicht mehr aufrichten
3	deutliche Paresen der Hinterbeine und Bauchmuskelschwäche
3,5	Paraplegie der Hinterbeine und Vorderbeinschwäche
4	Tetraplegie
4,5	Inkontinenz
5	Tod durch EAE

Tabelle 1: Klinische Beurteilung der Versuchstiere

2.3 Genotypisierung

Der Genotyp der verwendeten Mäuse wurde aus isolierter DNA durch eine konventionelle Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) bestimmt. Zur DNA-Gewinnung wurden die Tiere im Alter von zwei bis drei Wochen an der Ohrmuschel oder der Schwanzspitze biopsiert. Zur Auflösung des Gewebes folgte nun eine Inkubation der Biopsate mit 20 µl Proteinase K in 350 µl Lyse-Puffer über Nacht bei 56 °C. Nach Zentrifugation der Proben bei 13200 rpm (revolutions per minute) für fünf Minuten wurde dem gewonnenen Überstand 350 µl Isopropanol zugegeben, in dem die DNA präzipitierte und durch weitere Zentrifugation für fünf Minuten am Boden ein Pellet bildete. Der Überstand wurde verworfen. Zur weiteren Aufreinigung wurden dem Pellet dann 500 µl Ethanol (70 %) zugegeben und erneut zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet zur vollständigen Entfernung des Alkohols für 20 Minuten bei 45 °C getrocknet. Zum Abschluss der DNA-Isolation erfolgte eine Resuspension der DNA in 100 µl H₂O.

Im nächsten Schritt wurde für alle Proben ein dem Gen entsprechender Master-Mix

angesetzt. Die Zusammensetzung jenes Master-Mix ist unten angeführter Tabelle zu entnehmen. Nach Aufteilung des Master-Mix auf die Proben erfolgte eine Amplifikation im Thermocycler T3 der Firma Biometra nach unten angeführtem Schema. Die amplifizierten DNA-Proben wurden dann auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen, welches ein in die DNA interkalierendes Ethidiumbromid enthielt. Es wurde eine Spannung von 90 Volt bei einer Stromstärke von 400 mA für 60 Minuten angelegt. In diesem elektrischen Feld wanderten die amplifizierten DNA-Stränge aufgrund ihrer negativen Eigenladung und entsprechend ihrer Basenpaargröße in unterschiedlicher Geschwindigkeit in Richtung der Anode. Durch Vergleich der Höhe der Banden mit einer in ihrer Basenpaaranzahl bekannten Leiter konnten die Banden unter UV-Licht hinsichtlich ihrer Basenpaargröße näherungsweise bestimmt werden.

Bezeichnung	Volumen	Hersteller
5x Puffer	2,50 µl	Promega ¹
10 mM dNTPs	2,50 µl	Fermentas ²
50 µM Forward-Primer	0,50 µl	MPI Göttingen ³
50 µM Reverse-Primer Knockout	0,50 µl	MPI Göttingen
50 µM Reverse-Primer Wildtyp	0,50 µl	MPI Göttingen
5 U /µl Taq Polymerase	0,10 µl	Promega
DMSO	1,25 µl	ICN Biomedicals ⁴
H ₂ O	15,15 µl	
DNA	2,00 µl	

Tabelle 2: PCR-Mastermix zur CX₃CR1-Genotypisierung

1. Promega, Madison, USA

2. Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

3. Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen, Deutschland

4. ICN Biomedicals, Aurora, USA

Konstrukt	Primer		Größe	Nukleotid-Sequenz	
	Richtung	Nummer	[bp]		
CX ₃ CR1	Antisense	5929	407 bp = WT	5'CAGTGATGCTCTTG GGCTTCC3'	Reverse- primer für CX ₃ CR1-WT
CX ₃ CR1	Antisense	5928	825 bp = KI	5'GTAGTGGTTGTCTGG GCAGCAG3'	Reverse- primer für CX ₃ CR1-KI
CX ₃ CR1	Sense	5927		5'TCAGTGTTTTCTCC CGCTTGC3'	Forward primer

Tabelle 3: CX₃CR1-Primersequenzen

Bezeichnung	Volumen	Hersteller
5x Puffer	4,00 µl	Promega
10 mM dNTPs	0,40 µl	Fermentas
10 µM Forward-Primer	0,50 µl	Microsynth ¹
10 µM Reverse-Primer	0,50 µl	Microsynth
5 U /µl Taq Polymerase	0,10 µl	Promega
H ₂ O	9,50 µl	
DNA	5,00 µl	

Tabelle 4: PCR-Mastermix zur 2D2-Genotypisierung

1. Microsynth, Balgach, Schweiz

Name	Gen	Größe [bp]	Nukleotid-Sequenz
		675	
Va3.2-2D2-M	Valpha 3.2 TCR		5'CCCGGGCAAGGCTCAGCCAT GCTCCTG3'
Ja18-2D2-M	Valpha 3.2 TCR		5'GCGGCCGCAATTCCCAGAGA CATCCCTCC3'

Tabelle 5: 2D2-Primersequenzen

Bezeichnung	Volumen	Hersteller
5x Puffer	4,00 µl	Promega
10 mM dNTPs	0,40 µl	Fermentas
10 µM Forward-Primer wt	0,50 µl	Microsynth
10 µM Reverse-Primer wt	0,50 µl	Microsynth
10 µM Forward-Primer tg	0,50 µl	Microsynth
10 µM Reverse-Primer tg	0,50 µl	Microsynth
5 U /µl Taq Polymerase	0,10 µl	Promega
H ₂ O	8,50 µl	
DNA	5,00 µl	

Tabelle 6: PCR-Mastermix zur MOG-IgG-Genotypisierung

Name	Gen	Nukleotid-Sequenz
8.18C5-sense #1	anti-MOG IgH (8.18C5)	5'TGAGGACTCTGCCGTCTATTA CTGT3'
8.18C5-AS #2	anti-MOG IgH (8.18C5)	5'GGAGACTGTGAGAGTGGTGCCT3'
mlgH-sense #1	Ig heavy chain	5'ATTGGTCCCTGACTCAAGAGA TG3'
mlgH-AS #2	Ig heavy chain	5'TGGTGCTCCGCTTAGTCAAA3'

Tabelle 7: MOG-IgG-Primersequenzen

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (Minuten)	Bemerkung
1.	94	3	
2.	94	0,5	
3.	60	0,5	
4.	72	1	nach 4. zurück zu 2. 40x
5.	72	10	
6.	10	unendlich	

Tabelle 8: Thermocyclerprogramm der CX₃CR1-PCR

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (Minuten)	Bemerkung
1.	95	2	
2.	95	1	
3.	58	1	
4.	72	1	nach 4. zurück zu 2. 30x
5.	72	10	
6.	14	unendlich	

Tabelle 9: Thermocyclerprogramm der 2D2-PCR

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (Minuten)	Bemerkung
1.	95	2	
2.	95	1	
3.	61	1	
4.	72	1	nach 4. zurück zu 2. 30x
5.	72	10	
6.	14	unendlich	

Tabelle 10: Thermocyclerprogramm der MOG-IgG-PCR

2.3.1 Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Starlab ¹
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich ²
Lyse-Puffer	
100 mM TrisHCl, pH 8,5	Carl Roth ³
5 mM EDTA	Life Technologies ⁴
200 mM NaCl	Merck ⁵
0,2 % SDS	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Roche ⁶

Tabelle 11: Verwendete Materialien zur Genotypisierung

1. Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
2. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
3. Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
4. Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
5. Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
6. Roche GmbH, Mannheim, Deutschland

2.4 Quantitative PCR aus Gewebe

Die Tiere erhielten zunächst eine letale Überdosis von 300 µl 14 % Chloralhydrat intraperitoneal. Nach Einsetzen der Schnappatmung und Ausfall des Kornealreflexes sowie fehlender Reaktion auf Schmerzreize erfolgte die Eröffnung des Thorax. Das Herz wurde freipräpariert und eine Eröffnung des Blutkreislaufes durch Inzision des rechten Herzohres vorgenommen. Durch Punktion erfolgte nun eine langsame Infusion von 20 ml eiskaltem PBS in den linken Ventrikel. Nach Applikation des PBS wurde die Haut des Tieres über dem Rücken und dem Kopf abpräpariert, die Wirbelsäule kranial des Beckens durchtrennt und bis zum Cranium vom umgebenden Gewebe frei präpariert. Nun wurde die Wirbelsäule kaudal vom Cranium mit einer Rasierklinge abgetrennt. Es folgte die schnelle Eröffnung des gesamten Rückenmarkkanals mit einer feinen Schere und die Entnahme des Rückenmarks. Anschließend wurde zur Freilegung des Gehirns die Schädeldeckel jeweils seitlich inzidiert und mit einer Pinzette abgehebelt. Nun konnte das Gehirn entnommen werden. Sowohl Gehirn als auch Rückenmark wurden nach Entnahme sofort getrennt in eisgekühltes PBS gegeben.

Zur Lyse der Zellen wurden Gehirn und Rückenmark zunächst mit einer Pipettenspitze mechanisch zerkleinert. Dem Homogenisat wurde dann 900 µl Qiazol-Lyse-Reagenz zugegeben und gut vermischt. Die anschließende Zugabe von 180 µl Chloroform diente der Phasentrennung. Nach Zentrifugation bei 13200 rpm für 15 Minuten erhielt man eine obere wässrige Phase, die nun die RNA enthielt. Diese wurde nach vorsichtiger Abpipettierung mit einem 1,5 fachen Anteil an 96 % Ethanol präzipitiert. Zur Fixierung der RNA auf einer Membran folgte die Beladung einer Quiagen-Säule mit präzipitierter RNA durch Zentrifugation bei 13200 rpm für 15 Sekunden. Es folgten drei Waschschrte mit 700 µl RW1- und zweimalig mit jeweils 500 µl RPE-Puffer und anschließender Zentrifugation mit 13200 rpm für 15 Sekunden. Zur vollständigen Trocknung wurde für zwei Minuten bei 13200 rpm erneut zentrifugiert. Zur Elution der RNA erfolgte die Zugabe von 35 µl RNase-freiem

Wasser, welches die RNA während einer kurzen Inkubation und einmütigen Zentrifugation bei 13200 rpm aus der Membran löste.

Die folgenden Schritte dienten der Umschreibung der gewonnenen RNA in einzelsträngige cDNA. Zunächst erfolgte eine photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration jeder einzelnen Probe. Für jede Probe wurde eine Umschreibung von 200 ng RNA angestrebt und entsprechend in die folgende Reverse-Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion) eingesetzt. Der entsprechende Master-Mix für diese Reaktion setzte sich nach unten angeführtem Schema zusammen.

Bezeichnung	Volumen	Hersteller
10x RT Puffer	2,00 µl	Applied Biosystems ¹
100 mM dNTPs	0,80 µl	Applied Biosystems
10x RT Random Primer	2,00 µl	Applied Biosystems
50 U /µl Multiscribe RT-Enzym	1,00 µl	Applied Biosystems
RNAse freies H ₂ O	4,20 µl	Qiagen ²
RNA	Entsprechend der RNA-Konzentration der jeweiligen Probe mit dem Ziel, 200 ng RNA in die Reaktion einzusetzen	

Tabelle 12: RT-Mastermix zur Umschreibung von RNA in cDNA

1. Applied Biosystems, Foster City, USA

2. Qiagen, Hilden, Deutschland

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (Minuten)	Bemerkung
1.	16	30	
2.	42	30	
3.	85	5	
4.	4	Unendlich	

Tabelle 13: Thermocyclerprogramm für RT-Reaktion

Die RT-Reaktion erfolgte im Thermocycler T3 der Firma Biometra gemäß oben angeführtem Standardprotokoll. Nach erfolgreicher Umschreibung in cDNA stellte die

quantitative PCR (qPCR) den nächsten Schritt dar. Für die qPCR kam die Methode der „Taqman-Sonde“ zur Anwendung. Diese bietet die Möglichkeit, ein gewünschtes DNA-Produkt während einer PCR nachzuweisen und zu quantifizieren. Bei Taqman-Sonden handelt es sich um Oligonukleotide, die zwischen den Primern der jeweiligen cDNA-Sequenz binden. Diese Sonden sind mit einem Fluorchrom als Reporter und einem Quencher gekoppelt, der im intakten Zustand die Fluoreszenz des Fluorchroms unterdrückt. Die in diesem Verfahren eingesetzte Taq-Polymerase besitzt eine zusätzliche Exonuklease-Aktivität, welche zur Folge hat, dass bei Synthese des komplementären Stranges der Zielsequenz die Sonde abgebaut wird. Dadurch kommt es zur Trennung von Quencher und Fluorchrom, dessen frei werdende Fluoreszenz am Ende eines Zyklus gemessen werden kann. In der frühen Phase der PCR-Reaktion ist zunächst die geringe Menge an cDNA der limitierende Faktor. Mit der weiteren Amplifikation der DNA-Fragmente kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung. Diese nimmt zu einem späteren Zeitpunkt der Reaktion durch Mangel an Reagenzien, Inaktivierung der Polymerase durch andauernde Hitzeeinwirkung oder Hemmung der Reaktion durch sich anhäufende Produkte nur noch einen linearen Verlauf und kommt schließlich zum Stehen. Für die Quantifizierung ist der Ct-Wert maßgebend. Dieser gibt die Zyklusanzahl an, bei der die Fluoreszenz erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt.

Für die quantitative PCR wurde zunächst ein Mastermix nach unten genanntem Schema angesetzt und anschließend auf die Proben verteilt. Nach kurzer Zentrifugation erfolgte die PCR-Reaktion im Thermocycler iQ5 der Firma Bio-Rad gemäß unten angeführtem Standardprotokoll.

Bezeichnung	Volumen	Hersteller
10x Puffer	2,50 µl	Eurogentec ¹
50 mM MgCl ₂	2,50 µl	Eurogentec
5 mM dNTP	1,00 µl	Eurogentec
5 U /µl TaqPolymerase	0,10 µl	Eurogentec
1 U /µl Uracil N-Glycosylase	0,20 µl	Eurogentec
20x Primer	1,00 µl	Applied Biosystems

RNase-freies H ₂ O	8,50 µl	Qiagen
RNA	5,00 µl	

Tabelle 14: Mastermix zur quantitativen PCR

1. Eurogentec, Seraing, Belgien

Cycle	Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (Minuten)	Bemerkung
1.	1	50	2	
2.	1	95	10	
3.	1	95	0,25	
	2	60	1	Wiederholung 3.Cycle 40x

Tabelle 15: Thermocyclerprogramm für eine qPCR

2.4.1 Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Chloralhydrat 14 %	Merck
Ethanol 70 %	Merck
PBS DULBECCO	Biochrom ¹
Qiazol-Lyse-Reagenz	Qiagen
RPE-Puffer	Qiagen
RW1-Puffer	Qiagen
RNeasy Mini Spin Column	Qiagen
Wasser, RNase-frei	Qiagen

Tabelle 16: Verwendete Materialien zur qPCR aus Gewebe

1. Biochrom AG, Berlin, Deutschland

2.5 Perfusion und Präparation der Versuchstiere

Zur histologischen Auswertung der Versuche erfolgte die Entnahme von Gehirn und Rückenmark der Mäuse. Zur Beurteilung des akuten Stadiums wurden Tiere am Höhepunkt ihrer Erkrankung verwendet, der durchschnittlich am fünften Tag nach

Erkrankungsbeginn erreicht wurde. Für die histologische Auswertung des chronischen Stadiums wurden Tiere zum Zeitpunkt der vierten bis fünften Woche nach Erkrankungsbeginn untersucht. Die Mäuse erhielten 300 µl 14%igen Chloralhydrats intraperitoneal. Nach Einsetzen der Schnappatmung und Ausfall des Kornealreflexes sowie fehlender Reaktion auf Schmerzreize erfolgte die Eröffnung des Thorax. Nach Freilegung des Herzens erfolgte zur Eröffnung des Blutkreislaufes die Inzision des rechten Herzohres. In den linken Ventrikel wurde eine Kanüle appliziert, über die 20 ml eiskaltes PBS langsam antegrad in den Kreislauf infundiert wurde. Zur Fixierung erfolgte dann die Infusion von in PBS gelöstem 4%igem PFA. Es folgte die vorsichtige Präparation von Gehirn und Rückenmark aus den Mäusen und die Zerteilung des Rückenmarks in 3 mm dicke Schnitte. Das gewonnene Gewebe wurde dann in einer in ihrer Konzentration aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in Paraffin eingebettet. Aus den Paraffinblöcken wurden mittels Mikrotom 2-5 µm dicke Schnitte hergestellt und auf Objektträger aufgebracht.

2.5.1 Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Chloralhydrat 14 %	Merck
Ethanol absolut	Merck
PBS DULBECCO	Biochrom
Paraffin, Paraplast Plus	Tyco Healthcare ¹
Paraformaldehyd (PFA) 4 %, gelöst in aqua bidest.	Merck

Tabelle 17: Verwendete Chemikalien zur Perfusion der Tiere und Fixierung des Gewebes

1. Tyco Healthcare GmbH, Neustadt an der Donau, Deutschland

2.6 Grundlagen und Durchführung einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine Routinefärbung und beruht auf zwei gegensätzlich geladenen Komponenten. Das basische Hämatoxylin färbt alle sauren Zellbestandteile blau. Dazu zählen der Zellkern, welcher die negativ geladene Desoxyribonukleinsäure enthält, und das raue endoplasmatische Retikulum. Der

saure Farbstoff Eosin färbt hingegen basische Strukturen rot, wozu vor allem das Zellplasma und Kollagenfasern gehören.

