

Aus der Abteilung Neuropathologie  
(Prof. Dr. med. W. Brück)  
im Zentrum Pathologie und Rechtsmedizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Das lymphozytäre Entzündungsinfiltrat in Multiple-Sklerose-Läsionen:  
Immunhistochemische Analyse im Bezug auf immunopathogenetische Subtypen  
und Läsionsaktivitäten

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

vorgelegt von  
Kathrin Wilhelm  
geb. Plünnecke  
aus  
Emden

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Brück

II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Flügel

Tag der mündlichen Prüfung: 04.07.2012

---

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>- 1 -</b>
1.1 Multiple Sklerose (Encephalomyelitis disseminata)	- 1 -
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	- 1 -
1.1.2 Klinik	- 3 -
1.1.3 Diagnosestellung	- 4 -
1.1.4 Therapie	- 5 -
1.1.5 Pathologie	- 6 -
1.1.5.1 Makroskopische Pathologie	- 6 -
1.1.5.2 Histopathologie	- 7 -
1.2 Das Immunsystem	- 10 -
1.2.1 T-Lymphozyten	- 11 -
1.2.1.1 Allgemeine Funktion	- 11 -
1.2.1.2 T-Lymphozyten in der Multiplen Sklerose	- 12 -
1.2.2 B-Lymphozyten und Plasmazellen	- 14 -
1.2.2.1 Allgemeine Funktion	- 14 -
1.2.2.2 B-Lymphozyten und Plasmazellen in der Multiplen Sklerose	- 16 -
1.3 Fragestellung	- 18 -
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>- 19 -</b>
2.1 Material	- 19 -
2.1.1 Ausgewertetes Gewebe	- 19 -
2.1.2 Materialaufbereitung	- 20 -
2.2 Methoden	- 21 -
2.2.1 APAAP-Methode	- 21 -
2.2.2 ABC-Methode	- 23 -
2.2.3 Verwendete Antikörper	- 24 -
2.2.3.1 CD 3	- 24 -
2.2.3.2 CD 8	- 25 -
2.2.3.3 Granzym B	- 25 -
2.2.3.4 CD 20	- 26 -
2.2.3.5 CD 138	- 26 -
2.2.4 Mapping	- 27 -

---

	<b>Seite</b>
2.2.4.1 Standardfärbungen	- 27 -
2.2.4.2 Läsionsaktivitäten	- 28 -
2.2.5 Morphometrie	- 29 -
2.2.6 Statistische Auswertung	- 29 -
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>- 30 -</b>
3.1 Histologische Befunde	- 30 -
3.1.1 Infiltrat frühaktiver Läsionen	- 30 -
3.1.1.1 CD3-positive T-Lymphozyten	- 30 -
3.1.1.2 CD8-positive T-Lymphozyten	- 30 -
3.1.1.3 Granzym-B-positive T-Lymphozyten	- 31 -
3.1.1.4 CD20-positive B-Lymphozyten	- 31 -
3.1.1.5 CD138-positive Plasmazellen	- 31 -
3.1.2 Infiltrat in verschiedenen Läsionsaktivitäten	- 32 -
3.1.2.1 CD3-positive T- Lymphozyten	- 32 -
3.1.2.2 CD8-positive T- Lymphozyten	- 33 -
3.1.2.3 Granzym-B-positive T- Lymphozyten	- 33 -
3.1.2.4 CD20-positive B-Lymphozyten	- 34 -
3.1.2.5 CD138-positive Plasmazellen	- 35 -
3.1.3 Periläsionale weiße Substanz (PPWM)	- 35 -
3.1.3.1 T-Lymphozyten	- 35 -
3.1.3.2 B-Lymphozyten und Plasmazellen	- 37 -
3.1.4 Perivaskuläre Infiltrate	- 38 -
3.1.4.1 T-Lymphozyten	- 38 -
3.1.4.2 B-Lymphozyten und Plasmazellen	- 40 -
3.2 Das lymphozytäre Infiltrat in MS-Biopsien in Bezug auf klinische Charakteristika	- 42 -
3.2.1 Geschlecht	- 42 -
3.2.2 Alter zum Zeitpunkt der Biopsie	- 43 -
3.2.3 OP-Lokalisation und klinische Verläufe bei Biopsie	- 44 -
<b>4 Diskussion</b>	<b>- 46 -</b>
4.1 Das lymphozytäre Infiltrat in MS-Läsionen	- 46 -
4.1.1 T-Lymphozyten	- 46 -

---

	<b>Seite</b>
4.1.2 B-Lymphozyten und Plasmazellen	- 47 -
4.2 Das lymphozytäre Infiltrat in frühaktiven Läsionen	- 48 -
4.2.1 T-Lymphozyten	- 48 -
4.2.2 B-Lymphozyten und Plasmazellen	- 51 -
4.3 Das lymphozytäre Infiltrat in verschiedenen Läsionsaktivitäten	- 53 -
4.3.1 T-Lymphozyten	- 53 -
4.3.2 B-Lymphozyten und Plasmazellen	- 56 -
4.4 Das lymphozytäre Infiltrat in der periläsionalen weißen Substanz	- 59 -
4.5 Das lymphozytäre Infiltrat in MS-Biopsien in Bezug auf klinische Charakteristika	- 60 -
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>- 63 -</b>
<b>6 Anhang</b>	<b>- 65 -</b>
6.1 Tabellen	- 65 -
6.2 Boxplot-Analysen	- 80 -
6.3 Graphische Darstellungen	- 84 -
6.4 Fotos	- 85 -
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>- 91 -</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Multiple Sklerose (Encephalomyelitis disseminata)

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch entzündliche demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS).

Schon 1868 beschrieb Jean M. Charcot im Rahmen von Autopsien einiger Patienten mit Episoden neurologischer Dysfunktion das gehäufte Auftreten inflammatorischer Zellen und zahlreicher gliöser Herde in Gehirn und Rückenmark (Charcot 1868). Von diesen multiplen Entmarkungsherden, welche zur Fasergliose (Sklerose) führen können, rührt auch der Name „sclérose en plaques disseminées“ bzw. „Multiple Sklerose“.

### 1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Heute ist die Multiple Sklerose die häufigste neurologische Erkrankung junger Erwachsener in der wirtschaftlich entwickelten Welt, das Manifestationsalter liegt bei der Mehrzahl der Patienten zwischen dem 20. und dem 40. Lebensjahr (Lowis 1990, Sadovnick und Ebers 1993).

Frauen sind etwa in einem Verhältnis von 2:1 häufiger betroffen als Männer (Lowis 1990, Duquette et al. 1992, Sadovnick und Ebers 1993), die Zahl der Erkrankten weltweit wird auf ca. 2,5 Millionen Menschen geschätzt. In Deutschland sind Hochrechnungen zufolge ca. 122 000 Menschen betroffen (Hein und Hopfenmüller 2000).

Die Erkrankungshäufigkeit ist bei Angehörigen der weißen Rasse im Vergleich zu anderen Rassen erhöht. Prävalenzraten von über 30 pro 100 000 sind besonders in Europa, Nordamerika und Australien zu finden, wohingegen die niedrigsten Prävalenzraten in Japan, China, Sibirien, Zentralafrika und Südamerika zu verzeichnen sind. Somit ist die Erkrankung in Äquatornähe selten und nimmt mit wachsender Entfernung vom Äquator zu (Kurtzke 1985, Martyn und Gale 1997).

Epidemiologische Studien konnten zeigen, dass Migration vor der Pubertät aus einem Land hoher in ein Land niedriger MS-Prävalenz das Risiko einer MS-Erkrankung senkt (Sadovnick und Ebers 1993, Martyn und Gale 1997).

Die Ätiopathogenese der Multiplen Sklerose ist noch nicht vollständig bekannt. In der jüngeren Vergangenheit wurde die MS als T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung angesehen, die zur Destruktion der Myelinscheiden führt. Die Heterogenität der Multiplen Sklerose bezüglich

Klinik, Diagnostik, Pathologie und Therapieansprechen deutet allerdings auf verschiedene Mechanismen in der Pathogenese hin (Lucchinetti et al. 2000).

So scheinen Infektionen als Umweltfaktor eine Rolle zu spielen. Schon 1884 beschrieb Pierre Marie eine Koinzidenz von Multipler Sklerose und Symptomen einer Infektion (Marie 1884). Sibley et al. beobachteten das Auftreten eines klinischen MS-Schubs nach einer Infektionskrankheit (Sibley et al. 1985).

Verschiedene Viren werden in einem möglichen Zusammenhang mit der Multiplen Sklerose beschrieben. Waksman beschrieb ein erhöhtes Risiko einer MS-Erkrankung nach einer Infektion mit Masern-, Mumps- oder Rötelnviren im Alter von 12-15 Jahren (Waksman 1989). Das Humane Herpesvirus 6 (HHV-6) wird ebenfalls als potentieller Auslöser vermutet. Es ist neurotrop und lymphotrop und besitzt eine Kreuzreaktivität mit dem Myelin-basischen Protein (MBP) (Tejada-Simon et al. 2003). Durch die Infektion mit einem Agens, das körpereigenen Strukturen ähnelt, kann es zur Auslösung einer Autoimmunreaktion kommen, diesen Mechanismus bezeichnet man als *molecular mimicry*. Auch das Epstein-Barr-Virus könnte ein auslösender Faktor der Multiplen Sklerose sein (Cepok et al. 2005a).

Große Familien- und Zwillingsstudien lassen außerdem eine genetische Komponente in der Pathogenese der Multiplen Sklerose vermuten. So konnte bei Verwandten ersten Grades, besonders bei Töchtern von erkrankten Müttern, ein höheres Risiko einer MS-Erkrankung beobachtet werden (Sadovnik et al. 1991). Ist ein Elternteil erkrankt, beträgt die Erkrankungswahrscheinlichkeit bei Nachkommen 1,83%, sind beide Eltern erkrankt, steigt das Risiko für die Nachkommen auf 6% (Robertson et al. 1997). Bei einem monozygoten Zwilling eines/einer Erkrankten beträgt das Erkrankungsrisiko 38%, beim dizygoten Zwilling und bei Geschwistern 3-5% und bei Adoptivgeschwistern 0,2% (Sadovnik et al. 1999).

Einige Untersuchungen deuten auch auf eine Assoziation der MS mit verschiedenen HLA-Haplotypen hin. So berichteten Bertram und Kuwert einen Zusammenhang mit den Allelen HLA-A3 und HLA-B7 (Bertram und Kuwert 1982) und Tiwari und Terasaki eben diesen mit HLA-DR2 (Tiwari und Terasaki 1985). Verschiedene Haplotypen scheinen mit verschiedenen Krankheitsverläufen assoziiert zu sein (Hammond et al. 1988).

Neuere Untersuchungen sprechen dafür, dass außer einer T-Zell-vermittelten Autoimmunreaktion auch andere Komponenten des Immunsystems wie Makrophagen, B-Lymphozyten, Plasmazellen

und Autoantikörper in der Pathogenese der Multiplen Sklerose eine Rolle spielen, in den folgenden Kapiteln wird noch näher darauf eingegangen.

### **1.1.2 Klinik**

Die Multiple Sklerose ist eine heterogene Erkrankung. Das Spektrum der Symptome und ihrer Ausprägung ist breit. Häufig lassen sich Sehstörungen/Okulomotorikstörungen, zentrale Paresen, Ataxie, Parästhesien, Blasen- und Mastdarmstörungen sowie psychische Veränderungen und Gedächtnisstörungen feststellen.

Des Weiteren ist auch der Krankheitsverlauf sehr variabel, man unterscheidet folgende Verlaufsformen:

#### - schubförmig-remittierend (RRMS: relapsing-remitting MS):

Ein Schub ist definiert als akutes oder subakutes Auftreten neuer Symptome bzw. einer Verschlechterung bereits bestehender Symptome. Diese können subjektiv berichtet oder objektiv beobachtet sein und müssen mindestens 24 Stunden anhalten (Poser et al. 1983). Häufig beginnt die Erkrankung mit einer isolierten Symptomatik (*clinically isolated syndrome*, CIS).

Anschließend folgt nach einigen Tagen bis Wochen die inkomplette oder auch komplette Remission. Das Intervall zwischen den Schüben kann stark variieren, muss aber mindestens 30 Tage betragen, um als erneuter Schub angesehen zu werden (McDonald et al. 2001). Bei 80% der Patienten beginnt die Erkrankung in dieser Form (Weinshenker 1998).

#### - sekundär chronisch-progredient (SPMS: secondary progressive MS):

Die Erkrankung beginnt schubförmig-remittierend, nach 25 Jahren ist allerdings bei 66 % der Patienten ein Übergang in eine kontinuierlich fortschreitende klinische Verschlechterung erfolgt (Weinshenker et al. 1989).

#### - primär chronisch-progredient (PPMS: primary progressive MS):

10-20 % der Patienten haben keine Schübe, die Erkrankung verläuft von Beginn an schleichend progredient.

Auch hinsichtlich der Ausprägung der Erkrankung lässt sich eine Variabilität beobachten: So spricht man zum einen von einer benignen MS, wenn noch 15 Jahre nach Beginn der Erkrankung

alle neurologischen Systeme voll funktionstüchtig sind (Lublin und Reingold 1996) und die Patienten ohne gravierende Einschränkungen im Alltag aktiv sein können. Bei einem sehr schnell progredienten Verlauf mit schwerwiegender Behinderung oder einem akut tödlichen Verlauf spricht man hingegen von einer malignen MS (Lublin und Reingold 1996).

Außerdem gibt es noch verschiedene Sonderformen der Multiplen Sklerose: Beim Typ Devic (Neuromyelitis optica) kommt es meist doppelseitig zu einer Neuritis nervi optici mit folgender Sehstörung und einer Querschnittslähmung durch eine Myelitis, während Läsionen im Gehirn selten vorkommen. Humorale Mechanismen scheinen in der Pathogenese des Devic-Syndroms eine besondere Rolle zu spielen (Lucchinetti et al. 2002).

Weitere Sonderformen sind der Typ Schilder (Diffuse entzündliche Sklerose), der Typ Baló (Konzentrische Sklerose) und die ADEM (Acute disseminated encephalomyelitis).

In großen Studien wurden prognostische Faktoren ermittelt. So gelten beispielsweise das weibliche Geschlecht, ausschließlich sensible Symptome, ein monosymptomatischer Beginn vor dem 40. Lebensjahr oder eine geringe Schubfrequenz als prognostisch günstig (Weinshenker 1994, Noseworthy et al. 2000). Diese Faktoren lassen allerdings keine exakte individuelle Prognose bei Beginn der Erkrankung zu. Die Aussagekraft des Auftretens oligoklonaler Banden als Hinweis auf intrathekale IgG-Synthese bezüglich der Prognose wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Zeman et al. beschrieben eine günstigere Prognose für Patienten ohne oligoklonale Banden (Zeman et al. 1996), dies konnte von Imrell et al. bezüglich Alter bei Auftreten der Erkrankung, Verlauf und Schweregrad nicht bestätigt werden (Imrell et al. 2006).

### **1.1.3 Diagnosestellung**

Die Diagnosestellung der Multiplen Sklerose stützt sich vor allem auf die klinische Symptomatik, Liquordaten, die Elektrophysiologie und Magnetresonanztomographie (MRT)-Befunde. Die MRT wird zur räumlichen und zeitlichen Erfassung der Läsionen genutzt. Des Weiteren findet man bei über 90% der Patienten oligoklonale Banden, die auf eine intrathekale IgG-Synthese hinweisen. Um eine Fehldiagnose zu vermeiden, sollten alle Symptome und paraklinischen Befunde auf mögliche Differentialdiagnosen überprüft und diese ausgeschlossen werden (Schumacher et al. 1965, McDonald et al. 2001). Bis vor einigen Jahren wurden die Schumacher- und die Poser Kriterien angewandt. Demnach gilt eine MS-Diagnose als gesichert, wenn sich nach zwei Schüben entweder nur klinische oder klinische und paraklinische

Veränderungen auf wenigstens zwei separate Läsionen zurückführen lassen. Hierbei muss ein Schub mindestens 24 Stunden dauern (Poser et al. 1983). Seit 2001 werden nun besonders die international anerkannten McDonald-Kriterien herangezogen, sie beziehen die MRT-Befunde stärker mit ein und scheinen eine höhere Spezifität und Sensibilität zu besitzen als die zuvor genutzten Kriterien (Dalton et al. 2002, CHAMPS Study Group 2002, Barkhof et al. 2003b, Tintoré et al. 2003). Nach den McDonald-Kriterien, die im Jahr 2005 nochmals überarbeitet wurden, kann die Diagnose Multiple Sklerose bei zeitlich und räumlich disseminierten positiven Befunden im MRT des Hirns und/oder des Rückenmarks schon nach einem Schub oder nach einem Jahr Progression gestellt werden, oligoklonale Banden können, müssen aber nicht vorhanden sein (McDonald et al. 2001, Polman et al. 2005).

#### **1.1.4 Therapie**

Da die Ätiopathogenese der Multiplen Sklerose noch nicht vollständig bekannt ist, gibt es derzeit keine kausale Therapie, die zur Heilung führt. Neben der rein symptomatischen Therapie werden verschiedene Therapiestrategien angewendet, die Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG) veröffentlichte 2006 Empfehlungen zur Schubtherapie, Basistherapie und Therapieeskalation (MSTKG 2006).

Die Behandlung eines akuten Schubes besteht aus der kurzfristigen intravenösen Gabe von hochdosierten Kortikosteroiden. So wird eine Pulstherapie von je 500mg-1000mg über 3-5 Tage durchgeführt. Ein langfristiger Einfluss auf den Krankheitsverlauf konnte bisher nicht beobachtet werden, Ziel der Therapie ist die Reduktion des Schweregrades und die schnellere Rückbildung der Symptome des Schubes (Beck 1995, Miller et al. 2000), da Kortikosteroide antiinflammatorisch und stabilisierend auf die Blut-Hirn-Schranke wirken (Pozzilli et al. 2004). Eine weitere Therapieoption bei einem akuten schweren Schub ist die Plasmapherese. Sie kann bei den Patienten nach erfolgloser Therapie mit Kortikosteroiden zu einer Verbesserung der Symptome führen (Weinshenker et al. 1999). Sinn der Plasmapherese ist die Elimination von Antikörpern und Entzündungsmediatoren. So beschrieben Keegan et al. ein signifikantes Ansprechen ausschließlich bei Patienten, die dem Immunsotyp II der Multiplen Sklerose (siehe Kapitel 1.1.5.2, S.7) zugeordnet werden konnten (Keegan et al. 2005).

Die Empfehlung der MSTKG bezüglich der Basistherapie ist die Behandlung mit Interferon  $\beta$  oder Glatirameracetat.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die immunmodulatorische Therapie mit Interferon  $\beta$  sowohl bei schubförmig-remittierendem (The IFNB Multiple Sclerosis Study Group 1993) als auch bei sekundär-progredientem Verlauf (European Study Group on Interferon  $\beta$ -1b in secondary progressive MS 1998) effektiv ist, es reduziert die Schubrate und die Krankheitsaktivität im MRT (UBC MS/MRI Study Group and IFNB Multiple Sclerosis Study Group 1993). Allerdings ist besonders in den ersten beiden Jahren der Behandlung das Risiko der Bildung neutralisierender Antikörper erhöht (Sorensen et al. 2005), so dass bei Therapieversagen oder Unverträglichkeit von Interferon  $\beta$  auch mit Glatirameracetat behandelt werden kann (Vallittu et al. 2005). Mangels ausreichender Studiendaten werden Azathioprin und intravenöse Immunglobuline derzeit nur als Reservepräparate in der Basistherapie von schubförmiger MS angesehen.

Bei fortschreitender Krankheitsaktivität empfiehlt die MSTKG eine immunsuppressive Eskalationstherapie mit Cyclophosphamid oder Mitoxantron. Eine neue Therapieoption ist die Behandlung mit Natalizumab, einem monoklonalen Antikörper gegen  $\alpha$ 4-Integrin. Dieser vermindert die Auswanderung der Lymphozyten und Monozyten über die Blut-Hirn-Schranke in entzündlich verändertes Gewebe. Natalizumab kann als Monotherapie bei schubförmiger MS im Sinne einer Eskalationstherapie angewandt werden, bei mindestens zwei schweren Schüben pro Jahr ist der Einsatz auch als Primärtherapie möglich (MSTKG 2006). Gegenstand der Forschung ist zurzeit die Therapie der schubförmig-remittierenden MS mit Rituximab, einem Antikörper gegen CD 20-positive B-Zellen. Ziel ist die Verminderung der B-Zellen, was sich reduzierend auf die Antikörperproduktion, B-Zell-vermittelte Antigenpräsentation und die Aktivierung von T-Zellen und Makrophagen auswirkt (Duddy und Bar-Or 2006). Rituximab reduziert die Krankheitsaktivität sowohl klinisch als auch im MRT, es liegen jedoch noch keine Langzeitergebnisse vor (Stüve et al. 2005, Hauser et al. 2008).

## **1.1.5 Pathologie**

### **1.1.5.1 Makroskopische Pathologie**

Die Multiple Sklerose ist eine demyelinisierende Erkrankung, die das gesamte ZNS betreffen kann. Durch entzündliche Prozesse kommt es fokal zu einer Schädigung der Markscheiden, ohne die die Nervenleitgeschwindigkeit verzögert ist. Schließlich führt eine Aktivierung und Proliferation der Astrozyten zu einer Glianarbe.

Im Sektionspräparat erscheinen frische Läsionen rötlich, ältere Läsionen hingegen eher gräulich-hyalin. Die Plaques lassen sich in unterschiedlicher Größe und Gestalt beobachten, sie sind häufig mit bloßem Auge zu erkennen, gliotische Narben sind als Verhärtung zu ertasten. Dabei können frische und sklerotische Läsionen unmittelbar nebeneinander auftreten.

Die Entmarkungsherde sind bevorzugt im Bereich der Nervi optici, der periventrikulären weißen Substanz, der Kleinhirnstiele und der Hinterstränge des Rückenmarks lokalisiert.

Durch den Demyelinisierungsprozess kommt es zur Schrumpfung der betroffenen Areale, sodass Gehirn und Rückenmark nach längerer Krankheitsdauer eine zum Teil stark ausgeprägte Atrophie aufweisen.

### **1.1.5.2 Histopathologie**

Wie schon Charcot 1868 beschreibt, ist die Entzündung ein charakteristisches Merkmal der Multiplen Sklerose. Das besonders perivenös gelegene entzündliche Infiltrat besteht v.a. aus Makrophagen, Mikrogliazellen, T-Lymphozyten und einigen B-Zellen und Plasmazellen.

Außerdem ist die Axondestruktion bedeutend (Lassmann 1998), die je nach Grad der Ausprägung zu gravierenden irreversiblen neurologischen Defiziten führen kann und schon bei Krankheitsbeginn auftritt (Trapp et al. 1998). Das Ausmaß des akuten Axonschadens ist größer in aktiv demyelinisierenden Läsionen im Vergleich zu inaktiv demyelinisierenden Läsionen, so dass ein Zusammenhang zwischen Entzündung und Schädigung der Axone anzunehmen ist (Kuhlmann et al. 2002). Der Axonschaden korreliert im Vergleich zur Demyelinisierung besonders mit bleibenden neurologischen Defiziten (Pendlebury et al. 2000).

Weder für die Demyelinisierung noch für die Axonschädigung konnte bisher eine eindeutige Ursache identifiziert werden. In den histologischen Abbildungen 2 und 3 im Anhang stellt sich der Verlust des Myelins und der Axonschaden in der Läsion dar.

In zahlreichen neuropathologischen Untersuchungen von MS-Läsionen zeigte sich neben Demyelinisierung und Axonschaden auch eine Remyelinisierung, die sich im Vergleich zum normalen Myelin durch eine schwächere Anfärbung der dünneren Myelinscheiden darstellt. Die Remyelinisierung läuft meist inkomplett ab, die remyelinisierten Axone sind besonders an der Grenze zur umgebenden weißen Substanz zu finden (Prineas und Connell 1979, Mews et al. 1998).

Die Oligodendrozytendichte innerhalb der Läsion spielt für das Ausmaß der Remyelinisierung eine Rolle (Ozawa et al. 1994, Lucchinetti et al. 1999), allerdings ist die Oligodendrozytenreduktion sehr variabel von komplettem Verlust bis vollständigem Vorliegen (Lucchinetti et al. 1999).

Areale mit einem hohen Grad an Remyelinisierung werden als Markschattenherde (*shadow plaques*) bezeichnet.

Zusätzlich scheinen auch noch andere Faktoren wie autoreaktive Antikörper die Remyelinisierung positiv zu beeinflussen (Rodriguez und Lennon 1990, Asakura et al. 1998). Anzeichen einer Remyelinisierung sind in bis zu 40 % der sklerotischen Plaques zu beobachten (Barkhof et al. 2003a).

Die Heterogenität der Multiplen Sklerose zeigt sich nicht nur in der Klinik, Diagnostik und im Therapieansprechen, sondern auch in der Histopathologie, die sich besonders auf Unterschiede bezüglich Ausmaß der Entzündung, Immunglobulin- und Komplementablagerung und Oligodendrozytenschädigung bezieht.

Derzeit wird diskutiert, ob diese histopathologische Heterogenität auf einen stadien-abhängigen Entwicklungsprozess der Läsion zurückzuführen ist (Barnett und Prineas 2004), oder ob sie als Hinweis auf eine heterogene subtypen-spezifische Pathogenese angesehen werden kann (Lucchinetti et al. 2000, Lucchinetti et al. 2004).

Lucchinetti et al. definieren vier verschiedene Muster, die sogenannten immunpathologischen Muster, der aktiven Entmarkung (Lucchinetti et al. 2000):

**Muster I:** T-Zellen- und Makrophagen- assoziierte Entmarkung

**Muster II:** Antikörper- und Komplement- medierte Entmarkung

**Muster III:** Distale Oligodendrogliopathie

**Muster IV:** Primäre Oligodendrozytendegeneration.

In einer Analyse von 91 Biopsien ließ sich Muster II mit 37% am häufigsten feststellen, gefolgt von Muster I mit 19% und Muster III mit 17%. Muster IV ist sehr selten und konnte in dieser Analyse nicht ermittelt werden (Pittock et al. 2005). Die Charakteristika der verschiedenen immunopathogenetischen Subtypen sollen nun näher erläutert werden:

### Muster I und II

Bei Muster I und II steht die entzündliche Entmarkung im Vordergrund. Die Läsionen lassen sich häufig durch einen Makrophagenwall deutlich von der umgebenden weißen Substanz abgrenzen (den scharfen Übergang von einer Subtyp-II-Läsion zur periläsionalen weißen Substanz (PPWM) zeigt Abbildung 1 im Anhang), das diffuse und perivenös gelegene Infiltrat besteht größtenteils aus T-Lymphozyten und Makrophagen. In Läsionen des Musters II sind allerdings zusätzlich Immunglobulin- und Komplementablagerungen nachzuweisen. Die Oligodendrozytenreduktion ist im Bereich der aktiven Entmarkung unterschiedlich stark ausgeprägt, im Plaquezentrum wurde hingegen eine höhere Anzahl an Oligodendrozyten beobachtet (Storch et al. 1998). Dies wird mit einem stärkeren Ausmaß der Remyelinisierung in Verbindung gebracht (Lucchinetti et al. 2000).

### Muster III und IV

Bei Muster III und IV steht weniger die Entzündungsreaktion, sondern die Schädigung der Oligodendrozyten im Vordergrund. Die Läsionen sind unscharf von der umgebenden weißen Substanz abgegrenzt, Immunglobulin- und Komplementablagerungen lassen sich nicht nachweisen.

Muster III ist durch den Verlust von Oligodendrozyten gekennzeichnet. Die apoptotischen Oligodendrozyten sind besonders an den Grenzen der aktiven Läsionen zur weißen Substanz zu beobachten. Charakteristisch ist der Verlust von Myelin-assoziiertem Glykoprotein (MAG), andere Myelinproteine wie das Proteolipidprotein (PLP), das Myelin-basische Protein (MBP) oder die Myelin 2,3`-zyklische Nukleotid 3`-Phosphodiesterase (CNP) lassen sich in der beschädigten Myelinscheide noch nachweisen. MAG liegt periaxonal und ist somit am weitesten entfernt vom Oligodendrozyten, weshalb Muster III auch als „distale Oligodendrogliopathie“ bezeichnet wird.

Die Demyelinisierung in Muster IV ist vermutlich auf eine metabolische Schädigung der Oligodendrozyten zurückzuführen, daher bezeichnet man diesen Subtyp als „primäre Oligodendrozytendegeneration“. In den Oligodendrozyten liegt zwar eine DNA-Fragmentation vor, ansonsten sind aber keine morphologischen Strukturen der Apoptose wie in Muster III zu beobachten. Die demyelinisierten Areale sind von einem schmalen Saum von weißer Substanz umgeben.

Sowohl in Muster III als auch in Muster IV liegen keine *shadow plaques* und somit kaum Anzeichen einer Remyelinisierung vor (Lucchinetti et al.2000).

In Bezug auf die Histopathologie konnten zwar Unterschiede zwischen verschiedenen MS-Patienten beobachtet, jedoch eine subtypen-spezifische intra-individuelle Homogenität festgestellt werden (Lucchinetti et al. 2000)

MS-Läsionen können in unterschiedliche Aktivitätsstadien eingeteilt werden. Unterschieden wird in aktiv und inaktiv entmarkende Läsionen. Darüberhinaus wird das Ausmaß der De- bzw. Remyelinisierung in „demyelinisiert“, „früh remyelinisierend“ und „spät remyelinisierend“ unterschieden. Grundlage für die Beurteilung der Entmarkungsaktivität ist der Aktivierungszustand der Makrophagen und deren Phagozytose von Myelinproteinen (Brück et al. 1994, Brück et al. 1995, Lucchinetti et al. 1996). In Kapitel 2.2.4 (S.27) wird diese Einteilung noch näher erläutert.

Auch in der periläsionalen weißen Substanz (*periplaque white matter*, PPWM) lässt sich eine diffuse Reaktion auf den entzündlichen Entmarkungsprozess in den Plaques feststellen. Zwar liegt in der PPWM keine Entmarkung vor, aber besonders Lymphozyten sind dort an der Grenze zur aktiven Demyelinisierung zu beobachten (Prineas 1975). Die diffuse Entzündungsreaktion scheint sich in der PPWM langsamer auszubreiten, eine Axonschädigung in Verbindung mit aktivierten Mikrogliazellen wurde jedoch auch hier gefunden (Bjartmar et al. 2001, Kutzelnigg et al. 2005). Außerdem kann eine verminderte Anzahl an Oligodendrozyten in der PPWM vorliegen (Lucchinetti et al. 2000) und auch Plasmazellen konnten in der PPWM identifiziert werden (Prineas und Wright 1978).

## **1.2 Das Immunsystem**

Das Immunsystem setzt sich aus verschiedenen Abwehrmechanismen zusammen, deren Ziel das Erkennen und Abtöten fremder Antigene und somit der Schutz des Organismus vor pathogenen Strukturen wie Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten ist.

Diese verschiedenen Abwehrmechanismen lassen sich in zelluläre und humorale Komponenten unterteilen. Zur humoralen Abwehr gehören u.a. Immunglobuline, Zytokine, Interferone und das Komplementsystem, zelluläre Komponenten sind T- und B-Lymphozyten, natürliche Killerzellen,

Granulozyten und Makrophagen. Die Immunabwehr besteht aus unspezifischen und aus spezifischen Mechanismen. So gehören beispielsweise Makrophagen, natürliche Killerzellen, Granulozyten und das Komplementsystem zur unspezifischen Abwehr. Diese ist schon bei der Geburt voll ausgebildet und bewirkt eine unmittelbare Immunantwort ohne Vorprozessierung des Fremdan Antigens. Zu der spezifischen Abwehr gehören T- und B-Lymphozyten sowie die Immunglobuline. Aufgabe dieses erworbenen Mechanismus ist die präzise Erkennung der fremden Molekülstruktur, Anpassung der Immunantwort und Abspeicherung der gewonnenen Information im immunologischen Gedächtnis. Die verschiedenen Abwehrmechanismen wirken jedoch stets zusammen, als Vermittler dienen u.a. Zytokine und Interferone.

Normalerweise besitzt das Immunsystem die Fähigkeit zwischen körpereigenen und fremden Molekülstrukturen zu unterscheiden. Werden körpereigene Strukturen als fremd erkannt und somit verschiedene Abwehrmechanismen aktiviert, kann dies zu Autoimmunerkrankungen wie der Myasthenia gravis oder der Rheumatoiden Arthritis führen. Diese Autoreaktivität wird auch im Zusammenhang mit der Pathogenese der Multiplen Sklerose diskutiert. Bei der Multiplen Sklerose könnte außerdem das Prinzip des *molecular mimicry* eine Rolle spielen. Nach einer Infektion mit einem Organismus, der Strukturen enthält, die körpereigenen Antigenen ähneln, kann es zu einer Kreuzreaktion und somit zu einer Autoimmunerkrankung kommen (Albert und Inman 1999, Gran et al. 1999).

## **1.2.1 T- Lymphozyten**

### **1.2.1.1 Allgemeine Funktion**

T-Lymphozyten machen den größten Anteil der mononukleären Zellen im Blut aus, sie befinden sich aber auch im Knochenmark und in den sekundären lymphatischen Organen. Auf der einen Seite sind sie ein wichtiger Baustein der spezifischen zellulären Immunreaktion, auf der anderen Seite beeinflussen sie durch Stimulation der B-Lymphozyten auch die humorale Immunreaktion. Nach antigener Stimulation proliferieren die T-Lymphozyten und differenzieren sich zu den T-Effektorzellen. Diese Effektorzellen lassen sich hinsichtlich ihrer Funktion in T-Helferzellen und in zytotoxische T-Zellen unterscheiden: T-Helferzellen treten mit Makrophagen und B-Lymphozyten in Wechselwirkung und lassen sich aufgrund ihres Zytokinmusters in TH1-Helferzellen und TH2-Helferzellen einteilen. TH1-Helferzellen lösen durch Makrophagenaktivierung eine Entzündungsreaktion aus, während TH2-Helferzellen durch

B-Zell-Aktivierung und deren Differenzierung zu Plasmazellen eine Immunglobulinbildung bewirken.

Die zytotoxischen T-Zellen hingegen sind wesentlich an der Zerstörung körperfremder Zielzellen (z.B. virusinfizierte Zellen) beteiligt. Nach Erkennung des Antigens sezernieren die zytotoxischen T-Zellen Enzyme, zum einen membranzerstörende Perforine, zum anderen in die Zielzelle gelangende Proteasen (besonders Granzym B). Dabei können T-Lymphozyten durch Interaktion mit verschiedenen Adhäsionsmolekülen aus den Blutgefäßen ins Gewebe einwandern.

T-Lymphozyten sind nicht in der Lage, unlösliche Antigene zu erkennen, es werden die sogenannten Histokompatibilitätsantigene MHC-I und MHC-II benötigt. Dabei nehmen antigenpräsentierende Zellen (z.B. B-Lymphozyten und Makrophagen der mononukleären phagozytischen Systems) und andere kernhaltige Körperzellen Fremdanigene auf und präsentieren sie in Form von Peptidfragmenten eingebettet in MHC-Proteine. Antigene in Verbindung mit MHC-I-Proteinen werden von zytotoxischen T-Zellen erkannt, MHC-II-Proteine spielen für die Erkennung durch T-Helferzellen eine Rolle.

T-Lymphozyten leiten sich von den lymphoiden Stammzellen des Knochenmarks ab. Die Reifung von den T-Vorläuferzellen zu den verschiedenen T-Subpopulationen erfolgt im Thymus. Dort kommt es neben der Zelloberflächenexpression der T-Zell-Rezeptoren auch zur Expression verschiedener Oberflächenantigene wie den CD (*cluster of differentiation*)-Molekülen. Diese spielen als Unterscheidungsmerkmal der verschiedenen T-Zell-Populationen eine Rolle. Während alle T-Lymphozyten das CD3-Molekül exprimieren, sind T-Helferzellen durch CD4-Moleküle und zytotoxische T-Zellen durch CD8-Oberflächenantigene charakterisiert.

### **1.2.1.2 T- Lymphozyten in der Multiplen Sklerose**

Die Pathogenese der Multiplen Sklerose ist bisher noch nicht vollständig bekannt. Zahlreiche Studien deuten darauf hin, dass u.a. die T-Zell- vermittelte Autoimmunität eine wichtige Rolle spielt. Auch inaktive T-Zellen können die Bluthirnschranke überqueren, sie akkumulieren im Parenchym des ZNS aber erst nach lokaler Erkennung eines Antigens (Flügel et al. 2001). So wird vermutet, dass es sich bei den Antigenen, die eine autoimmune Reaktion bei der MS auslösen, um Bestandteile der Myelinscheide handelt. Glynn und Linington konnten die EAE, das experimentelle Modell der MS, durch Transfer von MBP-oder PLP-spezifischen CD4+-T-Zellen auslösen (Glynn und Linington 1989). Das Zytokinmuster (z.B. Interferon  $\gamma$ ,

Interleukin-2) in aktiv demyelinisierenden Läsionen spricht außerdem für eine Th1-vermittelte Immunreaktion (Merrill 1992, Sørensen et al. 1999), die vermutlich über Makrophagenaktivierung zu einer Zerstörung des Myelins führt. Sun et al. beschrieben MOG-reaktive T-Zellen sowohl im Liquor als auch im Blut (Sun J et al. 1991). Es scheinen jedoch nicht nur CD4-positive T-Zellen, sondern auch andere Subpopulationen der T-Lymphozyten eine Rolle zu spielen. Booss et al. beobachteten in den MS-Läsionen einen zehnfach größeren Anteil an CD8-positiven als an CD4-positiven T-Zellen (Booss et al. 1983) und auch Babbe et al. beschrieben eine klonale Expansion der CD8-positiven T-Zellen (Babbe et al. 2000). Dabei waren CD8-positive Zellen vor allem in aktiv demyelinisierenden Läsionen, CD4-positive Lymphozyten hingegen besonders im perivaskulären entzündlichen Infiltrat zu finden (Babbe et al. 2000). Im Gegensatz zu den beiden genannten Untersuchungen haben Sun et al. keine erhöhte Infiltration von CD8-positiven Zellen im Vergleich zu CD4-positiven Zellen im EAE-Modell gefunden, allerdings bewirken MOG-spezifische zytotoxische T-Zellen eine stärkere Gewebeschädigung und einen höheren Schweregrad der Erkrankung (Sun D et al. 2001). Die durch MBP-spezifische CD8-positive T-Zellen im EAE-Modell ausgelösten Symptome wie z.B. Ataxie oder spastische Lähmung ähneln zudem eher der MS als die CD4-induzierte EAE, die eine aufsteigende schlaffe Lähmung zeigt (Huseby et al. 2001). Außerdem wurden aktivierte zytotoxische T-Zellen in der Nähe von Anhäufungen EBV-infizierter B-Zellen in Gehirn von MS-Patienten gefunden (Serafini et al. 2007) Haring et al. beobachteten bei Mäusen eine von zytotoxischen T-Lymphozyten vermittelte Demyelinisierung nach viraler Infektion (Haring et al. 2002). T-Zellen spielen nicht nur bei der Demyelinisierung eine Rolle, sondern sind auch im Zusammenhang mit der Axonschädigung beschrieben. So bauen zytotoxische T-Lymphozyten, nicht aber CD4-positive T-Zellen, in Zell-Kulturen nach Erkennung des passenden MHC I-Antigens stabile Verbindungen zu Axonen auf und diese Interaktion führt zur Durchtrennung der Axone (Medana et al. 2001). Auch im Hirngewebe von MS-Patienten wurden CD8-positive Zellen nahe der demyelinisierten Axone beobachtet. Innerhalb der aktiv demyelinisierenden Läsionen wurden dabei besonders Granzym B(GrB)-positive zytotoxische T-Lymphozyten in engem Kontakt zu den geschädigten Axonen gefunden, die zytotoxischen Vesikel erschienen polarisiert in Richtung der Axone (Neumann et al. 2002). Der Axonschaden korreliert mit der Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten in der Läsion (Bitsch et al. 2000).

Zudem scheint sich Granzym B besonders toxisch auf Neurone auszuwirken, Astrozyten werden durch Granzym B nicht geschädigt (Wang et al. 2006). Des Weiteren können MBP-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten auch MHC I-exprimierende Oligodendrozyten direkt durch Lyse schädigen (Jurewicz et al. 1998).

Allerdings wird den T-Lymphozyten nicht nur eine schädigende Funktion zugeschrieben.

Madakamutil et al. beschrieben, dass regulatorische CD4-positive und CD8-positive T-Zellen die Apoptose von MBP-spezifischen T-Zellen auslösen können (Madakamutil et al. 2003).

Außerdem wirken T-Lymphozyten auch neuroprotektiv beispielsweise durch Bildung von BDNF (Kerschensteiner et al. 1999) und können Neurone des ZNS nach Schädigung des Axons vor sekundärer Degeneration schützen (Moalem et al. 1999).

Bezüglich der Anzahl der T-Lymphozyten im Blut von MS-Patienten existieren verschiedene Beobachtungen. Skulina et al. fanden eine erhöhte Anzahl von CD8-positiven Zellen, nicht aber von CD4-positiven Zellen, sowohl in MS-Läsionen und im Liquor als auch im Blut. Diese CD8-positiven Klone persistieren teilweise länger als 5 Jahre im Liquor und im Blut, was möglicherweise zu einer Krankheitsprogression führen kann (Skulina et al. 2004).

Killestein et al. beschrieben eine negative Korrelation zwischen Anzahl der CD8-positiven T-Zellen im Blut und der Anzahl der Läsionen im MRT (Killestein et al. 2003).

Berthelot et al. hingegen beobachteten hingegen keinen Unterschied zwischen MS-Patienten und gesunden Personen bezüglich der Anzahl autoreaktiver CD8-positiver T-Zellen im Blut und vermuteten, dass vollständig aktivierte zytotoxische T-Zellen schon früh ins ZNS einwandern (Berthelot et al. 2008). In-vitro-Untersuchungen zeigen einen anderen Aktivierungsgrad der autoreaktiven T-Zellen im Blut von MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Personen (Zhang J et al. 1994, Hellings et al. 2001). T-Zellen von MS-Patienten produzieren vermutlich während eines Schubes mehr pro-inflammatorische Zytokine wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Hollifield et al. 2003).

## **1.2.2 B-Lymphozyten und Plasmazellen**

### **1.2.2.1 Allgemeine Funktion**

B-Lymphozyten sind der kleinere Anteil der mononukleären Zellen im Blut. Der größte Teil der B-Zellen befindet sich im Knochenmark und in den sekundären lymphatischen Organen.

Sie sind einerseits Effektorzellen bei der Eliminierung von Antigenen durch Antikörperproduktion und damit Grundlage der spezifischen humoralen Immunantwort, andererseits sind sie auch antigenpräsentierende Zellen.

B-Lymphozyten exprimieren transmembranöse Immunglobuline (IgM-Monomer und IgD), die als B-Zellrezeptor dienen.

Nach dem Kontakt mit einem Antigen wird eine bestimmte Sorte von B-Zellen (klonale Selektion) aktiviert, denn ein antigenes Epitop wird nur von den B-Zellen erkannt, die über einen passenden Immunglobulinrezeptor verfügen. Diese Zellen proliferieren und differenzieren zum einen zu Plasmazellen, zum anderen zu B-Gedächtniszellen. Die Plasmazellen produzieren und sezernieren antigenspezifische Antikörper. Durch die Bindung des Antikörpers an das pathogene Antigen wird die Phagozytose durch unspezifische Abwehrzellen erleichtert, außerdem wird durch die Antikörper der klassische Weg der Komplementaktivierung eingeleitet und die Ausfällung unlöslicher Immunkomplexe kann ebenfalls zur Inaktivierung des Antigens führen. Von den bei der Differenzierung entstandenen B-Gedächtniszellen werden Informationen über die Struktur des Antigens gespeichert, so dass bei erneutem Antigenkontakt unverzüglich große Mengen von spezifischen Antikörpern gebildet werden können.

Im Gegensatz zu den T-Lymphozyten können B-Zellen über den Immunglobulin-Rezeptor auch komplette Proteine erkennen, es ist keine Vorprozessierung durch antigenpräsentierende Zellen nötig. Die Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen erfolgt allerdings meist erst nach Interaktion mit den T-Helferzellen, denen sie das Antigen über das MHC-II-Molekül präsentieren.

Wird den B-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen, meist dendritische Zellen, ein Antigen angeboten, können sie sich differenzieren und kurzlebige IgM-Antikörper sezernieren, dies auch ohne Interaktion mit den T-Helferzellen (Fayette et al. 1998, Baumgarth 2000).

Auch B-Lymphozyten leiten sich von lymphoiden Stammzellen des Knochenmarks ab. Die Reifung erfolgt sowohl im Knochenmark als auch antigengesteuert in den sekundären lymphatischen Organen. B-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche neben den Immunglobulinen auch verschiedene CD-Antigene. So ist für alle B-Lymphozyten die Expression von CD19 und CD20 charakteristisch. Plasmazellen hingegen exprimieren diese beiden Oberflächenantigene nicht, sondern sind mit der Expression von CD138 assoziiert.

### 1.2.2.2 B-Lymphozyten und Plasmazellen in der Multiplen Sklerose

In den letzten Jahren deuten immer mehr Studien darauf hin, dass neben den T-Zellen auch die B-Zellen, Plasmazellen und Autoantikörper eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Multiplen Sklerose spielen. Schon lange ist bekannt, dass in über 90% der MS-Patienten eine erhöhte intrathekale Immunglobulinsynthese vorliegt (Kabat et al. 1948), die sich in oligoklonalen Banden nachweisen lässt.

Verschiedene Untersuchungen des Liquors von MS-Patienten zeigten eine klonale Expansion von B-Zellen und CD138-positiven Plasmazellen (Colombo et al. 2000, Ritchie et al. 2004), die sich nicht im Blut der Patienten widerspiegelte (Colombo et al. 2000). Colombo et al. beobachteten 2003 B-Zell-Klone im Liquor von Patienten mit schubförmig-remittierender MS und deren Persistenz auch bei sekundär-progressivem Verlauf (Colombo et al. 2003).

In zahlreichen Untersuchungen konnte eine Akkumulation von B-Zell-Klonen nicht nur im Liquor, sondern auch in MS-Läsionen aufgezeigt werden (Qin et al. 1998, Cross et al. 2001, Gilden et al. 2001). Dabei variieren die Angaben zur Anzahl der B-Zellen, Plasmazellen und Antikörper in den Läsionen bezüglich der Läsionsaktivität. Esiri beschrieb eine höhere Anzahl in aktiven Läsionen (Esiri 1977) und auch Gay et al. fanden hypermutierte B-Zell-Klone und Immunglobuline bzw. Immunkomplexe in Zusammenhang mit untergegangenen Myelin besonders in sehr frühen Stadien der Läsionsentwicklung (Gay et al. 1997). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte eine Akkumulation von Plasmazellen in chronischen MS-Läsionen (Prineas und Wright 1978, Mallison et al. 1991) und in der umgebenden weißen Substanz (Prineas und Wright 1978) beobachtet werden und auch Ozawa et al. beschrieben eine erhöhte Anzahl in späten Stadien der Erkrankung (Ozawa et al. 1994).

Die Akkumulation von Plasmazellen in MS-Läsionen erfolgt teilweise unspezifisch, hauptsächlich aber antigengesteuert (Mallison et al. 1991). Das auslösende Antigen in der Pathogenese der Multiplen Sklerose ist allerdings noch nicht eindeutig identifiziert. Warren und Catz beobachteten Autoantikörper gegen MBP und PLP im Liquor (Warren und Catz 1994). In akuten MS-Läsionen wurden Antikörper gegen MOG und MBP gebunden an beschädigtem Myelin gefunden (Genain et al. 1999, Raine et al. 1999) und Gerritse et al. beschrieben MBP-spezifische B- und Plasmazellen im ZNS-Gewebe von MS-Patienten (Gerritse et al. 1994). Außerdem könnte die B-Zell-Antwort in der Multiplen Sklerose auch von vorangegangenen Infektionen ausgelöst werden, da oligoklonales IgG Epstein-Barr-Virus-Proteine binden kann (Rand et al. 2000, Cepok et al. 2005a).

Neben der Antikörperproduktion können auch andere Funktionen der B- und Plasmazellen in der Pathogenese der MS eine Rolle spielen. Wucherpfennig et al. fanden in MS-Läsionen sowohl MBP-spezifische B-Zellen und gleichzeitig T-Zellen spezifisch für MBP-Epitope (Wucherpfennig et al. 1997) und auch die antigenpräsentierende Funktion der B-Zellen ist für die Interaktion von B- und T-Zellen von Bedeutung (Cross et al. 2001). Trotter et al. beschrieben die Opsonisierung von Myelin durch Antikörper und folgende Phagozytose durch Makrophagen in EAE und MS (Trotter et al. 1986).

Verschiedene Untersuchungen deuten auf den Einfluss der B-Zell-Linie auf den Krankheitsverlauf hin. Auf der einen Seite steigern Myelin-spezifische Antikörper den Schweregrad der EAE (Iglesias et al. 2001) und Cepok et al. beschrieben eine mögliche Korrelation zwischen intrathekalen B-Zell-Dominanz und Krankheitsprogression der Multiplen Sklerose (Cepok et al. 2001). Auf der anderen Seite können B-Zellen wie auch T-Zellen BDNF produzieren und somit neuroprotektiv wirken (Kerschensteiner et al. 1999) und es wird ihnen über Produktion von IL-10 eine regulatorische Funktion zugeschrieben (Fillatreau et al. 2002). Des Weiteren steigern Antikörper gegen verschiedene ZNS-Antigene die Remyelinisierung in der EAE (Rodriguez und Lennon 1990).

Die Herkunft von Plasmazellen und autoreaktiven Antikörpern im ZNS ist zurzeit noch Gegenstand der Forschung. Linington et al. zeigten in EAE, dass Antikörper gegen Bestandteile der Myelinscheide und der Oligodendrozyten (MOG) über die zerstörte Blut-Hirn-Schranke ins ZNS gelangen können (Linington et al. 1988). Aber auch B-Zellen können die Blut-Hirn-Schranke überwinden, wenn sie Oberflächenmoleküle exprimieren, die mit Liganden/Rezeptoren der Endothel-Zellen interagieren (Alter et al. 2003). Dies scheint besonders auf die B-Gedächtniszellen zuzutreffen (Niino et al. 2006). B-Zellen können in das ZNS einwandern, dort unter Deposition des spezifischen Antigens akkumulieren und zu Plasmazellen differenzieren (Knopf et al. 1998). In MS-Läsionen wurden Zytokine wie z.B. IL-4 gefunden, die die Differenzierung von B-Zellen fördern (Canella and Raine 1995). Corcione et al. beobachteten in Liquoranalysen von MS-Patienten sämtliche Stadien der B-Zelldifferenzierung (Corcione et al. 2004), so dass vermutlich auch innerhalb des ZNS eine B-Zell-Entwicklung ähnlich der Keimzentrumsreaktion in den sekundären lymphatischen Organen stattfindet.

Lymphfollikel-ähnliche Strukturen in den Meningen von MS-Patienten deuten ebenfalls auf eine B-Zelldifferenzierung innerhalb des ZNS mit lokaler humoraler Immunantwort hin (Serafini et al. 2004). Das Auftreten der Follikel ist begleitet von massiver Infiltration von B-Zellen und

Plasmazellen in der weißen Substanz, teilweise auch als perivaskuläre Cuffs (Magliozzi et al. 2007). Antigengesteuerte B-Zellen wandern in das ZNS ein und finden in den entzündeten Meningen gute Bedingungen für eine Proliferation und Differenzierung zu Plasmazellen vor (Magliozzi et al. 2007). Diese Follikelstrukturen wurden allerdings nur bei Patienten mit sekundär-progressivem Verlauf, nicht aber bei primär-progressivem Verlauf beobachtet und mit früherem Krankheitsbeginn und schwererem Krankheitsverlauf assoziiert (Serafini et al. 2004, Magliozzi et al. 2007).

### **1.3 Fragestellung**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrates humaner MS-Biopsien in Bezug auf T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Plasmazellen untersucht. Wie bereits erwähnt, ist die Multiple Sklerose durch eine ausgeprägte Heterogenität gekennzeichnet, die sich in der Unterteilung in vier Subtypen der aktiven Entmarkung mit vermutlich unterschiedlichen zugrunde liegenden Pathomechanismen (Lucchinetti et al. 2000) widerspiegelt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Überprüfung der Hypothese möglicher subtypenspezifischer Unterschiede mit folgenden Schwerpunkten:

-Analyse der Infiltration von T-Zellen mit dem Pan-T-Zell-Marker CD3 in den verschiedenen Immunsubtypen und Identifikation des Anteils zytotoxischer T- Lymphozyten am Gesamt-T-Zell- Infiltrat mithilfe des immunohistochemischen Markers CD8. Des Weiteren wurde der Anteil Granzym-B-exprimierender T-Zellen am Infiltrat zytotoxischer T- Lymphozyten in den verschiedenen Subtypen analysiert.

-Beurteilung der Infiltration von B-Lymphozyten mithilfe des Pan-B-Zell-Markers CD20 und Identifikation von Plasmazellen mithilfe des immunohistochemischen Markers CD138 in den verschiedenen Subtypen.

Mögliche Unterschiede bezüglich des Anteils von T-, B-Lymphozyten und Plasmazellen am entzündlichen Infiltrat zwischen den verschiedenen Immunsubtypen und Läsionsaktivitäten (s. Kapitel 2.2.4, S.27) wurden untersucht. Die Infiltration der periläsionalen weißen Substanz als Ausdruck einer möglichen pathologischen Veränderung wurde ebenfalls näher betrachtet. Anschließend wurden die histopathologischen Daten mit klinischen Patientendaten korreliert, um einen möglichen Zusammenhang zwischen vermutlich heterogener Pathogenese, Histopathologie und klinischen Charakteristika zu überprüfen.

---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Ausgewertetes Gewebe

Bei dem ausgewerteten Material handelt es sich um humane Hirn- und Rückenmarksbiopsien, die zwischen 1997 und 2005 in verschiedenen neurochirurgischen Zentren im Rahmen der Diagnostik entnommen und zu einer zweiten Beurteilung an die neuropathologische Abteilung der Universität Göttingen unter der Leitung von Prof. Brück gesandt wurden. Bezüglich der verschiedenen Läsionsaktivitäten (siehe Kapitel 2.2.4, S.27) wurden 51 frühaktive und 20 inaktive Fälle untersucht. In 3 Biopsien ausgedehnter Läsionen mit ausreichend großen unterschiedlichen De- und Remyelinisierungsanteilen wurden diese jeweils gesondert ausgewertet. Unabhängig von kleineren Arealen unterschiedlicher De- und Remyelinisierungsgrade wurde sich bei den übrigen Fällen auf den dominierenden Grad fokussiert. Bei einem Patienten lagen Biopsate aus zwei verschiedenen Operationen vor, diese wurden getrennt ausgewertet. Für die untersuchten frühaktiven Fälle lag folgende Verteilung auf die Subtypen vor: 17 Fälle Immunmuster I, 21 Fälle Immunmuster II und 13 Fälle Immunmuster III. Das Immunmuster IV ist sehr selten und bisher nur in Autopsien von Patienten mit PPMS beschrieben worden (Lucchinetti et al. 2000). In Biopsien konnte der Subtyp IV noch nicht identifiziert werden, sodass sich die Überprüfung möglicher Unterschiede auf die Subtypen I-III bezieht. Bezüglich der Läsionsaktivitäten ergab sich folgende Verteilung: 45 frühaktive Fälle ohne Remyelinisierung (EA no RM), 6 frühaktive Fälle mit früher Remyelinisierung (EA ERM), 10 inaktive Fälle ohne Remyelinisierung (IA no RM) und 10 inaktive Fälle mit früher Remyelinisierung (IA ERM).

Die Auswertung CD138-positiver Plasmazellen erfolgte an diesen 71 Fällen, für die anderen verwendeten Marker konnten mangels ausreichenden Gewebes nicht alle 71 Fälle analysiert werden. Für die Auswertung der CD20-positiven B-Zellen konnten 43 frühaktive und 18 inaktive Fälle berücksichtigt werden, für die Marker CD3 und CD8 standen 28 frühaktive und 20 inaktive Fälle zur Verfügung und GrB-positiv T-Zellen konnten in 43 frühaktiven und inaktiven Fällen ausgewertet werden. Eine detaillierte Verteilung in Bezug auf die Subtypen ist im Anhang in Tabelle 1 und eine Verteilung auf die Läsionsaktivitäten ist in Tabelle 2 zu finden.

Neben den Läsionen wurde, soweit vorhanden, auch die umgebende weiße Substanz (PPWM) untersucht. Für die Auswertung der CD138-positiven Plasmazellen standen 29 frühaktive und 7 inaktive Fälle zur Verfügung, für den Marker CD20 lag in 21 frühaktiven und 5 inaktiven Fällen PPWM vor, für die Auswertung von CD3- und CD8-positiven T-Zellen konnten 11 frühaktive und 8 inaktive Fälle berücksichtigt werden und die Analyse von GrB-positiven T-Zellen in der PPWM erfolgt an 24 frühaktiven und 7 inaktiven Fällen. Eine Überprüfung von Unterschieden wurde aufgrund zu kleiner Fallzahlen nur zwischen allen frühaktiven und allen inaktiven Fällen durchgeführt. Die Verteilung der Fallzahlen der PPWM auf die Subtypen frühaktiver Läsionen und auf die inaktiven Läsionen zeigt Tabelle 3 im Anhang.

Ließen sich in dem untersuchten Gewebe auch Gefäße identifizieren, so wurde neben der Infiltration des Parenchyms auch die Anzahl der T-Zellen, B-Zellen und Plasmazellen in direkter Nachbarschaft zu den Gefäßen getrennt untersucht. Ausgewertet wurden dabei die Zellen, die das Gefäßendothel durchwandert hatten, intraluminale Zellen wurden nicht berücksichtigt. Abbildung 4 im Anhang zeigt ein perivaskuläres Infiltrat CD8-positiver T-Lymphozyten.

### **2.1.2 Materialaufbereitung**

Die im Rahmen der Aufbereitung der Biopsien und der immunhistochemischen Färbungen verwendeten Materialien und Antikörper sind der Tabelle 4 und 5 im Anhang zu entnehmen.

#### Herstellung von Leerschnitten

Die Proben wurden formalinfixiert und in Paraffin eingebettet zugesandt.

Mit einem Schlittenmikrotom wurden zunächst aus den gehärteten Paraffinblöcken 1-2 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf Silane-beschichtete Objektträger aufgetragen. Anschließend wurden die Schnitte im Wärmeschrank bei 37°C über Nacht getrocknet.

#### Entparaffinierung und Rehydrierung

Vor jeder Färbung erfolgte die Entparaffinisierung der Schnitte im Xylolbad (3x5 min) und die Rehydrierung mit Isopropylalkohol verdünnt mit Aqua dest in absteigender Reihe (99%, 90%, 70%, 50%, je 3 min). Schließlich wurden die Schnitte mit Aqua dest. oder mit Tris-Pufferlösung gespült.

### Demaskierung von Antigenen

Die durch die Fixierung maskierten Antigene mussten vor der Färbung durch thermische Vorbehandlung freigelegt werden. Die Gewebeschnitte wurden in einer Pufferlösung in der Mikrowelle (800 Watt) 3x5 min gekocht. Die Wahl der Pufferlösung hing von den verschiedenen Primärantikörpern ab. So wurde für anti-CD3 und anti-CD8 10mM Citratpuffer (pH 6,0), für anti-CD138 Tris/EDTA-Puffer (pH 8,5-9,0) und für anti-GrB 4mM Tris/HCl- Puffer verwendet. Anschließend wurde mit entionisiertem Wasser vorsichtig gespült.

## **2.2 Methoden**

Immunhistochemische Färbemethoden werden für den mikroskopischen Nachweis von Antigenen auf der Zelloberfläche und im Zellinneren genutzt.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden die APAAP-Methode und die ABC-Methode angewandt. Das Grundprinzip ist das Markieren von Antigenen mithilfe von Antikörpern, Enzymen und Farbsubstraten (Chromogenen).

Die Gewebereaktion wurde anhand von Positiv- und Negativkontrollen überprüft. Als Positivkontrolle diente für CD3, CD8, CD138 und für Granzym B Gewebe eines T-Zell-Lymphoms und für CD20 lymphatisches Tonsillengewebe. Als Negativkontrolle wurde statt des Primärantikörpers ausschließlich Phosphate Buffered Saline (PBS) aufgetragen. Nach dem Färbvorgang wurden die Schnitte in aufsteigender Isopropylalkohol-Reihe bis 100% dehydriert, in aufsteigenden Xylolkonzentrationen (bis 100%) inkubiert. und schließlich mit dem Eindeckmedium Depex eingedeckt.