Durchführung:

Die Rückenmarksquerschnitte wurden zunächst nach Aufbringung auf einen Objektträger mit Xylol entparaffiniert und anschließend in einer in ihrer Konzentration absteigenden Alkoholreihe (100 %, 90 %, 70 %, 50 %) rehydriert. Es folgte die Färbung der Schnitte in Mayers Hämalaun-Lösung für sechs Minuten. Nach einer Spülung in Aqua bidest. wurden diese zur Differenzierung in Chlorwasserstoff-Alkohol inkubiert. Der nächste Schritt beinhaltete das Bläuen in Leitungswasser. Nachfolgend wurde eine 0,1%ige Eosin-Lösung (in 95 % Ethanol) für vier Minuten aufgebracht. Es erfolgte dann eine Dehydrierung in einer in ihrer Konzentration aufsteigenden Alkoholreihe, eine Inkubation in Xylol und abschließend eine Eindeckelung der Schnitte auf dem Objektträger.

2.7 Grundlagen und Durchführung einer LFB/ PAS-Färbung (Luxol-Fast-Blue/ Perjodsäure-Schiff-Reaktion)

Die LFB/ PAS-Färbung setzt sich aus zwei Reaktionen zusammen. Die Luxol-Fast-Blue-Lösung zeigt hohe Affinität zu Phospholipiden, weshalb hier besonders Myelin zur Darstellung kommt. Perjodsäure bildet Aldehydgruppen an Glykogen und an Zuckerkomponenten von Glykoproteinen. Das Schiff-Reagens färbt diese rot-violett.

Durchführung:

Nach Aufbringung der hergestellten Rückenmarksquerschnitte auf einem Objektträger wurden diese im ersten Schritt mit Xylol entparaffiniert und anschließend in einer in ihrer Konzentration absteigenden Alkoholreihe (100 %, 90 %) rehydriert. Diese wurden nun in einer 60 °C heißen Luxol-Fast-Blue-Lösung (1 g Luxol-Fast-Blue, 1000 ml 95%iges Ethanol, 5 ml 10%ige Essigsäure) für einen Tag inkubiert. Es schloss sich daran die Fortsetzung der Alkoholreihe an (bis 70 %). Zur Differenzierung wurde den Schnitten eine 0,05%ige Lithiumcarbonatlösung (in Aqua bidest.) sowie eine 70%ige Ethanol Lösung zugegeben. Es folgte die Färbung in 1%iger Perjodsäure und nach fünf Minuten die Spülung jener in Leitungswasser für weitere fünf Minuten. Nach kurzer Spülung in Aqua bidest. wurde das Schiff'sche

Reagenz auf die Schnitte gegeben (20 Minuten). Diese Reaktion wurde durch fünfminütige Spülung in Leitungswasser beendet und Mayers-Hämalaun-Lösung zur Färbung für zwei Minuten zugegeben. Nach kurzer Differenzierung in Chlorwasserstoff-Alkohol-Lösung wurden die Schnitte in Leitungswasser gebläut. Zur Dehydrierung folgte nun das Einstellen der Schnitte in einer in ihrer Konzentration aufsteigenden Alkoholreihe und die Inkubation in Xylol. Der letzte Schritt beinhaltete die Eindeckelung der Schnitte auf dem Objektträger.

2.8 Grundlagen und Durchführung einer Bielschowsky-Färbung

Die Darstellung von Axonen hat die Versilberung nach Bielschowsky zum Ziel. Sie färbt Axone, Neurofibrillen und Dendriten schwarz.

Durchführung:

Nach Herstellung der Rückenmarksquerschnitte wurden diese auf Objektträger aufgebracht. Es folgte die Entparaffinierung in Xylol und die Rehydrierung in einer in ihrer Konzentration absteigenden Alkoholreihe. Den Schnitten wurde nun für 20 Minuten eine 20%ige Silbernitratlösung (in Wasser) zugegeben. Nach Spülung mit Aqua bidest. erfolgte eine 15minütige Inkubation der Schnitte im Dunkeln mit einer klaren Lösung, die aus Silbernitrat- und 32%iger Ammoniaklösung (in Aqua bidest.) bestand. Diese wurde durch Spülung mit Aqua bidest. beendet und es folgte die Zugabe von zehn Tropfen einer Entwicklerlösung (20 mg Formalin, 100 ml Aqua bidest., 0,5 g Citronensäure, 0,1 ml 65%ige Salpetersäure). Im nächsten Schritt wurden die Schnitte für eine Minute in einer Lösung inkubiert, die sich aus der bereits verwendeten Silbernitrat-/ Ammoniaklösung und 13 Tropfen der Entwicklerlösung zusammensetzte. Nach Spülung in Aqua bidest. wurde 2%iges Natriumthiosulfat zur Fixierung zugegeben, in einer in ihrer Konzentration aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, mit Xylol inkubiert und die Schnitte abschließend auf einem Objektträger eingedeckelt.

2.9 Durchführung einer immunhistochemischen Färbung

Im ersten Schritt wurden zunächst Rückenmarksquerschnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Diese wurden nun in Xylol entparaffiniert und in einer in ihrer Konzentration absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Zur Antigendemaskierung

wurden die Schnitte in kochendem 10 mM Citratpuffer für fünfmal drei Minuten inkubiert und anschließend mit PBS gespült. Im nächsten Schritt erfolgte zur Blockierung der endogenen Peroxidase die Zugabe von H₂O₂-Lösung für 20 Minuten (45 ml PBS und 5 ml H₂O₂ 30%). Es erfolgte eine weitere Spülung mit PBS. Bei der CD3-Färbung folgte nun eine zusätzliche Inkubation in einer 1%igen Triton-Lösung für eine Stunde. Die Schnitte wurden dann zur Blockierung unspezifischer Bindungen für 20 Minuten in 10 % FCS (in PBS) und einer feuchten Kammer inkubiert. Auf die Schnitte wurde der verdünnte primäre Antikörper aufgebracht (über Nacht bei 4 °C). Nach Entfernung des nicht gebundenen Anteils des primären Antikörpers durch PBS-Spülung erfolgte die Applikation des biotinylierten und verdünnten sekundären Antikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur. Auch hier wurde der nicht gebundene Anteil anschließend durch PBS-Spülung entfernt. Im nächsten Schritt wurde Extravidin-Peroxidase, die an den biotinylierten Anteil des sekundären Antikörpers bindet, auf die Schnitte gegeben und nach einer Stunde mit PBS gespült. Es erfolgte dann die Inkubation mit dem Substrat der Peroxidase 3-3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) unter Zugabe von 30%igem H₂O₂. Bei der CD3-Färbung erfolgte an dieser Stelle eine Verstärkung durch Kupfersulfat für zehn Minuten und anschließender Spülung mit Aqua bidest. Nach einer Gegenfärbung in Mayers Hämalaun-Lösung für 30 Sekunden wurden die Schnitte in einer in ihrer Konzentration aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und abschließend in Xylol inkubiert. Im letzten Schritt erfolgte die Eindeckelung der Schnitte auf dem Objektträger.

Von diesem Vorgehen wich die APP-Färbung ab, bei welcher der Sekundärantikörper als Primärantikörper verwendet wurde und aufgrund seiner Biotinylierung auf einen Sekundärantikörper verzichtet werden konnte.

2.9.1 Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Ammoniaklösung 32 % in Aqua bidest.	Merck
Aqua bidest.	-
Chlorwasserstoff 1 mol/l	Merck

Citrat-Puffer	Merck
Citronensäure	Merck
3-3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB)	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Merck
Ethanol absolut	Merck
Eosin-G Certistain 1 %	Merck
Extravidin-Peroxidase	Sigma-Aldrich
Fetales Kälberserum (FCS) 10 % in PBS	Biochrom
Formalin	Merck
Kupfersulfat	Merck
Lithiumcarbonat	Merck
Luxol-fast-blue	VWR International Ltd. ¹
Mayers Hämalun-Lösung	Merck
Natriumthiosulfat	Merck
PBS DULBECCO	Biochrom
Perjodsäure	Merck
Salpetersäure	Merck
Schiff'sches Reagenz	Merck
Silbernitrat	Carl Roth
Triton-Lösung	Merck
Wasserstoffperoxid 30 % in Aqua bidest.	Merck
Xylol	Merck

Tabelle 18: Verwendete Materialien zur Färbung der Schnitte

1. VWR International Ltd., Poole, Großbritannien

2.9.2 Verwendete Antikörper

Antigen	Spezies	Klon	Hersteller	Katalog-Nr.	Verdünnung mit 10 % FCS/ PBS
APP	Maus	22C11	Merck Millipore ¹	MAB 348	1:2000
B220	Ratte	RA3-6B2	BD Pharmingen ²	557390	1:200
CD3	Hase	SP7	DCS ³	C15971001	1:150
c-Jun	Hase	H79	Santa Cruz Biotechnology ⁴	sc-1694	1:200
Mac3	Ratte	M3/84	BD Pharmingen	553322	1:200

Tabelle 19: Primärantikörper

1. Merck Millipore, Billerica, USA

2. BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

3. DCS, Hamburg, Deutschland

4. Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

Bezeichnung	konjugiert mit	Hersteller	Katalog-Nr.	Verdünnung mit 10 % FCS/ PBS
Schaf-anti-Maus-Ig	Biotin	GE Healthcare ¹	RPN1001	1:200
Ziege-anti-Ratte-Ig	Biotin	GE Healthcare	RPN1005	1:200
Esel-anti-Hase-Ig	Biotin	GE Healthcare	RPN1004	1:200
Anti-Maus-IgG (Plasmazelle)	Biotin	Vector ²	BA2000	1:200

Tabelle 20: Sekundärantikörper

1. GE Healthcare, Solingen, Deutschland

2. Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.10 Histologische Auswertung

Die histologische Auswertung der gefärbten Schnitte erfolgte lichtmikroskopisch (Firma Olympus, Hamburg, Deutschland). Dabei wurden Okulare mit 10facher Vergrößerung verwendet, die standardisierte Zählgitter enthielten. Diese ermöglichten sowohl das Auszählen von Zellen in einem Gesichtsfeld als auch die

Bestimmung von Axonzahlen. Daneben wurden Objektive mit einer minimalen Vergrößerung von 2x und einer maximalen Vergrößerung von 1000x verwendet. Im Einzelnen wurden die Färbungen folgendermaßen ausgewertet:

LFB/ PAS-Färbung: In LFB/ PAS-gefärbten Schnitten kamen Läsionen der weißen Substanz zur Darstellung. Diese waren aufgrund der Demyelinisierung durch den Verlust der blauen Myelinfärbung gekennzeichnet. Um den Grad der Entmarkung zu quantifizieren, wurde die Läsionsfläche in Verhältnis zur Gesamtfläche der weißen Substanz gesetzt (Läsionsindex). Dazu wurden die Schnitte zunächst unter 200facher Vergrößerung digital fotografiert und anschließend mit der Software „Analysis“ (Firma Olympus, Hamburg, Deutschland) vermessen.

Bielschowsky-Färbung: In der Färbung nach Bielschowsky ließ sich das Ausmaß des Axonverlustes in Läsionen quantifizieren, die zunächst in der LFB/ PAS-Färbung identifiziert wurden. Dazu wurden die Schnitte unter einer 1000fachen Vergrößerung und Öl eingestellt. 25 Kreuzungspunkte eines Axonzählgitters wurden in eine Läsion gelegt. Die Anzahl der mit den Kreuzungspunkten des Zählgitters getroffenen Axone diente als Maß für den Axonverlust in den Läsionen. Diese Zahl wurde dann ins Verhältnis zur ermittelten Axonanzahl in nicht betroffener weißer Substanz gesetzt. Die Quantifizierung des Axonverlustes wurde an drei bis fünf Tieren der drei Genotypen vorgenommen.

Immunhistochemische Färbungen: Zur Bestimmung der Entzündungsaktivität dienten die Anzahl an T-, B- und Plasmazellen sowie Makrophagen in Schnitten der Tiere der drei Genotypen Wildtyp, Heterozygot und Knockout.

CD 3: In der immunhistochemischen Färbung der T-Zellen diente CD3 als Antigen. Die Anzahl der T-Zellen wurde lichtmikroskopisch in Tieren der akuten und chronischen Krankheitsphase sowohl in Läsionen der weißen Substanz als auch im Bereich der Meningen semiquantitativ bestimmt.

B 220: B-Zellen wurden immunhistochemisch durch das Antigen B220 angefärbt. Deren Anzahl wurde in der akuten und chronischen Krankheitsphase semiquantitativ bestimmt. Es erfolgte eine Auszählung in Läsionen und in den Meningen.

Plasmazellen: Plasmazellen wurden immunhistochemisch mittels eines biotinylierten Sekundärantikörpers gegen zellgebundenes Maus-Immunglobulin G, der als Primärantikörper verwendet wurde, angefärbt. Die Zahl der Plasmazellen wurde semiquantitativ in akuter und chronischer Krankheitsphase im Bereich der Meningen bestimmt.

Makrophagen: Makrophagen wurden immunhistochemisch durch Antikörper gegen Mac 3 dargestellt. Jene wurden in dem am stärksten betroffenen Schnitt eines Tieres mittels eines Zählgitters ausgezählt (Makrophagen pro Schnitt). Dieses erfolgte in Tieren der akuten und chronischen Krankheitsphase.

APP: Neben der Auszählung noch vorhandener Axone im Bereich von Läsionen diente die immunhistochemische Färbung APP-positiver Sphäroide als Parameter für einen axonalen Schaden. Diese wurden in Tieren der akuten Krankheitsphase pro Fläche ausgezählt (APP-positive Sphäroide pro mm²).

c-Jun: Zur Quantifizierung eines neuronalen Schadens diente die immunhistochemische Färbung des Antigens c-Jun. Dieses wurde im Bereich der grauen Substanz des Rückenmarks in Tieren der akuten und chronischen Krankheitsphase semiquantitativ bestimmt.

3 Ergebnisse

Ich habe in der vorliegenden Arbeit die Funktion des Chemokin-Rezeptors CX₃CR1 in einem spontanen EAE-Modell der Maus untersucht. Alle Mäuse waren transgen für einen T-Zell-Rezeptor gegen MOG und transgen für eine MOG-spezifische Immunglobulin-schwere Kette, unterschieden sich jedoch in ihrem CX₃CR1-Genotyp.

3.1 CX₃CR1-defiziente OSE-Mäuse erkranken signifikant häufiger spontan an EAE

OSE-Mäuse, die entweder CX₃CR1^{+/+} (n = 116 Tiere), CX₃CR1^{+/GFP} (n = 84 Tiere) oder CX₃CR1^{GFP/GFP} (n = 81 Tiere) waren, wurden für 100 Tage verlaufsbeobachtet. 31,9 Prozent (37 Tiere) der OSE CX₃CR1^{+/+}, 44 Prozent (37 Tiere) der OSE CX₃CR1^{+/GFP} und 54,3 Prozent (44 Tiere) der OSE CX₃CR1^{GFP/GFP} Mäuse entwickelten in diesem Zeitraum eine spontane EAE. OSE CX₃CR1^{GFP/GFP} Mäuse erkrankten häufiger spontan an EAE als OSE CX₃CR1^{+/+} Tiere und CX₃CR1^{+/GFP} Tiere. Dieser Unterschied war in der globalen Varianzanalyse mit einem p-Wert von unter 0,0001 signifikant. Interessanterweise war die EAE-Inzidenz von OSE CX₃CR1^{+/GFP}- gegenüber OSE CX₃CR1^{+/+}-Mäusen ebenfalls signifikant erhöht. Der mittlere Erkrankungsbeginn der Tiere lag bei 45 Tagen (SD ± 14 Tage) für OSE CX₃CR1^{+/+} und bei 47 Tagen für OSE CX₃CR1^{+/GFP} (SD ± 18 Tage) und OSE CX₃CR1^{GFP/GFP} (SD ± 18 Tage). In der globalen Varianzanalyse gab es in diesem Punkt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (p-Wert von 0,9125).

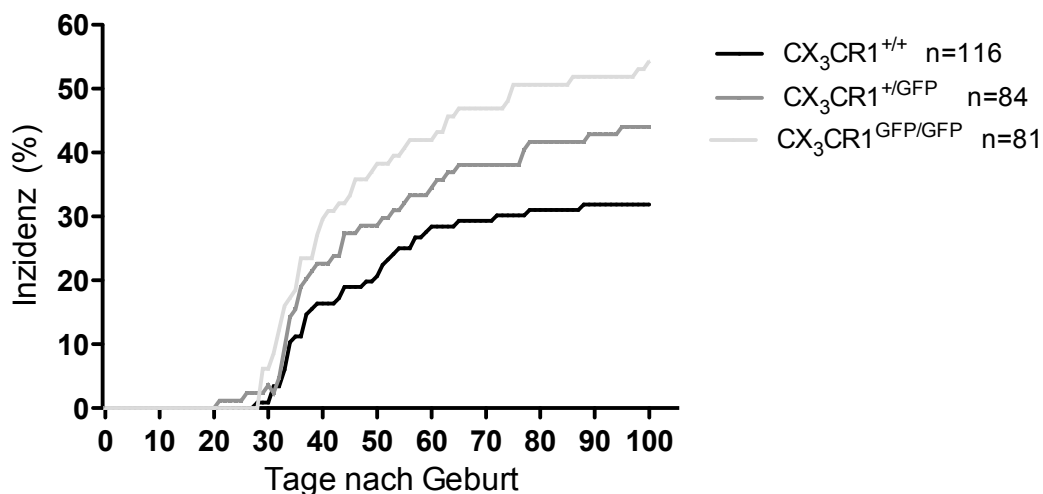


Abbildung 1: Vergleich der Inzidenz einer spontanen EAE in einem Beobachtungszeitraum von 100 Tagen in Abhängigkeit vom CX₃CR1-Genotyp. Am häufigsten erkrankten OSE-Tiere des Genotyps CX₃CR1^{GFP/GFP} mit einer Rate von 54 %. Deutlich seltener waren OSE CX₃CR1^{+/+}-Mäuse mit circa 32 % betroffen. Dazwischen lagen OSE-Tiere des CX₃CR1^{+/GFP}-Genotyps. Mit einem p-Wert von 0,0001 bestand in der globalen Varianzanalyse Signifikanz. Im multiplen Mittelwertsvergleich zeigte sich ein signifikanter Unterschied beim Vergleich von OSE CX₃CR1^{+/+} und CX₃CR1^{GFP/GFP} sowie von OSE CX₃CR1^{+/+} und CX₃CR1^{+/GFP}. Ein Unterschied hinsichtlich des Erkrankungszeitpunktes bestand nicht (p-Wert von 0,9125).