Nachfolgend sollen die APAAP-Methode und die ABC-Methode erläutert werden:

### **2.2.1 APAAP-Methode**

#### Prinzip

Die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Methode ist eine indirekte Nachweismethode und nutzt eine Farbreaktion basierend auf einem präformierten löslichen Enzym-anti-Enzym-Komplex und entsprechenden Antikörpern.

Zuerst wird ein Primärantikörper (Antikörper gegen das zu markierende Antigen) aufgetragen. Dieser wird dann über ein oder zwei Sekundärantikörper mit dem Enzym-anti-Enzymkomplex verbunden. Bei dieser Methode ist wichtig, dass die vor und nach dem jeweiligen

Sekundärantikörper applizierten Antikörper von der gleichen Spezies abstammen, sodass der jeweilige Sekundärantikörper als Brückenantikörper wirken kann.

Als Enzym wird die alkalische Phosphatase verwendet. Diese spaltet durch Hydrolyse Phosphatgruppen von organischen Estern ab, wodurch aus dem fast farblosen Chromogen ein farbiges Endprodukt entsteht.

### Durchführung

Für die Spülgänge zwischen den einzelnen Schritten wurde PBS (Phosphatpuffer 9,55g/l) verwendet.

Nach der Entparaffinierung und der Vorbehandlung wurde der monoklonale Primärantikörper appliziert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Verdünnung variierte zwischen den verschiedenen Primärantikörpern, in Testfärbungen wurde die optimale Antikörperkonzentration ermittelt (siehe Tabelle 6 im Anhang).

Nach dreimaligem Spülen wurde der Sekundärantikörper (Kaninchen-anti-Maus bzw. Kaninchen-anti-Ratte) aufgetragen und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte mehrmaliges Spülen und das Aufbringen des APAAP-Komplexes, der für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Durch dreimaliges Spülen wurde die Inkubation beendet.

### Umsetzung des Chromogens/Gegenfärbung

Als Substrat wurde eine Neufuchsin-Färbelösung verwendet. Das Levamisol der Lösung diente der Unterdrückung der endogenen Alkalische-Phosphatase-Aktivität. Die Schnitte wurden in der Lösung 30 min unter Schütteln inkubiert. Es entwickelte sich unter mikroskopischer Kontrolle aus dem Chromogen ein rotes Reaktionsprodukt, die Reaktion wurde durch Spülen mit Aqua dest. beendet.

Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun-Blau (verdünnt 1:1 mit Aqua bidest) für 30 sec, das Bläuen wurde dann unter fließendem Leitungswasser durchgeführt und somit eine Blaufärbung der Zellkerne erreicht.

## 2.2.2 ABC-Methode

### Prinzip

Die Avidin-Biotin-Complex (ABC)-Methode ist eine indirekte Nachweismethode und baut auf der starken Affinität von Avidin (ein aus Hühnereiweiß isoliertes Glykoprotein) bzw.

Streptavidin (ein Protein des Bakteriums *Streptomyces avidinii*) zu Biotin auf.

Zuerst wird der Primärantikörper aufgetragen. Anschließend folgt ein biotinylierter Sekundärantikörper als Verbindung des Primärantikörpers mit dem danach aufzutragenden präformierten Avidin/Streptavidin-Biotin-Enzym-Komplex. Als Enzym eignet sich die Peroxidase gut, sie ist stabil, bleibt auch bei Kopplung aktiv und ist im Gewebe nur in geringen Mengen enthalten, welche sich leicht mit einem Puffer unterdrücken lässt.

Die Peroxidase überträgt Wasserstoffionen. Diese reduzieren das vorher fast farblose Chromogen zu einem farbigen Endprodukt.

### Durchführung

Für die Spülgänge zwischen den einzelnen Schritten wurde PBS (Phosphatpuffer, 9,55g/l) verwendet.

Nach der Entparaffinierung und der Vorbehandlung wurden die Schnitte zum Blockieren der endogenen Peroxidase 10 min in 3%igem  $H_2O_2$  /PBS (45ml PBS+5ml  $H_2O_2$  30 %ig) inkubiert. Nach mehrmaligem Spülen folgte eine 10-minütige Inkubation mit fetalem Kälberserum (FCS) (10% FCS/PBS (120 $\mu$ l)) zum Blockieren unspezifischer Proteinbindungsstellen. Nach diesem Schritt wurde nicht gespült, sondern sofort der monoklonale Primärantikörper aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Antikörperkonzentration unterschied sich nicht von der APAAP-Methode (siehe Tabelle x). Anschließend wurde der biotinylierte Sekundärantikörper (Verdünnung 1:2000 mit 10%FCS/PBS) im Überschuss aufgebracht und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach mehrmaligem Spülen wurde der Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Verdünnung 1:1000) eingebracht und 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten mehrmalige Spülgänge.

### Reduktion des Chromogens/Gegenfärbung

Als Chromogen wurde 3'-3'-Diaminobenzidin (DAB) (50 mg DAB auf 100 ml PBS mit 32 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) aufgetragen, unter Sicht entwickelte sich nach 2-8 min ein braunes Reaktionsprodukt, die Reaktion wurde dann durch Spülen mit entionisiertem Wasser beendet.

Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun-Blau (verdünnt 1:1 mit Aqua bidest) für 30 sec und anschließendem Spülen mit Aqua dest. Schließlich wurden die Schnitte in HCl-Alkohol (aus 1750ml Iso-Alkohol/ 750ml Aqua dest/ 25ml 25%ige HCL-Lsg.) gedippt, um die Hintergrundreaktion abzuschwächen und das Bläuen der Zellkerne erfolgte dann unter fließendem Leitungswasser (7 min).

### **2.2.3 Verwendete Antikörper**

In diesem Abschnitt werden die verwendeten Antikörper für die Epitope CD3, CD8, Granzym B, CD20 und CD138 zur immunhistochemischen Analyse des entzündlichen Infiltrates näher erläutert.

#### **2.2.3.1 CD 3**

CD 3 ist ein Proteinkomplex, welcher aus 6 Polypeptiden mit unterschiedlichen transmembranen Ketten besteht und zu der Superfamilie der Immunglobuline gehört. Während der Reifung der T-Lymphozyten in der Thymusrinde erscheint CD3 zunächst als intrazytoplasmatischer Bestandteil, später dann als Oberflächenantigen der Thymozyten und wird fortan von allen Subpopulationen der reifen T-Lymphozyten exprimiert (Alberts et al. 2004). Das CD3-Molekül ist eng mit dem T-Zell-Rezeptor assoziiert, es bewirkt nicht die Antigen/MHC-Erkennung per se, sondern ermöglicht die Signaltransduktion nach Stimulation des T-Zellrezeptors durch Fremdartigenkontakt und somit die T-Zellaktivierung. Da das Antigen CD3 bisher nur bei normalen und malignen T-Zellen beobachtet wurde, werden Antikörper gegen CD3 häufig in der Diagnostik von T-Zell-Neoplasien beschrieben (Braylan et al. 2001). Die Abbildungen 5-10 im Anhang zeigen CD3-positive T-Lymphozyten in Läsionen und in der PPWM.

### **2.2.3.2 CD 8**

CD 8 ist ein transmembranes 68 kDa Glykoprotein, welches aus zwei Ketten besteht und ebenfalls zur Superfamilie der Immunglobuline gehört. Während der Reifung der T-Zellen wird das Oberflächenantigen CD8 wie auch CD4 von den Thymozyten exprimiert. Im Gegensatz zu den reifen, CD4-positiven T-Helferzellen bleibt CD8 bei den reifen zytotoxischen T-Lymphozyten und T-Suppressorzellen erhalten. Auch CD8 ist mit dem T-Zellrezeptor assoziiert und hat eine erhöhte Affinität zu den Antigenen, die über den MHC-I- Proteinkomplex präsentiert werden. Es stabilisiert die Bindung zwischen den zytotoxischen T-Lymphozyten und der antigenpräsentierenden Zelle und bewirkt anschließend die Signaltransduktion (Norment et al. 1988, Alberts et al. 2004). Antikörper gegen CD8 sind nützliche Marker zur Identifikation von zytotoxischen und Suppressor-T-Zellen und werden somit besonders in der Diagnostik von Neoplasien dieser Zellen genutzt (Mason et al. 1992). Die Abbildungen 11-16 zeigen CD8- positive zytotoxische T-Lymphozyten in Läsionen und in der PPWM.

### **2.2.3.3 Granzym B**

Granzym B, auch als granzymin- 2 bezeichnet, gehört zu den 5 bekannten humanen Granzymen (Abkürzung für granule enzymes), einer Familie der Serinproteasen. Die Struktur dieses Proteins mit 32 kDa ähnelt der Struktur der Chymotrypsins. Die proapoptotische Funktion des Granzyms B ist ein Bestandteil der Immunabwehr durch zytotoxische T- Lymphozyten und natürliche Killerzellen, die Synthese kann durch Stimulation mit IL-2 gesteigert werden (Liu et al. 1989, Salcedo et al. 1993).

In den genannten Zellen wird Granzym B als Proenzym produziert und in Vesikeln durch Cathepsin C aktiviert (Smyth et al. 1995). Innerhalb der Zielzelle interagiert Granzym B unter Anwesenheit von Perforin (Kagi et al. 1994) mit Schlüsselsubstraten der Apoptose wie den Pro-Caspasen (Martin et al. 1996) und bewirkt rapide DNA-Fragmentation.

Granzym B wird in aktivierten zytotoxischen T-Lymphozyten und in natürlichen Killerzellen (NK) gefunden (Hameed et al. 1988, Krähenbühl et al. 1988). Somit können monoklonale Antikörper wie der in der vorliegenden Arbeit verwendete Clone GrB-7 zur Identifizierung zytotoxischer T- Lymphozyten verwendet werden (Kummer et al. 1993) und zeigen eine punktförmige Reaktivität im Zytoplasma (siehe Abb.17-22 im Anhang). Bisher wurde dieser Antikörper besonders im Zusammenhang mit T- und NK-Zell- Lymphomen beschrieben (Cho et al. 1997).

#### **2.2.3.4 CD 20**

CD 20 ist ein 33-37 kDa nicht-glykosyliertes Phosphoprotein, dessen Transmembranteil viermal die Zellmembran überquert. Es gleicht strukturell einem Ionenkanal und scheint eine Rolle beim transmembranösen Calcium-Strom zu spielen, was auf eine regulierende Funktion bezüglich Proliferation und Differenzierung der B-Zellen hinweisen könnte (Tedder und Engel 1994). Schon während der Reifung der B-Lymphozyten im Knochenmark wird CD20 auf den späten Progenitor-B-Zellen gefunden, wird dann ebenso auf den reifen B-Zellen exprimiert und geht erst nach der Differenzierung zu Plasmazellen verloren (Tedder und Engel 1994). Antikörper gegen CD20 werden besonders zur Identifizierung von Neoplasien, die sich von den B-Zellen ableiten, genutzt (Takami et al. 1989). Die Abbildungen 23-28 im Anhang zeigen CD20-positive B-Lymphozyten in Läsionen und in der PPWM.

#### **2.2.3.5 CD 138**

CD 138, auch als syndecan-1 bezeichnet, ist ein transmembranes Heparansulfatproteoglycan, das aus einem Kernprotein mit 30,5 kDa und verschiedenen Glykosaminoglykanen besteht. CD 138 gehört zu der Familie der Syndecane und ist das meist erforschte der vier bekannten Syndecane. Die Funktionen dieser Zelloberflächenproteoglycane sind vielfältig, so sind die Vermittlung der Adhäsion sowohl zweier Zellen als auch die Adhäsion zwischen Zelle und der extrazellulären Matrix zu nennen. Des Weiteren spielen sie eine Rolle bei der Bindung von Wachstumsfaktoren (Rapraeger 1993). Das Muster der Syndecan- Expression ist spezifisch für unterschiedliche Zellen und ihre verschiedenen Entwicklungsstufen (Bernfield et al. 1992). So wird CD 138 auf reifen Epithelzellen exprimiert (Bernfield et al. 1993, Elenius und Jalkanen 1994), nicht aber auf Endothelzellen und mesenchymalen Zellen (Hayashi et al. 1987). Auch innerhalb des hämatopoetischen Systems ist die Expression von CD 138 beschrieben. So findet man während der Differenzierung der B- Zellen bei B- Vorläuferzellen die Expression von CD 138, diese verliert sich bei zirkulierenden B-Zellen und zeigt sich schließlich wieder bei reifen Plasmazellen (Sanderson et al. 1989). Bisher wurde der immunhistochemische Marker CD 138 besonders im Zusammenhang mit verschiedenen Neoplasien erwähnt. CD 138- Reaktivität wurde beispielsweise beim Multiplen Myelom (Ridley et al. 1993, O`Connell et al. 2004) oder bei epithelialen Neoplasien wie dem

Mammacarcinom, dem Magencarcinom oder dem Bronchialcarcinom (Costes et al. 1999, O'Connell et al. 2004).

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete monoklonale Antikörper Mi15 (Anti-syndecan-1) wurde von Costes et al. 1999 als geeigneter Marker für die Identifizierung und Quantifizierung von normalen und malignen Plasmazellen beschrieben (Costes et al. 1999), die Immunhistochemie zeigt eine deutlich membranöse Reaktivität (siehe Abbildungen 29-34 im Anhang).

#### **2.2.4 Mapping**

Die untersuchten Biopsien wurden besonders im Hinblick auf die Läsionsaktivität beurteilt, da in einer Biopsie Areale unterschiedlicher Aktivität gefunden werden können. Eine Subtypisierung in die Immunmuster ist hier nur für frühaktive Läsionen möglich, daher wurde eine separate Auswertung der frühaktiven und der inaktiven Areale durchgeführt. Berücksichtigt wurde zusätzlich auch der Grad der Remyelinisierung. Zur Identifikation der verschiedenen Läsionsaktivitäten und der umgebenden weißen Substanz (PPWM) wurden verschiedene immunhistochemische Färbungen verwendet und anschließend wurde eine Zeichnung der verschiedenen Areale der jeweiligen Biopsie (Mapping) angefertigt. In 3 Biopsien ausgedehnter Läsionen mit ausreichend großen unterschiedlichen De- und Remyelinisierungsanteilen wurden diese jeweils gesondert ausgewertet. Unabhängig von kleineren Arealen unterschiedlicher De- und Remyelinisierungsgrade wurde sich bei den übrigen Fällen auf den dominierenden Grad fokussiert.

Die verschiedenen Läsionsaktivitäten und die Verwendung der histologischen Färbungen werden im Folgenden näher erläutert.

##### **2.2.4.1 Standardfärbungen**

Die neuropathologischen Standardfärbungen wurden routinemäßig zur Diagnosestellung einer entzündlichen ZNS-Entmarkung durchgeführt. Hämatoxilin-Eosin (HE) und Luxol-Fast-Blue-Period-Schiffsäure (LFB-PAS) erlauben die Beurteilung der Zellmorphologie und des Entmarkungszustandes, die Versilberung nach Bielschowsky ermöglicht die Auswertung der Axone.

#### 2.2.4.2 Läsionsaktivitäten

MS-Läsionen können in unterschiedliche Aktivitätsstadien eingeteilt werden. Grundlage dieser Einteilung ist der Grad der De- bzw. Remyelinisierung und die Analyse der Makrophagenpopulation, die sich besonders auf den Aktivierungszustand der Makrophagen und deren Phagozytose von Myelinproteinen stützt (Brück et al. 1994, Brück et al. 1995, Lucchinetti et al. 1996).

Zum Zweck der Stadieneinteilung wurden neben den Standardfärbungen auch noch folgende Färbungen beurteilt: Makrophagenaktivierungsantigen MRP14, die Myelinproteine Myelin-basisches Protein (MBP), Proteolipidprotein (PLP), Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG), Myelin-Oligodendroglia-Glykoprotein (MOG) und Myelin-2,3'-zyklische Nucleotid 3'-Phosphodiesterase (CNP).

Im Folgenden werden die verschiedenen Aktivitätsstadien erläutert (eine Übersicht bietet Tabelle 6 im Anhang):

Früh aktiv (early active, EA): Diese Läsionen liegen meistens an der Grenze zwischen Plaque und normal erscheinender weißer Substanz. Sie sind charakterisiert durch zahlreiche LFB-positive Makrophagen, die außerdem Abbauprodukte der Myelinproteine MBP, PLP, MAG, MOG und CNP enthalten.

Auch das Auftreten des Makrophagenantigens MRP 14 kennzeichnet die frühaktive Läsion (Brück et al. 1995).

Spät aktiv (late active, LA): Diese Läsionen ähneln den frühaktiven Läsionen, allerdings ist Myelindegradation schon weiter fortgeschritten. Die Makrophagen sind weiterhin LFB-positiv, enthalten Abbauprodukte der Myelinproteine MBP und PLP, jedoch nicht von MAG, MOG und CNP.

Inaktiv demyelinisiert (inactive demyelinating, IA DM): In diesen Läsionen sind weniger Makrophagen zu finden. Diese Makrophagen enthalten leere Vakuolen oder PAS-positive Myelinbestandteile und keine Abbauprodukte der genannten Myelinproteine. Die Läsionen sind vollständig demyelinisiert und zeigen keine Hinweise für eine Remyelinisierung.

Früh remyelinisiert (early remyelinating, ERM): Die Makrophagen enthalten keine oder PAS-positive Myelinabbauprodukte, es kann sich auch eine Immunreaktivität für die Myelinproteine zeigen. Zudem sind Cluster dünner, unregelmäßig konfigurierter neugebildeter Markscheiden als Anzeichen der Remyelinisierung zu finden. Diese kann sowohl in inaktiv entmarkenden als auch bereits in frühaktiv entmarkenden Läsionen ausgeprägt sein (Lucchinetti et al.1999).

Spät remyelinisiert (late remyelinating, LRM): Diese Läsionen sind charakterisiert durch wenig entzündliches Infiltrat, eine Fasergliose und durch ein dichtes Netzwerk dünner Myelinscheiden. Die Myelindichte ist allerdings im Vergleich zur normal erscheinenden weißen Substanz reduziert.

### **2.2.5 Morphometrie**

Die quantitative Auswertung der positiven Zellen erfolgte lichtmikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung (Okular 10x, Objektiv 40x) mittels eines morphometrischen Zählgitters. In einigen Biopsien konnten verschiedene Läsionsaktivitäten gefunden werden. So wurden 10 zufällig gewählte morphometrische Gesichtsfelder pro Läsionsaktivität ausgewertet. Bei Biopsaten mit einer Größe kleiner als 10 Gesichtsfelder wurden mindestens 4 Gesichtsfelder betrachtet. Kleinere Läsionen wurden mangels ausreichender Beurteilbarkeit ausgeschlossen. In den Gesichtsfeldern mit je einer Fläche von 62.500  $\mu\text{m}^2$  wurden CD3-, CD8-, GranzymB-, CD20- und CD138-positive Zellen im Parenchym sowie separat auch positive perivaskuläre Zellen, sogenannte Cuffs, ausgewertet. Des Weiteren wurde soweit vorhanden auch periläsionale weiße Substanz untersucht.

#### Auswertung positiver Zellen

Aus der Anzahl positiver Zellen, sowohl parenchymal als auch perivaskulär, wurde der Mittelwert pro Gesichtsfeld berechnet und dann mit 16 multipliziert, um die mittlere Zelldichte für eine Fläche von 1  $\text{mm}^2$  zu erhalten.

### **2.2.6 Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung der Daten wurde das Statistikprogramm STATISTICA Version 8.0 verwendet. Im Rahmen der Analyse wurden der Kruskal-Wallis-Test und der Mann-Whitney-Test eingesetzt. Dabei wurden Daten mit einem p-Wert  $\leq 0,05$  als signifikant, ab einem p-Wert  $\leq 0,001$  als hochsignifikant gewertet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Histologische Befunde

#### 3.1.1 Infiltrat frühaktiver Läsionen

Die im Rahmen des Mappings (siehe Kapitel 2.2.4, S.27) identifizierten frühaktiven Läsionsareale wurden hinsichtlich ihres lymphozytären Entzündungsinfiltrates untersucht und in Bezug auf subtypenspezifische Unterschiede überprüft. Eine Übersicht der Ergebnisse zeigen die Tabelle 7 und die Abbildungen A-E im Anhang.

##### 3.1.1.1 CD3-positive T-Lymphozyten

Für die Analyse der CD3-positiven T-Lymphozyten standen 28 Biopsien zur Verfügung. Die Zelldichte für alle frühaktiven Läsionen betrug im Median 29,6 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 9,6-112 Zellen/mm<sup>2</sup>). Im Vergleich der verschiedenen Subtypen ergab sich die höchste Zelldichte bei Subtyp II mit dem Median 37,2 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 16-77,6 Zellen/mm<sup>2</sup>), gefolgt von Subtyp III mit 31,2 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 20-35,2 Zellen/mm<sup>2</sup>) und Subtyp I mit 26,8 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 9,6-112 Zellen/mm<sup>2</sup>). Ein signifikanter Unterschied zwischen den 3 Subtypen konnte nicht festgestellt werden ( $p=0,34$ ). Der Vergleich der beiden T-Zellen/Makrophagen-assoziierten Subtypen I und II mit dem Subtyp III ergab keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,85$ ).

##### 3.1.1.2 CD8-positive T-Lymphozyten

Die Auswertung der CD8-positiven T-Lymphozyten in frühaktiven Läsionen wurde an 28 Biopsien durchgeführt. Die ermittelte Zelldichte für alle 3 Subtypen lag bei dem Median 17,8 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 4,8-65,6 Zellen/mm<sup>2</sup>). Die Überprüfung möglicher subgruppenspezifischer Unterschiede zeigte die höchste Zelldichte bei Subtyp II mit einem Median von 24 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 6,9 -40 Zellen/mm<sup>2</sup>). Subtyp III wies 15,2 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 4,8-33,6 Zellen/mm<sup>2</sup>) auf und die Zelldichte des Subtyps I lag bei 14,4 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 6,4-65,6 Zellen/mm<sup>2</sup>). Bezüglich der Unterschiede der 3 Subtypen ließ sich keine Signifikanz erkennen ( $p=0,26$ ). Auch im Vergleich zwischen Subtyp III und den Subtypen I und II ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen ( $p=0,49$ ).

Der Anteil CD8-positiver Zellen an der CD3-positiven Gesamtpopulation der T-Zellen in allen frühaktiven Läsionen lag im Median bei 62,9%. Im Subtyp I war der Anteil mit 67,7% im

Median am höchsten, gefolgt von 62,5% im Subtyp III und 59,5% im Subtyp II. Ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Subtypen zeigte sich nicht ( $p=0,95$ ).

### **3.1.1.3 Granzym-B-positive T-Lymphozyten**

Die Infiltration GrB-positiver T-Lymphozyten in frühaktiven Läsionen konnte an 43 Biopsien ausgewertet werden. In den Läsionen aller Subtypen wurden im Median 3,2 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-25,6 Zellen/mm<sup>2</sup>) ermittelt. Die höchste Zelldichte im Vergleich der Subtypen lag im Subtyp II mit dem Median 4 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-19,2 Zellen/mm<sup>2</sup>). Folgend kam der Subtyp III mit dem Median 3,3 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-19,2 Zellen/mm<sup>2</sup>) und der Subtyp I mit einer durchschnittlichen Zelldichte von 3,2 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-25,6 Zellen/mm<sup>2</sup>). Ein signifikanter Unterschied zwischen den 3 Subtypen ließ sich jedoch nicht aufzeigen ( $p=0,98$ ). Der Vergleich zwischen den Subtypen I und II und dem Subtyp III, der mit der Apoptose der Oligodendrozyten assoziiert ist, ließ ebenfalls keinen signifikanten Unterschied erkennen ( $p=0,84$ ).

Der Anteil GrB-positiver Zellen an den CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen in allen frühaktiven Läsionen lag bei 36,9% im Median. Das höchste Verhältnis ergab sich bei Subtyp II mit 46,2% im Median. Subtyp III wies ein durchschnittliches Verhältnis von 34,7% und Subtyp I einen Median von 33,2% auf. Es ließ sich allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Subtypen darstellen ( $p=0,57$ ).

### **3.1.1.4 CD20-positive B-Lymphozyten**

Die Auswertung von CD20-positiven B-Lymphozyten in frühaktiven Läsionen erfolgte an 43 Biopsien. Die ermittelte Zelldichte aller frühaktiven Läsionen war sehr gering, der Median lag bei 0 Zellen/mm<sup>2</sup>, der Mittelwert bei 2,2 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-24 Zellen/mm<sup>2</sup>). Die Überprüfung subtypenspezifischer Unterschiede ergab bei allen 3 Subtypen einen Median von 0 Zellen/mm<sup>2</sup>, Subtyp I wies mit 3,3 Zellen/mm<sup>2</sup> den höchsten Mittelwert auf (Range 0-24 Zellen/mm<sup>2</sup>), gefolgt von Subtyp III mit 1,8 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-6,4 Zellen/mm<sup>2</sup>) und Subtyp II mit 1,5 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-8 Zellen/mm<sup>2</sup>). Zwischen den 3 Subtypen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p=0,79$ ). Der Vergleich des Subtyps III mit den Subtypen I und II ergab keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,77$ ).

### **3.1.1.5 CD138-positive Plasmazellen**

Zur Auswertung der CD138-positiven Plasmazellen in frühaktiven Läsionen standen 51 Biopsien zur Verfügung. Die Zelldichte aller frühaktiven Läsionen ergab im Median 1,6

Zellen/mm<sup>2</sup>, der Mittelwert lag bei 5 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-28,8 Zellen/mm<sup>2</sup>). Somit war die Zelldichte der CD138-positiven Plasmazellen höher als die der CD20-positiven B-Lymphozyten. Die Überprüfung der Zelldichte hinsichtlich der verschiedenen Subtypen zeigte folgende Ergebnisse:

Die höchste Zelldichte war bei Subtyp II mit einem Median von 2,4 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-20 Zellen/mm<sup>2</sup>) zu verzeichnen. Sowohl bei Subtyp I ergab sich eine Dichte von 1,6 Zellen/mm<sup>2</sup> im Median (Range 0-27,2 Zellen/mm<sup>2</sup>) als auch bei Subtyp III (Range 0-28,8 Zellen/mm<sup>2</sup>).

Trotz der höchsten Zelldichte in Subtyp II konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den 3 verschiedenen Subtypen ermittelt werden ( $p=0,68$ ). Auch der Vergleich zwischen Subtyp III und den autoimmun-medierte Subtypen I und II ergab keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,74$ ).

### **3.1.2 Infiltrat in verschiedenen Läsionsaktivitäten**

Im Rahmen des Mappings (siehe Kapitel 2.2.4, S.27) wurden die verschiedenen Läsionsaktivitäten einer Biopsie identifiziert und anschließend wurde die Auswertung des entzündlichen Infiltrates bezüglich T-Zellen, B-Zellen und Plasmazellen durchgeführt. Die ermittelten Daten wurden zur Überprüfung möglicher Unterschiede zwischen folgenden Läsionsaktivitäten analysiert:

1. Frühaktive Läsionen ohne Remyelinisierung (EA no RM), 2. Frühaktive Läsionen mit früher Remyelinisierung (EA ERM), 3. Inaktive Läsionen ohne Remyelinisierung (IA no RM), 4. Inaktive Läsionen mit früher Remyelinisierung (IA ERM).

Außerdem wurden die gesamten frühaktiven Fälle den gesamten inaktiven Fällen gegenübergestellt. Eine Übersicht der Ergebnisse zeigen die Tabellen 7-8 und die Abbildungen F-O im Anhang.

#### **3.1.2.1 CD3-positive T-Lymphozyten**

Die Auswertung CD3-positiver T-Lymphozyten wurde an 28 frühaktiven und 20 inaktiven Fällen durchgeführt. Dabei ergab sich eine höhere Zelldichte bei den inaktiven Läsionen mit einem Median von 39,2 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 4,8-64 Zellen/mm<sup>2</sup>) gegenüber den frühaktiven Läsionen mit einem Median von 29,6 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 9,6-112 Zellen/mm<sup>2</sup>). Der Unterschied zwischen frühaktiven und inaktiven Läsionen zeigte jedoch keine Signifikanz ( $p=0,51$ ). Die Überprüfung möglicher Unterschiede zwischen den vier verschiedenen Läsionsaktivitäten führte zu folgendem Ergebnis: Die höchste Zelldichte wies IA no RM mit einem Median von 48 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 4,8-62,4 Zellen/mm<sup>2</sup>) auf, gefolgt von IA ERM mit

einem Median von 33,2 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 12,8-64 Zellen/mm<sup>2</sup>), EA no RM mit einem Median von 32,8 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 12,3-112 Zellen/mm<sup>2</sup>) und EA ERM mit einem Median von 22,8 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 9,6-28 Zellen/mm<sup>2</sup>). Insgesamt ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Läsionsaktivitäten feststellen ( $p=0,34$ ).

### 3.1.2.2 CD8-positive T-Lymphozyten

Die Infiltration CD8-positiver T-Zellen konnte an 28 frühaktiven und 20 inaktiven Fällen beurteilt werden. Die höhere Zelldichte mit dem Median 20,8 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-52,8 Zellen/mm<sup>2</sup>) war bei den inaktiven Läsionen zu verzeichnen, die frühaktiven Fälle wiesen einen Median von 17,8 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 4,8-65,6 Zellen/mm<sup>2</sup>) auf. Es ließ sich allerdings kein signifikanter Unterschied feststellen ( $p=1,0$ ). Die höchste Zelldichte im Vergleich der vier verschiedenen Läsionsaktivitäten konnte bei IA ERM mit einem Median von 23,2 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 1,6-52,8 Zellen/mm<sup>2</sup>) ermittelt werden. Es folgten EA no RM mit einem Median von 19,8 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 4,8-65,6 Zellen/mm<sup>2</sup>), IA no RM mit einer durchschnittlichen Zelldichte von 18,4 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-35,2 Zellen/mm<sup>2</sup>) und EA ERM mit einem Median von 14,4 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 6,4-24 Zellen/mm<sup>2</sup>). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Läsionsaktivitäten zeigte sich jedoch nicht ( $p=0,78$ ).

Der Anteil CD8-positiver T-Lymphozyten an der CD3-positiven Gesamtpopulation war bei den frühaktiven Läsionen mit einem Median von 62,9% höher als bei den inaktiven Läsionen mit einem Median von 57,9%, der Unterschied zeigte allerdings keine Signifikanz ( $p=0,12$ ). Im Vergleich der vier untersuchten Läsionsaktivitäten ergab sich der höchste Anteil bei EA ERM mit einem Median von 73,3%, gefolgt von IA ERM mit einem Median von 68,7%, EA no RM mit einem Median von 59,6% und IA no RM mit einem Median von 55,3%. Ein signifikanter Unterschied ließ sich jedoch nicht feststellen ( $p=0,32$ ).

### 3.1.2.3 Granzym-B-positive T-Lymphozyten

Die Auswertung GrB-positiver T-Zellen erfolgte an 43 frühaktiven und 20 inaktiven Fällen. Mit einem Median von 6,4 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-27,2 Zellen/mm<sup>2</sup>) ergab sich in inaktiven Läsionen eine höhere Zelldichte als in frühaktiven Läsionen mit einem Median von 3,2 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-25,6 Zellen/mm<sup>2</sup>), die Unterschiede wiesen allerdings keine Signifikanz auf ( $p=0,71$ ).

Im Vergleich der vier untersuchten Läsionsaktivitäten wurde die höchste Zelldichte bei IA no RM mit einem Median von 7,2 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-27,2 Zellen/mm<sup>2</sup>) ermittelt, gefolgt von IA ERM mit einem Median von 5,6 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-14,4 Zellen/mm<sup>2</sup>) und EA no RM

mit einem Median von 4,4 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-25,6 Zellen/mm<sup>2</sup>). Die niedrigste Zelldichte ergab EA ERM mit einem Median von 2,7 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-10,4 Zellen/mm<sup>2</sup>), es ließ sich allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Läsionsaktivitäten feststellen ( $p=0,64$ ).

Der Anteil GrB-positiver Zellen an den CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen zeigte bei den frühaktiven Fällen mit dem Median 36,9% eine höhere Verteilung als bei den inaktiven Fällen mit dem Median 33,3%, ein signifikanter Unterschied wurde somit nicht gefunden ( $p=0,41$ ). Im Gegensatz dazu ergab der Vergleich der vier Läsionsaktivitäten bei jedoch geringen Fallzahlen einen signifikanten Unterschied ( $p=0,025$ ). Im detaillierten Vergleich konnte ein signifikanter Unterschied sowohl zwischen EA no RM und EA ERM ( $p=0,02$ ) als auch zwischen EA no RM und IA ERM ( $p=0,01$ ) festgestellt werden. Zwischen folgenden Läsionsaktivitäten ergab sich kein signifikanter Unterschied: EA ERM und IA ERM ( $p=0,47$ ), EA ERM und IA no RM ( $p=0,1$ ), EA no RM und IA no RM ( $p=0,9$ ), IA no RM und IA ERM ( $p=0,09$ ). Das höchste Verhältnis konnte bei EA no RM mit einem Median von 42,9% ermittelt werden, gefolgt von IA no RM mit 41,1%, IA ERM mit 22,1% und EA ERM mit einem Median von 0%.

#### **3.1.2.4 CD20-positive B-Lymphozyten**

Für die Auswertung von CD20-positiven B-Lymphozyten konnten 43 frühaktive und 18 inaktive Fälle berücksichtigt werden. Die Zelldichte war sowohl in den frühaktiven als auch in den inaktiven Läsionen sehr gering, beide Aktivitäten wiesen eine Zelldichte mit dem Median 0 Zellen/mm<sup>2</sup> auf. Bei den frühaktiven Läsionen konnte jedoch ein höherer Mittelwert von 2,2 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-24 Zellen/mm<sup>2</sup>) als bei den inaktiven Läsionen mit einem Mittelwert von 0,98 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-8 Zellen/mm<sup>2</sup>) festgestellt werden. Der Unterschied zwischen frühaktiven und inaktiven Läsionen war allerdings nicht signifikant ( $p=0,23$ ). Der Vergleich der vier oben genannten Läsionsaktivitäten ergab die höchste Zelldichte für EA ERM mit einem Median von 4,8 Zellen/mm<sup>2</sup> und einem Mittelwert von 3,1 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-5,6 Zellen/mm<sup>2</sup>), wobei die Fallzahl für EA ERM mit 5 Fällen gering war. Die anderen 3 Läsionsaktivitäten wiesen einen Median von 0 Zellen/mm<sup>2</sup> auf, davon konnte der höchsten Mittelwert bei EA no RM mit 2,1 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-24 Zellen/mm<sup>2</sup>), gefolgt von IA no RM mit dem Mittelwert 1 Zelle/mm<sup>2</sup> (Range 0-8 Zellen/mm<sup>2</sup>) und IA ERM mit dem Mittelwert 0,96 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-8 Zellen/mm<sup>2</sup>) festgestellt werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Läsionsaktivitäten wurde nicht gefunden ( $p=0,27$ ).

### 3.1.2.5 CD138-positive Plasmazellen

Die Infiltration CD138-positiver Plasmazellen konnte in 51 frühaktiven und 20 inaktiven Fällen ausgewertet werden. Eine höhere Zelldichte wurde in inaktiven Läsionen mit einem Median von 3,6 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-36,8 Zellen/mm<sup>2</sup>) im Gegensatz zu einem Median von 1,6 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-28,8 Zellen /mm<sup>2</sup>) in frühaktiven Läsionen ermittelt. Der Unterschied zwischen frühaktiven und inaktiven Läsionen zeigte jedoch keine Signifikanz ( $p=0,45$ ). Im Vergleich der vier verschiedenen Läsionsaktivitäten konnte die höchste Zelldichte bei IA no RM mit einem Median von 7,6 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-36,8 Zellen/mm<sup>2</sup>) festgestellt werden, gefolgt von IA ERM mit einem Median von 3,2 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-16 Zellen/mm<sup>2</sup>). Die beiden frühaktiven Läsionsaktivitäten wiesen jeweils einen Median von 1,6 Zellen/mm<sup>2</sup> auf, bei EA no RM ergab der Mittelwert 5,4 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-28,8 Zellen/mm<sup>2</sup>), bei EA ERM lag der Mittelwert 2,1 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-5,3 Zellen/mm<sup>2</sup>) vor. Ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Läsionsaktivitäten ließ sich jedoch nicht feststellen ( $p=0,71$ ).

### 3.1.3 Periläsionale weiße Substanz (PPWM)

Auch die periläsionale weiße Substanz wurde im Rahmen des Mappings identifiziert und auf entzündliche Veränderungen bezüglich der Infiltration von T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Plasmazellen untersucht. Aufgrund geringer Fallzahlen wurden zwar die frühaktiven Fälle auf subtypenspezifische Unterschiede überprüft, anschließend allerdings nicht die 4 verschiedenen Läsionsaktivitäten, sondern die gesamten frühaktiven mit den gesamten inaktiven Fällen verglichen. Tabellen 10 und 11 und Abbildungen P-W im Anhang geben eine Übersicht der Ergebnisse.

#### 3.1.3.1 T-Lymphozyten

Zur Auswertung CD3-positiver und CD8-positiver T-Zellen in der PPWM standen 11 frühaktive und 8 inaktive Fälle zur Verfügung. In den frühaktiven Fällen ergab sich im Median eine Dichte CD3-positiver Zellen von 6,4 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0,8-20,8 Zellen/mm<sup>2</sup>), die somit höher ausfiel als die Zelldichte der inaktiven Fälle mit einem Median von 4 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-16 Zellen/mm<sup>2</sup>). Es ließ sich allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen der PPWM frühaktiver und inaktiver Fälle bezüglich der Infiltration CD3-positiver T-Zellen darstellen ( $p=0,6$ ). Die Fallzahlen pro Subtyp waren relativ klein, dennoch wurde die höchste Zelldichte bei Subtyp I mit einem Median von 6,4 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 4,8-16 Zellen/mm<sup>2</sup>) ermittelt, gefolgt von Subtyp III mit einem Median von 4,4 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range

0,8-8 Zellen/mm<sup>2</sup>) und dem Subtyp II mit einem Median von 3,2 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 1,6-20,8 Zellen/mm<sup>2</sup>). Der Unterschied zwischen den Subtypen bezüglich der Zelldichte in der PPWM ergab, wie auch in den frühaktiven Läsionen, keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,67$ ), ebenso zeigte ein Vergleich der Subtypen I und II mit dem Subtyp III keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,58$ ).

Im Hinblick auf die Zelldichte der CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen wurde sowohl in der PPWM der frühaktiven als auch in der PPWM der inaktiven Fälle ein Median von 1,6 Zellen/mm<sup>2</sup> gefunden, der Mittelwert der inaktiven Fälle war mit 4,0 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-14,4 Zellen/mm<sup>2</sup>) minimal höher als der Mittelwert 3,5 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-11,2 Zellen/mm<sup>2</sup>) der frühaktiven Fälle, ein signifikanter Unterschied zeigte sich jedoch nicht ( $p=1$ ). Im Vergleich der verschiedenen Subtypen der frühaktiven Läsionen konnte die höchste Zelldichte bei Subtyp I mit einem Median von 4 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-11,2 Zellen/mm<sup>2</sup>) ermittelt werden. Subtyp II ergab eine durchschnittliche Zelldichte von 1,6 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 6,8-9,6 Zellen/mm<sup>2</sup>) und Subtyp III einen Median von 0,4 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-0,8 Zellen/mm<sup>2</sup>). Zwischen den Subtypen konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ( $p=0,25$ ). Auch der Vergleich der Subtypen I und II mit dem Subtyp III ergab keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,15$ ).

Der durchschnittliche Anteil der zytotoxischen T-Zellen an der Gesamtpopulation der T-Zellen lag sowohl in der PPWM der frühaktiven als auch in der PPWM der inaktiven Fälle bei 50%. Der Vergleich der 3 Subtypen der frühaktiven Fälle zeigte den höchsten Anteil bei 60% im Median bei Subtyp I, gefolgt von Subtyp II und III mit jeweils einem Median von 50%. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Subtypen konnte nicht festgestellt werden ( $p=0,77$ ). Die Auswertung der GrB-positiven T-Zellen in der PPWM erfolgte in 24 frühaktiven und 7 inaktiven Fällen. Für die frühaktiven Fälle ergab sich eine Zelldichte mit dem Median 0 Zellen/mm<sup>2</sup> und dem Mittelwert 1,5 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-14,4 Zellen/mm<sup>2</sup>), dabei wies Subtyp I die höchste Zelldichte mit einem Median von 0,8 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-1,6 Zellen/mm<sup>2</sup>) auf. Sowohl bei Subtyp II als auch bei Subtyp III zeigte sich ein Median von 0 Zellen/mm<sup>2</sup>, wobei bei Subtyp III der höhere Mittelwert von 2,9 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-14,4 Zellen/mm<sup>2</sup>) im Vergleich zum Subtyp II mit dem Mittelwert 1,1 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-9,6 Zellen/mm<sup>2</sup>) gefunden wurde. Ein signifikanter Unterschied zwischen den 3 Subtypen ließ sich jedoch nicht feststellen ( $p=0,59$ ). Zwischen den T-Zell-/Makrophagen-assoziierten Subtypen I und II und dem Subtyp III konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ( $p=0,87$ ).

Die inaktiven Fälle ergaben ebenfalls eine Zelldichte mit dem Median 0 Zellen/mm<sup>2</sup>, der Mittelwert von 0,2 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-1,6 Zellen/mm<sup>2</sup>) lag unter dem Mittelwert 1,5 Zellen/mm<sup>2</sup> der frühaktiven Fälle, ein signifikanter Unterschied zeigte sich jedoch nicht ( $p=0,37$ ).

Das Verhältnis GrB-positiver T-Zellen zu den gesamten CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen ergab sowohl bei den frühaktiven als auch bei den inaktiven Fällen den Median 0%, die inaktiven Fälle wiesen mit 14,3% den höheren Mittelwert auf als die frühaktiven Fälle mit einem Mittelwert von 6,8%. Ein signifikanter Unterschied konnte nicht aufgezeigt werden ( $p=0,8$ ). Im Vergleich der 3 Subtypen der frühaktiven Fälle ergab sich der größte Anteil bei Subtyp I mit 14,3% im Gegensatz zum Verhältnis 0 bei Subtyp II und III. Für diesen Unterschied konnte jedoch keine Signifikanz nachgewiesen werden ( $p=0,21$ ).

### **3.1.3.2 B-Lymphozyten und Plasmazellen**

Die Infiltration CD20-positiver B-Zellen in der PPWM wurde an 21 frühaktiven und 5 inaktiven Fällen untersucht. In der PPWM konnte in keinem der frühaktiven Fälle eine Immunreaktivität für CD20 beobachtet und somit kein Unterschied zwischen den verschiedenen Subtypen festgestellt werden. Nur in einem inaktiven Fall mit früher Remyelinisierung (IA ERM) war 1 Zelle/mm<sup>2</sup> zu finden.

Die Auswertung der CD138-positiven Plasmazellen erfolgte an 29 frühaktiven und an 7 inaktiven Fällen. Die Infiltration von CD138-positiven Plasmazellen in der PPWM der frühaktiven Fälle war mit einem Median von 0 Zellen/mm<sup>2</sup> zwar sehr gering, mit dem Mittelwert 0,6 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-8 Zellen/mm<sup>2</sup>) jedoch im Vergleich zu der Infiltration von CD20-positiven B-Zellen etwas höher. Für alle 3 Subtypen betrug der Median 0 Zellen/mm<sup>2</sup>, Subtyp I wies einen Mittelwert von 0,9 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-8 Zellen/mm<sup>2</sup>) und Subtyp II einen Mittelwert von 0,7 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-3,2 Zellen/mm<sup>2</sup>) auf. Dabei muss erwähnt werden, dass in Subtyp I nur in einem Fall Plasmazellen ermittelt werden konnten, während in Subtyp II in fünf Fällen die PPWM von Plasmazellen infiltriert wurde. Im Subtyp III konnte keine Plasmazelle gefunden werden. Der Unterschied zwischen den verschiedenen Subtypen zeigte keine Signifikanz ( $p=0,19$ ). Der Vergleich der Subtypen I und II mit dem Subtyp III wies ebenfalls keinen signifikanten Unterschied auf ( $p=0,36$ ).

Auch die inaktiven Fälle ergaben eine Zelldichte mit dem Median 0 Zellen/mm<sup>2</sup>, der Mittelwert 0,46 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-1,6 Zellen/mm<sup>2</sup>) lag unter dem Mittelwert 0,63 Zellen/mm<sup>2</sup> der frühaktiven Fälle, es ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der PPWM der frühaktiven und der PPWM der inaktiven Fälle ausmachen ( $p=0,85$ ).

### 3.1.4 Perivaskuläre Infiltrate

Ließen sich in dem untersuchten Gewebe auch Gefäße identifizieren, so wurde neben der Infiltration des Parenchyms auch die Anzahl der T-Zellen, B-Zellen und Plasmazellen in direkter Nachbarschaft zu den Gefäßen gesondert untersucht. Ausgewertet wurden dabei die Zellen, die das Gefäßendothel komplett durchwandert hatten, intraluminale Zellen wurden nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse der frühaktiven und inaktiven Fälle zeigen sich in Tabelle 9, die der PPWM in den Tabellen 10 und 11.

#### 3.1.4.1 T-Lymphozyten

##### Läsionen

Die Auswertung perivaskulärer CD3-positiver T-Lymphozyten konnte an 24 frühaktiven und 16 inaktiven Fällen durchgeführt werden. In den frühaktiven Läsionen wurden im Median 7,2 Zellen/mm<sup>2</sup> gefunden. Die meisten perivaskulären Zellen konnten im Subtyp II mit einem Median von 12,8 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 2,4-65,5 Zellen/mm<sup>2</sup>) ermittelt werden, gefolgt von Subtyp I mit 4,8 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 2,24-57,6 Zellen/mm<sup>2</sup>) und Subtyp III mit 2 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-8 Zellen/mm<sup>2</sup>). Dabei ergab sich im Vergleich der verschiedenen Subtypen ein signifikanter Unterschied ( $p=0,025$ ). Die detaillierte Analyse zeigte eine Signifikanz sowohl zwischen Subtyp I und Subtyp III ( $p=0,04$ ) als auch zwischen Subtyp II und Subtyp III ( $p=0,008$ ). Zwischen Subtyp I und Subtyp II konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ( $p=0,36$ ).

Die inaktiven Läsionen wiesen denselben Median von 7,2 Zellen/mm<sup>2</sup> wie die frühaktiven Läsionen auf, der Mittelwert war bei den frühaktiven Läsionen mit 14 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-65,5 Zellen/mm<sup>2</sup>) höher als bei den inaktiven Läsionen mit 11,7 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 1,6-51,2 Zellen/mm<sup>2</sup>). Ein signifikanter Unterschied ergab sich somit nicht ( $p=0,4$ ).

Im Vergleich der vier untersuchten Läsionsaktivitäten konnten bei IA ERM die meisten perivaskulären Zellen mit einem Median von 11,6 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 1,6-51,2 Zellen/mm<sup>2</sup>) ermittelt werden. Es folgten EA no RM mit einem Median von 8 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-65,5 Zellen/mm<sup>2</sup>), EA ERM mit 4,8 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 2-9,6 Zellen/mm<sup>2</sup>) und IA no RM mit 4 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 1,6-30,4 Zellen/mm<sup>2</sup>). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Läsionsaktivitäten konnte nicht festgestellt werden ( $p=0,39$ ).

Die Auswertung perivaskulärer CD8-positiver zytotoxischer T-Zellen erfolgte an 25 frühaktiven und 17 inaktiven Fällen. Bei den frühaktiven Fällen konnte im Median 1,6 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-46,4 Zellen/mm<sup>2</sup>) ermittelt werden. Die höchste Anzahl fand sich bei Subtyp II mit 4,8 Zellen/mm<sup>2</sup> im Median (Range 0-46,4 Zellen/mm<sup>2</sup>), gefolgt von Subtyp I

mit 1,6 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-33,6 Zellen/mm<sup>2</sup>) und Subtyp III mit dem Median 0 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-6,4 Zellen/mm<sup>2</sup>). Im Gegensatz zu der CD3-positiven Gesamtpopulation der T-Zellen ergab sich für die zytotoxischen T-Zellen kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Subtypen ( $p=0,15$ ).

In den inaktiven Läsionen wurde derselbe Median von 1,6 Zellen/mm<sup>2</sup> ermittelt wie in den frühaktiven Läsionen, die jedoch einen geringfügig höheren Mittelwert von 7 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-46,4 Zellen/mm<sup>2</sup>) aufwiesen als die inaktiven mit 6,6 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-40 Zellen/mm<sup>2</sup>). Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p=0,69$ ). Der Vergleich der verschiedenen Läsionsaktivitäten ergab die höchste Anzahl der perivaskulären Zellen bei IA ERM mit einem Median von 5,6 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-40 Zellen/mm<sup>2</sup>), gefolgt von EA no RM mit einem Median von 4,4 Zellen/mm<sup>2</sup> (0-46,4 Zellen/mm<sup>2</sup>). IA no RM und EA ERM wiesen beide einen Median 0 Zellen/mm<sup>2</sup> auf, bei IA no RM konnte der Mittelwert 4,2 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-25,6 Zellen/mm<sup>2</sup>) ermittelt werden, während sich in EA ERM keine perivaskuläre zytotoxische T-Zelle fand. Es ließ sich jedoch zwischen den verschiedenen Läsionsaktivitäten kein signifikanter Unterschied feststellen ( $p=0,93$ ).

Die Auswertung perivaskulärer GrB-positiver zytotoxischer T-Zellen erfolgte in 42 frühaktiven und 18 inaktiven Fällen. Die Anzahl perivaskulärer Zellen war sehr gering, der Median sowohl der frühaktiven als auch der inaktiven Fälle lag bei 0 Zellen/mm<sup>2</sup>.

Der Vergleich der drei Subtypen ergab jedoch den höchsten Mittelwert mit 3 Zellen/mm<sup>2</sup> beim Subtyp III (Range 0-22,4 Zellen/mm<sup>2</sup>), gefolgt vom Subtyp I mit dem Mittelwert 0,8 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-8 Zellen/mm<sup>2</sup>) und dem Subtyp II mit dem Mittelwert 0,25 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-2,4 Zellen/mm<sup>2</sup>). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Subtypen nachgewiesen werden ( $p=0,18$ ).

Im Vergleich der verschiedenen Läsionsaktivitäten ergab sich der höchste Mittelwert bei EA no RM mit 1,3 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-22,4 Zellen/mm<sup>2</sup>), gefolgt von EA ERM mit einem Mittelwert von 0,8 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-2,4 Zellen/mm<sup>2</sup>) und IA no RM mit dem Mittelwert 0,4 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-1,6 Zellen/mm<sup>2</sup>). IA ERM wies keine perivaskuläre GrB-positive T-Zelle auf. Es konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den Läsionsaktivitäten festgestellt werden ( $p=0,29$ ).

### PPWM

Aufgrund geringer Fallzahlen wurden nur die gesamten frühaktiven mit den gesamten inaktiven Fällen verglichen.

Die Auswertung der CD3-positiven T-Zellen ergab einen höheren Median von 6,4 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-73,6 Zellen/mm<sup>2</sup>) bei den 9 frühaktiven Fällen im Gegensatz zu einem Median von 0 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-12,8 Zellen/mm<sup>2</sup>) bei den 3 inaktiven Fällen. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (p=0,28).

Die Auswertung der CD8-positiven T-Zellen wies ebenfalls einen höheren Median von 1,6 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-62,4 Zellen/mm<sup>2</sup>) bei den 9 frühaktiven Fällen auf als bei den 6 inaktiven Fälle mit einem Median von 0 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-8 Zellen/mm<sup>2</sup>), der Unterschied zeigte jedoch keine Signifikanz (p=0,11).

Im Gegensatz zu den CD3- und CD8-positiven T-Zellen konnten nur sehr wenige perivaskuläre GrB-positive T-Zellen ermittelt werden. Sowohl die 20 frühaktiven als auch die 6 inaktiven Fälle wiesen im Median 0 Zellen/mm<sup>2</sup> auf, die frühaktiven Fälle ergaben einen Mittelwert von 0,24 Zellen/mm<sup>2</sup> (0-1,6 Zellen/mm<sup>2</sup>), in den inaktiven Fällen konnte keine GrB-positive Zelle gefunden werden.

### **3.1.4.2 B-Lymphozyten und Plasmazellen**

#### Läsionen

Die Anzahl perivaskulärer CD20-positiver B-Zellen wurde in 34 frühaktiven und 18 inaktiven Fällen ermittelt. Wie auch im Parenchym fanden sich wenige B-Zellen im Bezug zu den Gefäßen, sowohl in den frühaktiven als auch in den inaktiven Fällen lag der Median bei 0 Zellen/mm<sup>2</sup>.

Der Vergleich der Subtypen ergab den höchsten Mittelwert von 5 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-44,8 Zellen/mm<sup>2</sup>) in Subtyp III, gefolgt von Subtyp II mit einem Mittelwert von 1,12 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-8 Zellen/mm<sup>2</sup>) und Subtyp I mit 1 Zelle/mm<sup>2</sup> (Range 0-3,2 Zellen/mm<sup>2</sup>). Zwischen den verschiedenen Subtypen ließ sich kein signifikanter Unterschied nachweisen (p=0,49).

Im Gegensatz dazu stellte sich im Vergleich der Läsionsaktivitäten ein signifikanter Unterschied dar (p=0,049). Die detaillierte Analyse ergab nur eine Signifikanz zwischen EA ERM und IA no RM (p=0,04). Allerdings konnten nur in 2 Fällen EA ERM Gefäße identifiziert werden. Der detaillierte Vergleich der übrigen Läsionsaktivitäten zeigte keine weiteren signifikanten Unterschiede.

Die höchste Anzahl an perivaskulären CD20-positiven B-Zellen wurde bei EA ERM mit einem Median von 4,4 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0,8-8 Zellen/mm<sup>2</sup>) festgestellt. Die übrigen untersuchten Läsionsaktivitäten wiesen einen Median von 0 Zellen/mm<sup>2</sup> auf, wobei davon bei IA ERM der höchste Mittelwert von 3,3 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-17,6 Zellen/mm<sup>2</sup>) vorlag,

gefolgt von EA no RM mit dem Mittelwert 2 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-44,8 Zellen/mm<sup>2</sup>). In Läsionen mit der Aktivität IA no RM konnte keine positive B-Zelle ermittelt werden.

Die Auswertung perivaskulärer CD138-positiver Plasmazellen erfolgte in 49 frühaktiven und 20 inaktiven Fällen. Die Analyse ergab ebenfalls sowohl in den frühaktiven als auch in den inaktiven Fällen einen Median von 0 Zellen/mm<sup>2</sup>.

Im Vergleich der 3 Subtypen wies Subtyp III die höchste Anzahl mit einem Mittelwert von 3,1 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-35,2 Zellen/mm<sup>2</sup>) auf. Es folgten Subtyp I mit einem Mittelwert von 1 Zelle/mm<sup>2</sup> (Range 0-9,6 Zellen/mm<sup>2</sup>) und Subtyp II mit einem Mittelwert von 0,94 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-7 Zellen/mm<sup>2</sup>). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Subtypen konnte nicht festgestellt werden (p=0,92).

Der Vergleich der verschiedenen Läsionsaktivitäten ergab die höchste Anzahl bei EA no RM mit einem Mittelwert von 1,7 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-35,2 Zellen/mm<sup>2</sup>), gefolgt von IA no RM mit einem Mittelwert von 0,48 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-1,6 Zellen/mm<sup>2</sup>) und IA ERM mit einem Mittelwert von 0,32 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-1,6 Zellen/mm<sup>2</sup>). EA ERM wies keine perivaskuläre Plasmazelle auf.

Zwischen den verschiedenen Läsionsaktivitäten konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (p=0,39).

### PPWM

Perivaskuläre CD20-positive B-Zellen konnten in der PPWM kaum ermittelt werden. Weder die Subtypen II und III der 18 frühaktiven Fälle noch die 4 inaktiven Fällen wiesen positive Zellen auf, die 6 Fälle des Subtyp I zeigten jedoch einen Mittelwert von 0,27 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-1,6 Zellen/mm<sup>2</sup>).

Die Anzahl der perivaskulären CD138-positiven Plasmazellen war auch gering, es ließen sich allerdings etwas mehr Plasmazellen als CD20-positive B-Zellen ermitteln. Lag der Median sowohl bei den 28 frühaktiven Fällen als auch bei den 6 inaktiven Fällen bei 0 Zellen/mm<sup>2</sup>, konnte bei den frühaktiven Fällen ein höherer Mittelwert von 0,43 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-4,8 Zellen/mm<sup>2</sup>) als bei den inaktiven Fällen mit 0,27 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-1,6 Zellen/mm<sup>2</sup>) festgestellt werden, ein signifikanter Unterschied zeigte sich nicht (p=0,95). Von den drei Subtypen wurde bei Subtyp II der höchste Mittelwert von 0,74 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-4,8 Zellen/mm<sup>2</sup>) ermittelt, gefolgt von Subtyp III mit 0,27 Zellen/mm<sup>2</sup> (Range 0-1,6 Zellen/mm<sup>2</sup>) und Subtyp I mit 0,09 Zellen/mm<sup>2</sup> (0-0,8 Zellen/mm<sup>2</sup>). Ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Subtypen konnte nicht nachgewiesen werden (p=0,68).

## 3.2 Das lymphozytäre Infiltrat in MS-Biopsien in Bezug auf klinische Charakteristika

Im folgenden Kapitel wird die Verteilung des untersuchten Patientenguts von 71 Fällen bezüglich Geschlecht, Alter zum Zeitpunkt der Biopsie, OP-Lokalisation und klinischer Verlauf zum Zeitpunkt der Biopsie beschrieben. Eine Zusammenstellung der klinischen Charakteristika der frühaktiven Fälle zeigen die Tabellen 12-14, die der inaktiven Fälle zeigt die Tabelle 15 im Anhang.

Außerdem wurden in der vorliegenden Arbeit die frühaktiven Fälle auf eine mögliche Korrelation der Zelldichte des einzelnen Komponenten des lymphozytären Infiltrats mit den klinischen Charakteristika Geschlecht, Alter und Verlauf zum Zeitpunkt der Biopsie, auch im Hinblick auf die verschiedenen immunopathogenetischen Subtypen, überprüft. Eine Übersicht der p-Werte der statistischen Analyse bietet Tabelle 16 im Anhang.

### 3.2.1 Geschlecht

Im Hinblick auf die Geschlechterverteilung aller 71 untersuchten Fälle stammten 45 Fälle von Frauen und 26 Fälle von Männern. Somit ergab sich ein Verhältnis von Frauen zu Männern von 1,7:1. Betrachtete man die frühaktiven und die inaktiven Fälle getrennt, so stammten bei den frühaktiven Fällen 34 Fälle von Frauen und 17 Fälle von Männern und bei den inaktiven Fällen 11 Fälle von Frauen und 9 Fälle von Männern. Tabelle 17 im Anhang zeigt die Geschlechterverteilung in Bezug auf die verschiedenen Subtypen der frühaktiven Fälle. Abbildung X im Anhang zeigt die Geschlechterverteilung des gesamten untersuchten Patientengutes auf.

In Bezug auf eine mögliche Korrelation des Geschlechts mit der Zelldichte der einzelnen Komponenten des lymphozytären Infiltrats stellte sich der Sachverhalt wie folgt dar: Unabhängig vom Subtyp konnte sowohl bei Männern als auch bei Frauen ein lymphozytäres Infiltrat in den Läsionen ohne signifikanten Unterschied festgestellt werden (CD3:  $p=0,52$ ; CD8:  $p=0,38$ ; GrB:  $p=0,41$ ; CD20:  $p=0,77$ ; CD138:  $p=0,77$ ). Betrachtet man die verschiedenen Subtypen getrennt, so konnte bei allerdings geringen Fallzahlen in Subtyp I bei den Frauen eine signifikant höhere Dichte an CD3-positiven T-Lymphozyten beobachtet werden ( $p=0,03$ ). In den Subtypen II und III unterschied sich die Infiltration CD3-positiver T-Zellen nicht signifikant (IP II:  $p=0,55$ , IP III:  $p=0,95$ ). Eine Infiltration der übrigen Komponenten des lymphozytären Infiltrates konnte sowohl in Subtyp I (CD8:  $p=0,15$ ; GrB:  $p=0,37$ ; CD20:  $p=0,73$ ; CD138:  $p=0,89$ ) als auch in Subtyp II (CD8:  $p=0,55$ ; GrB:  $p=0,81$ ; CD20:  $p=0,79$ ; CD138:  $p=0,75$ ) als auch in Subtyp III (CD8:  $p=0,53$ ; GrB:  $p=0,81$ ; CD20:

p=0,91; CD138: p=0,83) bei Männern und Frauen ohne signifikanten Unterschied nachgewiesen werden. Betrachtete man nur die Männer, so konnten bei jedoch geringen Fallzahlen in Subtyp I signifikant weniger CD3-positive T-Zellen festgestellt werden als in Subtyp II (p=0,03), die Subtypen I und III (p=0,13) und die Subtypen II und III (p=0,4) unterschieden sich jedoch nicht signifikant. Bei den Männern konnten die übrigen Komponenten des lymphozytären Infiltrats in allen Subtypen gleichermaßen nachgewiesen werden (CD8: p=0,19; GrB: p=0,73; CD20: p=0,3; CD138: p=0,91). Bei den Frauen ließen sich die einzelnen Komponenten des lymphozytären Infiltrats ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den Subtypen aufzeigen (CD3: p= 0,95; CD8: p=0,97; GrB: p=0,95; CD20: p=0,96; CD138: p=0,62).