3.2 CX₃CR1-defiziente OSE-Mäuse erkranken signifikant weniger schwer an EAE

Der Erkrankungsverlauf der Mäuse in Abhängigkeit von ihrem CX₃CR1 Genotyp ist in Abbildung 2 dargestellt. Der mittlere klinische Score betrug bei OSE-Mäusen des Genotyps CX₃CR1^{+/+} 2,93 (SD ± 0,5), bei OSE CX₃CR1^{+/GFP} 2,91 (SD ± 0,63) und bei OSE CX₃CR1^{GFP/GFP} 2,19 (SD ± 0,87). CX₃CR1-defiziente Tiere erkrankten somit weniger schwer an EAE als OSE CX₃CR1^{+/+} und CX₃CR1^{+/GFP}. Dieser Unterschied war in der globalen Varianzanalyse signifikant (p-Wert 0,0242). Beim kumulativen Score erreichten OSE CX₃CR1^{+/+} Tiere einen mittleren Wert von 98,75 (SD ± 15,54), OSE CX₃CR1^{+/GFP} Tiere 90,28 (SD ± 19,15) und OSE CX₃CR1^{GFP/GFP} Mäuse 68 (SD ± 26,94). Auch dieser Unterschied war in der globalen Varianzanalyse signifikant (p-Wert 0,0242). Obwohl CX₃CR1-defiziente Mäuse häufiger an einer EAE erkrankten, war deren Krankheitsverlauf signifikant milder als bei OSE CX₃CR1^{+/GFP}- und OSE-CX₃CR1^{+/+}-Mäusen.

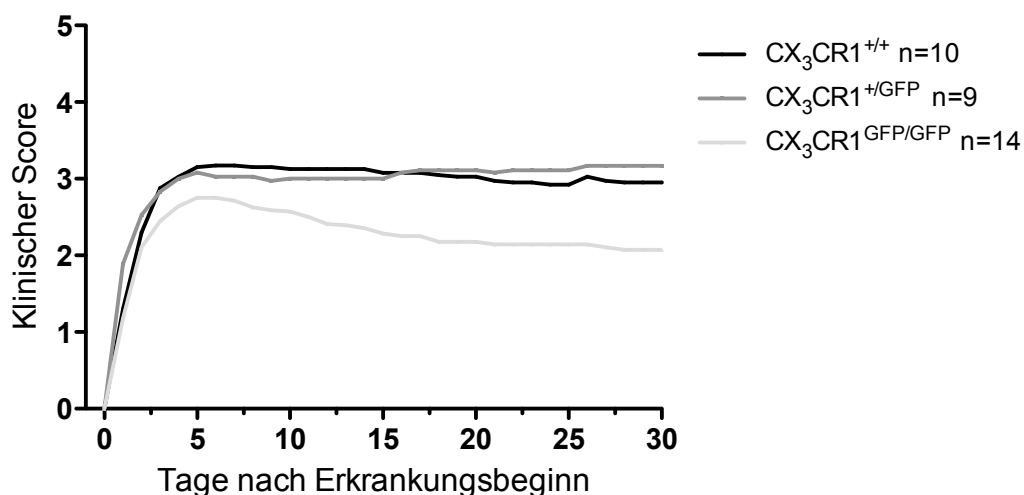


Abbildung 2: Vergleich des Krankheitsverlaufes von OSE-Mäusen mit den drei CX₃CR1-Genotypen CX₃CR1^{+/+} (n=10), CX₃CR1^{+/GFP} (n=9) und CX₃CR1^{GFP/GFP} (n=14). CX₃CR1-defiziente OSE-Mäuse erkrankten signifikant weniger schwer an EAE. OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}-Tiere erreichten einen signifikant geringeren mittleren klinischen und kumulativen Score als OSE CX₃CR1^{+/GFP}- und OSE CX₃CR1^{+/+}-Mäuse (p-Wert jeweils von 0,0242).

Genotyp	Inzidenz (%)	Mittlerer klinischer Score ± SD	Mittlerer kumulativer Score ± SD	Mittlerer Erkrankungsbeginn ± SD (T)
OSE CX ₃ CR1 ^{+/+}	37/116 (31,9)	2,93 ± 0,5	98,75 ± 15,54	45 ± 14
OSE CX ₃ CR1 ^{+/GFP}	37/84 (44)	2,91 ± 0,63	90,28 ± 19,15	47 ± 18
OSE CX ₃ CR1 ^{GFP/GFP}	44/81 (54,3)	2,19 ± 0,87	68 ± 26,94	47 ± 18

Tabelle 21: Klinische Daten von OSE-Tieren mit den drei Genotypen CX₃CR1^{+/+}, CX₃CR1^{+/GFP} und CX₃CR1^{GFP/GFP}

3.3 CX₃CR1-defiziente OSE-Mäuse zeigen in der akuten Krankheitsphase meningeal und intraläsional geringere entzündliche Infiltrate

Zur Charakterisierung entzündlicher Infiltrate im akuten Stadium wurden Läsionen im Bereich des Rückenmarks hinsichtlich des Vorkommens von B-Zellen, Plasmazellen, T-Zellen und Makrophagen untersucht. Die semiquantitative Bestimmung der B-Zellen zeigte ein häufiges Vorkommen dieser Zellen im Bereich der Meningen von Tieren des Typs OSE CX₃CR1^{+/+}. Etwas weniger häufig fanden sich B-Zellen meningeal in Tieren der OSE CX₃CR1^{+/GFP}- und OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}-Gruppe. Vereinzelt waren diese bei allen drei Genotypen auch im Bereich der Läsionen zu sehen. Ein Unterschied bestand dort jedoch nicht. Plasmazellen waren bei OSE CX₃CR1^{+/+} und OSE CX₃CR1^{+/GFP} nur wenige in den Meningen nachweisbar. In OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}-Tieren waren sie nur vereinzelt sichtbar (keine Abbildung). Hinsichtlich der T-Zellen war zwischen den drei Genotypen kein Unterschied feststellbar. Diese fanden sich in gleicher Häufigkeit sowohl meningeal als auch im Bereich der Läsionen. Zur Analyse der Makrophagen wurde pro Tier der am stärksten betroffene Schnitt ausgewählt und die Zahl der Makrophagen pro Schnitt im Zählgitter bestimmt. Hier zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen OSE CX₃CR1^{+/+} und OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}. Beim Wildtyp fanden sich im Mittel 2063

Makrophagen pro Schnitt, während sich bei Knockout-Tieren lediglich 633 Makrophagen nachweisen ließen. Zwischen diesen beiden lagen OSE $CX_3CR1^{+/GFP}$ -Mäuse mit 1669 Makrophagen pro Schnitt. Mit einem p-Wert von weniger als 0,001 in der globalen Varianzanalyse bestand Signifikanz. Im Mittelwertsvergleich nach Tukey fand sich ein signifikanter Unterschied beim Vergleich von Wildtypen und Knockout-Tieren einerseits sowie Heterozygoten und Knockout-Tieren andererseits.

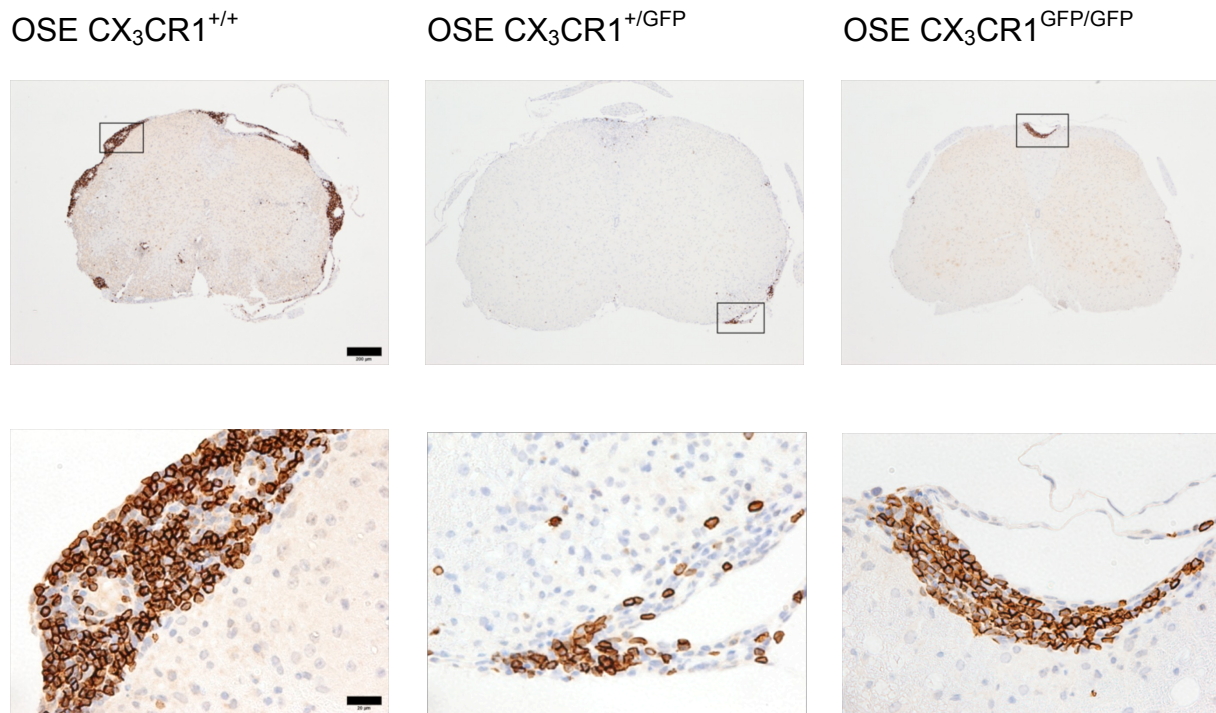


Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung der B-Zellen in der akuten Krankheitsphase (B220-Färbung). B-Zellen sind in dieser Färbung braun gefärbt. Es erfolgte eine semiquantitative Bestimmung in den drei Genotypen (OSE $CX_3CR1^{+/+}$ n=6, OSE $CX_3CR1^{+/GFP}$ n=6, OSE $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ n=7). Besonders häufig waren B-Zellen meningeal in Tieren des Wildtyps zu finden. Weniger häufig waren sie auch im Bereich der Läsionen zu finden. Hier fand sich jedoch kein Unterschied zwischen den drei Genotypen. *Schwarzer Balken der oberen Reihe entspricht 200 µm, schwarzer Balken der unteren Reihe entspricht 20 µm.*

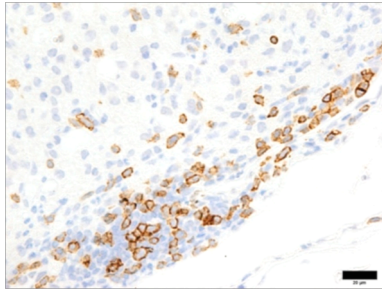
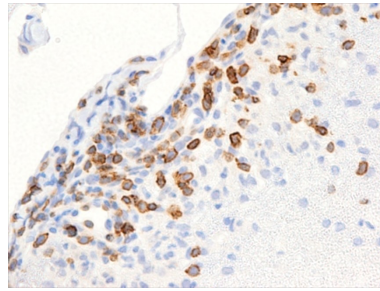
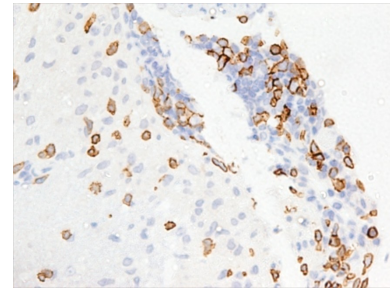
OSE CX₃CR1^{+/+}OSE CX₃CR1^{+/GFP}OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}

Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung der T-Zellen in der akuten Krankheitsphase (CD3-Färbung). T-Zellen sind hier braun gefärbt. Die Bestimmung der Anzahl der T-Zellen erfolgte semiquantitativ für jeden der drei Genotypen (OSE CX₃CR1^{+/+} n=6, OSE CX₃CR1^{+/GFP} n=6, OSE CX₃CR1^{GFP/GFP} n=7). Diese fanden sich sowohl meningeal als auch weniger häufig im Bereich der Läsionen. Ein Unterschied zwischen den drei Genotypen bestand nicht. *Schwarzer Balken entspricht 20 µm.*

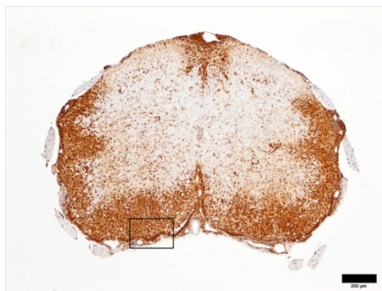
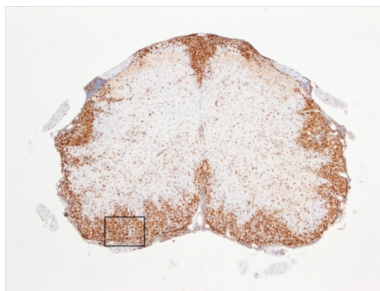
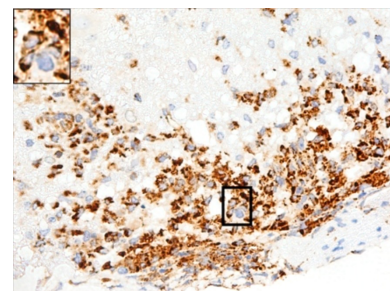
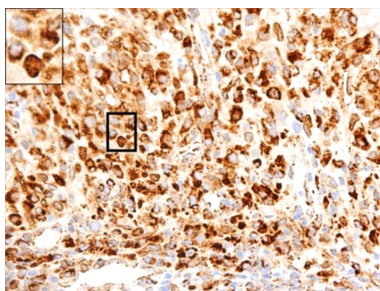
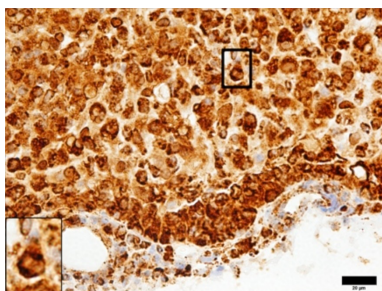
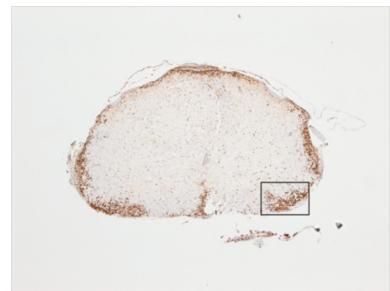
OSE CX₃CR1^{+/+}OSE CX₃CR1^{+/GFP}OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}

Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung der Makrophagen in der akuten Krankheitsphase (Mac3-Färbung). In dieser Färbung sind Makrophagen braun angefärbt. Die obere Bildreihe zeigt Rückenmarksschnitte der drei Genotypen im Überblick, die untere Reihe stellt Makrophagen vergrößert dar. *Schwarzer Balken der oberen Reihe entspricht 200 µm, schwarzer Balken der unteren Reihe entspricht 20 µm (Insets: Vergrößerung um 200 %).*

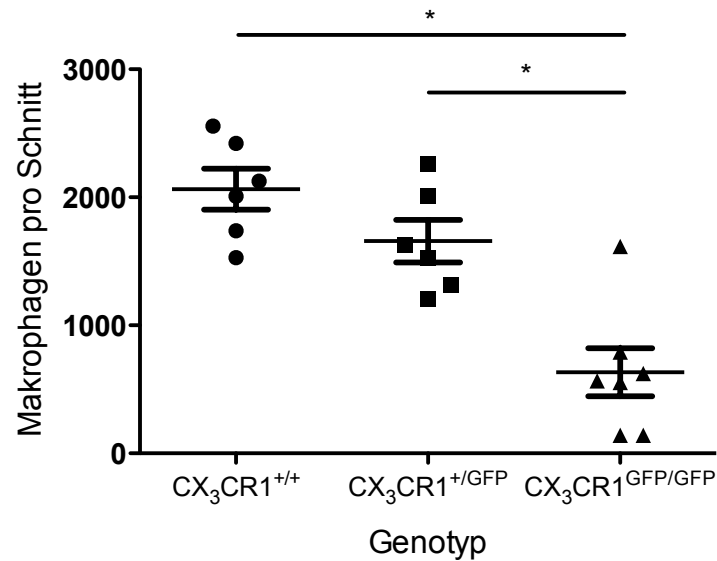


Abbildung 15: Makrophagen pro Schnitt zum Zeitpunkt der akuten Krankheitsphase. Makrophagen wurden im am stärksten betroffenen Rückenmarksquerschnitt eines Tieres ausgezählt. Aus den Tieren wurde ein Mittelwert für jeden Genotyp gebildet (OSE $CX_3CR1^{+/+}$ $n=6$, OSE $CX_3CR1^{+/GFP}$ $n=6$, OSE $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ $n=7$). Mit im Mittel 2063 Makrophagen pro Schnitt waren die meisten Makrophagen in Wildtypen zu finden. Die Mittelwerte der Heterozygoten und Knockouts lagen bei 1669 und 633 Makrophagen pro Schnitt. Eine deutliche Signifikanz zeigte sich in der globalen Varianzanalyse (ANOVA) mit einem p-Wert von $<0,001$. Im multiplen Mittelwertsvergleich nach Tukey war ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtypen und Knockouts (* $p < 0,05$), sowie zwischen Heterozygoten und Knockouts festzustellen (* $p < 0,05$).