### 3.2.2 Alter zum Zeitpunkt der Biopsie

Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Biopsie betrug 39,2 Jahre. Die Altersspanne reichte jedoch von 11 Jahren bis zu 64 Jahren. 38 Patienten erkrankten im statistisch häufigsten Manifestationsalter zwischen 20 und 40 Jahren. Einmal wurde die Erkrankung unter 20 Jahren symptomatisch und 32 Patienten waren zum Zeitpunkt der Biopsie älter als 40 Jahre. Bei den frühaktiven Fällen lag das Durchschnittsalter bei 39,3 Jahren, bei den inaktiven Fällen mit 38,9 Jahren etwas darunter. Tabelle 18 im Anhang zeigt die Altersverteilung in Bezug auf die Subtypen der frühaktiven Fälle. Abbildung Y im Anhang bietet eine Übersicht der Altersverteilung des gesamten Patientengutes.

In Bezug auf die Geschlechter waren die Frauen mit durchschnittlich 39,5 Jahren etwas älter als die Männer mit 38,5 Jahren.

Die Überprüfung einer möglichen Korrelation zwischen dem Alter zum Zeitpunkt der Biopsie und der Zelldichte der einzelnen Komponenten des lymphozytären Infiltrats ergab folgendes Ergebnis: Unabhängig vom Subtyp konnte sowohl bei Patienten in einem Alter unter 20 Jahren als auch in der Altersspanne zwischen 20 und 40 Jahren als auch in einem Alter über 40 Jahren ein lymphozytäres Infiltrat in den Läsionen nachgewiesen werden (CD3: p= 0,56; CD8: p=0,91; GrB: p= 0,14; CD20: p= 0,27; CD138: p=0,28). Bei der Betrachtung der verschiedenen Subtypen konnten in Subtyp I in jeder Altersgruppe die einzelnen Komponenten des lymphozytären Infiltrates gleichermaßen aufgezeigt werden (CD3: p=0,53; CD8: p=0,69; GrB: p=0,07; CD20: p= 0,73; CD138: p=0,67). Da nur 1 Fall der Gruppe unter 20 Jahren vorlag und dieser dem Subtyp I zuzuordnen war, wurden bezüglich der Subtypen II und III nur die Altersgruppen 20-40 Jahre und älter als 40 Jahre verglichen. Dabei zeigte sich für Subtyp II in jeder Altersgruppe gleichermaßen ein lymphozytäres Infiltrat (CD3: p=0,42;

CD8:  $p=0,55$ ; GrB:  $p=0,46$ ; CD20:  $p=0,34$ ; CD138:  $p=0,86$ ). Für Subtyp III konnte bezüglich der Infiltration CD138-positiver Plasmazellen eine signifikant höhere Dichte in der Altersgruppe von 20-40 Jahren festgestellt werden ( $p=0,01$ ). Die übrigen Komponenten des lymphozytären Infiltrates waren in beiden Altersgruppen ohne signifikanten Unterschied nachzuweisen (CD3:  $p=1$ ; CD8:  $p=1$ ; GrB:  $p=0,82$ ; CD20:  $p=0,22$ ). In der Altersgruppe 20-40 Jahre konnte in allen drei Subtypen ohne signifikanten Unterschied lymphozytäres Infiltrat in den Läsionen aufgezeigt werden (CD3:  $p=0,32$ ; CD8:  $p=0,17$ ; GrB:  $p=0,66$ ; CD20:  $p=0,47$ ; CD138:  $p=0,2$ ). Auch in der Altersgruppe älter als 40 Jahre konnte in allen Subtypen gleichermaßen lymphozytäres Infiltrat nachgewiesen werden (CD3:  $p=0,43$ ; CD8:  $p=0,35$ ; GrB:  $p=0,11$ ; CD20:  $p=0,92$ ; CD138:  $p=0,32$ ).

### 3.2.3 OP-Lokalisation und klinische Verläufe bei Biopsie

Die Mehrzahl der Biopsien wurde supratentoriell entnommen. Von den 71 Fällen stammen 64 aus supratentoriellen Läsionen, 2 Biopsien wurden infratentoriell und 5 Biopsien wurden spinal entnommen. Für die frühaktiven Fälle ergab sich folgende Verteilung: 45 Fälle waren supratentoriell lokalisiert, 2 Biopsien entstammen infratentoriellen Läsionen und 4 spinale Biopsien wurden untersucht. Des Weiteren konnten bei den inaktiven Fällen 19 supratentorielle, keine infratentorielle Biopsien und eine spinale Biopsie ausgewertet werden. Für die frühaktiven Fälle wurden auch die Krankheitsverläufe zum Zeitpunkt der Biopsie betrachtet. Die meisten Patienten, nämlich 31 von 51 Fällen, zeigten mit einem isolierten Symptom einen monophasischen Verlauf, ein sogenanntes *clinically isolated syndrome* (CIS), in 19 Fällen konnte ein schubförmig-remittierender Verlauf (RRMS) beobachtet werden und bei einem Patienten wurde bereits ein sekundär progredienter Verlauf (SPMS) festgestellt. Tabelle 19 im Anhang zeigt eine Übersicht der Krankheitsverläufe bei den frühaktiven Fällen. Die Überprüfung einer möglichen Korrelation zwischen der Dichte des lymphozytären Infiltrates und dem klinischen Verlauf der MS stellte sich wie folgt dar: Unabhängig vom Subtyp konnte sowohl bei monophasischem als auch bei schubförmig-remittierendem als auch bei sekundär progredientem Verlauf eine Infiltration von Lymphozyten in den Läsionen ohne signifikanten Unterschied nachgewiesen werden (CD3:  $p=0,49$ ; CD8:  $p=0,5$ ; GrB:  $p=0,25$ ; CD20:  $p=0,68$ ; CD138:  $p=0,74$ ). Ein sekundär-progressiver Verlauf konnte nur in einem Fall, welcher dem Subtyp II zuzuordnen war, ermittelt werden. Für die Subtypen I und III wurde somit nur CIS und RRMS verglichen. Für Subtyp I konnten sowohl bei CIS als auch bei RRMS die verschiedenen Komponenten des lymphozytären Infiltrates ohne signifikanten Unterschied festgestellt werden (CD3:  $p=0,34$ ; CD8:  $p=0,15$ ; GrB:  $p=0,08$ ; CD20:  $p=0,87$ ;

---

CD138:  $p=0,17$ ). Für Subtyp II konnte für die Verläufe CIS, RRMS und SPMS gleichermaßen eine lymphozytäre Infiltration ermittelt werden (CD3:  $p=0,36$ ; CD8:  $p=0,56$ ; GrB:  $p=0,74$ ; CD20:  $p=0,79$ ; CD138:  $p=0,48$ ). Für den Subtyp III wurde sowohl bei CIS als auch bei RRMS ein lymphozytäres Infiltrat ohne signifikanten Unterschied nachgewiesen (CD3:  $p=1$ ; CD8:  $p=1$ ; GrB:  $p=0,48$ ; CD20:  $p=0,4$ ; CD138:  $p=0,81$ ). Bei monophasischem Verlauf wiesen alle Subtypen gleichermaßen eine Infiltration von Lymphozyten auf (CD3:  $p=0,61$ ; CD8:  $p=0,24$ ; GrB:  $p=0,33$ ; CD20:  $p=0,91$ ; CD138:  $p=0,72$ ). Auch bei schubförmig-remittierendem Verlauf konnte in allen Subtypen ein lymphozytäres Infiltrat ohne signifikanten Unterschied nachgewiesen werden (CD3:  $p=0,24$ ; CD8:  $p=0,15$ ; GrB:  $p=0,25$ ; CD20:  $p=0,57$ ; CD138:  $p=0,15$ ).

## 4 Diskussion

### 4.1 Das lymphozytäre Infiltrat in MS-Läsionen

#### 4.1.1 T-Lymphozyten

Neben Makrophagen sind T-Lymphozyten ein großer Bestandteil des entzündlichen Infiltrates in Multiple-Sklerose-Läsionen. In der Vergangenheit wurden insbesondere CD4-positiven T-Zellen eine Rolle in der Pathogenese der MS zugeschrieben. Untersuchungen am Tiermodell, in denen die EAE durch den Transfer von MBP-oder PLP-spezifischen CD4+-T-Zellen ausgelöst werden konnte (Glynn und Linington 1989), unterstützten diese Hypothese. Neuere Untersuchungen lassen jedoch auch eine Beteiligung der CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen vermuten. Huseby et al. beschrieben am EAE-Modell, dass die durch MBP-spezifische CD8-positiven T-Zellen ausgelösten Symptome eher der MS ähneln als die CD4-induzierter EAE (Huseby et al. 2001).

Es ist jedoch nicht geklärt, ob und in welchem Maß eine Subpopulation in der Pathogenese der MS überwiegt; dies wird kontrovers diskutiert. Während Booss et al. einen zehnfach höheren Anteil von CD8 als CD4 in MS-Läsionen beschrieben (Booss et al. 1983) und auch Babbe et al. eine klonale Expansion von CD8 positiven T-Zellen in MS-Läsionen beobachteten (Babbe et al. 2000), konnten Sun et al. keine erhöhte Infiltration von CD8 feststellen (Sun D et al. 2001). Da die Behandlung mit CD4-Antikörpern nicht zu einer Verringerung der Aktivität der MS führte (van Oosten et al. 1997), bezogen verschiedene Therapiestudien auch die CD8-positiven Zellen in die Untersuchungen ein. Der Einsatz eines Antikörpers, der sowohl zur Dezimierung der CD4- als auch der CD8-positiven T-Zellen führte, reduzierte die Schubfrequenz und das Auftreten neuer Läsionen, allerdings bewirkte dies auch nur geringe Verbesserungen des neurologischen Defizits (Coles et al. 1999, Paolillo et al. 1999)

In der vorliegenden Arbeit wurde durch den Marker CD3 die Gesamtpopulation der T-Lymphozyten, sowie durch den Marker CD8 der Anteil der zytotoxischen T-Lymphozyten ermittelt, so dass indirekt auch auf den Anteil der CD4-positiven Zellen geschlossen werden konnte. Hierbei ergab sich mit durchschnittlich 60% ein höherer Anteil von CD8-positiven T-Zellen an der Gesamtpopulation, ein signifikanter Unterschied zwischen den drei immunopathogenetischen Subtypen und zwischen den Läsionsaktivitäten konnte nicht nachgewiesen werden. Somit werden am ehesten die Beobachtungen von Booss et al. und Babbe et al. durch diese Dominanz der zytotoxischen T-Zellen unterstützt.

### 4.1.2 B-Lymphozyten und Plasmazellen

In der Vergangenheit wurde im Zusammenhang mit der MS das Augenmerk besonders auf Makrophagen und T-Zellen gerichtet. Verschiedene Studien lassen jedoch vermuten, dass auch B-Zellen, Plasmazellen und Antikörper eine Rolle in der Pathogenese der Multiplen Sklerose spielen. So konnte in akuten MS-Läsionen die Bindung MOG- und MBP-spezifischer Antikörper an beschädigtem Myelin beobachtet werden (Genain et al. 1999, Raine et al. 1999), im Liquor zeigte sich eine klonale Expansion von B-Zellen und CD138-positiven Plasmazellen (Colombo et al. 2000, Ritchie et al. 2004). Die Infiltration von B- und Plasmazellen in den MS-Läsionen wird hingegen kontrovers diskutiert. In Untersuchungen von Traugott konnten selten B-Zellen, jedoch einige Plasmazellen im Infiltrat ermittelt werden (Traugott 1990), andere Studien ergaben eine Akkumulation von B-Zell-Klonen nicht nur im Liquor, sondern auch in Läsionen (Qin et al. 1998, Cross et al. 2001, Gilden et al. 2001).

Es ist allerdings derzeit noch nicht geklärt, ob und in welcher Funktion B-Zellen und Plasmazellen eine Rolle spielen. Erste kleinere Therapiestudien mit dem CD20-Antikörper Rituximab lassen jedoch eine Beteiligung der B-Zellen vermuten. So konnte Rituximab die Anzahl der B-Zellen im Liquor senken und die Krankheitsaktivität klinisch und im MRT vermindern (Stüve et al. 2005, Hauser et al. 2008). Da Plasmazellen nicht das Ziel von Rituximab sind, wird weniger eine Auswirkung auf Antikörperproduktion als vielmehr eine konsekutive Verminderung der B-Zell-vermittelten Antigenpräsentation und der Aktivierung der Makrophagen und T-Zellen vermutet (Meinl et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit war die Infiltration von CD20-positiven B-Zellen insgesamt mit einem Median von 0 Zellen/mm<sup>2</sup> und einem Mittelwert von 1,9 Zellen/mm<sup>2</sup> sehr gering, die Infiltration der Plasmazellen insgesamt mit einem Median von 2,4 Zellen/mm<sup>2</sup> etwas höher. Dabei stellte sich sowohl zwischen den drei immunopathogenetischen Subtypen als auch zwischen den Läsionsaktivitäten kein signifikanter Unterschied dar. Die hier erhobenen Daten stehen somit am ehesten mit den Beobachtungen von Traugott im Einklang. Daher scheinen B-Zellen nicht in den Läsionen zu akkumulieren und zu Plasmazellen zu differenzieren. Möglicherweise findet eine Akkumulation im Liquor statt, verschiedene Untersuchungen zeigten eine klonale Expansion von B-Zellen und CD138-positiven Plasmazellen im Liquor (Colombo et al. 2000, Ritchie et al. 2004). Des Weiteren wurde auch in entzündeten Meningen ein geeignetes Milieu für die Proliferation von B-Zellen und ihre Differenzierung zu Plasmazellen beschrieben (Magliozzi et al. 2007).

## 4.2 Das lymphozytäre Infiltrat in frühaktiven Läsionen

### 4.2.1 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten sind in dem entzündlichen Infiltrat aller immunopathogenetischen Subtypen ohne wesentliche Unterschiede bezüglich der Zelldichte zu beobachten (Lucchinetti et al. 2000). Die hier vorliegende Arbeit konnte diese Untersuchungen bestätigen, alle drei Subtypen wiesen CD3-positive T-Lymphozyten auf, ein signifikanter Unterschied konnte im Parenchym nicht nachgewiesen werden. T-Zellen infiltrieren jedoch nicht nur diffus das Gewebe, sie können sich auch im Bereich der Virchow-Robin-Räume als sogenannte perivaskuläre Cuffs ansammeln (van der Valk und de Groot 2000). Dabei scheinen T-Zellen, insbesondere CD8 positive T-Zellen, durch Interaktion über den Glykoproteinligand-1 eine erhöhte Adhäsionsfähigkeit zu den Venolen zu besitzen (Battistini et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit konnten in allen drei Subtypen perivaskuläre T-Zellen beobachtet werden, allerdings war die Zelldichte in Subtyp I und in Subtyp II jeweils signifikant höher als in Subtyp III. Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang mit der perivenösen Läsionsentwicklung von Subtyp I und II (Lucchinetti et al. 2000).

Innerhalb der Gesamtpopulation der T-Lymphozyten überstieg die Dichte der CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen in allen drei Subtypen die Dichte der CD4-positiven T-Zellen, jedoch untereinander ebenfalls ohne signifikante Unterschiede. Somit könnten in der vorliegenden Arbeit besonders die zytotoxischen T-Lymphozyten als Effektorzellen eine Rolle spielen. Die Dominanz der CD8-positiven T-Lymphozyten könnte mit Untersuchungen am Tiermodell von Huseby et al. im Einklang stehen, in denen die durch CD8 positive T-Zellen ausgelöste EAE eher der MS ähnelt als die durch CD4-positive T-Zellen ausgelöste EAE (Huseby et al. 2001) Wie auch bezüglich der CD3-positiven Gesamtpopulation der T-Zellen, ließ sich in allen drei Subtypen eine Infiltration der CD8-positiven T-Zellen diffus im Parenchym, jedoch auch perivaskulär, ohne einen signifikanten Unterschied ermitteln. Daher scheinen die T-Lymphozyten, insbesondere zytotoxische T-Lymphozyten, in allen drei Subtypen wichtige Effektorzellen zur Vermittlung der Entzündungsreaktion und des Entmarkungsprozesses zu sein. Die Funktionen der T-Lymphozyten sind allerdings vielfältig, so könnten in den verschiedenen Subtypen unterschiedliche Funktionen überwiegen. In den Subtypen I und II steht die autoimmun-medierte entzündliche Entmarkung im Vordergrund (Lucchinetti et al. 2000) Zytotoxische T-Lymphozyten können proinflammatorische Zytokine wie TNF  $\alpha$  und INF  $\gamma$  sezernieren (Friese und Fugger 2005) Diese Zytokine können Makrophagen aktivieren (Al-Omaishi et al. 1999) was zu der erhöhten Makrophagendichte in Subtyp I, aber auch in

Subtyp II, führen könnte. In der vorliegenden Arbeit ist die Anzahl sowohl der CD3- als auch der CD8-T-Zellen in Subtyp II am höchsten, was eine verstärkte Entzündungsreaktion vermuten lässt. Der Anteil der CD8-positiven T-Zellen an der CD3-positiven Gesamtpopulation war allerdings im Vergleich der Subtypen in diesem Subtyp II mit 60% am geringsten. Somit scheinen im Umkehrschluss auch die CD4-positiven Zellen im Subtyp II eine größere Rolle zu spielen als in den anderen Subtypen. Dies könnte eine höhere Aktivierung von B-Zellen und deren Differenzierung zu Plasmazellen mit konsekutiver Antikörperproduktion bewirken und somit auch die für Subtyp II charakteristischen Immunglobulinablagerungen erklären. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass der Anteil der zytotoxischen T-Lymphozyten an der Gesamtpopulation zwar in dem Subtyp I mit durchschnittlich 67,7 % und bei Subtyp III mit 62,5 % höher war und somit der Anteil der CD4-positiven Zellen geringer, der Unterschied zwischen den Subtypen zeigte jedoch keine Signifikanz. Dennoch könnte besonders in Subtyp II eine Interaktion zwischen CD8- und CD4-positiven Zellen stattfinden. Verschiedene Untersuchungen beschrieben ein komplexes Zusammenspiel der beiden Subpopulationen: Myelinspezifische CD8-positive T-Zellen sind in der Lage, ebenfalls myelinspezifische CD4-positive T-Zellen mithilfe von Chemokinen anzulocken (Biddison et al. 1998). Außerdem könnten T-Helferzellen zur Initiierung der CD8-T-Zell-Antwort (Smith et al. 2004) und zum Entstehen von CD8-positiven Gedächtniszellen beitragen (Sun JC et al. 2004, Bevan 2004).

Im Gegensatz zu den Subtypen I und II wird bei dem Subtyp III weniger eine autoimmune Entzündungsreaktion als vielmehr eine Schädigung der Oligodendrozyten als Pathomechanismus vermutet. Somit könnte im Subtyp III die Zytotoxizität der T-Lymphozyten eine wesentliche Rolle spielen. Zytotoxische T-Lymphozyten erkennen ein Antigen, wenn es durch den MHC-I-Komplex präsentiert wird. Untersuchungen konnten zeigen, dass in aktiven MS-Läsionen verschiedene Zellarten wie Oligodendrozyten und Neurone MHC-I exprimieren, wodurch sie ein mögliches Ziel der zytotoxischen T-Zellen darstellen könnten (Höftberger et al. 2004). So beschrieben Jurewicz et al, dass MBP-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten MHC I-exprimierende Oligodendrozyten direkt durch Lyse schädigen können (Jurewicz et al. 1998).

Derzeit wird vermutet, dass die Schädigung der Oligodendrozyten durch eine Virusinfektion verursacht sein könnte (Lucchinetti et al. 1996 und 2000). Auch Haring et al. beobachteten bei Mäusen eine von zytotoxischen T-Lymphozyten vermittelte Demyelinisierung nach viraler Infektion (Haring et al. 2002). Möglicherweise könnten die Oligodendrozyten auf die virale Infektion mit einer erhöhte Expression von MHC I reagieren, was dann die Zerstörung dieser

Zellen durch CD8-positive zytotoxische T-Zellen zur Folge hätte und eine Demyelinisierung auslösen könnte.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit die Dichte Granzym-B-positiver zytotoxischer T-Lymphozyten im entzündlichen Infiltrat untersucht. GrB-positive zytotoxische T-Lymphozyten wurden in vorangegangenen Untersuchungen besonders in engem Kontakt zu den geschädigten Axonen gefunden, die zytotoxischen Vesikel erschienen polarisiert in Richtung der Axone (Neumann et al. 2002). Wang et al. beobachteten eine toxische Wirkung im Hinblick auf Neurone, während Astrozyten durch Granzym B nicht geschädigt wurden (Wang et al. 2006). Die Entmarkung in Läsionen des Subtyps III wird im Vergleich mit den autoimmun-medierten Subtypen I und II eher auf eine Oligodendrozytopathie zurückgeführt. Oligodendrozyten in Läsionen des Subtyps III weisen apoptotische Veränderungen und einen Verlust spezifischer Myelinproteine auf (Lucchinetti et al. 2000).

GrB interagiert innerhalb der Zielzellen mit Schlüsselsubstraten der Apoptose wie den Pro-Caspasen (Martin et al. 1996). Es wurde daher vermutet, dass GrB auch an der Apoptose der Oligodendrozyten vor allem in Subtyp III beteiligt sein könnte. In der vorliegenden Arbeit war die Zelldichte der GrB-positiven T-Zellen insgesamt mit durchschnittlich 3,2 Zellen/mm<sup>2</sup> gering, der Anteil der GrB-positiven Zellen an den zytotoxischen T-Zellen betrug durchschnittlich 37%. Dabei ließ sich zwischen den Subtypen sowohl im Parenchym als auch perivaskulär kein signifikanter Unterschied nachweisen. Somit könnte GrB nicht nur in Subtyp III, sondern auch in den Subtypen I und II am Verlust von Oligodendrozyten beteiligt sein. Da die Schädigung der Oligodendrozyten jedoch in Subtyp III besonders ausgeprägt ist, scheinen neben Granzym B auch andere Faktoren diese Apoptose auszulösen. Auch wenn GrB mit Perforin interagiert (Kagi et al. 1994), so vermag bereits Perforin allein die Lyse der Oligodendrozyten zu bewirken (Zeine et al. 2001). Auch INF- $\gamma$  kann in vitro die Apoptose der Oligodendrozyten induzieren (Vartanian et al. 1995). Außerdem kann die Apoptose über den sogenannten Fas-Liganden ausgelöst werden, der auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird und an den CD95-Rezeptor der Zielzelle bindet (Gulbins et al. 2000). In Betracht kommt schließlich auch der tumor necrosis factor (TNF), welcher unabhängig von Caspasen zu einer Apoptose der Oligodendrozyten führen kann (Jurewicz et al. 2005).

Ob die Anzahl GrB-positiver T-Zellen mit der Dichte der Oligodendrozyten oder dem Ausmaß der Axonschädigung in den verschiedenen Subtypen korreliert, könnte Gegenstand weitererführender Untersuchungen sein.

Neben den GrB-enhaltenden T-Lymphozyten scheinen zytotoxische T-Lymphozyten im Allgemeinen nicht nur als Effektorzellen im Entmarkungsprozess, sondern besonders im Rahmen der Axonschädigung eine Rolle zu spielen. In CD8-T-Zell-defizienten Mäusen im MS-Tiermodell konnte zwar eine fortdauernde Demyelinisierung, jedoch ein erhaltener axonaler Transport beobachtet werden (Ure und Rodriguez 2002). Außerdem bauen zytotoxische T-Lymphozyten, nicht aber CD4-positive T-Zellen, *in vitro* nach Erkennung des passenden MHC I-Antigens stabile Verbindung zu Axonen auf und diese Interaktion führt zur Durchtrennung der Axone (Medana et al. 2001). Der Axonschaden korreliert mit der Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten in der Läsion (Bitsch et al. 2000). Größere Untersuchungen bezüglich der Axonschädigung und ihrer Korrelation mit der Infiltration von T-Lymphozyten im Hinblick auf die verschiedenen immunopathogenetischen Subtypen und Läsionsaktivitäten könnten weiteren Aufschluss geben.

#### **4.2.2 B-Lymphozyten und Plasmazellen**

In der Vergangenheit wurde vorrangig den T-Zellen und Makrophagen eine Rolle in der Pathogenese der Multiplen Sklerose zugeschrieben, eine mögliche Beteiligung der B-Zellen, Plasmazellen und der Antikörper wurde vernachlässigt. Allerdings beobachtete schon Esiri eine erhöhte Anzahl von B-Zellen und Plasmazellen in aktiven Läsionen (Esiri 1977) und Gay et al. beschrieben hypermutierte B-Zell-Klone und Immunglobuline bzw. Immunkomplexe in Zusammenhang mit untergegangenen Myelin in sehr frühen Stadien der Läsionsentwicklung (Gay et al. 1997).

Bisher ist die Infiltration von CD20-positiven B-Zellen zur Überprüfung möglicher Unterschiede zwischen den verschiedenen immunopathogenetischen Subtypen noch nicht an einer größeren Anzahl von Biopsien analysiert worden. In der vorliegenden Arbeit wurden nur vereinzelt CD20-positive B-Zellen im entzündlichen Infiltrat ermittelt, ein signifikanter Unterschied zwischen den Subtypen konnte nicht festgestellt werden. Wie bereits erwähnt unterstützen diese Daten die Beobachtungen von Traugott (Traugott 1990). Die Anzahl der B-Zellen im entzündlichen Infiltrat liegt somit auch deutlich unter der Anzahl der T-Zellen, die somit eher wichtige Effektorzellen im Entzündungsprozess darstellen könnten. Die antigenpräsentierende Funktion der B-Zellen spielt jedoch für die Aktivierung der T-Zellen eine Rolle (Cross et al. 2001). Auch B-Zellen können die Blut-Hirn-Schranke überwinden, wenn sie Oberflächenmoleküle exprimieren, die mit Liganden/Rezeptoren der Endothelzellen interagieren (Alter et al. 2003) und können somit in das ZNS einwandern. Es wurde beobachtet, dass B-Zellen nach der Einwanderung in das ZNS unter Deposition eines

spezifischen Antigens akkumulieren (Knopf et al. 1998). Die Daten der vorliegenden Arbeit lassen jedoch vermuten, dass B-Zellen nicht in den Läsionen akkumulieren und zu Plasmazellen differenzieren. Möglicherweise findet eine Akkumulation im Liquor statt, verschiedene Untersuchungen zeigten eine klonale Expansion von B-Zellen und CD138-positiven Plasmazellen im Liquor (Colombo et al. 2000, Ritchie et al. 2004). Ob sich die Dichte der B-Zellen im Liquor zwischen den verschiedenen immunopathogenetischen Subtypen unterscheidet, könnte Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

Wie verschiedene, oben genannte Untersuchungen gezeigt haben, können im entzündlichen Infiltrat der MS-Läsionen auch Plasmazellen in unterschiedlicher Dichte enthalten sein.

Lucchinetti et al. beobachteten Plasmazellen in allen immunopathogenetischen Subtypen (Lucchinetti et al. 2000). Die Daten der vorliegenden Arbeit können diese Beobachtungen bestätigen. So ist die Infiltration von Plasmazellen in den frühaktiven Läsionen mit einem Median von 1,6 Zellen/mm<sup>2</sup> zwar gering, jedoch lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Subtypen nachweisen. Auch in den Virchow-Robin-Räumen wurden Plasmazellen beobachtet (Zhang Y et al. 2005). Vereinzelt konnten diese in der vorliegenden Arbeit ohne signifikanten Unterschied zwischen den Subtypen ermittelt werden.

Trotz der geringen Infiltration von Plasmazellen konnten verschiedene Studien eine mögliche Beteiligung der humoralen Immunabwehr aufzeigen. Im Tiermodell ließ sich eine gesteigerte Demyelinisierung durch Autoantikörper beobachten (Linnington et al. 1988) und in akuten MS-Läsionen wurde die Bindung MOG- und MBP-spezifischer Antikörper an beschädigtem Myelin festgestellt (Genain et al. 1999, Raine et al. 1999). Nach der Einteilung der vier pathogenetischen Subtypen von Lucchinetti et al. ist der Subtyp II mit Komplement- und Immunglobulinablagerungen assoziiert (Lucchinetti et al. 2000). Diese Hypothese wird auch durch ein erfolgreiches Ansprechen auf die Plasmapherese ausschließlich bei Subtyp II untermauert (Keegan et al. 2005). Auch wenn in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Unterschied zwischen den Subtypen bezüglich der Plasmazelldichte festgestellt werden konnte, so wurde doch die höchste Zelldichte von 2,4 Zellen/mm<sup>2</sup> in Subtyp II ermittelt. Daher könnte man vermuten, dass die Plasmazellen am ehesten in Subtyp II eine Rolle spielen und dort zumindest teilweise zur Immunglobulinablagerung beitragen.

Die Herkunft der Immunglobuline ist jedoch nicht vollständig geklärt. Auf der einen Seite können Antikörper gegen Bestandteile der Myelinscheide und der Oligodendrozyten (MOG) über die zerstörte Blut-Hirn-Schranke ins ZNS gelangen (Linnington et al. 1988). Auf der anderen Seite wurde eine Antikörperproduktion von Plasmazellen innerhalb des ZNS beobachtet (Knopf et al. 1998). Sollte die Antikörperproduktion innerhalb des ZNS

stattfinden, würde dies die Frage nach der Lokalisation aufwerfen. Zum einen könnten die Antikörper von Plasmazellen innerhalb der Läsion ausgehen. Für die Antikörperproduktion im Rahmen der MS scheinen vor allem kurzlebige Plasmazellen relevant zu sein (Cepok et al. 2005b). Dies könnte möglicherweise erklären, warum in der vorliegenden Arbeit selbst in Subtyp II eine relativ geringe Dichte an Plasmazellen ermittelt wurde. Zum anderen konnte die Produktion von oligoklonalen IgG im Liquor festgestellt werden (Tourtellotte et al. 1984). Außerdem beobachteten Corcione et al. in Liquoranalysen sämtliche Stadien der B-Zelldifferenzierung (Corcione et al. 2004). Somit könnten die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen und die Antikörperproduktion im Liquor stattfinden, die Antikörper könnten anschließend in das ZNS-Gewebe gelangen.

Es ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, ob Antikörper in der Initiierung des Entmarkungsprozesses eine Rolle spielen oder ob diese eine Reaktion auf die Gewebeschädigung darstellen (Cross et al. 2001). Für eine Beteiligung an der Initiierung spricht die Identifizierung von Antikörpern in frühen Läsionen (Gay et al. 1997, Genain et al. 1999). Weiterführende Untersuchungen im Hinblick auf die Rolle der Antikörper könnten dies jedoch erhellen.

### **4.3 Das lymphozytäre Infiltrat in verschiedenen Läsionsaktivitäten**

#### **4.3.1 T-Lymphozyten**

Wie bereits oben beschrieben sind T-Lymphozyten ein großer Bestandteil des entzündlichen Infiltrats und es wird ihnen eine Rolle in der Pathogenese der MS und somit insbesondere eine Infiltration in den aktiv demyelinisierenden Plaques zugeschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde nun auch die Dichte der T-Lymphozyten in den inaktiven Läsionen mit der Dichte in den frühaktiven Läsionen verglichen.

Auch inaktiv demyelinisierte Läsionen enthalten T-Zellen, Kornek et al. beobachteten hier jedoch eine geringere Dichte als in aktiven Läsionen (Kornek et al. 2000). Ebenso wurde eine mit dem Alter der Läsion abnehmende Dichte CD8-positiver Zellen beschrieben (Traugott 1984, Hauser et al. 1986). CD8-positive T-Zellen scheinen jedoch trotzdem nicht nur in frühaktiven Läsionen eine Rolle zu spielen. Sie sind auch sehr häufig in chronischen Läsionen aufzufinden (Al-Omaishi et al. 1999) und können, vermutlich als T-Gedächtniszellen, teilweise länger als 5 Jahre im Liquor und im Blut persistieren und möglicherweise zur Krankheitsprogression beitragen (Skulina et al. 2004).

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigten eine etwas höhere Dichte der T-Zellen in den inaktiven Läsionen, somit konnten die Ergebnisse von Kornek et al., Traugott und Hauser et al. nicht bestätigt werden. Der Unterschied bezüglich der Zelldichte der T-Zellen zwischen den frühaktiven und den inaktiven Läsionen zeigte jedoch keine Signifikanz.

In inaktiv demyelinisierten Plaques ist eine gesteigerte Expression von MHC-I besonders auf der Mikroglia zu beobachten (Höftberger et al. 2004) und auch auf Astrozyten konnte in vitro während ihrer Aktivierung ein gesteigerte Expression von MHC-I und MHC-II festgestellt werden (Wong et al. 1984, Vidovic et al. 1990). Dies könnte im Zusammenhang mit der Präsenz sowohl der CD8-positiven als auch der CD4-positiven T-Zellen in den inaktiven Läsionen stehen.

Die Funktion der T-Zellen in den inaktiven Läsionen ist jedoch noch nicht geklärt. CD8- positive T-Zellen könnten durch ihre zytotoxische Funktion zur Axonschädigung beitragen. Wie bereits oben erwähnt, korreliert der Axonschaden mit der Anzahl der CD8-positiven T-Zellen in der Läsion (Bitsch et al. 2000). In inaktiven MS Läsionen kann sich die Axonschädigung fortsetzen (Kornek et al. 2000). Somit ließe sich auch die Infiltration der GrB-positiven zytotoxischen T-Zellen in den inaktiven Läsionen erklären.

Andererseits lassen Therapiestudien mit Glatirameracetat, in denen eine CD8- positive T-Zell- Antwort induziert wurde, sowohl zytotoxische als auch regulatorische Effekte der CD8- positive T-Zellen vermuten (Karandikar et al. 2002, Tennakoon et al. 2006). So könnte die regulatorische Funktion der CD8-positiven Zellen besonders in den inaktiven Läsionen eine Rolle spielen.

Antigenspezifische CD8- positive T-Zellen können in vitro die Immunantwort durch Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen unterdrücken, die dann durch verminderte Expression co-stimulatorischer Moleküle keine Aktivierung CD4-positiver T-Zellen bewirken (Najafian et al. 2003). Eine weitere Studie beschrieb eine erhöhte Produktion des immunsuppressiven Zytokins IL-10 durch regulatorische CD8- positive T-Lymphozyten (Gilliet und Liu 2002). Im Tiermodell der EAE konnten regulatorische CD8- positive T-Zellen vor erneuten Schüben schützen (Jiang et al. 1992, Koh et al. 1992). Zur Abgrenzung dieser regulatorischen Funktion gibt es allerdings derzeit noch keinen speziellen Marker für regulatorische CD8- positive T-Zellen, außer einer verminderten Expression von CD28 (Sun D et al. 1988). Die Zelldichte der T-Zellen war in den inaktiven Läsionen weder im Parenchym noch perivaskulär signifikant höher als in den frühaktiven Läsionen, so dass größere Studien, auch in Korrelation mit dem Krankheitsverlauf, möglicherweise Aufschluss darüber geben

könnten, ob T-Lymphozyten auch in späteren Läsionsstadien persistieren und ob sie zur Krankheitsprogression beitragen könnten.

### Remyelinisierung

Neben der Demyelinisierung kann bereits in frühaktiven Läsionen auch eine Remyelinisierung stattfinden (Lucchinetti et al. 1999). Dies lässt vermuten, dass die Immunzellen des entzündlichen Infiltrats nicht nur eine Rolle im entmarkenden Prozess spielen, sondern auch die Remyelinisierung stimulieren (Foote and Blakemore 2005). Untersuchungen an CD4- und CD8-defizienten Mäusen zeigten verminderte Remyelinisierung (Bieber et al. 2003). Inwiefern T-Zellen auf die Remyelinisierung einwirken, ob sie möglicherweise mit Oligodendrozyten oder deren Vorläuferzellen interagieren, ist noch nicht geklärt. Die Oligodendrozytendichte könnte für das Ausmaß der Remyelinisierung eine Rolle zu spielen (Ozawa et al. 1994), sie korreliert jedoch nicht mit dem entzündlichen T-Zell-Infiltrat (Lucchinetti et al. 1999). Andererseits sezernieren T-Zellen Faktoren, die für das Überleben und die Migration von Oligodendrozyten-Progenitorzellen nötig sind (Bieber et al. 2003). Andere Untersuchungen beschrieben eine sehr variable Remyelinisierung, unabhängig vom Krankheitsverlauf, Alter und Geschlecht der Patienten, abhängig von der Lokalisation der Läsion (Patrikios et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit konnten zwischen den frühaktiven (EA) und den inaktiven (IA) Läsionen, jeweils zum einen komplett demyelinisiert (no RM), zum anderen früh remyelinisiert (ERM) bezüglich der Zelldichte sowohl der CD3-, als auch der CD8-positiven T-Zellen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Tendenziell war der Anteil der CD8-positiven T-Zellen in den remyelinisierten Läsionen (EA ERM 73,3%, IA ERM 68,7%) größer als bei den demyelinisierten Läsionen (EA no RM 59,6%, IA no RM 55,3 %)

Untersuchungen am Tiermodell EAE zeigten, dass proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  die Migration von Progenitorzellen der Oligodendrozyten positiv beeinflussen (Ben-Hur et al. 2003). CD8-positiv T-Zellen sezernieren TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$ , was die oben genannte Tendenz erklären könnte.

Die Zelldichte der GrB-enthaltenden T-Zellen unterschied sich ebenfalls nicht signifikant zwischen den verschiedenen Läsionsaktivitäten. Tendenziell war die Anzahl der GrB-enthaltenden Zellen in Arealen ohne Remyelinisierung etwas höher und der Anteil der GrB-positiven an den CD8-positiven T-Lymphozyten in EA no RM mit 42,9% am höchsten, was vermuten lassen könnte, dass GrB einen negativen Einfluss auf möglicherweise vorgeschädigte Oligodendrozyten oder Progenitorzellen haben könnte.

Da die Funktion des Myelins u.a. in dem Schutz der Axone besteht, ist es wichtig, fördernde und hemmende Faktoren der Remyelinisierung zu kennen, um sich dies möglicherweise auch therapeutisch zunutze machen können. Weiterführende Untersuchungen humaner Biopsien mit einer größeren Anzahl remyelinisierter Läsionen, könnten, auch in Korrelation mit dem klinischen Verlauf, den möglichen Einfluss der T-Zellen und anderer Immunzellen wie der Makrophagen auf die Remyelinisierung weiter erhellen.

### **4.3.2 B-Lymphozyten und Plasmazellen**

Wie bereits erwähnt wird erst seit der jüngeren Vergangenheit eine mögliche Beteiligung der B- Zellen, Plasmazellen und Antikörper an der Pathogenese der Multiplen Sklerose näher betrachtet. Neben der Infiltration von B-Zellen und Plasmazellen in den verschiedenen Subtypen der frühaktiven Läsionen wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Zelldichte dieser Zellen in inaktiven Läsionen analysiert. Während einige Untersuchungen eine erhöhte Infiltration von B-Zellen und Plasmazellen in frühaktiven Läsionen ergaben (Esiri 1977, Gay et al. 1997), zeigten andere Studien eine Akkumulation von Plasmazellen in chronischen MS-Läsionen (Prineas and Wright 1978, Mallison et al. 1991) und einen höheren Anteil von Plasmazellen im Infiltrat von späten Stadien der MS-Läsionen als im Infiltrat von frühen Stadien (Ozawa et al. 1994). Außerdem wurden an Axone gebundene Antikörper in aktiv demyelinisierenden, aber auch in inaktiven Läsionen beschrieben (Zhang Y et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl in den frühaktiven als auch den inaktiven Läsionen nur vereinzelt B-Zellen ermittelt werden, ein signifikanter Unterschied wurde dabei nicht nachgewiesen. Die Infiltration von Plasmazellen war zwar insgesamt gering, Plasmazellen konnten jedoch nicht nur in frühaktiven, sondern in etwas höherer Dichte auch in inaktiven Läsionen festgestellt werden. Der Unterschied zeigte allerdings sowohl im Parenchym als auch perivaskulär keine Signifikanz, stützt jedoch am ehesten die Beobachtungen von Ozawa und Mitarbeitern.

Verschiedene Untersuchungen lassen vermuten, dass die humorale Immunantwort nicht nur im akuten Entzündungsprozess eine Rolle spielt, sondern dass sie auch noch im weiteren Verlauf persistieren könnte. So sind oligoklonale Banden, die die intrathekale Immunglobulinsynthese darstellen, über viele Jahre nachweisbar (Walsh und Tourtellotte 1986). Da in der vorliegenden Arbeit nur vereinzelt B-Zellen in den inaktiven Läsionen ermittelt werden konnten, lässt sich vermuten, dass die B-Zellen, wie bereits bei den frühaktiven Läsionen erwähnt, nicht in den Läsionen akkumulieren und persistieren. Bei einem sekundär-progressiven Verlauf der MS konnte jedoch die Persistenz von B-Zell-Klonen

im Liquor festgestellt werden (Colombo et al. 2003). Auch Cepok et al. beschrieben eine mögliche Korrelation zwischen intrathekaler B-Zelldichte und Krankheitsprogression (Cepok et al. 2001). Dabei scheinen die meisten Zellen der B-Zelllinie im Liquor B-Gedächtniszellen und Plasmazellen zu sein (Corcione et al. 2004, Cepok et al. 2005b). Neben der Akkumulation im Liquor könnten die B-Zellen auch in entzündeten Meningen ein geeignetes Milieu für Proliferation und Differenzierung zu Plasmazellen vorfinden (Magliozzi et al. 2007). In den Meningen wurden lymphfollikel-ähnliche Strukturen beschrieben, diese konnten jedoch nur bei Patienten mit sekundär-progressivem Verlauf beobachtet werden (Serafini et al. 2004). Das Auftreten der Follikel ist begleitet von einer Infiltration von Plasmazellen im Parenchym, teilweise auch perivaskulär (Magliozzi et al. 2007). Dies könnte die Beobachtung von Plasmazellen auch in inaktiven Läsionen erklären. Andererseits könnte es sich in den inaktiven Läsionen auch um langlebige Plasmazellen handeln. So können schon während der Entzündung verschiedene Mediatoren wie B cell activating factor of the tumor necrosis family (BAFF) und Chemokin-CXC-Motiv-Ligand 12 (CXCL 12) entstehen, die zur Persistenz von langlebigen Plasmazellen nötig sind (Krumbholz et al. 2005, Krumbholz et al. 2006). Dabei können Astrozyten auch BAFF produzieren (Krumbholz et al. 2005) und in inaktiven Läsionen wurde die Hochregulierung von CXCL 12 beobachtet (Krumbholz et al. 2006). Langlebige Plasmazellen können auch ohne ein spezifisches Antigen aus B-Gedächtniszellen entstehen (Bernasconi et al. 2002) und Antikörper produzieren (Manz et al. 2005). Die Rolle der Antikörper ist jedoch nicht vollständig geklärt. Zum einen könnten sie Myelinreste für die Phagozytose durch Makrophagen opsonisieren. Auch in den inaktiven Läsionen könnten sie zur Axonschädigung beitragen (Zhang Y et al. 2005). Am Modell der EAE konnte auch ein regulatorischer Einfluss der Antikörper beobachtet werden, indem sich Mäuse ohne Antikörperproduktion langsamer erholten als Mäuse vom Wildtyp (Wolf et al. 1996). Weiterführende Untersuchungen können dies auch in Bezug auf mögliche Unterschiede zwischen frühaktiven und inaktiven Läsionen erhellen.

### Remyelinisierung

Da eine Remyelinisierung bereits in sehr frühen Läsionen auftreten kann (Lucchinetti et al. 1999), liegt die Vermutung nahe, dass die Immunzellen des entzündlichen Infiltrates sowohl zur Demyelinisierung als auch zur Remyelinisierung beitragen (Foote and Blakemore 2005). Verschiedene Untersuchungen zeigten ebenfalls eine mögliche Beteiligung der humoralen Immunantwort an der Remyelinisierung auf. So waren im Theiler's Virus-Modell monoklonale Antikörper in der Lage, Remyelinisierung zu induzieren (Warrington et al. 2000)

und Antikörper gegen verschiedene ZNS-Antigene steigerten die Remyelinisierung in der EAE (Rodriguez und Lennon 1990).

Mit welchem Mechanismus Antikörper Remyelinisierung induzieren ist unklar, möglicherweise bewirken sie eine Prävention der Apoptose der Progenitorzellen der Oligodendrozyten (Howe et al. 2004). Der Charakter der Antikörper scheint sich jedoch zwischen Demyelinisierung und Remyelinisierung zu unterscheiden: Antikörper im Rahmen der Demyelinisierung scheinen hoch affine IgG und spezifisch für ein einziges Antigen zu sein, während die Remyelinisierung-induzierenden Antikörper niedrig affine und wenig spezifische IgM sein könnten, die sich im Modell als nicht pathogen erwiesen (Rodriguez 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnten zwischen den frühaktiven (EA) und inaktiven (IA) Läsionen, jeweils zum einen komplett demyelinisiert (no RM), zum anderen mit früher Remyelinisierung (ERM), bezüglich der Zelldichte sowohl der CD20-positiven B-Zellen, als auch der CD138-positiven Plasmazellen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Wie bereits erwähnt traten B-Zellen nur vereinzelt in den Läsionen auf, Plasmazellen waren etwas häufiger zu ermitteln. Tendenziell wurden mehr Plasmazellen in nicht remyelinisierten Arealen beobachtet, die höchste Zelldichte lag bei IA no RM mit 7,6 Zellen/mm<sup>2</sup>. Sollten Antikörper die Remyelinisierung induzieren, wirft dies also erneut die Frage nach der Herkunft der Antikörper auf. Aufgrund der vorliegenden Tendenz scheinen diese Antikörper nicht vorwiegend von Plasmazellen aus der Läsion zu stammen. Außerdem scheint die Oligodendrozytendichte für das Ausmaß der Remyelinisierung eine Rolle zu spielen (Ozawa et al. 1994) Lucchinetti et al. beobachteten jedoch, dass auch die Oligodendrozytendichte nicht mit dem entzündlichen Plasmazellinfiltrat korreliert (Lucchinetti et al. 1999) was somit ebenfalls die Rolle der Plasmazellen zumindest in den Läsionen im Rahmen der Remyelinisierung als fraglich erscheinen lässt. Zudem stammen die meisten Erkenntnisse bezüglich der Induktion der Remyelinisierung aus Tiermodellen. Andere Untersuchungen beschrieben im Gegensatz zu den oben genannten eine sehr variable Remyelinisierung, unabhängig vom Krankheitsverlauf, Alter und Geschlecht der Patienten, abhängig von der Lokalisation der Läsion (Patrikios et al. 2006).

Die Remyelinisierung stellte keinen Schwerpunkt der Arbeit dar, so wurde nur eine mögliche Tendenz beschrieben, die in weiterführenden Untersuchungen mit größeren Fallzahlen überprüft werden könnte. Da der Axonschaden mit bleibenden neurologischen Defiziten korreliert (Pendlebury et al. 2000) und die Remyelinisierung vermutlich zum Schutz der Axone beitragen kann, könnte die Erforschung fördernder und hemmender Faktoren der

Remyelinisierung und somit auch die Entwicklung entsprechender therapeutischer Strategien in Zukunft Gegenstand weiterführender Studien sein.

#### **4.4 Das lymphozytäre Infiltrat in der periläsionalen weißen Substanz**

Neben dem entzündlichen Entmarkungsprozess in den Läsionen lässt sich auch in der periläsionalen weißen Substanz (PPWM) eine diffuse Reaktion auf diese Entzündung feststellen. Besonders Lymphozyten wurden an der Grenze zur aktiven Demyelinisierung beobachtet (Prineas 1975). Bezüglich der Lymphozyten sind vor allem die Plasmazellen und T-Lymphozyten im diffusen Infiltrat beschrieben worden (Prineas und Wright 1978, Kutzelnigg et al. 2005). In der periläsionalen weißen Substanz ist auch die Expression von MHC-I besonders auf Mikroglia erhöht (Höftberger et al. 2004). Dies könnte die Infiltration von zytotoxischen Lymphozyten erklären. Außerdem kann eine verminderte Anzahl an Oligodendrozyten in der PPWM vorliegen (Lucchinetti et al. 2000). In der PPWM wurden zwar noch keine charakteristischen Zeichen einer Entmarkung festgestellt und die diffuse Entzündungsreaktion scheint sich in der PPWM langsamer auszubreiten, eine Axonschädigung in Verbindung mit aktivierten Mikrogliazellen wurde jedoch auch hier beschrieben (Bjartmar et al. 2001, Kutzelnigg et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit ließ sich eine diffuse Infiltration von Lymphozyten in der periläsionalen weißen Substanz, vereinzelt auch perivaskulär, feststellen. Die Zelldichte war zwar in der PPWM geringer als in den Läsionen, jedoch war auch hier kein signifikanter Unterschied weder zwischen den verschiedenen immunopathogenetischen Subtypen der frühaktiven Fälle einerseits noch zwischen den gesamten frühaktiven und den inaktiven Fällen andererseits nachweisbar. Somit scheint die diffuse Reaktion der periläsionalen weißen Substanz nicht nur während des frühaktiven akuten Entmarkungsprozesses aufzutreten, auch in späteren Stadien scheint die pathologische Veränderung der PPWM zu persistieren. GrB-positive T-Lymphozyten traten sowohl in den Subtypen der frühaktiven Läsionen als auch in den inaktiven Fällen nur vereinzelt auf. Der Anteil der zytotoxischen T-Zellen an der CD3-positiven Gesamtpopulation der T-Zellen lag bei den frühaktiven und auch bei den inaktiven Fällen bei durchschnittlich 50% und war somit etwas niedriger als in den Läsionen. Daher scheinen zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen gleichermaßen an der diffusen Reaktion der PPWM beteiligt zu sein.

Wie auch in den entzündlich-entmarkenden Läsionen war die Infiltration der B- und Plasmazellen in der PPWM geringer als die Infiltration der T-Zellen.

In der PPWM ließ sich außer bei einem inaktiven Fall keine Infiltration von CD20-positiven B-Zellen ermitteln. Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass B-Zellen weniger ins Parenchym einwandern, sondern eher beispielsweise im Liquor oder in den Meningen akkumulieren und persistieren. Wie in den Läsionen war die Zelldichte der Plasmazellen auch in der PPWM etwas höher als die der B-Zellen, dies jedoch ebenfalls ohne signifikanten Unterschied. In Subtyp II ließen sich in 5 Fällen und somit am häufigsten Plasmazellen beobachten, während in Subtyp I nur in einem Fall und in Subtyp III keine Plasmazelle ermittelt werden konnte. Dies könnte bestätigen, dass die Plasmazellen möglicherweise am ehesten in Subtyp II eine Rolle spielen.

Insgesamt lassen sich die eingangs genannten Beobachtungen durch die Daten der vorliegenden Arbeit bestätigen. Es ist zwar keine Entmarkung in der PPWM zu erkennen, doch lassen sich pathologische Veränderungen im periläsionalen Gewebe, insbesondere eine Infiltration von Lymphozyten, nachweisen.

#### **4.5 Das lymphozytäre Infiltrat in MS-Biopsien in Bezug auf klinische Charakteristika**

In verschiedenen Untersuchungen wurden prognostische Faktoren ermittelt. So gilt das weibliche Geschlecht, ausschließlich sensible Symptome, ein monosymptomatischer Beginn vor dem 40. Lebensjahr oder eine geringe Schubfrequenz als prognostisch günstig (Weinshenker 1994, Noseworthy et al. 2000). Somit scheint das männliche Geschlecht und ein höheres Alter bei Krankheitsbeginn mit einer schlechten Prognose verbunden (Cottrell et al. 1999), jedoch wurde diesbezüglich auch schon das Gegenteil beschrieben (Pittock et al. 2005). Auch ein Einfluss des Hormonhaushalts auf den Verlauf der MS scheint möglich: Zum einen hatte die Gabe von Estriol bei Patientinnen mit RRMS positive Effekte (Sicotte et al. 2002) und in der EAE konnte Estriol den Schweregrad senken und MBP-spezifische T-Lymphozyten produzierten in Estriol-behandelten Mäusen mehr IL-10 (Kim et al. 1999). Zum anderen scheint die Schubrate während der Schwangerschaft reduziert zu sein und erst nach der Geburt wieder anzusteigen (Confavreux et al. 1998). Durch welche Mechanismen die prognostischen Faktoren Einfluss auf den Verlauf der MS nehmen können, ist noch nicht geklärt, es liegen bisher vor allem epidemiologische Studien vor. Wie im Tiermodell gezeigt werden konnte, beeinflussen Hormone möglicherweise die Zytokinproduktion (Whitacre et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurden klinische Daten der frühaktiven Fälle, nämlich Geschlecht, Alter und Verlauf zum Zeitpunkt der Biopsie, auf mögliche Korrelation mit der Zelldichte des

lymphozytären Infiltrats, auch im Hinblick auf die verschiedenen immunopathogenetischen Subtypen, überprüft.

In einer Analyse von 91 Biopsien stammten 53% von Patientinnen, bei denen in der Mehrzahl Subtyp I, gefolgt von Subtyp II und Subtyp III festgestellt wurde (Pittock et al. 2005). Auch in der vorliegenden Arbeit war der Frauenanteil mit 66,7% höher, vorrangig wurden Subtyp I (35,3%) und Subtyp II (38,2%) ermittelt, Subtyp III (26,2%) war etwas weniger vertreten. Bei den Frauen konnte in allen Subtypen ein ähnliches lymphozytäres Infiltrat festgestellt werden, bei den Männern konnte bei geringen Fallzahlen im Einzelfall ein geringeres Infiltrat CD3-positiver T-Zellen aufgezeigt werden. Innerhalb der Subtypen ergab sich zwischen Männern und Frauen kein signifikanter Unterschied, bei den Frauen zeigte sich vereinzelt bei Subtyp I ein erhöhtes Infiltrat CD3-positiver T-Zellen. Die Daten der vorliegenden Arbeit lassen somit vermuten, dass der prognostisch günstige „Faktor weibliches Geschlecht“, unabhängig von den Subtypen, nicht auf eine unterschiedliche Dichte des lymphozytären Infiltrates zurückzuführen ist und sich ein erhöhter Estriol-Spiegel und ein möglicherweise dadurch verändertes Zytokinmuster (Whitacre et al. 1999) nicht über den Einfluss auf das lymphozytäre Infiltrat auf den Verlauf der MS auswirkt.

In der bereits erwähnten Analyse von Pittock et al. lag das mittlere Alter der Patienten bei 36,6 Jahren, das statistisch häufigste Manifestationsalter ist zwischen dem 20. und dem 40. Lebensjahr beschrieben (Lowis 1990, Sadovnick und Ebers 1993). Das in der vorliegenden Arbeit ermittelte Durchschnittsalter lag 39,2 Jahren und konnte dies somit bestätigen. Die Infiltration von Lymphozyten konnte sowohl in der Altersgruppe von 20 bis 40 Jahren als auch bei den Patienten älter als 40 Jahre ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den immunopathogenetischen Subtypen nachgewiesen werden. Auch innerhalb der Subtypen zeigte sich zwischen den verschiedenen Altersgruppen kein signifikanter Unterschied bezüglich der untersuchten Zellen in den Läsionen, in Subtyp III ließ sich im Alter 20-40 im Einzelfall ein erhöhtes Infiltrat CD138-positiver Plasmazellen feststellen. Ein höheres Alter bei Krankheitsbeginn wird wie bereits erwähnt als prognostisch ungünstiger Faktor beobachtet (Cottrell et al. 1999). Dies scheint sich, unabhängig vom Subtyp, jedoch nicht durch eine erhöhte Zelldichte des lymphozytären Infiltrates erklären zu lassen.

In der von Pittock et al. untersuchten Patientenkohorte wiesen die meisten Patienten einen schubförmig-remittierenden Verlauf auf, gefolgt von einem sekundär-progredienten, einem primär-progredienten und einem monophasischen Verlauf. In der vorliegenden Arbeit wurden zum Zeitpunkt der Biopsie vorwiegend ein monophasischer Verlauf (60,8%) oder ein schubförmig-remittierender Verlauf (37,3%) festgestellt. Crawford et al. beobachteten bei

---

Patienten mit RRMS eine vermehrte CD8-positive T-Zell-Antwort im Vergleich zu Patienten mit PPMS oder SPMS (Crawford et al. 2004). Dies ließ sich in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen, da sich bei allen betrachteten Krankheitsverläufen die Infiltration der CD3-, CD8- und der GrB-positiven T-Zellen unabhängig von den Subtypen nicht signifikant unterschied. Eine weitere Untersuchung beschrieb vermehrt Antikörper bei monophasischem und schubförmig-remittierendem Verlauf im Vergleich zu Patienten mit SPMS (Lalive et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte dies durch die Infiltration von B-Zellen und Plasmazellen nicht widerspiegelt werden, hier ergab sich unabhängig vom immunopathogenetischen Subtyp kein signifikanter Unterschied bei den verschiedenen Krankheitsverläufen. Somit scheint ein prognostisch günstiger monophasischer Verlauf bzw. ein Verlauf mit geringer Schubfrequenz nicht mit einer negativen Korrelation mit der Dichte des lymphozytären Infiltrates im Zusammenhang zu stehen.

Die Untersuchungen von Pittock et al. ergaben keine Korrelation zwischen den verschiedenen Immunomustern und den klinischen Charakteristika (Pittock et al. 2005). Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigten bei allen untersuchten Altersgruppen, Krankheitsverläufen und in beiden Geschlechtern eine lymphozytäre Infiltration in den Läsionen, es konnte unabhängig vom Subtyp kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Daher könnte vermutet werden, dass sich die mögliche Rolle der Lymphozyten in der Pathogenese der MS in verschiedenen klinischen Charakteristika nicht unterscheidet. Ebenso ist es unwahrscheinlich, aufgrund des Alters, des Krankheitsverlaufs oder des Geschlechts auf die Dichte des lymphozytären Infiltrates schließen zu können. Da die Beurteilbarkeit aufgrund kleiner Fallzahlen eingeschränkt war, könnten weiterführende größere Untersuchungen erhellen, ob und durch welche Mechanismen klinische Charakteristika und histopathologische Befunde korrelieren und ob sich daraus, auch im Hinblick auf die verschiedenen immunopathogenetischen Subtypen, therapeutische Strategien entwickeln lassen.

## 5 Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose ist eine heterogene chronisch-entzündliche Entmarkungserkrankung des ZNS, deren Entzündungsinfiltrat charakteristischerweise zahlreiche Makrophagen und Lymphozyten aufweist. Letztgenannter Zellpopulation wird eine wesentliche Rolle für die mutmaßlich autoimmune Pathogenese zugeschrieben. Histomorphologisch können neben unterschiedlichen Stadien der Entmarkungsaktivität und der Remyelinisierung auch vier verschiedene Immunmuster frühaktiv entmarkender Läsionen identifiziert werden, die sich auf vermutlich unterschiedliche Pathomechanismen zurückführen lassen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Überprüfung dieser Hypothese anhand einer immunhistochemischen Analyse des lymphozytären Infiltrates in 51 frühaktiv und 20 inaktiv entmarkenden Läsionen biopsierter MS-Patienten. Die periläsionale weiße Substanz wurde ebenfalls untersucht, da sich auch dort erste pathologische Veränderungen zeigen können. In einer statistischen Analyse wurden die gewonnenen Daten mit klinisch-relevanten Patientenmerkmalen wie Alter, Geschlecht und Krankheitsverlauf korreliert.

Eine diffuse Infiltration von CD3-, CD8- und in geringerer Dichte auch GrB-positiven T-Lymphozyten ließ sich in allen immunopathogenetischen Subtypen ohne signifikanten Unterschied feststellen. Neben den frühaktiven Läsionen konnte ein T-Zellinfiltrat gleichermaßen auch in den inaktiven Läsionen nachgewiesen werden. T-Zellen stellten den größeren Anteil des lymphozytären Infiltrats dar. CD20-positive B-Zellen wurden hingegen in allen Subtypen frühaktiver Läsionen sowie in den inaktiven Läsionen nur vereinzelt und ohne signifikante Unterschiede festgestellt. Die Zelldichte CD138-positiver Plasmazellen war geringfügig höher als die B-Zelldichte. Plasmazellen stellten sich jedoch in allen immunopathogenetischen Subtypen und ebenso in inaktiven Läsionen ohne statistisch signifikanten Unterschied dar. Sowohl in vollständig entmarkten Läsionen als auch in Arealen mit früher Remyelinisierung konnte gleichermaßen ein lymphozytäres Infiltrat aufgezeigt werden.