3.4 Reduzierte entzündliche Infiltrate in der chronischen Krankheitsphase ohne signifikanten Unterschied zwischen den CX_3CR1 -Genotypen

Die semiquantitative Bestimmung der B-Zellen, Plasmazellen, T-Zellen und Makrophagen zeigte ein reduziertes Vorkommen aller Zellen in der chronischen Phase mit Ausnahme der Plasmazellen. B-Zellen fanden sich in der OSE $CX_3CR1^{+/+}$ - und OSE $CX_3CR1^{+/GFP}$ -Gruppe vor allem meningeal und vereinzelt auch im Bereich der Läsionen. Etwas weniger häufig waren B-Zellen bei OSE $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ -Tieren in den Meningen zu sehen. Auch Plasmazellen waren etwas häufiger bei OSE $CX_3CR1^{+/+}$ - und OSE $CX_3CR1^{+/GFP}$ -Tieren nachweisbar. Sie fanden sich ausschließlich meningeal. Auch in der chronischen Phase war hinsichtlich des Vorkommens von T-Zellen kein wesentlicher Unterschied erkennbar. Im Vergleich

zur akuten Krankheitsphase war in der chronischen Phase eine deutlich reduzierte Anzahl an Makrophagen nachweisbar. Bei Mäusen des OSE CX₃CR1^{+/+}-Typs ließen sich im Mittel 52 Makrophagen pro Schnitt zählen. Bei OSE CX₃CR1^{+/GFP} waren es durchschnittlich 42 mehr. In OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}-Tieren fanden sich lediglich 10 Makrophagen pro Schnitt. Mit einem p-Wert von 0,3635 in der globalen Varianzanalyse bestand jedoch keine Signifikanz.

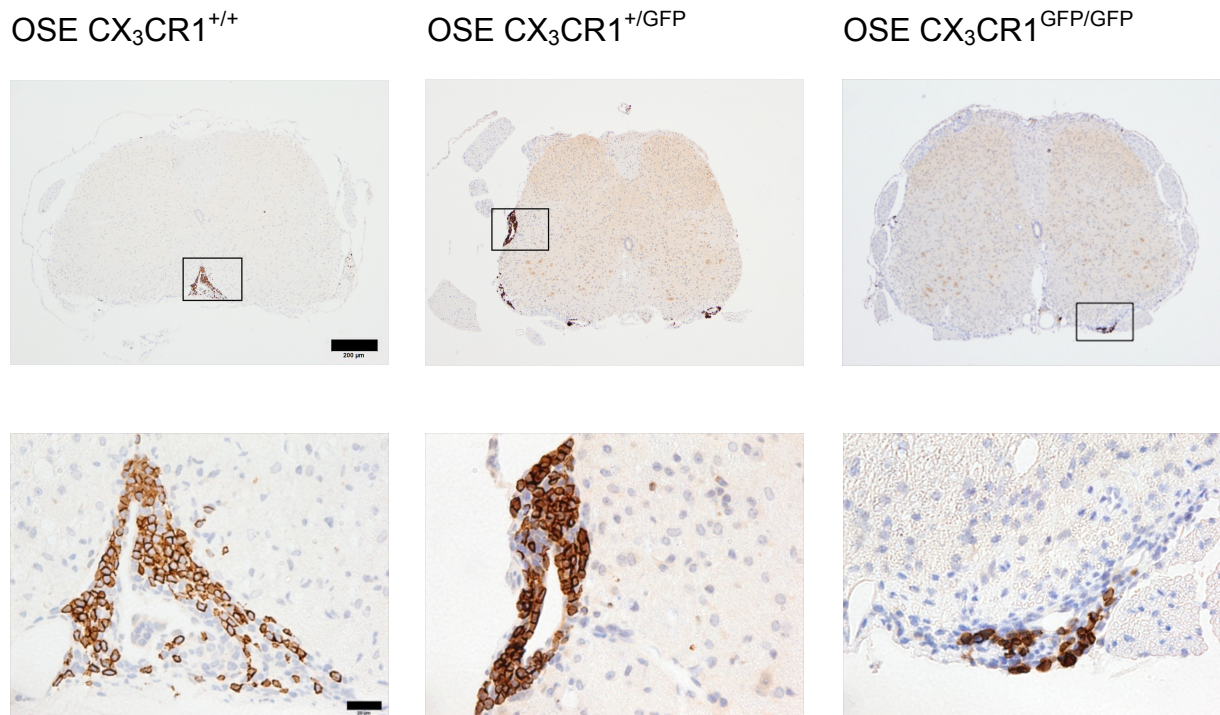


Abbildung 16: Immunhistochemische Färbung der B-Zellen in der chronischen Krankheitsphase (B220-Färbung). B-Zellen stellen sich hier braun gefärbt dar. Die Bestimmung der B-Zell-Anzahl erfolgte semiquantitativ für jeden Genotyp (OSE CX₃CR1^{+/+} n=5, OSE CX₃CR1^{+/GFP} n=7, OSE CX₃CR1^{GFP/GFP} n=7). B-Zellen fanden sich im Vergleich weniger häufig meningeal in Knockout-Tieren. Zwischen Wildtypen und Heterozygoten bestand kein Unterschied. Nur vereinzelt waren B-Zellen bei diesen Genotypen auch im Bereich der Läsionen zu finden.

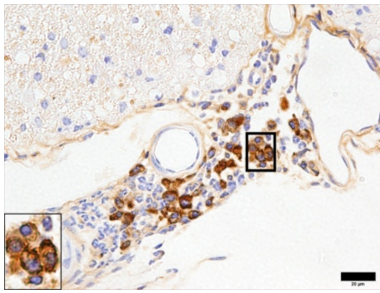
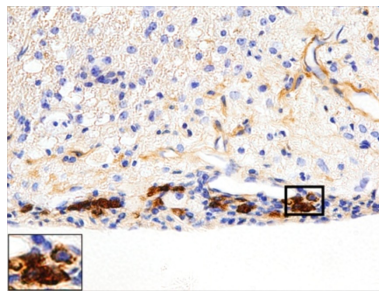
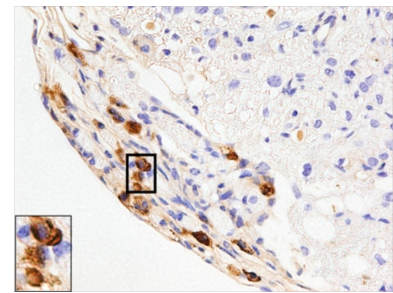
OSE CX₃CR1^{+/+}OSE CX₃CR1^{+/GFP}OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}

Abbildung 17: Immunhistochemische Färbung von Plasmazellen in der chronischen Krankheitsphase. Plasmazellen sind in dieser Färbung braun angefärbt. Es erfolgte eine semiquantitative Bestimmung der Plasmazellanzahlen für jeden Genotyp (OSE CX₃CR1^{+/+} n=5, OSE CX₃CR1^{+/GFP} n=7, OSE CX₃CR1^{GFP/GFP} n=7). Im Vergleich waren Plasmazellen weniger häufig meningeal bei Knockout-Tieren zu finden. Im Bereich der Läsionen waren diese bei keinem Genotyp nachweisbar. *Schwarzer Balken entspricht 20 µm (Insets: Vergrößerung um 200 %).*

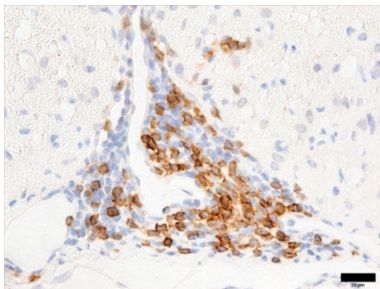
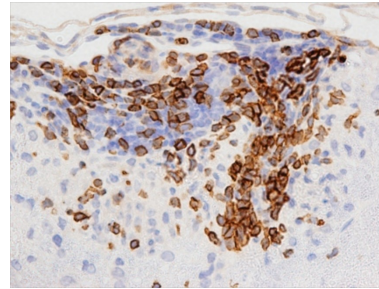
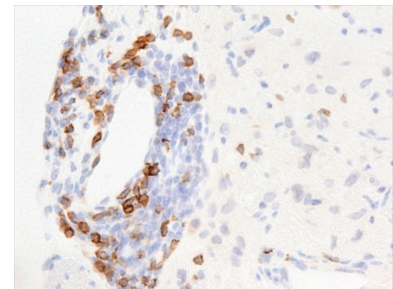
OSE CX₃CR1^{+/+}OSE CX₃CR1^{+/GFP}OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}

Abbildung 18: Immunhistochemische Färbung der T-Zellen in der chronischen Krankheitsphase (CD3-Färbung). T-Zellen sind auf den Bildern braun angefärbt. Die T-Zellanzahl wurde für jeden Genotyp semiquantitativ bestimmt (OSE CX₃CR1^{+/+} n=5, OSE CX₃CR1^{+/GFP} n=7, OSE CX₃CR1^{GFP/GFP} n=7). T-Zellen fanden sich häufiger meningeal als im Bereich von Läsionen. Ein Unterschied bestand zwischen den drei Genotypen nicht. *Schwarzer Balken entspricht 20 µm.*

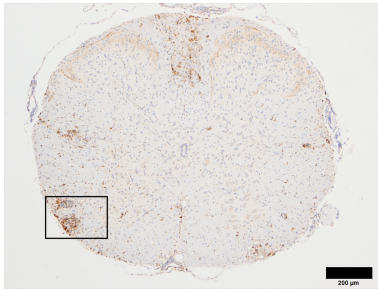
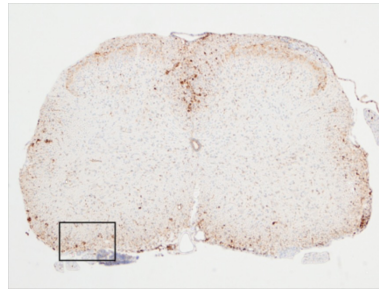
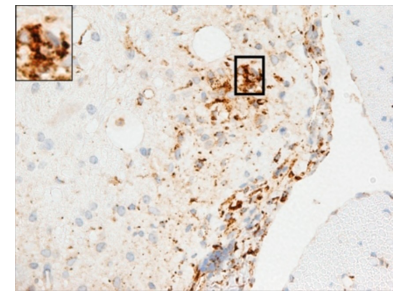
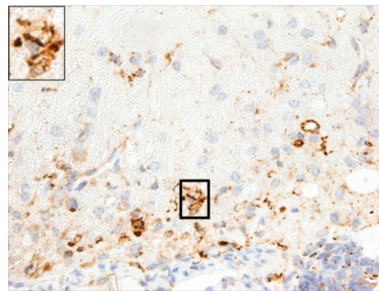
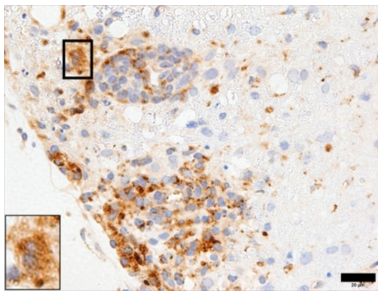
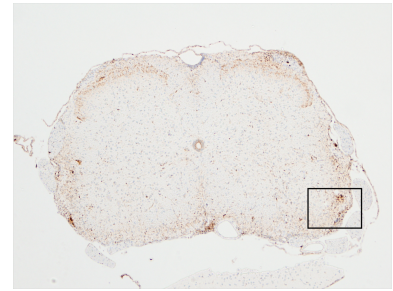
OSE CX₃CR1^{+/+}OSE CX₃CR1^{+/GFP}OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}

Abbildung 19: Immunhistochemische Färbung von Makrophagen zum Zeitpunkt der chronischen Krankheitsphase (Mac3-Färbung). Makrophagen stellen sich hier braun gefärbt dar. Die obere Bildreihe zeigt Rückenmarksschnitte der drei Genotypen im Überblick, die untere Reihe stellt Makrophagen vergrößert dar. *Schwarzer Balken der oberen Reihe entspricht 200 μm, schwarzer Balken der unteren Reihe entspricht 20 μm (Insets: Vergrößerung um 200 %).*

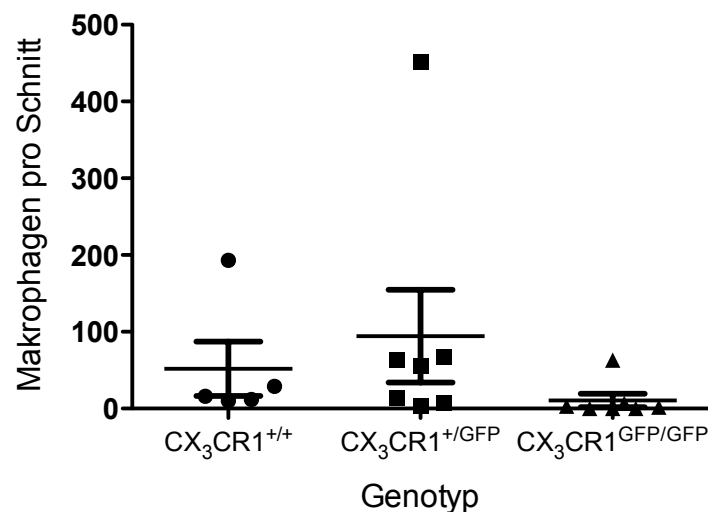


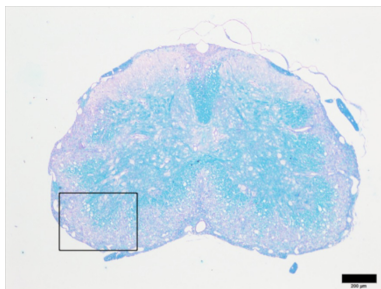
Abbildung 20: Makrophagen pro Schnitt in der chronischen Krankheitsphase. Diese wurden in dem am stärksten betroffenen Rückenmarksquerschnitt eines Tieres ausgezählt und aus diesen Werten ein Mittelwert für jeden Genotyp gebildet (OSE CX₃CR1^{+/+} n=5, OSE CX₃CR1^{+/GFP} n=7, OSE CX₃CR1^{GFP/GFP} n=7). In der chronischen Erkrankungsphase kamen Makrophagen deutlich reduziert vor. Mit einem Mittelwert von 94 pro Schnitt waren diesen in

Heterozygoten am häufigsten. Die Mittelwerte für Wildtypen und Knockouts lagen bei 52 und 10 Makrophagen pro Schnitt. In der globalen Varianzanalyse (ANOVA) bestand mit einem p-Wert von 0,3635 keine Signifikanz.

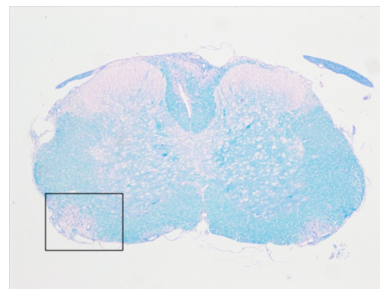
3.5 CX₃CR1-Wildtyp-OSE-Mäuse weisen in der akuten Krankheitsphase signifikant ausgeprägtere spinale Demyelinisierungen auf

In der akuten Krankheitsphase betrug der Läsionsindex bei OSE CX₃CR1^{+/+} im Mittel 38,3 %. Dieser war in der OSE CX₃CR1^{+/GFP}-Gruppe mit 23,9 % und bei den OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}-Tieren mit 14,4 % deutlich geringer ausgeprägt. Mit einem p-Wert von 0,0042 bestand in der globalen Varianzanalyse Signifikanz. Im Mittelwertsvergleich zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtypen und Knockout-Tieren.

OSE CX₃CR1^{+/+}



OSE CX₃CR1^{+/GFP}



OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}

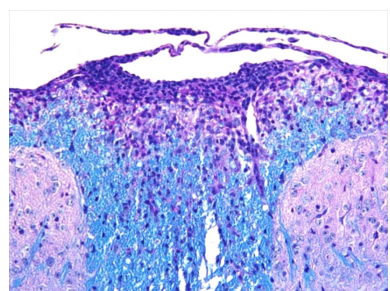
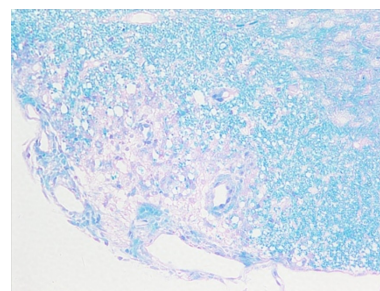
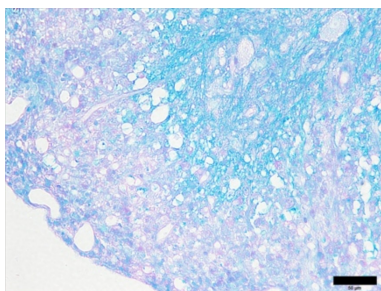
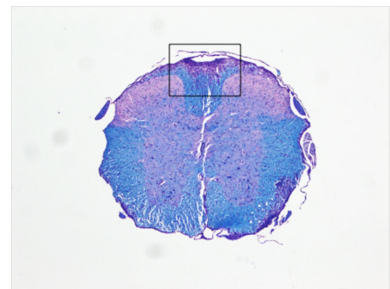


Abbildung 5: Histologische Färbung (LFB/ PAS) demyelinisierter Areale im Bereich der weißen Substanz des Rückenmarks in der akuten Krankheitsphase (circa fünfter Erkrankungstag). Die obere Bildreihe zeigt Rückenmarksschnitte der drei Genotypen im Überblick, die untere Reihe stellt demyelinisierte Areale vergrößert dar. *Schwarzer Balken der oberen Reihe entspricht 200 µm, schwarzer Balken der unteren Reihe entspricht 50 µm.*

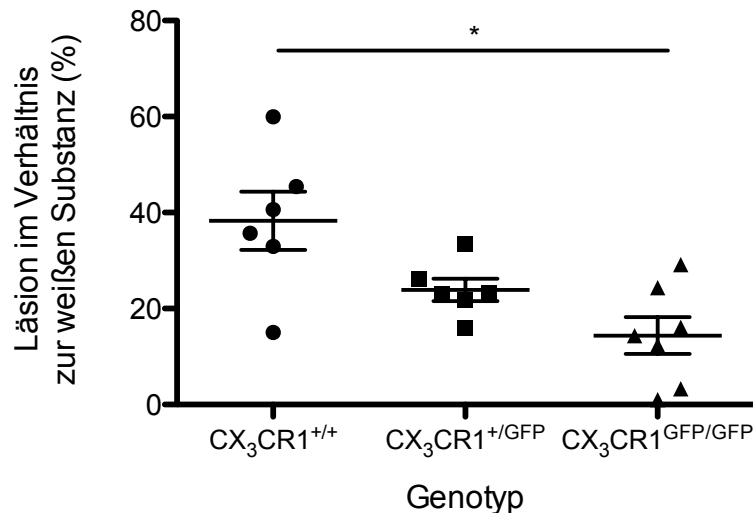


Abbildung 6: Anteil der Läsionsfläche an der weißen Substanz des Rückenmarks bei den drei Genotypen zum Zeitpunkt der akuten Krankheitsphase. Die in der LFB-PAS-Färbung zur Darstellung gekommenen demyelinisierten Areale wurden vermessen und ins Verhältnis zur gesamten Fläche der weißen Substanz gesetzt (OSE $CX_3CR1^{+/+}$ n=6, OSE $CX_3CR1^{+/GFP}$ n=6, OSE $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ n=7). Die Mittelwerte lagen in der OSE $CX_3CR1^{+/+}$ -Gruppe bei 38,3 %, in der OSE $CX_3CR1^{+/GFP}$ -Gruppe bei 23,9 % und bei OSE $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ -Tieren mit 14,4 % am niedrigsten. Die globale Varianzanalyse (ANOVA) zeigte mit einem p-Wert von 0,0042 einen signifikanten Unterschied. Dieser bestand im Mittelwertsvergleich nach Tukey zwischen Wildtypen und Knockouts (* p < 0,05).