Die periläsionale weiße Substanz ließ, wenn auch in geringerem Ausmaß als in den Läsionen, ebenfalls ein entzündliches Infiltrat bestehend aus T-Lymphozyten und Plasmazellen erkennen. Eine Infiltration von B-Zellen in der weißen Substanz zeigte sich mit einer einzigen Ausnahme jedoch nicht. Perivaskuläre Lymphozyten ließen sich in allen Subtypen frühaktiv entmarkender Läsionen sowie in inaktiven Plaques und in der periläsionalen weißen Substanz identifizieren. Im statistischen Vergleich des lymphozytären Infiltrats mit klinisch-relevanten

Patientenmerkmalen wie Geschlecht, Alter und Krankheitsverlauf konnten unabhängig vom Subtyp keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass in der Zusammensetzung des lymphozytären Infiltrats in den entzündlich-entmarkenden Läsionen humaner Hirnbiopsien ein T-lymphozytäres Infiltrat, insbesondere bestehend aus CD8-positiven T-Zellen, dominiert. T-Lymphozyten scheinen in allen drei untersuchten immunopathogenetischen Subtypen als Effektorzellen in der Vermittlung einer autoimmunen Entzündungsreaktion und des Entmarkungsprozesses eine wichtige Rolle zu spielen, wobei möglicherweise unterschiedliche Funktionen in einzelnen Subtypen überwiegen könnten. B-Zellen und Plasmazellen tragen hingegen kaum zum Entzündungsinfiltrat bei. Die von Lucchinetti et al. propagierte Heterogenität von MS-Läsionen spiegelt sich somit im lymphozytären Infiltrat nicht wider. Darüber hinaus spielen insbesondere T-Lymphozyten mutmaßlich nicht nur im aktiven Entmarkungsprozess eine Rolle, sondern lassen durch ihren Nachweis in inaktiv demyelinisierten Läsionen krankheitsunterstützende Mechanismen vermuten. Da sich lymphozytäres Infiltrat unabhängig vom Remyelinisierungsgrad nachweisen lässt, scheinen Lymphozyten keine ausschlaggebende Funktion im Rahmen der Remyelinisierung auszuüben. Klinische Charakteristika wie Geschlecht, Alter und Krankheitsverlauf scheinen, unabhängig vom Subtyp, keinen Einfluss auf die Zusammensetzung und das Ausmaß des lymphozytären Infiltrates zu haben. Weiterführende immunpathologische Studien und detailliertere Auswertungen klinischer Daten biopsierter MS-Patienten könnten weitere Erkenntnisse bezüglich einer pathogenetischen Heterogenität und der Charakterisierung verschiedener Läsionsaktivitäten entzündlich-entmarkender MS-Läsionen erbringen.

## 6 Anhang

### 6.1 Tabellen

Immunhistochemische Färbung	Subtyp I	Subtyp II	Subtyp III	Gesamt
CD 3	12	10	6	28
CD 8	12	10	6	28
Granzym B	14	17	12	43
CD 20	15	17	11	43
CD138	17	21	13	51

Tabelle 1: Verteilung der Fallzahlen auf die verschiedenen Subtypen frühaktiver Läsionen

Immunhistochemische Färbung	EA no RM	EA ERM	IA no RM	IA ERM	Gesamt
CD 3	24	4	10	10	48
CD 8	24	4	10	10	48
Granzym B	38	5	10	10	63
CD 20	38	5	8	10	61
CD 138	45	6	10	10	71

Tabelle 2: Verteilung der Fallzahlen auf die verschiedenen Läsionsaktivitäten

EA no RM: Frühaktiv ohne Remyelinisierung; EA ERM: Frühaktiv mit früher Remyelinisierung;

IA no RM: Inaktiv ohne Remyelinisierung; IA ERM: Inaktiv mit früher Remyelinisierung

Immunhistochemische Färbung	Subtyp I	Subtyp II	Subtyp III	EA gesamt	IA
CD3	4	5	2	11	8
CD8	4	5	2	11	8
GrB	7	11	6	24	7
CD20	6	11	4	21	5
CD138	9	14	6	29	7

Tabelle 3: Verteilung der Fallzahlen der PPWM auf die verschiedenen Subtypen frühaktiver Läsionen und auf die inaktiven Läsionen

EA: Frühaktiv (early active); IA: Inaktiv (inactive)

Artikel	Quelle
Schlittenmikrotom	Leica, Modell SM 2000 R
Objektträger	Knittel; (3-Aminopropyl)triethoxy-Silane: Nr. A3648, SIGMA <sup>®</sup>
Xylol	MERCK <sup>®</sup> , Nr. 1.08685-6025
Isopropylalkohol	Chemie Vertrieb <sup>®</sup> , Nr. 2002986
Citrat	MERCK <sup>®</sup> , Nr. 1-00244.0500
Tris	Roth, Nr. 4855.1
EDTA	SIGMA <sup>®</sup> /Aldrich, Nr. E2, 628-2
PBS Dulbecco 9,55g/l	BIOCHROM AG <sup>®</sup> , Nr. L 182-50
Sekundärantikörper (Anti-mouse biotinylated, Anti-rat biotinylated)	AMERSHAM- pharmacia biotech <sup>®</sup> Nr.: RPN 1001
APAAP-Komplex	Mouse Anti-Alkalische Phosphatase (monoklonal), Nr. D 0651
Neufuchsin	Aldrich, Nr. 22.931-8
Levamisol	SIGMA <sup>®</sup> , Nr.: L9756
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	MERCK <sup>®</sup> , Nr. 1-08597-1000
Fetal Bovine Serum	BIOCHROM <sup>®</sup> , Nr. S0115
Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex	Extravidin <sup>®</sup> , Extravidin Peroxidase Conjugate, SIGMA <sup>®</sup> , Nr. E2886
3,3'-Diaminobenzidin	SIGMA <sup>®</sup> , Nr. D 5637
Hämalaun-Blau	Mayer's Hämalaun, MERCK <sup>®</sup> , Nr. 1-09249-0500
DePex	GURR <sup>®</sup> BDH Laboratory Supplies Nr. 36086
Deckgläser	Menzel

Tabelle 4: Im Rahmen der Biopsieaufbereitung und der immunhistochemischen Färbung verwendete Materialien

Epitop	Antikörper	Verdünnung	Quelle
CD 3	monoclonal Rat Anti-Human, Clone CD3-12	1:200	Serotec, Nr. MCA 1477, Oxford, UK
CD 8	monoclonal Mouse Anti-Human, Clone C8/144B	1:50	DakoCytomation Nr. M 7103, Glostrup, Dänemark
Granzym B	monoclonal Mouse Anti-Human, Clone GrB-7	1:50	DakoCytomation, Nr. M 7235 Glostrup, Dänemark
CD 20	Monoclonal Mouse Anti-Human, Clone L26	1:100	DakoCytomation Nr. M 0755 Glostrup, Dänemark
CD 138	monoclonal Mouse Anti-Human, Clone MI15	1:100	DakoCytomation, Nr. M 7228, Glostrup, Dänemark

Tabelle 5: Verwendete Antikörper und ihre Verdünnung im Rahmen der immunhistochemischen Färbungen

	EA	LA	IA, DM	ERM	LRM
LFB-PAS	+	+	+/-	+/-	+/-
Myelinproteine MBP, PLP	+	+	-	+/-	-
Myelinproteine CNP, MOG, MAG	+	-	-	+/-	-

Tabelle 6: Identifizierung der Läsionsaktivität anhand phagozytierter Myelinabbauprodukte in Makrophagen

EA: Früh aktiv; LA: Spät aktiv; IA DM: Inaktiv demyelinisiert; ERM: Früh remyelinisiert; LRM: Spät remyelinisiert

	Subtyp I	Subtyp II	Subtyp III	p-Wert
CD3 im Parenchym	26,8 (9,6-112) <i>36,2; ±33,6</i>	37,2 (16-77,6) <i>39,9; ±18,9</i>	31,2 (20-35,2) <i>29,7; ±5,5</i>	0,34
CD8 im Parenchym	14,4 (6,4-65,6) <i>24,4; ±16,4</i>	24 (6,9-40) <i>24,1; ±9,4</i>	15,2 (4,8-33,6) <i>18,1; ±12,1</i>	0,26
GrB im Parenchym	3,2 (0-25,6) <i>6,7; ±8,4</i>	4 (0-19,2) <i>5,9; ±6,1</i>	3,3 (0-19,2) <i>6,1; ±6,7</i>	0,98
Anteil CD8/CD3 (%)	67,7 <i>64,6</i>	59,5 <i>62,6</i>	62,5 <i>59,9</i>	0,95
Anteil GrB/CD8 (%)	33,2 <i>29,9</i>	46,2 <i>38,7</i>	34,7 <i>40,1</i>	0,57
CD20 im Parenchym	0 (0-24) <i>3,3; ±6,5</i>	0 (0-8) <i>1,5; ±2,6</i>	0 (0-6,4) <i>1,8; ±2,3</i>	0,79
CD138 im Parenchym	1,6 (0-27,2) <i>4,6; ±7,3</i>	2,4 (0-20) <i>5,3; ±6,0</i>	1,6 (0-28,8) <i>5,0; ±8,2</i>	0,68
CD3 perivaskulär	4,8 (2,24-57,6) <i>17,2; ±22,3</i>	12,8 (2,4-65,5) <i>20,2; ±20,1</i>	2 (0-8) <i>3,1; ±3,1</i>	0,025
CD8 perivaskulär	1,6 (0-33,6) <i>7,3; ±12,1</i>	4,8 (0-46,4) <i>9,3; ±13,6</i>	0 (0-6,4) <i>1,6; ±2,8</i>	0,15
GrB perivaskulär	0 (0-8) <i>0,3; ±0,7</i>	0 (0-2,4) <i>0; ±0</i>	0 (0-22,4) <i>0,6; ±0,9</i>	0,18
CD20 perivaskulär	0 (0-3,2) <i>0,3; ±0,7</i>	0 (0-8) <i>0; ±0</i>	0 (0-44,8) <i>0; ±0</i>	0,49
CD138 perivaskulär	0 (0-9,6) <i>1,0; ±2,5</i>	0 (0-7) <i>0,9; ±1,8</i>	0 (0-35,2) <i>3,1; ±9,7</i>	0,92

Tabelle 7: Ergebnisse der statistischen Analyse der frühaktiven Läsionen

(Angabe des Medians, in Klammern des Range in Zellen/mm<sup>2</sup>, Kursiv: Mittelwert und dazugehörige Standardabweichung (±))

	EA Gesamt	IA gesamt	p-Wert 1	EA no RM	EA ERM	IA no RM	IA ERM	p-Wert 2
CD3	29,6 (9,6- 112) 36,1; ±24,5	39,2 (4,8-64) 37; ±18,8	0,51	32,8 (12,2- 112) 38,7; ±25,4	22,8 (9,6-28) 20,8; ±8,2	48 (4,8- 62,4) 38,3; ±21,4	33,2(12, 8-64) 35,6; ±17	0,34
CD8	17,8 (4,8- 65,6) 21,2; ±13,1	20,8 (0- 52,8) 20,9; ±15,2	1,0	19,8 (4,8- 65,6) 22,3; ±13,6	14,4 (6,4-24) 14,8; ±7,3	18,4 (0- 35,2) 19,8; ±12,8	23,2 (1,6- 52,8) 22; ±18	0,79
GrB	3,2 (0- 25,6) 6,2; ±6,9	6,4 (0- 27,2) 7; ±7,1	0,71	4,4 (0- 25,6) 6,6; ±7,1	2,7 (0- 10,4) 3,3; ±4,3	7,2 (0- 27,2) 8,4; ±8,4	5,6 (0- 14,4) 5,5 ; ±5,6	0,64
Anteil CD8/ CD3(%)	62,9 (17,6- 95,7)	57,9 49,1	0,12	59,6 61,5	73,3 71,5	55,3 47,8	68,7 50,3	0,32
Anteil GrB/ CD8 (%)	36,9 35,0	33,3 30,1	0,41	42,9 39,2	0 8,3	41,1 40,7	22,1 19,4	0,025
CD20	0 (0-24) 2,2; ±4,3	0 (0-8) 0,98; ±2,6	0,23	0 (0-24) 2,1; ±4,5	4,8(0- 5,6) 3,1;±2,9	0 (0-8) 1; ±2,8	0 (0-8) 0,96; ±2,5	0,27
CD138	1,6 (0- 28,8) 5; ±6,9	3,6 (0- 36,8) 7,2; ±9,5	0,45	1,6 (0- 28,8) 5,4; ±7,2	1,6 (0- 5,3) 2,1; ±2,2	7,6 (0- 36,8) 10,3; ±12,1	3,2 (0- 16) 4,1; ±4,7	0,71

Tabelle 8: Ergebnisse der statistischen Analyse der verschiedenen Läsionsaktivitäten (Parenchym)(Angabe des Medians, in Klammern des Range in Zellen/mm<sup>2</sup>, Kursiv: Mittelwert und dazugehörige Standardabweichung (±))

	EA Gesamt	IA gesamt	p-Wert 1	EA no RM	EA ERM	IA no RM	IA ERM	p-Wert 2
CD3	7,2(0- 65,5) <i>15,5, ±19,4</i>	7,2 (1,6- 51,2) <i>11,7; ±13,8</i>	0,4	8 (0- 65,5) <i>17; ±20,4</i>	4,8 (2- 9,6) <i>5,5; ±3,8</i>	4 (1,6- 30,4) <i>7,6; ±9,8</i>	11,6 (1,6- 51,2) <i>15,7; ±16,6</i>	0,39
CD 8	1,6 (0- 46,4) <i>7; ±11,6</i>	1,6 (0- 46,4) <i>6,6; ±11,1</i>	0,69	4,4 (0- 46,4) <i>7,9; ±12,1</i>	0 (0-0) <i>0</i>	0 (0- 25,6) <i>4,2; ±8,9</i>	5,6 (0- 40) <i>8,8; ±12,9</i>	0,93
GrB	0 (0- 22,4) <i>1,2, ±3,8</i>	0 (0- 1,6) <i>0,2; ±0,5</i>	0,41	0 (0- 22,4) <i>1,6; ±4</i>	0 (0- 2,4) <i>0,8, ±1,1</i>	0 (0- 1,6) <i>0,4; ±0,7</i>	0 (0-0) <i>0</i>	0,29
CD20	0 (0- 44,8) <i>2,1; ±7,7</i>	0 (0- 17,6) <i>1,9; ±4,7</i>	0,6	0 (0- 44,8) <i>2; ±7,9</i>	4,4 (0,8-8) <i>4,4; ±5,1</i>	0 (0-0)	0 (0- 17,6) <i>3,4; ±6,1</i>	0,049
CD138	0 (0- 35,2) <i>1,5; ±5,2</i>	0 (0- 1,6) <i>0,4; ±0,7</i>	0,6	0 (0- 35,2) <i>1,7, ±5,5</i>	0 (0-0)	0 (0- 1,6) <i>0,5, ±0,7</i>	0 (0- 1,6) <i>0,3; ±0,7</i>	0,39

Tabelle 9: Ergebnisse der statistischen Analyse der verschiedenen Läsionsaktivitäten  
(perivaskulär)

(Angabe des Medians, in Klammern des Range in Zellen/mm<sup>2</sup>, Kursiv: Mittelwert und dazugehörige Standardabweichung (±))

	Subtyp I	Subtyp II	Subtyp III	p-Wert
CD3 im Parenchym	6,4 (4,8-16) <i>8,4; ±5,1</i>	3,2 (1,6-20,8) <i>8; ±8,1</i>	4,4 (0,8-8) <i>4,4; ±5,1</i>	0,67
CD8 im Parenchym	4 (0-11,2) <i>4,8; ±4,7</i>	1,6 (6,8-9,6) <i>3,7; ±3,6</i>	0,4 (0-0,8) <i>0,4; ±0,6</i>	0,25
GrB im Parenchym	0,8 (0-1,6) <i>0,8; ±0,8</i>	0 (0-9,6) <i>1,1; ±2,9</i>	0 (0-14,4) <i>2,9; ±5,8</i>	0,59
Anteil CD8/CD3 (%)	60 55	50 47,8	50 50	0,77
Anteil GrB/CD8 (%)	14,3 15,9	0 0	0 0	0,21
CD138 im Parenchym	0 (0-8) <i>0,8; ±2,6</i>	0 (0-3,2) <i>0,7; ±1,1</i>	0 (0-0) 0	0,19
GrB perivaskulär	0 (0-1,6) <i>0,3; ±0,7</i>	0 (0-0) 0	0 (0-1,6) <i>0,6; ±0,9</i>	0,15
CD138 perivaskulär	0 (0-0,8) <i>0,09; ±0,3</i>	0 (0-4,8) <i>0,7; ±1,5</i>	0 (0-1,6) <i>0,3; ±0,7</i>	0,68

Tabelle 10: Ergebnisse der statistischen Analyse der PPWM der frühaktiven Fälle

(Angabe des Medians, in Klammern des Range in Zellen/mm<sup>2</sup>, Kursiv: Mittelwert und dazugehörige Standardabweichung (±))

	EA gesamt	IA gesamt	p-Wert
CD3 im Parenchym	6,4 (0,8-20,8) <i>7,5; ±6,2</i>	4 (0-16) <i>6,2; ±6</i>	0,6
CD8 im Parenchym	1,6 (0-11,2) <i>3,5; ±3,8</i>	1,6 (0-14,4) <i>4; ±5,2</i>	1,0
GrB im Parenchym	0 (0-14,4) <i>1,5; ±3,4</i>	0 (0-1,6) <i>0,2; ±0,6</i>	0,37
Anteil CD8/CD3 (%)	50,0 <i>50,8</i>	50,0 <i>43,5</i>	0,9
Anteil GrB/CD8 (%)	0	0	0,8
CD138 im Parenchym	0 (0-8) <i>0,6; ± 1,6</i>	0 (0-1,6) <i>0,5; ±0,78</i>	0,85
CD3 perivaskulär	6,4 (0-73,6) <i>18,5; ±24,4</i>	0 (0-12,8) <i>4,3; ±7,4</i>	0,28
CD8 perivaskulär	1,6 (0-62,4) <i>12,2; ±20,7</i>	0 (0-8) <i>1,3; ±3,3</i>	0,11
GrB perivaskulär	0 (0-1,6) <i>0,2; ±0,6</i>	0 (0-0) <i>0</i>	0,6
CD138 perivaskulär	0 (0-4,8) <i>0,4; ±1,1</i>	0 (0-1,6) <i>0,3; ±0,7</i>	0,95

Tabelle 11: Ergebnisse der statistischen Analyse der PPWM der gesamten frühaktiven und inaktiven Fälle

(Angabe des Medians, in Klammern des Range in Zellen/mm<sup>2</sup>, Kursiv: Mittelwert und dazugehörige Standardabweichung (±))

Fallnr.	Geschlecht	Alter zum Zeitpunkt der Biopsie (Jahre)	Biopsie-Lokalisation	Krankheitsverlauf bei Biopsie	Läsionsaktivität
1	männlich	20	supratentoriell	CIS	EA no RM
2	weiblich	11	supratentoriell	CIS	EA no RM
3	männlich	23	supratentoriell	RRMS	EA no RM
4	weiblich	44	supratentoriell	RRMS	EA no RM
5	weiblich	41	supratentoriell	RRMS	EA no RM
6	weiblich	32	supratentoriell	RRMS	EA no RM
7	weiblich	30	supratentoriell	CIS	EA no RM
8	weiblich	45	supratentoriell	RRMS	EA no RM
9	weiblich	43	supratentoriell	RRMS	EA no RM
10	männlich	34	supratentoriell	CIS	EA no RM
11	männlich	46	supratentoriell	CIS	EA no RM
12	weiblich	42	spinal	CIS	EA no RM
13	weiblich	22	spinal	CIS	EA no RM
14	weiblich	26	supratentoriell	CIS	EA no RM
15	weiblich	22	supratentoriell	RRMS	EA no RM
16	weiblich	40	supratentoriell	RRMS	EA ERM
17	männlich	47	infratentoriell	CIS	EA ERM

Tabelle 12: Zusammenstellung klinischer Charakteristika vom Subtyp I frühaktiver Fälle

CIS: clinically isolated syndrome; RRMS: schubförmig-remittierend, SPMS : sekundär progredient

Fallnr.	Geschlecht	Alter zum Zeitpunkt der Biopsie (Jahre)	Biopsie-Lokalisation	Krankheitsverlauf bei Biopsie	Läsionsaktivität
1	weiblich	37	supratentoriell	RRMS	EA no RM
2	männlich	36	supratentoriell	CIS	EA no RM
3	männlich	34	supratentoriell	CIS	EA no RM
4	weiblich	48	supratentoriell	RRMS	EA no RM
5	weiblich	27	supratentoriell	RRMS	EA no RM
6	weiblich	27	supratentoriell	CIS	EA no RM
7	männlich	24	supratentoriell	CIS	EA no RM
8	weiblich	32	supratentoriell	RRMS	EA no RM
9	weiblich	53	supratentoriell	CIS	EA no RM
10	männlich	38	supratentoriell	RRMS	EA no RM
11	weiblich	54	spinal	RRMS	EA no RM
12	weiblich	63	supratentoriell	CIS	EA no RM
13	männlich	39	supratentoriell	CIS	EA no RM
14	männlich	58	supratentoriell	CIS	EA no RM
15	männlich	54	supratentoriell	CIS	EA no RM
16	männlich	49	supratentoriell	CIS	EA no RM
17	weiblich	32	supratentoriell	SPMS	EA no RM
18	weiblich	24	supratentoriell	RRMS	EA no RM
19	weiblich	26	supratentoriell	CIS	EA ERM
20	weiblich	62	infratentoriell	RRMS	EA ERM
21	weiblich	47	supratentoriell	CIS	EA ERM

Tabelle 13: Zusammenstellung klinischer Charakteristika vom Subtyp II frühaktiver Fälle

CIS: clinically isolated syndrome; RRMS: schubförmig-remittierend, SPMS : sekundär progredient

Fallnr.	Geschlecht	Alter zum Zeitpunkt der Biopsie (Jahre)	Biopsie-Lokalisation	Krankheitsverlauf bei Biopsie	Läsionsaktivität
1	weiblich	41	supratentoriell	RRMS	EA no RM
2	weiblich	31	supratentoriell	CIS	EA no RM
3	weiblich	62	supratentoriell	CIS	EA no RM
4	weiblich	59	spinal	RRMS	EA no RM
5	weiblich	64	supratentoriell	CIS	EA no RM
6	männlich	51	supratentoriell	CIS	EA no RM
7	männlich	37	supratentoriell	CIS	EA no RM
8	männlich	26	supratentoriell	CIS	EA no RM
9	weiblich	48	supratentoriell	CIS	EA no RM
10	männlich	40	supratentoriell	CIS	EA no RM
11	weiblich	53	supratentoriell	CIS	EA no RM
12	weiblich	28	supratentoriell	RRMS	EA no RM
13	weiblich	31	supratentoriell	CIS	EA ERM

Tabelle 14: Zusammenstellung klinischer Charakteristika vom Subtyp III frühaktiver Fälle

CIS: clinically isolated syndrome; RRMS: schubförmig-remittierend, SPMS : sekundär progredient

Fallnr.	Geschlecht	Alter zum Zeitpunkt der Biopsie (Jahre)	Biopsie-Lokalisation	Läsionsaktivität
1	weiblich	28	Supratentoriell	IA no RM
2	männlich	26	Supratentoriell	IA no RM
3	männlich	38	Supratentoriell	IA no RM
4	weiblich	40	Supratentoriell	IA no RM
5	weiblich	51	Supratentoriell	IA no RM
6	weiblich	44	Supratentoriell	IA no RM
7	männlich	63	Supratentoriell	IA no RM
8	weiblich	47	Supratentoriell	IA no RM
9	männlich	57	Spinal	IA no RM
10	weiblich	40	Supratentoriell	IA no RM
11	männlich	26	Supratentoriell	IA ERM
12	weiblich	39	Supratentoriell	IA ERM
13	weiblich	40	Supratentoriell	IA ERM
14	männlich	25	Supratentoriell	IA ERM
15	weiblich	41	Supratentoriell	IA ERM
16	weiblich	41	Supratentoriell	IA ERM
17	weiblich	21	Supratentoriell	IA ERM
18	männlich	28	Supratentoriell	IA ERM
19	männlich	50	Supratentoriell	IA ERM
20	männlich	32	Supratentoriell	IA ERM

Tabelle 15: Zusammenstellung klinischer Charakteristika der inaktiven Fälle

Klinisches Charakteristikum	CD3	CD8	GrB	CD20	CD138
Geschlecht	0,52	0,38	0,41	0,77	0,77
Alter zum Zeitpunkt der Biopsie	0,56	0,91	0,14	0,27	0,28
Verlauf zum Zeitpunkt d. Biopsie	0,49	0,5	0,25	0,68	0,74

Tabelle 16: Ergebnisse der statistischen Analyse einer möglichen Korrelation zwischen den Komponenten des lymphozytären Infiltrates und klinischen Charakteristika unabhängig vom Subtyp (Angabe: p-Wert)

Geschlecht	Subtyp I	Subtyp II	Subtyp III	gesamt
Weiblich	12	13	9	34
Männlich	5	8	4	17
Gesamt	17	21	13	51

Tabelle 17: Geschlechterverteilung in Bezug auf die Subtypen der frühaktiven Fälle

Alter (Jahre)	IP I	IP II	IP III	gesamt
<20	1	0	0	1
20-40	9	12	6	27
>40	7	9	7	23

Tabelle 18: Altersverteilung in Bezug auf die Subtypen der frühaktiven Fälle

---

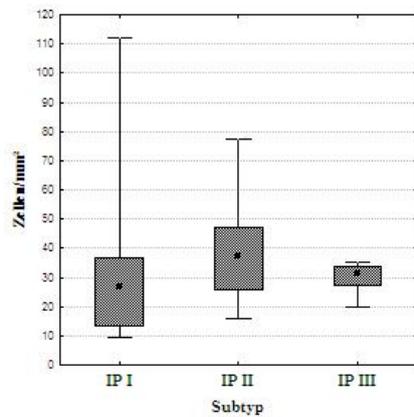
Verlauf	IP I	IP II	IP III	gesamt
CIS	9	12	10	31
RRMS	8	8	3	19
PPMS	0	0	0	0
SPMS	0	1	0	1

Tabelle 19: Verteilung der Krankheitsverläufe in Bezug auf die Subtypen der frühaktiven Fälle

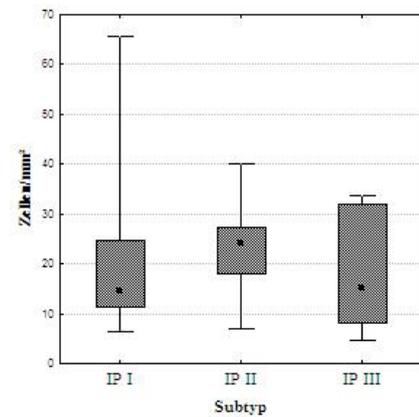
CIS: clinically isolated syndrome; RRMS: schubförmig-remittierend; PPMS: primär progredient;  
SPMS : sekundär progredient

## 6.2 Boxplot-Analysen

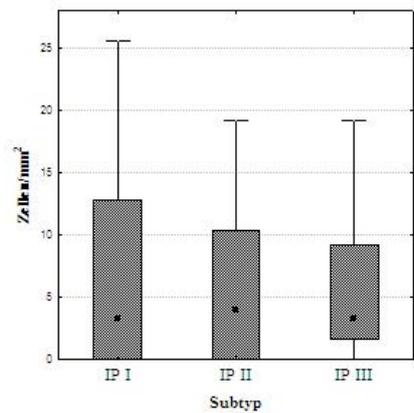
■ :Median; ■ :25%-75%; T :Min-Max



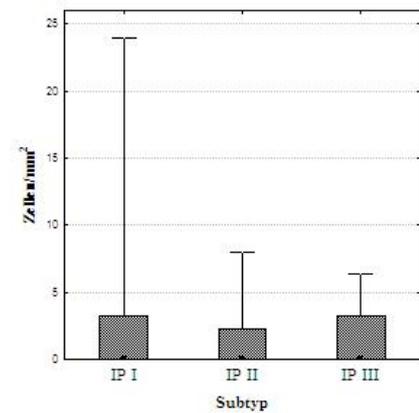
A



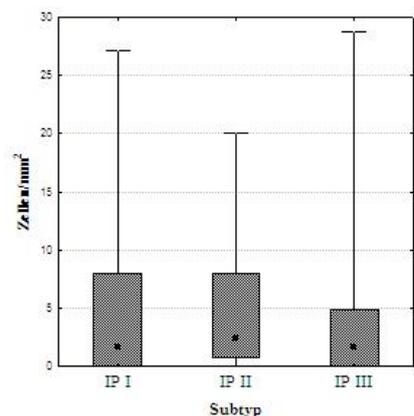
B



C



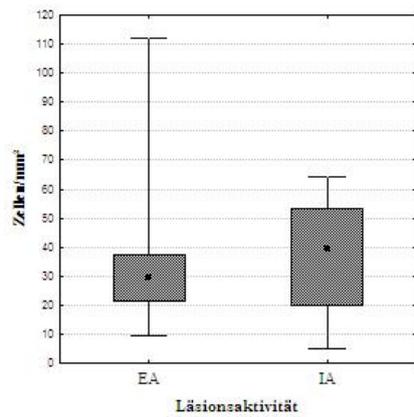
D



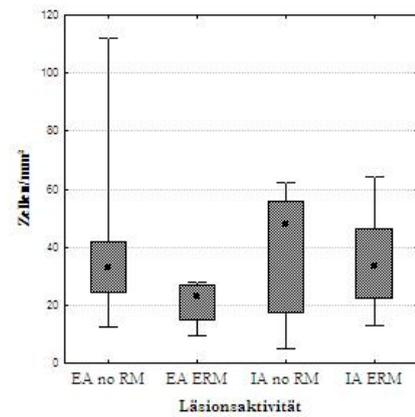
E

Abb. A - E: Graphische Darstellung der ermittelten Zelldichte (Zellen/mm<sup>2</sup>) des lymphozytären Infiltrates in den Subtypen der untersuchten frühaktiven Läsionen