3.6 CX_3CR1 -heterozygote OSE-Mäuse zeigen in der chronischen Krankheitsphase signifikant ausgeprägtere spinale Demyelinisierungen

Der Anteil der Läsionsfläche an der weißen Substanz betrug bei OSE $CX_3CR1^{+/+}$ -Mäusen in der chronischen Krankheitsphase im Mittel 15,4 %. Dieser lag bei OSE $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ um 9,5 % niedriger. Bei OSE $CX_3CR1^{+/GFP}$ war der Mittelwert mit 23,7 % am größten. Die globale Varianzanalyse (einfaktorielle Varianzanalyse) ergab eine Signifikanz mit einem p-Wert von 0,0142. Im multiplen Mittelwertsvergleich nach Tukey bestand ein signifikanter Unterschied zwischen OSE $CX_3CR1^{+/GFP}$ - und OSE $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ -Mäusen.

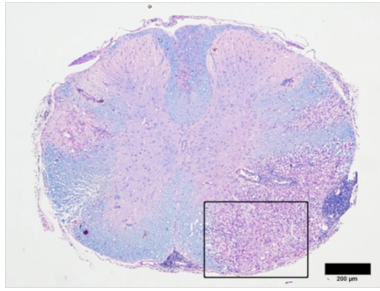
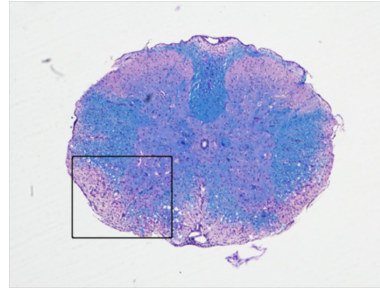
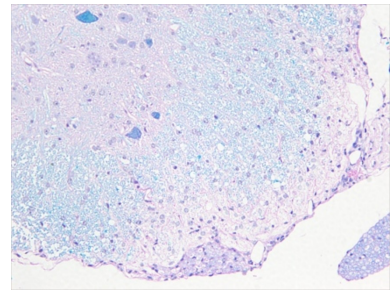
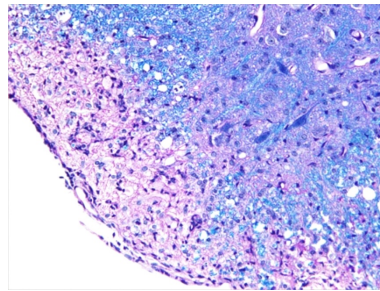
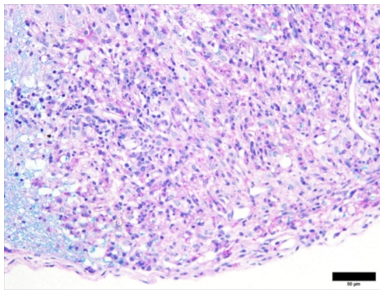
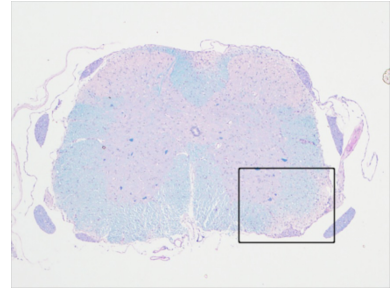
OSE CX₃CR1^{+/+}OSE CX₃CR1^{+/GFP}OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}

Abbildung 3: Histologische Färbung (LFB/ PAS) demyelinisierter Areale im Bereich der weißen Substanz des Rückenmarks in der chronischen Krankheitsphase (vierte bis fünfte Erkrankungswoche). Das Myelin kommt in blauer Färbung zur Darstellung, graue Substanz und demyelinisierte Areale sind violett gefärbt. Die obere Bildreihe zeigt Rückenmarksschnitte der drei Genotypen im Überblick, die untere Reihe stellt demyelinisierte Areale vergrößert dar. *Schwarzer Balken der oberen Reihe entspricht 200 μ m, schwarzer Balken der unteren Reihe entspricht 50 μ m.*

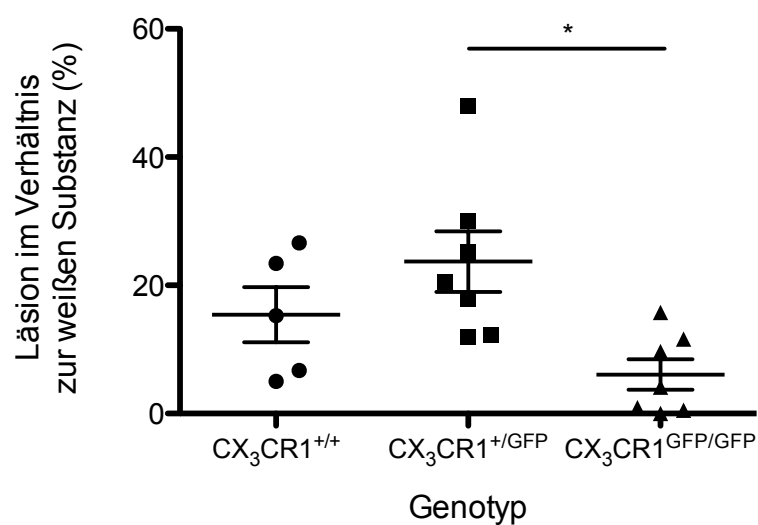


Abbildung 4: Anteil der Läsionsfläche an der weißen Substanz des Rückenmarks bei den drei CX₃CR1-Genotypen zum Zeitpunkt der chronischen Krankheitsphase. Die in der LFB-PAS-Färbung zur Darstellung gekommenen demyelinisierten Areale wurden vermessen und

ins Verhältnis zur gesamten Fläche der weißen Substanz gesetzt (OSE CX₃CR1^{+/+} n=5, OSE CX₃CR1^{+/GFP} n=7, OSE CX₃CR1^{GFP/GFP} n=7). Bei OSE CX₃CR1^{+/+} und OSE CX₃CR1^{+/GFP} Tieren lagen die Mittelwerte bei 15,4 % und 23,7 %. Bei den OSE CX₃CR1^{GFP/GFP} Tieren war dieser mit 6,1 % am niedrigsten. Es ergab sich bei einem p-Wert von 0,0142 Signifikanz in der globalen Varianzanalyse (ANOVA). Im multiplen Mittelwertsvergleich nach Tukey zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen heterozygoten und Knockout-Tieren (* p < 0,05).

3.7 Kein signifikanter Unterschied hinsichtlich spinaler axonaler Schädigung in akuter und chronischer Krankheitsphase

Zur Quantifizierung des axonalen Schadens in der chronischen Krankheitsphase wurde das Verhältnis der Quotienten aus Axonen pro Kreuzungspunkte des Zählgitters in Läsionen und nicht betroffener weißer Substanz gebildet. Dieses betrug in der OSE CX₃CR1^{+/+}-Gruppe 24,3 %. Bei OSE CX₃CR1^{+/GFP}-Tieren lag es bei 7,5 % und bei den OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}-Mäusen bei 13 %. Diese Werte erreichten in der globalen Varianzanalyse mit einem p-Wert von 0,723 nicht das Signifikanzniveau.

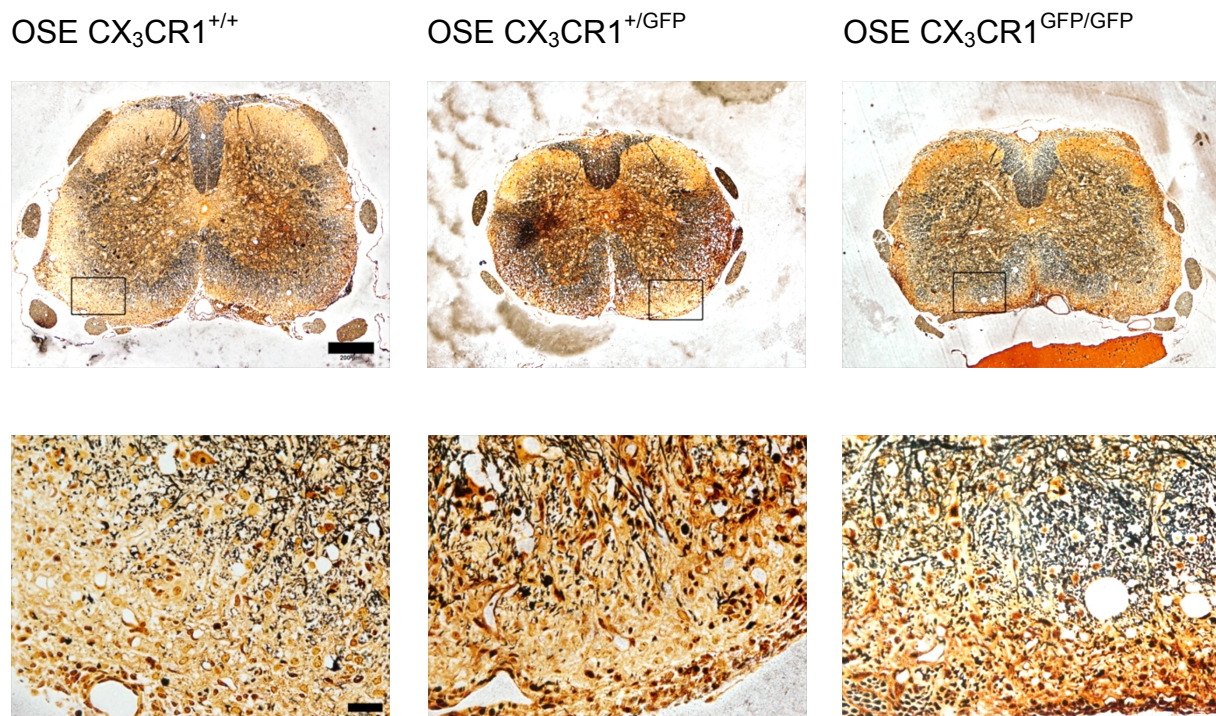


Abbildung 7: Histologische Färbung einer axonalen Schädigung (Bielschowsky-Färbung) in der chronischen Krankheitsphase. Axone stellen sich schwarz und Myelin hellbraun dar. Die obere Bildreihe zeigt Rückenmarksschnitte der drei CX₃CR1-Genotypen im Überblick, die untere Reihe stellt Läsionen mit Axonverlusten vergrößert dar. *Schwarzer Balken der oberen Reihe entspricht 200 µm, schwarzer Balken der unteren Reihe entspricht 20 µm.*

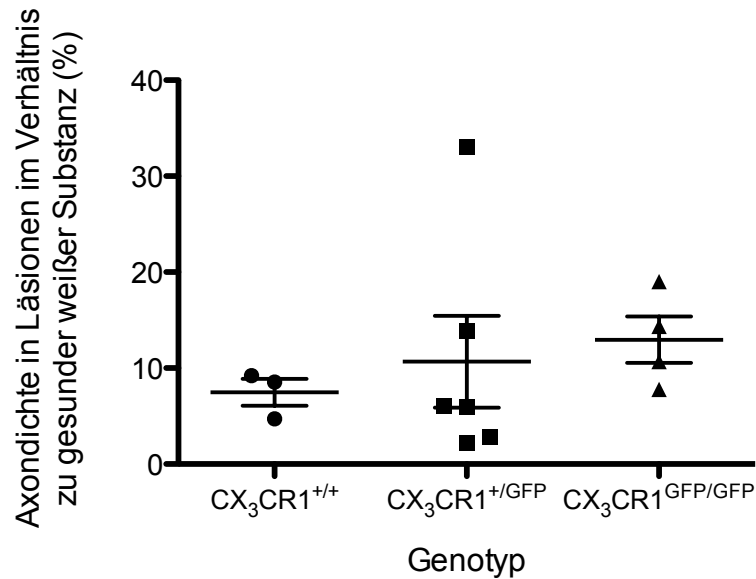


Abbildung 8: Axondichte in Läsionen im Verhältnis zur Axondichte in gesunder weißer Substanz. Die in der LFP-PAS-Färbung identifizierten entzündlichen Areale wurden in der Bielschowsky-Färbung erneut aufgesucht. Mithilfe eines Axonzählgitters wurde die Axondichte in diesen Arealen bestimmt. Gleiches erfolgte für die Axondichte in gesunder weißer Substanz (OSE $CX_3CR1^{+/+}$ $n=3$, OSE $CX_3CR1^{+/GFP}$ $n=6$, OSE $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ $n=4$). In den drei Gruppen Wildtyp, Heterozygot und Knockout lagen die Mittelwerte bei 7,5 %, 10,7 % und 13 %. In der globalen Varianzanalyse (ANOVA) ergab sich mit einem p-Wert von 0,723 keine Signifikanz.

Als Parameter für eine axonale Schädigung in der akuten Krankheitsphase diente die Anzahl APP-positiver Sphäroide. Der Mittelwert lag in der OSE $CX_3CR1^{+/+}$ -Gruppe bei 2211 /mm². Dieser war bei den OSE $CX_3CR1^{+/GFP}$ -Mäusen mit 1348 /mm² kleiner und in der OSE $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ -Gruppe mit einem Mittelwert von 2283 /mm² geringfügig größer. Mit einem p-Wert 0,1194 war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant.

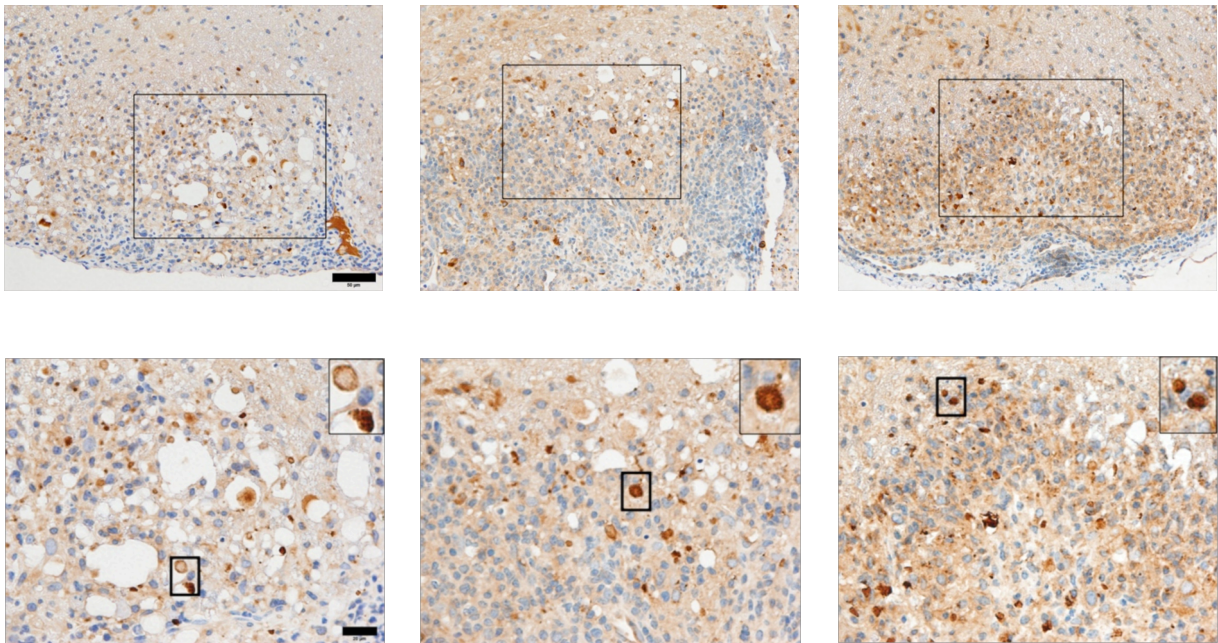
OSE CX₃CR1^{+/+}OSE CX₃CR1^{+/GFP}OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}

Abbildung 9: Immunhistochemische Färbung APP-positiver Sphäroide (APP-Färbung) in der akuten Krankheitsphasen. APP ist ein Protein, das in Axonen antegrad transportiert wird, und im Fall einer axonalen Schädigung zu Sphäroiden aufstaut. Diese kommen in der immunhistochemischen Färbung dunkelbraun gefärbt zur Darstellung. Die obere Bildreihe zeigt Rückenmarksschnitte der drei Genotypen im Überblick, die untere Reihe stellt entzündliche Areale vergrößert dar. Schwarzer Balken der oberen Reihe entspricht 50 μ m, schwarzer Balken der unteren Reihe entspricht 20 μ m (Insets: Vergrößerung um 200 %).

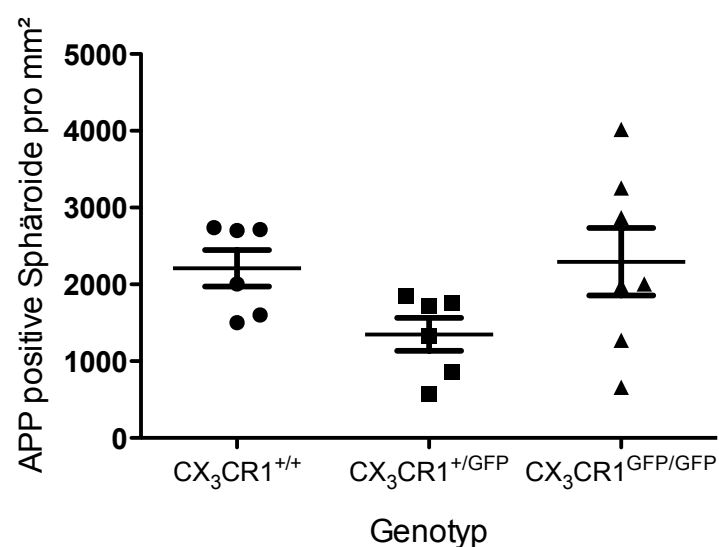


Abbildung 10: APP-positive Sphäroide pro mm² als Hinweis auf einen axonalen Schaden in den drei Genotypen zum Zeitpunkt der akuten Krankheitsphase. APP-positive Sphäroide wurden in entzündlichen Läsionen des Rückenmarks aufgesucht und deren Anzahl im

Zählgitter bestimmt (OSE CX₃CR1^{+/+} n=6, OSE CX₃CR1^{+/GFP} n=6, OSE CX₃CR1^{GFP/GFP} n=7). Der ermittelte Mittelwert lag mit 1348 /mm² bei den Heterozygoten am niedrigsten. Bei den Wildtypen und Knockouts lagen diese bei 2211 /mm² und 2283 /mm². In der globalen Varianzanalyse (ANOVA) bestand mit einem p-Wert von 0,1194 keine Signifikanz.

3.8 CX₃CR1-defiziente OSE-Mäuse weisen in der akuten Krankheitsphase spinal eine geringere neuronale Schädigung auf

Eine neuronale Schädigung in Form c-Jun-positiver Neurone ließ sich bei allen drei Genotypen vor allem in der akuten und weniger deutlich auch in der chronischen Krankheitsphase nachweisen. In der akuten Phase war die neuronale Schädigung ausgeprägter in Mäusen der OSE CX₃CR1^{+/+}- und der OSE CX₃CR1^{+/GFP}-Gruppe. Dabei konzentrierte sich die Schädigung auf die Laminae drei bis neun nach Rexed der grauen Substanz. Dieser Unterschied zwischen den Genotypen zeigte sich in geringerer Ausprägung auch in Tieren der chronischen Krankheitsphase.

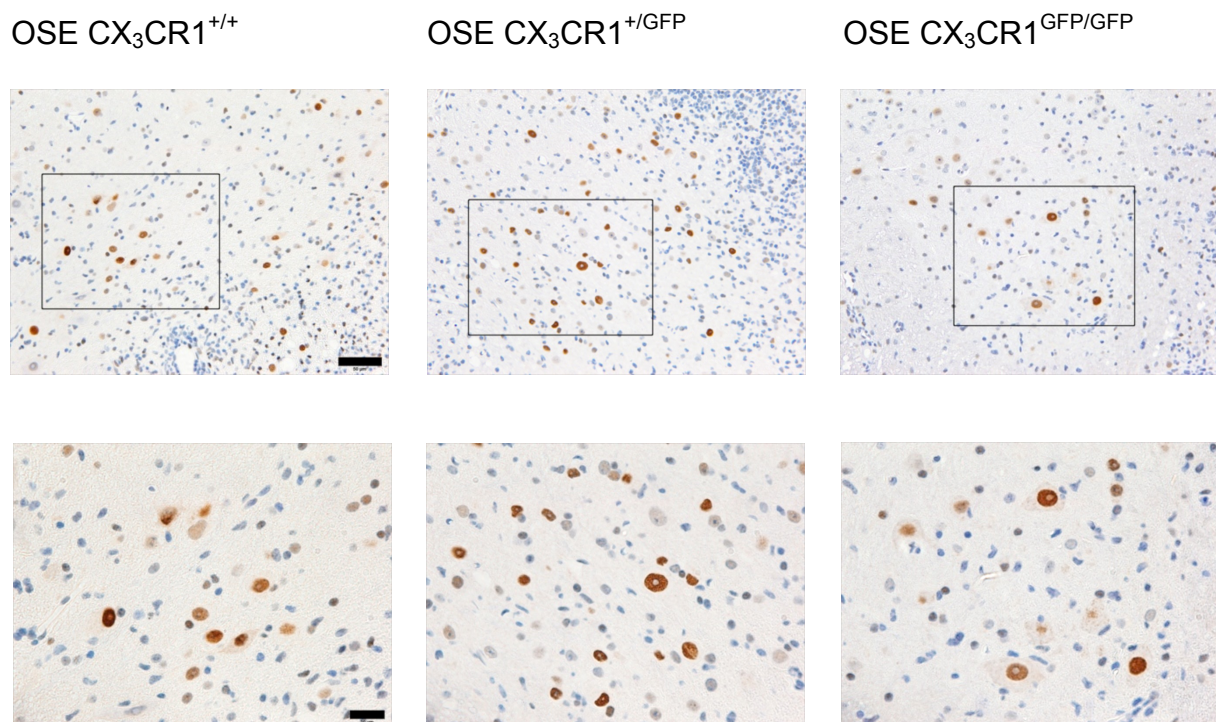


Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung c-Jun-positiver Neurone im Bereich der grauen Substanz des Rückenmarks in der akuten Krankheitsphase (c-Jun-Färbung). In dieser Färbung kommen geschädigte Neurone durch eine braune Färbung des Zellkerns zur Darstellung. Diese wurde für jeden Genotyp semiquantitativ bestimmt (Wildtyp n=6, Heterozygot n=6, Knockout n=7). In der akuten Krankheitsphase ließ sich im Vergleich eine erhöhte neuronale Schädigung in Mäusen des OSE CX₃CR1^{+/+}- und OSE CX₃CR1^{+/GFP}-Typs

nachweisen. Schwarzer Balken der oberen Reihe entspricht 50 μm , schwarzer Balken der unteren Reihe entspricht 20 μm .

3.9 Heterogene Expression inflammatorischer Moleküle in den CX₃CR1-Genotypen

Zur Untersuchung der Entzündung auf molekularer Ebene wurde die RNA-Expression inflammatorischer Moleküle in Tieren der drei CX₃CR1-Genotypen zum Zeitpunkt der akuten Krankheitsphase untersucht. Dabei wurde jeder CT-Wert pro Tier und Molekül zweifach bestimmt und der Mittelwert gebildet. Aus diesem wurde der Delta-CT-Wert ermittelt, der sich aus einer Subtraktion des CT-Wertes des House-Keeping-Gens GAPDH vom genannten Mittelwert errechnete. Der Delta-delta-CT-Wert wurde durch Subtraktion des Delta-CT-Wertes eines gesunden Tieres vom Delta-CT-Wert eines kranken Tieres desselben Genotyps gebildet. Die unten angeführten Werte geben die Höhe der Gen-Expression der erkrankten Tiere gegenüber einem gesunden Tier wieder ($n\text{-fache Expression} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$). Die angegebenen Expressionswerte wurden aus den Delta-delta-CT-Mittelwerten von fünf bis sechs erkrankten Tieren eines Genotyps errechnet.

Mittelwert	OSE CX ₃ CR1 ^{+/+}	OSE CX ₃ CR1 ^{+/GFP}	OSE CX ₃ CR1 ^{GFP/GFP}
IL-1b	19,7	55,72	35,75
IL-4	8,69	19,03	6,28
IL-6	5,13	4,35	13,27
IL-10	52,34	25,63	9,25
IL-17a	14,93	19,16	26,54
Ifn- γ	20,39	16,22	32,22
TNF α	48,5	32,9	24,42
TGF β	4,17	4,41	3,76
CCL5 (Rantes)	52,71	66,26	22,47
CX ₃ CL ₁	13,55	18,51	27,86

Tabelle 22: Höhe der Expression inflammatorischer Moleküle bei OSE CX₃CR1^{+/+}-, OSE CX₃CR1^{+/GFP}- und OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}-Mäusen. Die angegebenen Werte beziffern die n-fache Genexpression kranker Tiere gegenüber einem gesunden Tieres.

Der Vergleich der drei Genotypen zeigte eine erhöhte Expression früher

inflammatorischer Botenstoffe wie IL-1b und IL-6 in OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}-Tieren gegenüber Wildtypen. Auch IL-17a wurde durch Knockout-Tiere vermehrt exprimiert. Dieser Unterschied fand sich jedoch nicht bei TNF-α wieder, das ebenfalls der Akut-Phasereaktion zugerechnet wird. Ifn-γ wird von TH1-Zellen gebildet und aktiviert im Rahmen einer Entzündung Makrophagen. Dessen RNA wurde in OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}-Tieren höher exprimiert als in Mäusen der beiden anderen Genotypen. Im Gegensatz dazu fand sich eine geringere Expression von CCL5 (Rantes) in OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}-Tieren, welches unter anderem seine Aufgabe in der Rekrutierung von Leukozyten zum Ort der Entzündung besitzt. Auch eine deutlich geringere Expression des antiinflammatorischen IL-10, das verschiedene Effekte während einer Entzündung besitzt, konnte in OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}-Tieren nachgewiesen werden. Hinsichtlich des ebenfalls antiinflammatorisch wirkenden TGFβ bestand kein Unterschied zwischen den drei Genotypen.

4 Diskussion

Durch die bei der Erstbeschreibung von CX₃CR1 erwähnte Funktion in der Adhäsion und Migration von Leukozyten rückte zunächst die Rolle des Chemokinrezeptors in der Chemotaxis inflammatorischer Zellen an den Ort einer Entzündung in den Fokus des Interesses [Imai et al. 1997]. Tatsächlich konnte dieser Mechanismus in Tiermodellen wie dem für eine Glomerulonephritis demonstriert werden [Feng et al. 1999]. Andere Studien konnten diesen Effekt nicht beobachten und sahen beispielsweise eine unbeeinträchtigte Monozytenextravasation in einem Peritonitismodell im Falle einer CX₃CR1-Defizienz [Jung et al. 2000]. Welche Rolle CX₃CR1 und sein Ligand Fraktalkin als chemoattraktives Molekül spielen, ist nicht eindeutig geklärt. Eine zweite wichtige Funktion von CX₃CR1 wurde nach Analyse der receptorexprimierenden Zellen in der Interaktion von Neuronen mit Mikroglia innerhalb des ZNS gesehen. Neurone exprimieren den Liganden konstitutiv und unabhängig von einer Entzündung, während sich der Rezeptor auf Mikroglia nachweisen lässt [Schwaeble et al. 1998, Harrison et al. 1998]. In mehreren Tiermodellen neurologischer Erkrankungen zeigten sich eine erhöhte mikrogliale Neurotoxizität und neuronaler Schaden bei CX₃CR1-Defizienz hinweisend auf eine neuroprotektive Wirkung des Chemokins [Cardona et al. 2006], andere wiesen gegenteilige Effekte nach [Dénes et al. 2008]. Zuletzt lenkte der Nachweis des Chemokinrezeptors auf intestinalen Makrophagen und dendritischen Zellen die Aufmerksamkeit auf den Darm, wo CX₃CR1 eine Funktion in der Antigenpräsentation besitzt und eine Rezeptordefizienz einen vermehrten pathogenen Transfer intestinaler Bakterien in mesenteriale Lymphknoten bewirkt [Niess et al. 2005, Medina-Contreras et al. 2011].

4.1 Erhöhte Inzidenz einer spontanen EAE bei CX₃CR1-Defizienz

Die Funktion von CX₃CR1 in der Adhäsion und Migration von Leukozyten wird kontrovers diskutiert. Für den Chemokinrezeptor CCR2 konnte demonstriert werden, dass dieser im Rahmen einer EAE für die Monozytenmigration in das ZNS essentiell ist [Izikson et al. 2000]. Eine CCR2-Defizienz führt zu einer erhöhten Anzahl von Monozyten im Knochenmark und einer verringerten Anzahl von zirkulierenden Monozyten, was auf eine Funktion von CCR2 in der Monozytenmobilisation aus dem

Knochenmark hinweist [Tsou et al. 2007]. Im Falle einer EAE kommt es im Rahmen einer CCR2-Defizienz zu einem verzögerten Erkrankungsbeginn und aufgrund der fehlenden Monozytenmigration zu kompensatorischen Mechanismen wie der vermehrten Einwanderung von Neutrophilen in das ZNS [Gaupp et al. 2003]. Sofern CCR2-defiziente Mäuse und Wildtypkontrollen mit geringen Antigenmengen immunisiert werden, sind CCR2-defiziente Mäuse EAE resistent. In einem spontanen Modell einer EAE konnten wir nun demonstrieren, dass CX₃CR1-defiziente Mäuse mit einer Inzidenz von rund 54 % deutlich häufiger erkrankten als Tiere, die heterozygot oder wildtyp (Inzidenz von circa 32 %) für den Rezeptor waren. Diese Ergebnisse stehen einer Studie von Huang et al. 2006 gegenüber. Sie induzierten eine aktive EAE durch Immunisierung mit dem Peptid MOG₃₅₋₅₅. Es wurde in diesem Modell unabhängig vom Genotyp eine Inzidenz von 100 % beobachtet. Berer et al. 2011 konnten demonstrieren, dass im spontanen EAE-Modell MOG-spezifische autoreaktive CD4⁺-T-Zellen durch die kommensale Darmflora im Bereich der Lamina propria aktiviert werden und Autoantikörper produzierende B-Zellen rekrutieren. CX₃CR1 ist wichtig für den Erhalt der rezeptortragenden Makrophagen in der Lamina propria. Im Falle einer CX₃CR1-Defizienz kommt es zu einem vermehrten Transfer intestinaler Bakterien in mesenteriale Lymphknoten und führt dort zu vermehrter Th17-Antwort [Medina-Contreras et al. 2011]. Ein Erklärungsansatz für die von uns gefundene erhöhte Inzidenz in CX₃CR1^{GFP/GFP}-OSE-Mäusen besteht daher darin, dass durch eine CX₃CR1-Defizienz, die im Darm vor allem die Funktion der Makrophagen in der Lamina propria betrifft, Darmbakterien vermehrt in die Lamina propria gelangen und autoreaktive MOG-spezifische enzephalitogene T-Zellen aktivieren. Im Gegensatz zum CX₃CR1-abhängigen Priming von enzephalitogenen T-Zellen im Darm werden myelinspezifische T-Zellen nach aktiver Immunisierung zunächst in den regionalen Lymphknoten aktiviert und wandern dann nach weiteren Reifungsprozessen ins ZNS ein [Targoni et al. 2001].

4.2 Die CX₃CR1-Defizienz reduziert die Erkrankungsschwere im spontanen EAE-Modell

Klinisch zeigten in unserem Modell OSE CX₃CR1^{+/+}-Mäuse im Falle einer Erkrankung ausgeprägtere Paresen als OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}-Mäuse (Abbildung 2). Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Erkrankungsbeginns und der Art der Klinik (Entwicklung atypischer EAE-Symptome) bestand zwischen den drei

Genotypen nicht. Im Modell der aktiven Immunisierung erkrankten dagegen CX₃CR1^{GFP/GFP} Mäuse mit spastischen Paresen früher und schwerer und hatten eine erhöhte Letalität gegenüber Wildtypen, die lediglich vorübergehende schlaaffe Paresen entwickelten [Huang et al. 2006]. Vergleichbare Ergebnisse lieferten auch Versuche von Garcia et al. 2013 mit MOG_{35–55}-induzierter EAE in CX₃CR1^{GFP/GFP}-Mäusen (C57BL/6J), wobei Unterschiede in der Art der Klinik von diesen nicht beschrieben wurden. Darüber hinaus konnten sie einen schwereren Krankheitsverlauf auch durch adoptiven Transfer von MOG_{35–55} spezifischen T-Zellen in CX₃CR1^{GFP/GFP}-Mäusen beobachten. Histopathologisch fanden wir der Klinik entsprechend in der akuten Krankheitsphase weniger entzündliche Infiltrate in CX₃CR1^{GFP/GFP}-OSE-Mäusen. So waren in den Läsionen und meningeal vor allem Makrophagen und B-Zellen signifikant weniger vertreten. Passend zum geringeren entzündlichen Infiltrat wiesen CX₃CR1^{GFP/GFP}-OSE-Mäuse im akuten Krankheitsstadium auch eine signifikant geringere Demyelinisierung auf.

Bei der histopathologischen Untersuchung aktiv immunisierter Tiere fanden Huang et al. 2006 im chronischen Stadium (Tag 65 nach Immunisierung) eine vermehrte Demyelinisierung in CX₃CR1^{GFP/GFP}-Tieren ohne Angabe einer Lokalisation. Daneben waren spinale Hämorrhagien signifikant häufiger zum Zeitpunkt einer akuten mit MOG-induzierten EAE in CX₃CR1^{GFP/GFP}-Tieren nachweisbar. In einem Fall konnten diese auch im Bereich des Hirnstamms beobachtet werden. Garcia et al. 2013 wiesen immunhistochemisch einen vermehrte cerebralen Verlust von Myelin und Neuronen im akuten Stadium einer EAE bei CX₃CR1^{GFP/GFP}-Tieren nach, wobei eine neuronale Schädigung im Cerebrum im Rahmen einer EAE in C57BL/6-Mäusen untypisch ist. Ein Unterschied zur EAE nach aktiver Immunisierung mit MOG besteht daher in der Lokalisation der Entzündung, finden sich entzündliche Läsionen im spontanen Modell doch hauptsächlich im Nervus opticus und Rückenmark unter Aussparung des Cerebrums. Im akuten Erkrankungsstadium waren die spinalen Läsionen mit Verlust des Myelins im Bereich der weißen Substanz signifikant kleiner in Knockout-Tieren im Vergleich zu Wildtypen. Der von Krishnamoorthy et al. 2006 beschriebene milde axonale Schaden in doppeltransgenen CX₃CR1-Wildtypen ließ sich durch immunhistochemische Färbung APP-positiver Sphäroide als Hinweis auf axonale Schädigung nachvollziehen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Genotypen ergab sich jedoch nicht. Dagegen war durch Färbung cJun-positiver

Neurone eine vermehrte neuronale Schädigung in Wildtypen und Heterozygoten nachweisbar. Hinsichtlich des Vorkommens inflammatorischer Zellen fanden sich bei allen Genotypen B-, T-Zellen und Plasmazellen mehrheitlich im Bereich der Meningen und weniger häufig auch innerhalb der Läsionen, in denen Makrophagen der dominierende Zelltyp waren. Die von Huang et al. 2006 beschriebenen spinalen Hämorrhagien ließen sich nicht nachweisen. Zusammenfassend ist für das akute Stadium festzustellen, dass die histopathologischen Befunde mit einer geringeren Entzündungsaktivität in OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}-Tieren ein entsprechendes Korrelat für die klinischen Befunde liefern. Unsere histopathologischen Befunde bestätigen die vorheriger Studien in CX₃CR1-Wildtypen mit spontaner Entwicklung einer EAE [Bettelli et al. 2006, Krishnamoorthy et al. 2006]. In der chronischen Krankheitsphase war in allen Genotypen eine rückläufige Größe demyelinisierter Läsionen im Bereich der weißen Substanz sichtbar. Ein signifikanter Unterschied bestand hier nur noch zwischen OSE CX₃CR1^{GFP/+}-Mäusen, die stärker als OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}-Tiere betroffen waren. Der ebenfalls in allen Genotypen nachweisbare axonale Schaden lieferte keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich seiner Ausprägung. Bezüglich der entzündlichen Infiltrate zeigte sich das für die akute Phase beschriebene Muster in der chronischen Phase in reduzierter Ausprägung: Lymphozytäre Infiltrate vor allem meningeal und stärker vorhanden in Wildtypen und Heterozygoten. Eine Ausnahme bildeten Plasmazellen, die in der chronischen Phase häufiger nachweisbar waren und sich vor allem bei Wildtypen und Heterozygoten fanden. Auch in der chronischen Krankheitsphase hatten Makrophagen in den Läsionen eine dominierende Rolle. Sie kamen jedoch in deutlich reduzierter Anzahl vor ohne signifikanten Unterschied zwischen den drei Genotypen.

Die histologischen Ergebnisse weisen darauf hin, dass der mildere Krankheitsverlauf im spontanen Modell einer EAE unter anderem auf das deutlich reduzierte Vorkommen Mac3-positiver Makrophagen in der akuten Phase zurückzuführen ist. Dieser Befund würde die These unterstützen, dass auch CX₃CR1 für das Einwandern von Monozyten aus dem Blut in das entzündete ZNS verantwortlich ist. Tatsächlich wurde der Rezeptor auch auf murinen Monozyten des Blutes gefunden. Die pharmakologische Blockierung des Chemokinrezeptors außerhalb des ZNS in MOG-induzierter EAE in Ratten bewirkte einen milderen Krankheitsverlauf und eine geringere Entzündung des ZNS hinweisend auf eine chemoattraktive Wirkung von

CX₃CR1 auf Leukozyten. Insbesondere konnte die Fraktalkin-induzierte Aktivierung von Monozyten des Blutes blockiert werden [Ridderstad Wollberg et al. 2014]. Es konnte ein Subtyp unter den Monozyten definiert werden, der entlang der luminalen Endothelseite von Gefäßen in gesundem Gewebe patrouilliert und eine hohe CX₃CR1-Expression aufweist (Ly6c⁻CCR2^{low}CX₃CR1^{high}). In einem Peritonitismodell verursacht durch *Listeria monocytogenes* konnte gezeigt werden, dass diese residente Monozytenpopulation als Antwort auf einen Gewebeschaden innerhalb einer Stunde in das umliegende Gewebe einwandert und damit eine frühe Immunantwort bildet [Auffray et al. 2007]. Daneben wird diskutiert, ob diese residenten Monozyten eine Funktion in der Gewebeheilung besitzen. Nahrendorf et al. konnten demonstrieren, dass diese Monozyten nach einem Myokardinfarkt die Entzündung mildern und eine Heilung über die Akkumulation von Myofibroblasten, Angiogenese und Ablagerung von Kollagen bewirken [Nahrendorf et al. 2007]. Als zweite Monozytenpopulation wurde ein Subtyp definiert, der eine geringe CX₃CR1-Expression aufweist und einen entzündlichen Herd erst später erreicht (Ly6c⁺CCR2^{high}CX₃CR1^{low}) [Geissmann et al. 2003, Auffray et al. 2007]. Diese können sich zu verschiedenen Subtypen von Makrophagen und dendritischen Zellen entwickeln. Sie sind in der Lage, je nach Art des Reizes und des Pathogens eine Immunantwort zu aktivieren oder zu verhindern [Geissmann et al. 2010].

Die durchflusszytometrische Untersuchung kleiner Gruppen von heterozygoten und Knockout-OSE-Mäusen unterstützten im Wesentlichen die Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung (Daten in dieser Arbeit nicht gezeigt). Hier fanden sich an Tag zwei der Erkrankung in OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}-Tieren signifikant weniger CD45⁺-Leukozyten pro Tier als in OSE CX₃CR1^{GFP/+}-Tieren im ZNS. Es ließen sich bei OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}-Tieren weniger NK-Zellen, Granulozyten und inflammatorische Monozyten pro Tier nachweisen. Im Gegensatz zur histopathologischen Untersuchung fanden sich durchflusszytometrisch auch weniger T-Zellen, was möglicherweise durch den Untersuchungszeitpunkt bedingt ist, da die histopathologische Untersuchung erst an Tag vier erfolgte. Die inflammatorischen Monozyten wiesen eine intermediäre CX₃CR1-Expression auf (CD45⁺ CD11b⁺ Ly6c^{high} CX₃CR1^{int} CCR2⁺). Für die in Mäusen entdeckten Monozytenpopulationen konnten entsprechende Zellen auch im Menschen gefunden werden. So ähneln CD14⁺CD16⁻-Monozyten des Menschen in Morphologie und Rezeptorexpression

den inflammatorischen Gr1⁺ (Ly6c⁺) Monozyten der Maus. Humane CD16⁺CD14^{low}-Monozyten (CX₃CR1^{high}) können den residenten Gr1⁻ (Ly6c⁻) Monozyten der Maus zugeordnet werden [Geissmann et al. 2003]. Makrophagen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der MS und finden sich auch in demyelinisierenden Läsionen von MS-Patienten [Brück et al. 1995]. Im Blut von MS-Patienten konnte beispielsweise eine signifikant geringere Expression von CCR2 und CD14 auf Monozyten nachgewiesen werden [Nakajima et al. 2004]. Eine genaue Beschreibung der Funktion von Monozytensubtypen und von CX₃CR1 auf Monozyten in MS-Patienten ist jedoch Aufgabe der Zukunft.

4.3 Regulation von Th17-Zellen durch CX₃CR1

Garcia et al. 2013 wiesen zu Erkrankungsbeginn bei MOG-induzierter EAE erhöhte Zahlen von IL-17-produzierenden T-Zellen in Milz und Lymphknoten von CX₃CR1^{GFP/GFP}-Mäusen nach. Bereits zuvor wurde eine Verbindung zwischen CX₃CR1-exprimierenden Zellen und einer IL-17-Produktion in einem Kolitis-Modell beschrieben. CX₃CR1 ist auf dendritischen Zellen und Makrophagen der Lamina propria (LP) nachweisbar. Im Falle einer CX₃CR1-Defizienz kommt es zu einem vermehrten Transfer intestinaler Bakterien in mesenteriale Lymphknoten durch dendritische Zellen und in einem Kolitismodell zu einer verstärkten Th17-Anwort mit einem schwereren Krankheitsverlauf als bei Wildtypen [Medina-Contreras et al. 2011]. Möglicherweise bewirkt daher eine vermehrte Aktivierung von T-Zellen mit Th17-Profil im Darm von OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}-Mäusen eine erhöhte Inzidenz einer spontanen EAE. Huber et al. 2013 vermuten eine Bedeutung von IL17-produzierenden CD8⁺-T-Zellen für den Beginn einer EAE. Diese bewirken eine Differenzierung von CD4⁺-T-Zellen in einen pathogenen Th17-Phänotyp. Der Transfer von in vitro differenzierten, myelinspezifischen Th17-Zellen führt zu einer atypischen Klinik (Hemiparese, ataktisches Gangbild), da diese Zellen bevorzugt in Hirnstamm, Cerebellum und Cerebrum einwandern [Rothhammer et al. 2011]. Dementsprechend weisen die in unserem Experiment verwendeten CX₃CR1-defizienten Mäuse eine erhöhte Expression von Interleukin 17a im ZNS im Vergleich zu Wildtypen auf, wobei aufgrund der von uns beobachteten Klinik der Tiere und der histopathologischen Befunde Th17-Zellen nicht der dominierende Zelltyp zu sein scheinen. Dennoch gehen wir aufgrund unserer Befunde davon aus, dass sich im spontanen EAE-Modell die MOG-spezifischen transgenen T-Zellen im Darmtrakt bei

Vorliegen einer CX₃CR1-Defizienz aufgrund der erhöhten Permeabilität für intestinale Bakterien verstärkt in Th17-Zellen differenzieren und zur erhöhten spontanen EAE-Inzidenz führen.

4.4 Ausblick und mögliche Relevanz für die Multiple Sklerose

Im spontanen EAE-Modell erfolgt das Priming enzephalitogener T-Zellen CX₃CR1-abhängig im Darm der Mäuse (Berer et al. 2011). Eine CX₃CR1-Defizienz auf den rezeptortragenden Makrophagen der Lamina propria bewirkt einen vermehrten Transfer intestinaler Bakterien in mesenteriale Lymphknoten und bewirkt dort eine vermehrte kolitogene Th17-Antwort [Medina-Contreras et al. 2011]. Der Nachweis einer Entstehung von enzephalitogenen T-Zellen mit Th17-Profil im Darm CX₃CR1-defizienter Tiere aus naiven T-Zellen steht für das spontane Modell noch aus. Um dies zu demonstrieren, wäre ein weitergehendes Experiment die Kennzeichnung naiver 2D2-transgener T-Zellen mit einem Reporter bspw. mit einem Tandem-Dimer rot fluoreszierenden Protein (tdRFP, Luche et al. 2007). Durch den Transfer dieser gelabelten naiven transgenen 2D2-T-Zellen in OSE CX₃CR1^{GFP/GFP}-Mäuse könnte die Entstehung enzephalitogener T-Zellen mit Th17-Profil demonstriert werden.

Multiple Sklerose ist durch disseminierte Läsionen der weißen Substanz des ZNS gekennzeichnet. Mehrere Studien wiesen aber auch auf eine Beteiligung des cerebralen Kortex hin. Die häufigste kortikale Läsionspathologie stellt dabei die flächige subpiale Demyelinisierung dar [Bö et al. 2007]. Demgegenüber zeigen sowohl die experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis (EAE) als auch das von uns verwendete spontane Modell keine kortikale Beteiligung. Im ZNS scheint eine Schlüsselrolle von CX₃CR1 und seinem Liganden jedoch in der Interaktion von Mikroglia mit Neuronen zu bestehen [Harrison et al. 1998]. Zur Überprüfung der Rolle von CX₃CR1 in der Interaktion von Neuronen mit Mikroglia bedarf es daher eines weiteren Modells mit kortikaler Beteiligung. In einem Ratten-Modell einer kortikalen Multiplen Sklerose konnten bereits durch stereotaktische Injektion inflammatorischer Botenstoffe in den Kortex MOG-immunisierter Tiere demyelinisierende Läsionen im Neokortex hervorgerufen werden [Merkler et al. 2006]. Durch diese Methode könnte in MOG-immunisierten CX₃CR1^{GFP/GFP}-Mäusen die Funktion von CX₃CR1 in der Neuronen-Mikroglia-Interaktion im Rahmen einer cerebralen Inflammation charakterisiert werden.

Eine klinische Bedeutung kommt der Erforschung einer CX₃CR1-Funktion in der Pathogenese der EAE durch die Tatsache zu, dass im menschlichen Genom bislang zwei relevante Polymorphismen des Chemokinrezeptors gefunden wurden. Eine serbische Studie an MS-Patienten konnte bereits zeigen, dass der Haplotyp I249/T280 signifikant seltener in Patienten mit sekundär progredientem Verlauf vorkommt und möglicherweise vor dem Übergang eines schubförmig-remittierenden in einen sekundär progredienten Verlauf schützt. Bezüglich einer Suszeptibilität für eine MS konnte kein Zusammenhang gezeigt werden [Stojković et al. 2012]. Auch in einer türkischen Studie konnten Assoziationen von CX₃CR1-Polymorphismen mit unterschiedlichen Krankheitsverläufen einer MS gefunden werden [Arlı et al. 2013]. Für die Zukunft wären größer angelegte Studien wünschenswert, um die Bedeutung der geschilderten Polymorphismen für die MS besser einschätzen zu können.

5 Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine entzündliche Autoimmunerkrankung des Zentralnervensystems. Die klinisch und pathologisch heterogene Erkrankung wird im Tiermodell am besten durch eine experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis (EAE) abgebildet. Entzündliche Läsionen einer EAE sind neben Lymphozyten durch Monozyten/ Makrophagen gekennzeichnet. Der in dieser Arbeit untersuchte Chemokinrezeptor CX₃CR1 findet sich auf murinen Monozyten des Blutes und wird dort unterschiedlich hoch exprimiert. Im ZNS werden der Rezeptor auf Mikroglia und der Ligand Fraktalkin (CX₃CL1) konstitutiv und somit entzündungsunabhängig auf Neuronen exprimiert. In verschiedenen Tiermodellen neurologischer Erkrankungen wurden unterschiedliche Auswirkungen dieser Interaktion beschrieben.

Die vorliegende Studie untersucht die Fragestellung, ob sich in einem spontanen EAE-Modell CX₃CR1-defiziente OSE-Mäuse von CX₃CR1-kompetenten OSE-Mäusen hinsichtlich spontaner EAE-Inzidenz, Erkrankungsverlauf und Läsionspathologie unterscheiden. CX₃CR1-defiziente OSE-Mäuse zeigen in diesem Modell eine erhöhte Inzidenz (54% vs. 32%), aber einen milderen Krankheitsverlauf gegenüber Rezeptor-Wildtypen. Dem milderen Krankheitsverlauf entsprechend weisen OSE CX₃CR1-defiziente Mäuse histopathologisch in der akuten Phase kleinere demyelinisierte Läsionen der spinalen weißen Substanz und geringere meningeale spinale entzündliche Infiltrate auf mit einer signifikant geringeren Makrophageninfiltration in den Läsionen. In der spinalen grauen Substanz zeigen sie eine mildere neuronale Schädigung. In der chronischen Krankheitsphase findet sich eine reduzierte Infiltration von Entzündungszellen ohne signifikanten Unterschied zwischen OSE CX₃CR1-defizienten Mäusen und Rezeptorwildtypen. Molekularbiologisch zeigen OSE CX₃CR1-defiziente Mäuse eine verstärkte Expression von IL-17a in der akuten Krankheitsphase.

Die erhöhte EAE-Inzidenz in CX₃CR1-defizienten OSE-Mäusen ist am ehesten auf eine vermehrte Generierung von enzephalitogenen 2D2 T-Zellen im Darm in diesem spontanen EAE-Modell zurückzuführen. Der mildere Krankheitsverlauf bei CX₃CR1-defizienten Mäusen weist auf eine Bedeutung von CX₃CR1 in der Migration von Monozyten in das entzündete ZNS hin. Die vorliegende Arbeit ist die Grundlage für

weiterführende Studien, in welchen die Bedeutung der Fraktalkin-CX₃CR1-Interaktion für kortikale Pathologie bei der EAE untersucht werden wird.

6 Literaturverzeichnis

Arlı B, Irkeç C, Menevse S, Yılmaz A, Alp E (2013): Fractalkine gene receptor polymorphism in patients with multiple sclerosis. *Int J Neurosci* 123, 31–37

Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F (2007): Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317, 666–670

Baggiolini M, Dewald B, Moser B (1994): Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 55, 97–179

Baranzini SE (2011): Revealing the genetic basis of multiple sclerosis: are we there yet? *Curr Opin Genet Dev* 21, 317–324

Barnett MH, Prineas JW (2004): Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* 55, 458–468

Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ (1997): A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385, 640–644

Berer K, Mues M, Koutrolos M, Rasbi ZA, Boziki M, Johner C, Wekerle H, Krishnamoorthy G (2011): Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* 479, 538–541

Bernard CC, Carnegie PR (1975): Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: immunologic response to mouse spinal cord and myelin basic proteins. *J Immunol* 114, 1537–1540

Bettelli E, Pagany M, Weiner HL, Linington C, Sobel RA, Kuchroo VK (2003): Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med* 197, 1073–1081

Bettelli E, Baeten D, Jäger A, Sobel RA, Kuchroo VK (2006): Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice. *J Clin Invest* 116, 2393–2402

Boehme SA, Lio FM, Maciejewski-Lenoir D, Bacon KB, Conlon PJ (2000): The chemokine fractalkine inhibits Fas-mediated cell death of brain microglia. *J Immunol* 165, 397–403

Bö L, Geurts JJG, van der Valk P, Polman C, Barkhof F (2007): Lack of correlation between cortical demyelination and white matter pathologic changes in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 64, 76–80

Breij ECW, Brink BP, Veerhuis R, van den Berg C, Vloet R, Yan R, Dijkstra CD, van der Valk P, Bö L (2008): Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis. *Ann Neurol* 63, 16–25

Brück W, Porada P, Poser S, Rieckmann P, Hanefeld F, Kretzschmar HA, Lassmann H (1995): Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 38, 788–796

Calabresi PA, Kieseier BC, Arnold DL, Balcer LJ, Boyko A, Pelletier J, Liu S, Zhu Y, Seddighzadeh A, Hung S et al. (2014): Pegylated interferon β -1a for relapsing-remitting multiple sclerosis (ADVANCE): a randomised, phase 3, double-blind study. *Lancet Neurol* 13, 657–665

Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang D, Kidd G, Dombrowski S, Dutta R et al. (2006): Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci* 9, 917–924

Cepok S, Jacobsen M, Schock S, Omer B, Jaekel S, Bøddeker I, Oertel WH, Sommer N, Hemmer B (2001): Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis. *Brain* 124, 2169–2176

Chataway J, Schuerer N, Alsanousi A, Chan D, MacManus D, Hunter K, Anderson V, Bangham CRM, Clegg S, Nielsen C et al. (2014): Effect of high-dose simvastatin on brain atrophy and disability in secondary progressive multiple sclerosis (MS-STAT): a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet* 383, 2213–2221

Coles AJ, Fox E, Vladic A, Gazda SK, Brinar V, Selmaj KW, Skoromets A, Stolyarov I, Bass A, Sullivan H et al. (2012): Alemtuzumab more effective than interferon β -1a at 5-year follow-up of CAMMS223 clinical trial. *Neurology* 78, 1069–1078

Combadiere C, Gao J, Tiffany HL, Murphy PM (1998): Gene cloning, RNA distribution, and functional expression of mCX3CR1, a mouse chemotactic receptor for the CX3C chemokine fractalkine. *Biochem Biophys Res Commun* 253, 728–732

Compston A, Coles A (2002): Multiple sclerosis. *Lancet* 359, 1221–1231

Confavreux C, Aimard G, Devic M (1980): Course and prognosis of multiple sclerosis assessed by the computerized data processing of 349 patients. *Brain* 103, 281–300

Conradi S, Malzahn U, Schröter F, Paul F, Quill S, Spruth E, Harms L, Then Bergh F, Ditzenbach A, Georgi T et al. (2011): Environmental factors in early childhood are associated with multiple sclerosis: a case-control study. *BMC Neurol* 11, 123

Dénes A, Ferenczi S, Halász J, Környei Z, Kovács KJ (2008): Role of CX3CR1 (fractalkine receptor) in brain damage and inflammation induced by focal cerebral ischemia in mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 1707–1721

Dorner BG, Dorner MB, Zhou X, Opitz C, Mora A, Güttler S, Hutloff A, Mages HW, Ranke K, Schaefer M et al. (2009): Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8⁺ T cells. *Immunity* 31, 823–833

Driscoll BF, Kies MW, Alvord EC (1975): Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis (EAE): prevention of successful transfer by treatment of donors with myelin basic protein. *J Immunol* 114, 291–292

Faure S, Meyer L, Costagliola D, Vaneensberghe C, Genin E, Autran B, Delfraissy JF, McDermott DH, Murphy PM, Debré P et al. (2000): Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. *Science* 287, 2274–2277

Feng L, Chen S, Garcia GE, Xia Y, Siani MA, Botti P, Wilson CB, Harrison JK, Bacon KB (1999): Prevention of crescentic glomerulonephritis by immunoneutralization of the fractalkine receptor CX3CR1 rapid communication. *Kidney Int* 56, 612–620

Flügel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, Li Z, Ellwart JW, Willem M, Lassmann H, Wekerle H (2001): Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 14, 547–560

Gale CR, Martyn CN (1995): Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol* 47, 425–448

Garcia JA, Pino PA, Mizutani M, Cardona SM, Charo IF, Ransohoff RM, Forsthuber TG, Cardona AE (2013): Regulation of adaptive immunity by the fractalkine receptor during autoimmune inflammation. *J Immunol* 191, 1063–1072

Gaupp S, Pitt D, Kuziel WA, Cannella B, Raine CS (2003): Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in CCR2(-/-) mice: susceptibility in multiple strains. *Am J Pathol* 162, 139–150

Geissmann F, Jung S, Littman DR (2003): Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71–82

Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K (2010): Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656–661

Gold R, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Giovannoni G, Selmaj K, Tornatore C, Sweetser MT, Yang M, Sheikh SI et al. (2012): Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 367, 1098–1107

Harrison JK, Jiang Y, Chen S, Xia Y, Maciejewski D, McNamara RK, Streit WJ, Salafranca MN, Adhikari S, Thompson DA et al. (1998): Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 10896–10901

Hein T, Hopfenmüller W (2000): Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany. *Nervenarzt* 71, 288–294

Hogancamp WE, Rodriguez M, Weinshenker BG (1997): The epidemiology of multiple sclerosis. *Mayo Clin Proc* 72, 871–878

Huang D, Shi F-D, Jung S, Pien GC, Wang J, Salazar-Mather TP, He TT, Weaver JT, Ljunggren H-G, Biron CA et al. (2006): The neuronal chemokine CX3CL1/fractalkine selectively recruits NK cells that modify experimental autoimmune encephalomyelitis within the central nervous system. *FASEB J* 20, 896–905

Huber M, Heink S, Pagenstecher A, Reinhard K, Ritter J, Visekruna A, Guralnik A, Bollig N, Jeltsch K, Heinemann C et al. (2013): IL-17A secretion by CD8⁺ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 123, 247–260

Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiyama H, Schall TJ, Yoshie O (1997): Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 91, 521–530

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CCA, Patsopoulos NA, Moutsianas L, Dilthey A, Su Z et al. (2011): Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476, 214–219

Izikson L, Klein RS, Charo IF, Weiner HL, Luster AD (2000): Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2. *J Exp Med* 192, 1075–1080

Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR (2000): Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 20, 4106–4114

Karlmark KR, Zimmermann HW, Roderburg C, Gassler N, Wasmuth HE, Luedde T, Trautwein C, Tacke F (2010): The fractalkine receptor CX₃CR1 protects against liver fibrosis by controlling differentiation and survival of infiltrating hepatic monocytes. *Hepatology* 52, 1769–1782

Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Schall TJ (1994): Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 266, 1395–1399

Koritschoner R, Schweinburg F (1925): Klinische und experimentelle Beobachtungen über Lähmungen nach Wutschutzimpfung. *Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie* 42, 217–283

Koziolk MJ, Kitze B, Mühlhausen J, Müller GA (2013): Immunoabsorption in steroid-refractory multiple sclerosis. *Atheroscler Suppl* 14, 175–178

Krishnamoorthy G, Lassmann H, Wekerle H, Holz A (2006): Spontaneous optico-spinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. *J Clin Invest* 116, 2385–2392

Kurtzke JF (1983): Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33, 1444–1452

Lee YS, Morinaga H, Kim JJ, Lagakos W, Taylor S, Keshwani M, Perkins G, Dong H, Kayali AG, Sweet IR, Olefsky J (2013): The fractalkine/CX3CR1 system regulates β cell function and insulin secretion. *Cell* 153, 413–425

Lindner E, Weger M, Steinwender G, Griesbacher A, Posch U, Ulrich S, Wegscheider B, Ardjomand N, El-Shabrawi Y (2011): IL2RA gene polymorphism rs2104286 A>G seen in multiple sclerosis is associated with intermediate uveitis: possible parallel pathways? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 8295–8299

Litzenburger T, Fässler R, Bauer J, Lassmann H, Linington C, Wekerle H, Iglesias A (1998): B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice. *J Exp Med* 188, 169–180

Liu M, Wang F, Hong W, Wang C, Wang B, Jin L, Hou J, Lei Z (2003): [Distribution of HIV-1 coreceptor CX3CR1 allelic polymorphisms in general population, HIV-1 high-risk group and HIV-1 carriers of Chinese indigenous Han and Uygur people]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 24, 595–598

Lublin FD, Reingold SC (1996): Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46, 907–911

Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, Wolinsky JS, Balcer LJ, Banwell B, Barkhof F et al. (2014): Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* 83, 278–286

Lucchinetti CF, Brueck W, Rodriguez M, Lassmann H (1998): Multiple sclerosis: lessons from neuropathology. *Semin Neurol* 18, 337–349

Lucchinetti CF, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000): Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47, 707–717

Luche H, Weber O, Nageswara Rao T, Blum C, Fehling HJ (2007): Faithful activation of an extra-bright red fluorescent protein in „knock-in“ Cre-reporter mice ideally suited for lineage tracing studies. *Eur J Immunol* 37, 43–53

Łyszkiewicz M, Witzlau K, Pommerencke J, Krueger A (2011): Chemokine receptor CX3CR1 promotes dendritic cell development under steady-state conditions. *Eur J Immunol* 41, 1256–1265

Maciejewski-Lenoir D, Chen S, Feng L, Maki R, Bacon KB (1999): Characterization of fractalkine in rat brain cells: migratory and activation signals for CX3CR-1-expressing microglia. *J Immunol* 163, 1628–1635

Marrie RA (2004): Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol* 3, 709–718

Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG (2004): Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427, 355–360

Medina-Contreras O, Geem D, Laur O, Williams IR, Lira SA, Nusrat A, Parkos CA, Denning TL (2011): CX3CR1 regulates intestinal macrophage homeostasis, bacterial translocation, and colitogenic Th17 responses in mice. *J Clin Invest* 121, 4787–4795

Merkler D, Ernsting T, Kerschensteiner M, Brück W, Stadelmann C (2006): A new focal EAE model of cortical demyelination: multiple sclerosis-like lesions with rapid resolution of inflammation and extensive remyelination. *Brain* 129, 1972–1983

Metz I, Weigand SD, Popescu BFG, Frischer JM, Parisi JE, Guo Y, Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF (2014): Pathologic heterogeneity persists in early active multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 75, 728–738

Meucci O, Fatatis A, Simen AA, Miller RJ (2000): Expression of CX3CR1 chemokine receptors on neurons and their role in neuronal survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 8075–8080

Mionnet C, Buatois V, Kanda A, Milcent V, Fleury S, Lair D, Langelot M, Lacoëuille Y, Hessel E, Coffman R et al. (2010): CX3CR1 is required for airway inflammation by promoting T helper cell survival and maintenance in inflamed lung. *Nat Med* 16, 1305–1312

Mizuno T, Kawanokuchi J, Numata K, Suzumura A (2003): Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system. *Brain Res* 979, 65–70

Moatti D, Faure S, Fumeron F, Amara M el-W, Seknadji P, McDermott DH, Debré P, Aumont MC, Murphy PM, de Prost D, Combadière C (2001): Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease. *Blood* 97, 1925–1928

Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo J-L, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ (2007): The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 204, 3037–3047

Nakajima H, Sugino M, Kimura F, Hanafusa T, Ikemoto T, Shimizu A (2004): Decreased CD14+CCR2+ monocytes in active multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 363, 187–189

Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, Vyas JM, Boes M, Ploegh HL, Fox JG et al. (2005): CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307, 254–258

Nishiyori A, Minami M, Ohtani Y, Takami S, Yamamoto J, Kawaguchi N, Kume T, Akaike A, Satoh M (1998): Localization of fractalkine and CX3CR1 mRNAs in rat brain: does fractalkine play a role in signaling from neuron to microglia? *FEBS Lett* 429, 167–172

O'Connor P, Wolinsky JS, Confavreux C, Comi G, Kappos L, Olsson TP, Benzerdjeb H, Truffinet P, Wang L, Miller A et al. (2011): Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 365, 1293–1303

Olson JK, Croxford JL, Calenoff MA, Dal Canto MC, Miller SD (2001): A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 108, 311–318

Pan Y, Lloyd C, Zhou H, Dolich S, Deeds J, Gonzalo JA, Vath J, Gosselin M, Ma J, Dussault B et al. (1997): Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* 387, 611–617

Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung H-P, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW et al. (2005): Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the „McDonald Criteria“. *Ann Neurol* 58, 840–846

Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A et al. (2006): A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 354, 899–910

Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L et al. (2011): Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69, 292–302

Raport CJ, Schweickart VL, Eddy RL, Shows TB, Gray PW (1995): The orphan G-protein-coupled receptor-encoding gene V28 is closely related to genes for chemokine receptors and is expressed in lymphoid and neural tissues. *Gene* 163, 295–299

Ridderstad Wollberg A, Ericsson-Dahlstrand A, Juréus A, Ekerot P, Simon S, Nilsson M, Wiklund S-J, Berg A-L, Ferm M, Sunnemark D, Johansson R (2014): Pharmacological inhibition of the chemokine receptor CX3CR1 attenuates disease in a chronic-relapsing rat model for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 5409–5414

Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP (1933): OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN MONKEYS. *J Exp Med* 58, 39–53

Rothhammer V, Heink S, Petermann F, Srivastava R, Claussen MC, Hemmer B, Korn T (2011): Th17 lymphocytes traffic to the central nervous system independently of $\alpha 4$ integrin expression during EAE. *J Exp Med* 208, 2465–2476

Sabate J-M, Ameziane N, Lamoril J, Jouet P, Farmachidi J-P, Soulé J-C, Harnois F, Sobhani I, Jian R, Deybach J-C et al. (2008): The V249I polymorphism of the CX3CR1 gene is associated with fibrostenotic disease behavior in patients with Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 20, 748–755

Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GP, Bulman D, Hashimoto L, Paty DW, Hashimoto SA, Warren S, Hader W, Murray TJ (1993): A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Ann Neurol* 33, 281–285

Sadovnick AD, Ebers GC, Dyment DA, Risch NJ (1996): Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group. *Lancet* 347, 1728–1730

Saederup N, Cardona AE, Croft K, Mizutani M, Coteleur AC, Tsou C-L, Ransohoff RM, Charo IF (2010): Selective chemokine receptor usage by central nervous system myeloid cells in CCR2-red fluorescent protein knock-in mice. *PLoS ONE* 5, e13693

Schwaebler WJ, Stover CM, Schall TJ, Dairaghi DJ, Trinder PK, Linington C, Iglesias A, Schubart A, Lynch NJ, Weihe E, Schäfer MK (1998): Neuronal expression of fractalkine in the presence and absence of inflammation. *FEBS Lett* 439, 203–207

Stojković L, Djurić T, Stanković A, Dinčić E, Stančić O, Veljković N, Alavantić D, Zivković M (2012): The association of V249I and T280M fractalkine receptor haplotypes with disease course of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 245, 87–92

Stuart G, Krikorian K (1928): The neuro-paralytic accidents of anti-rabies treatment. *Ann Trop Med Parasitol* 22, 327–377

Sunnemark D, Eltayeb S, Nilsson M, Wallström E, Lassmann H, Olsson T, Berg A-L, Ericsson-Dahlstrand A (2005): CX3CL1 (fractalkine) and CX3CR1 expression in myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis: kinetics and cellular origin. *J Neuroinflammation* 2, 17

Targoni OS, Baus J, Hofstetter HH, Hesse MD, Karulin AY, Boehm BO, Forsthuber TG, Lehmann PV (2001): Frequencies of neuroantigen-specific T cells in the central nervous system versus the immune periphery during the course of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 166, 4757–4764

The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group (1996): Neutralizing antibodies during treatment of multiple sclerosis with interferon beta-1b: experience during the first three years. *Neurology* 47, 889–894

Tsou C-L, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M, Charo IF (2007): Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* 117, 902–909

Tuohy VK, Lu Z, Sobel RA, Laursen RA, Lees MB (1989): Identification of an encephalitogenic determinant of myelin proteolipid protein for SJL mice. *J Immunol* 142, 1523–1527

Vollmer T, Stewart T, Baxter N (2010): Mitoxantrone and cytotoxic drugs' mechanisms of action. *Neurology* 74 Suppl 1, S41–46

Vosoughi R, Freedman MS (2010): Therapy of MS. *Clin Neurol Neurosurg* 112, 365–385

Weinshenker BG, O'Brien PC, Petterson TM, Noseworthy JH, Lucchinetti CF, Dodick DW, Pineda AA, Stevens LN, Rodriguez M (1999): A randomized trial of plasma

exchange in acute central nervous system inflammatory demyelinating disease. *Ann Neurol* 46, 878–886

Whitham RH, Jones RE, Hashim GA, Hoy CM, Wang RY, Vandenbark AA, Offner H (1991): Location of a new encephalitogenic epitope (residues 43 to 64) in proteolipid protein that induces relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in PL/J and (SJL x PL)F1 mice. *J Immunol* 147, 3803–3808

Danksagung

Einige Personen haben mich bei meiner Arbeit unterstützt, denen ich an dieser Stelle danken möchte. Mein Dank geht an erster Stelle an Frau Prof. Dr. med. Stadelmann-Nessler und Herrn Dr. med. Nessler, die diese Arbeit ermöglicht und betreut haben. Für die Einarbeitung in die quantitative PCR möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. med. Junker und Frau Paap bedanken. Mein Dank geht auch an Herrn Dr. rer. nat. Dallenga und Frau Dr. rer. nat. Pfortner, die mich in die histologische Auswertung eingearbeitet haben. Vergessen möchte ich nicht die unermüdliche Unterstützung der medizinisch-technischen Assistentinnen der Neuropathologie. Dafür möchte ich mich an dieser Stelle insbesondere bei Frau Schulz, Frau Brodmerkel, Frau Dettmer und Frau Maruschak ganz herzlich bedanken.