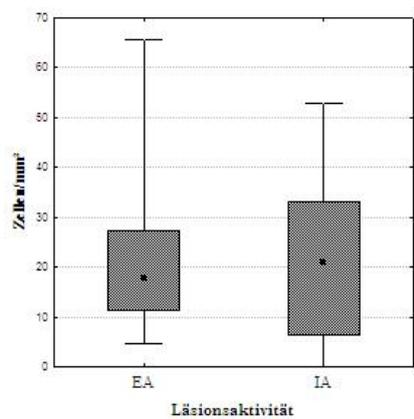
Abb.A: CD3-pos. T-Lymphozyten, Abb.B: CD8-pos. zytotoxische T-Lymphozyten, Abb.C: GrB-pos. T-Lymphozyten, Abb.D: CD20-pos. B-Lymphozyten, Abb.E: CD138-pos. Plasmazellen



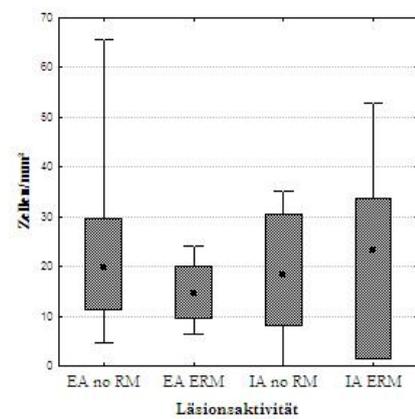
F



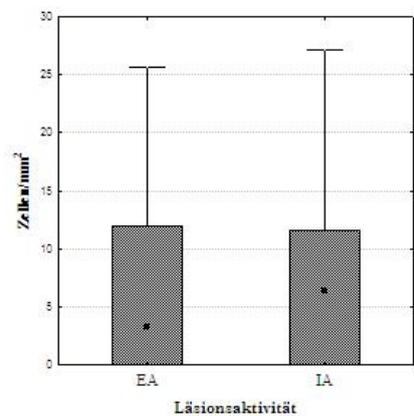
G



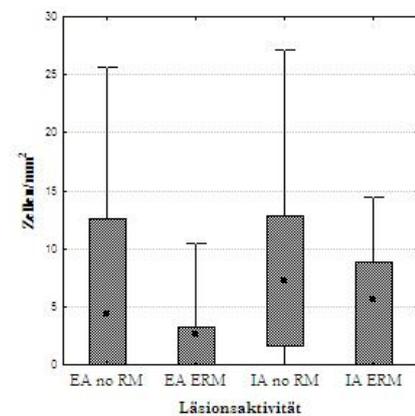
H



I



J



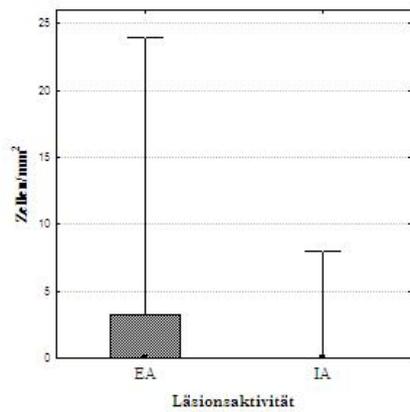
K

Abb. F-K: Graphische Darstellung der Zelldichte (Zellen/mm<sup>2</sup>) des T-Zell-Infiltrates in Bezug auf die Läsionsaktivitäten und auf den Grad der Remyelinisierung. (EA:frühaktiv, IA: inaktiv, no RM: keine Remyelinisierung, ERM: frühe Remyelinisierung)

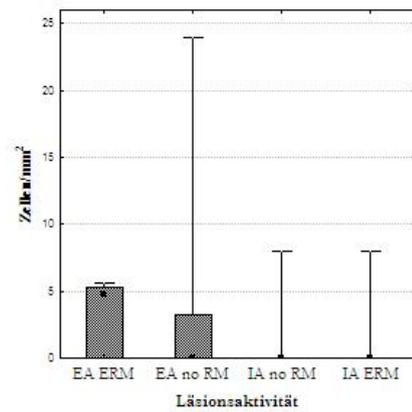
Abb. F und G: CD3-pos. T-Lymphozyten

Abb. H und I: CD8-pos. zytotoxische T-Lymphozyten

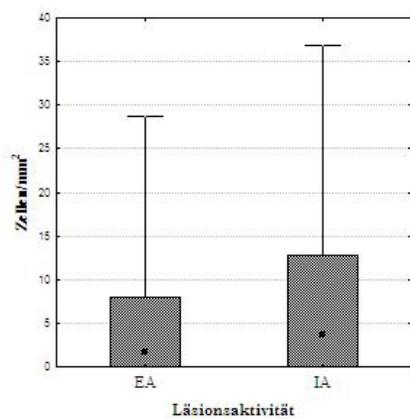
Abb. J und K: GrB-pos. T-Lymphozyten



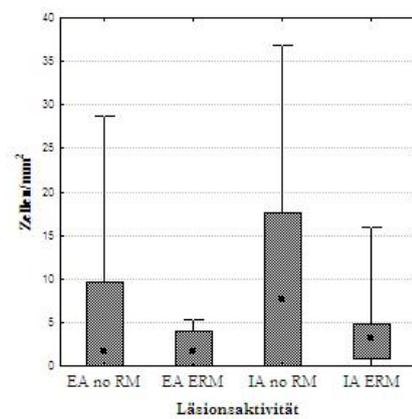
L



M



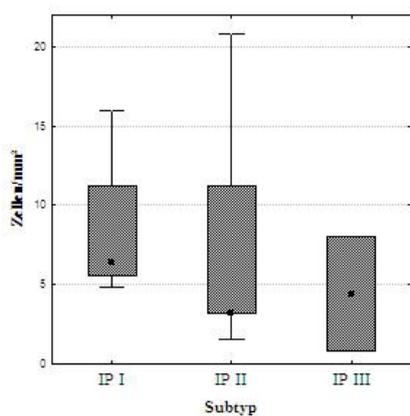
N



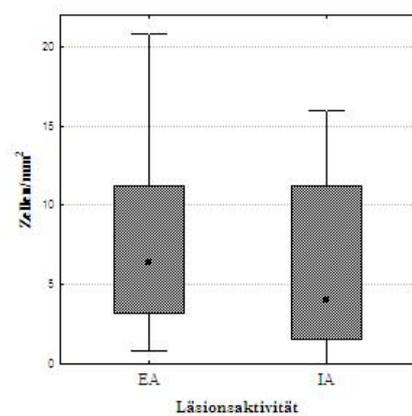
O

Abb.L–O: Graphische Darstellung der Zelldichte (Zellen/mm<sup>2</sup>) der B- und Plasmazellen in Bezug auf die Läsionsaktivitäten und auf den Grad der Remyelinisierung. (EA:frühaktiv, IA: inaktiv, no RM: keine Remyelinisierung, ERM: frühe Remyelinisierung)

Abb.: L und M: CD20-pos. B-Lymphozyten, Abb.: N und O: CD138-pos. Plasmazellen

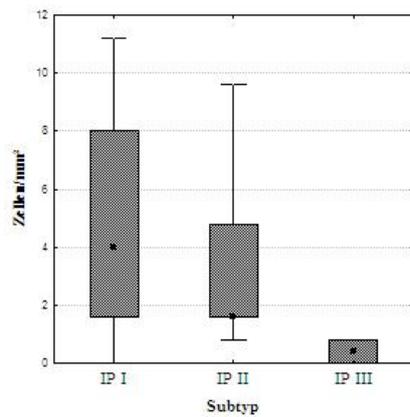


P

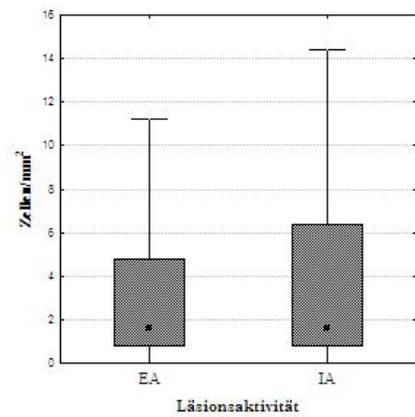


Q

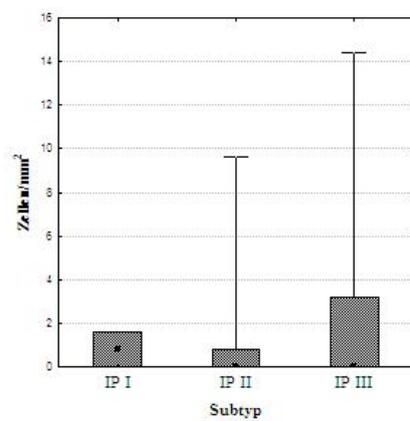
Abb.P und Q: Graphische Darstellung der Zelldichte (Zellen/mm<sup>2</sup>) der CD3-positiven T-Lymphozyten in der PPWM bezüglich der Subtypen der untersuchten frühaktiven Läsionen und in Bezug auf die Läsionsaktivitäten



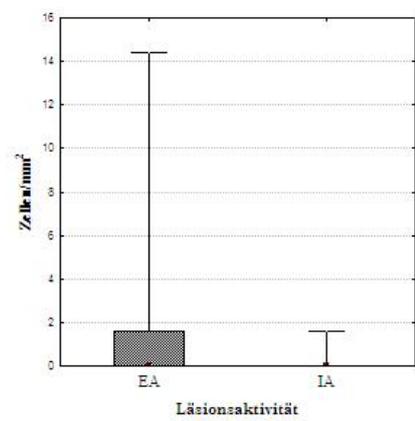
R



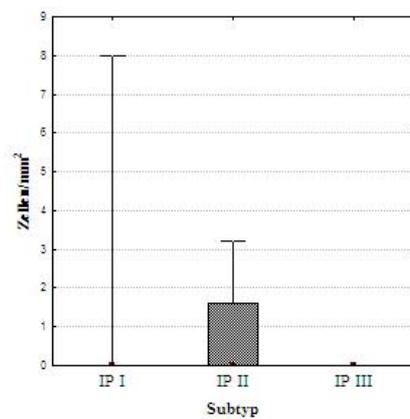
S



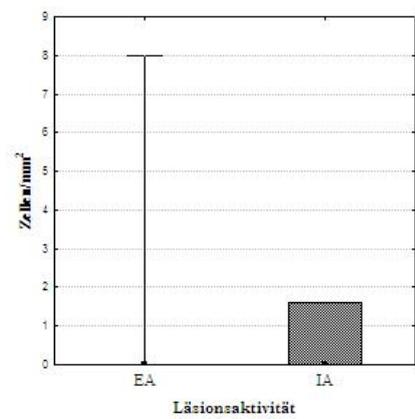
T



U



V



W

Abb.R-W: Graphische Darstellung der Zelldichte (Zellen/mm<sup>2</sup>) des lymphozytären Infiltrates in der PPWM bezüglich der Subtypen der untersuchten frühaktiven Läsionen und in Bezug auf die Läsionsaktivitäten (EA: Frühaktiv; IA: Inaktiv)

Abb.R und S: CD8-pos. zytotoxische T-Lymphozyten, Abb. T und U: GrB-pos. T-Lymphozyten, Abb. V und W: CD138-pos. Plasmazellen

Anmerkung: CD20-positive B-Zellen konnten in der PPWM mit Ausnahme eines inaktiven Falls nicht nachgewiesen werden.

### 6.3 Graphische Darstellungen

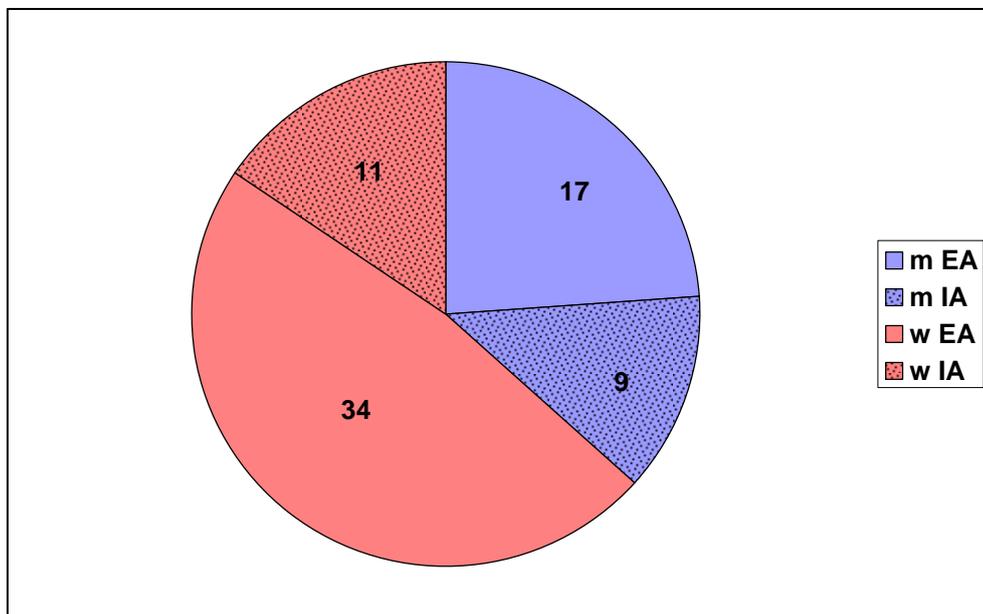


Abb. X: Geschlechterverteilung der untersuchten Fälle  
(m: männlich; w: weiblich; EA: frühaktiv; IA: inaktiv)

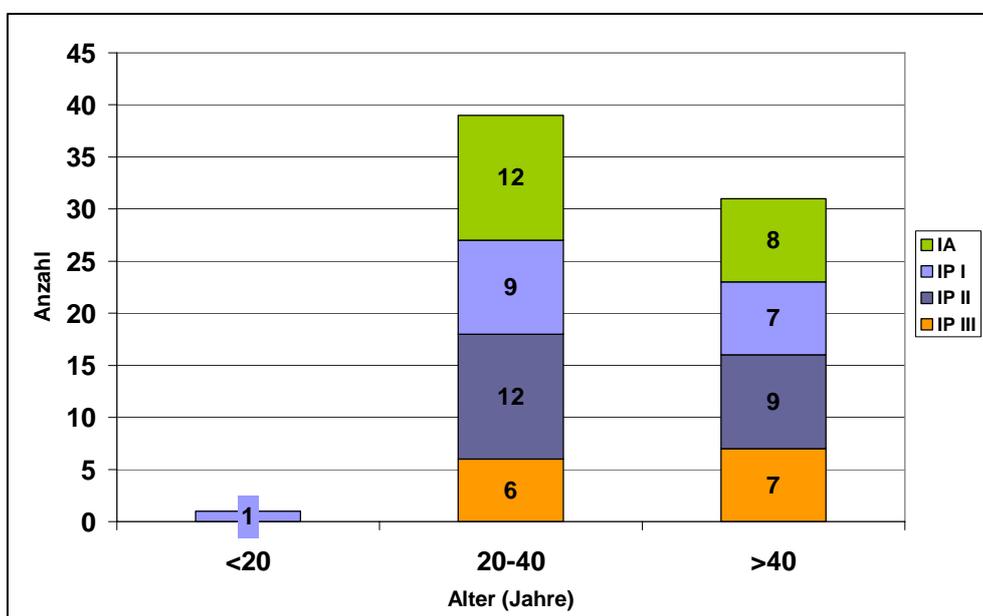


Abb. Y: Altersverteilung der untersuchten Fälle in Bezug auf die Subtypen der frühaktiven Fälle (IP I-IP III) und die inaktiven Fälle

## 6.4 Fotos

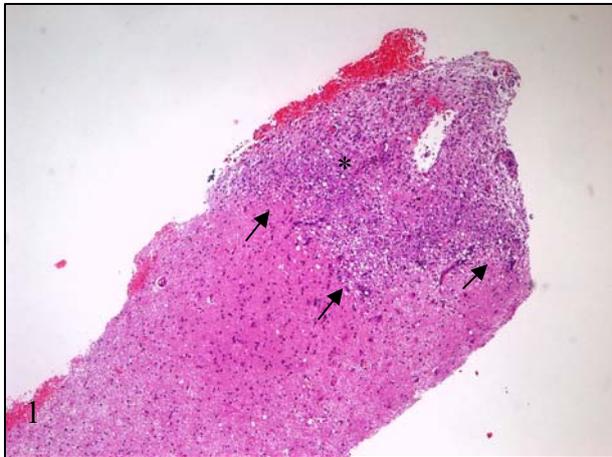


Abb.1: Scharf begrenzter Übergang (→) einer Subtyp II-Läsion (\*) zur PPWM (HE, 40fache Vergrößerung)

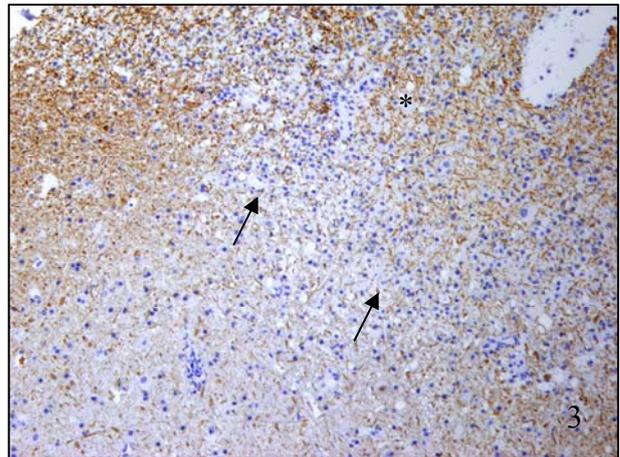
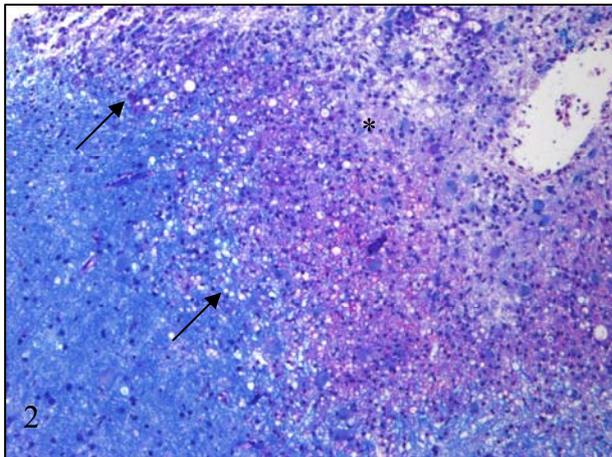


Abb.2 und 3: Übergang (→) der Läsion (\*) zur PPWM. Es stellt sich in der Läsion sowohl der Verlust des Myelins (Abb.2: LFB-Pas, 100fache Vergrößerung) als auch die Axonschädigung (Abb.3: SMI-31, 100fache Vergrößerung) dar.

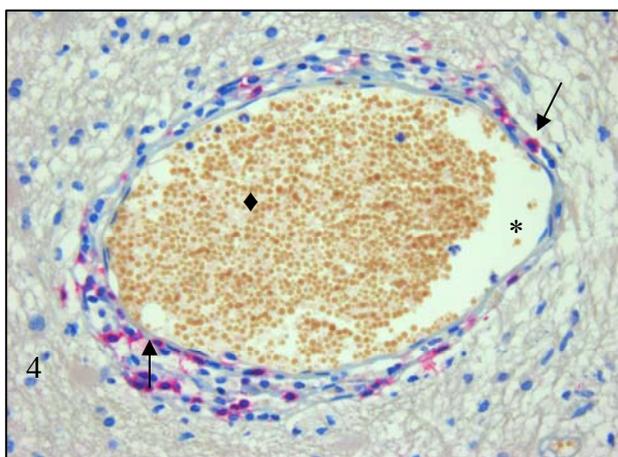


Abb. 4: Perivaskuläres Infiltrat CD8-positiver T-Lymphozyten (→) (400fache Vergrößerung)  
 \*: Gefäßlumen  
 ◆: Erythrozyten im Gefäßlumen

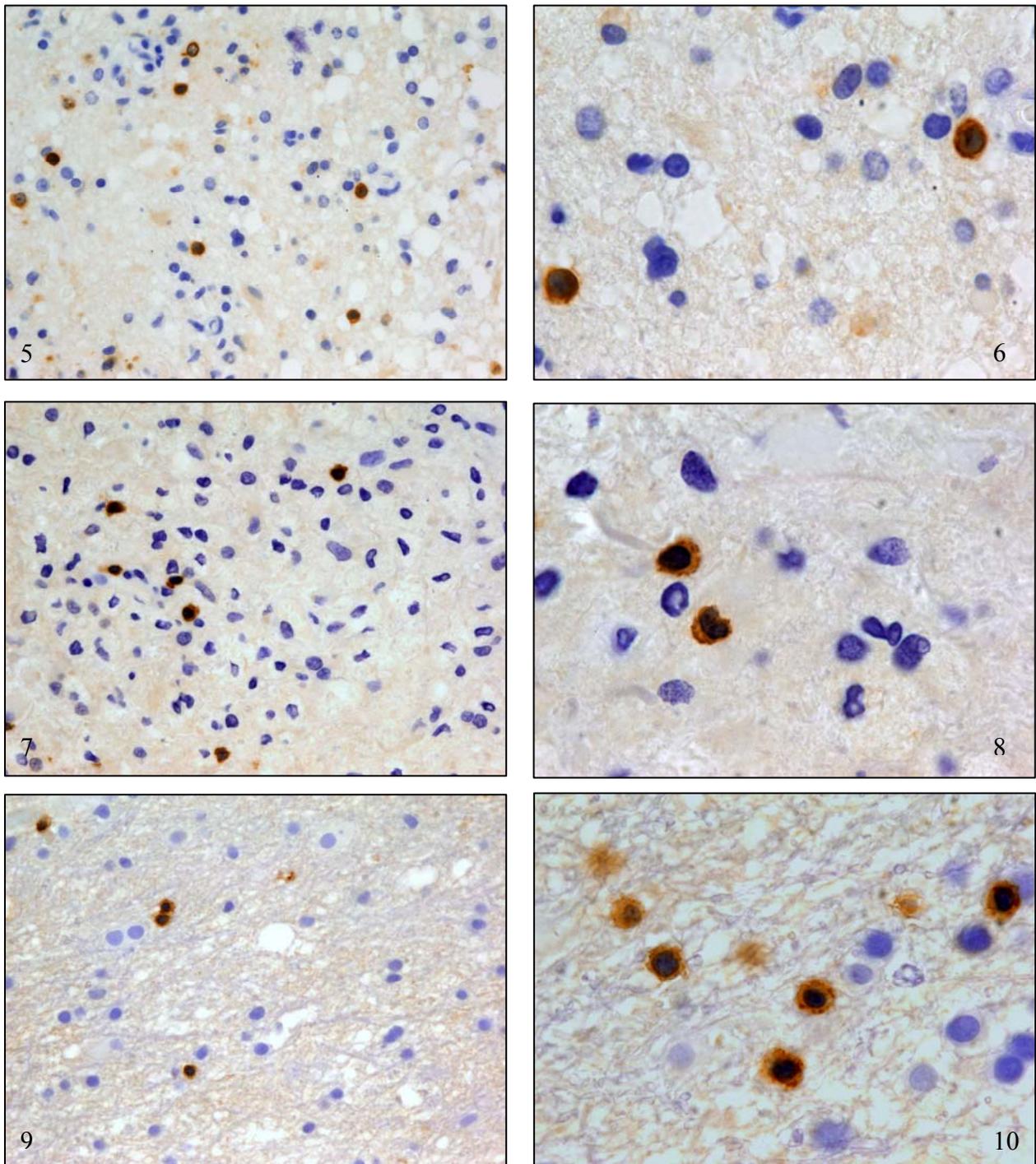


Abb.5-10: Diffuses Infiltrat CD3-positiver T-Lymphozyten

Abb.5 und 6: Infiltrat in frühaktiver Läsion (400fache und 1000fache Vergrößerung)

Abb.7 und 8: Infiltrat in inaktiver Läsion (400fache und 1000fache Vergrößerung)

Abb.9 und 10: Infiltrat in PPWM (400fache und 1000fache Vergrößerung)

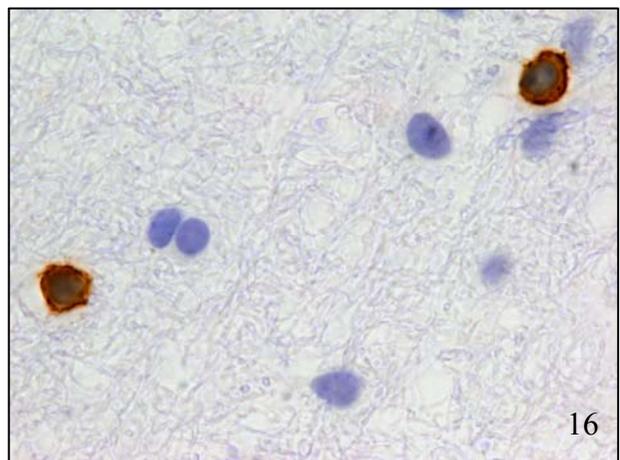
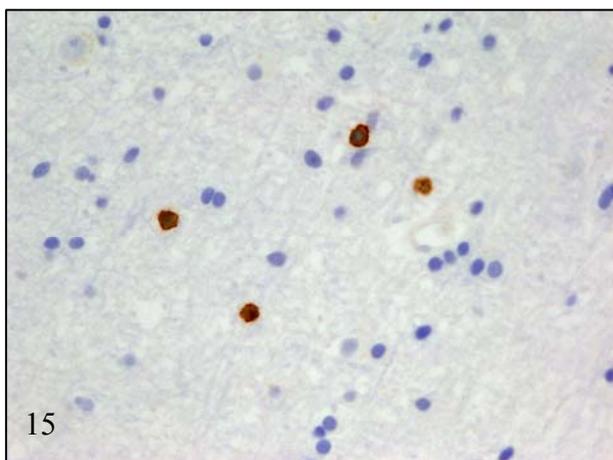
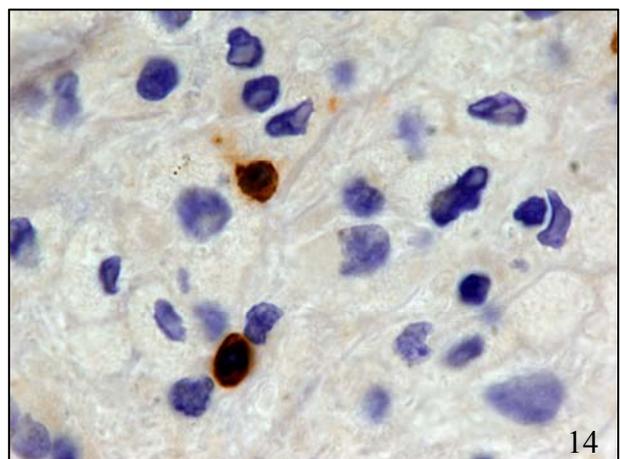
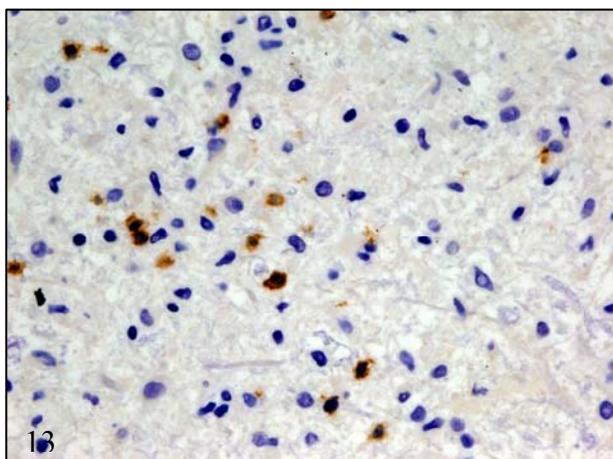
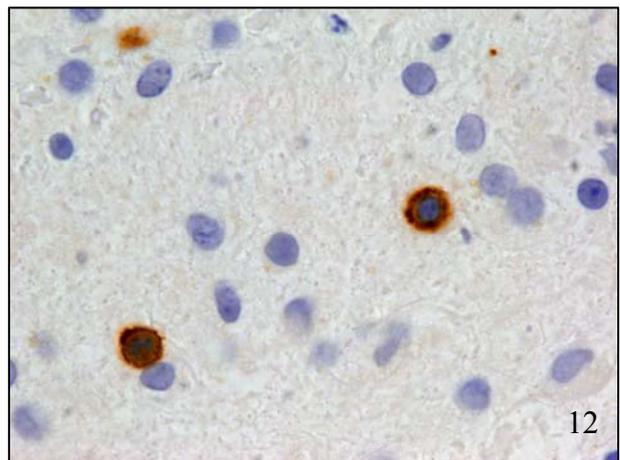
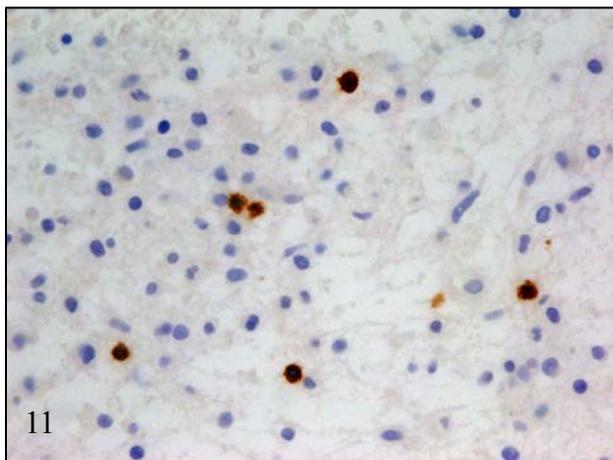


Abb.11-16: Diffuses Infiltrat CD8-positiver zytotoxischer T-Lymphozyten

Abb.11 und 12: Infiltrat in frühaktiver Läsion (400fache und 1000fache Vergrößerung)

Abb.13 und 14: Infiltrat in inaktiver Läsion (400fache und 1000fache Vergrößerung)

Abb.15 und 16: Infiltrat in PPWM (400fache und 1000fache Vergrößerung)

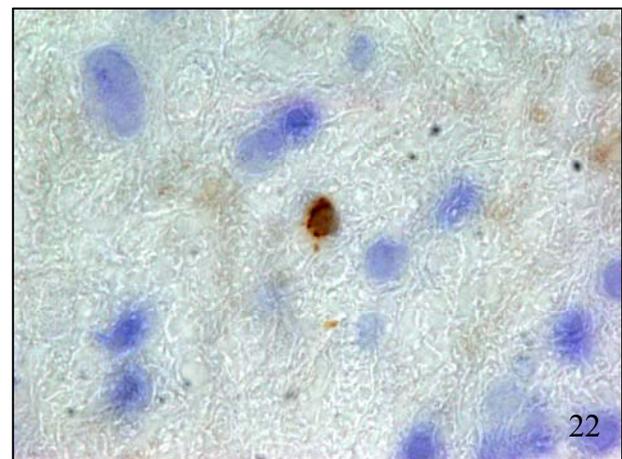
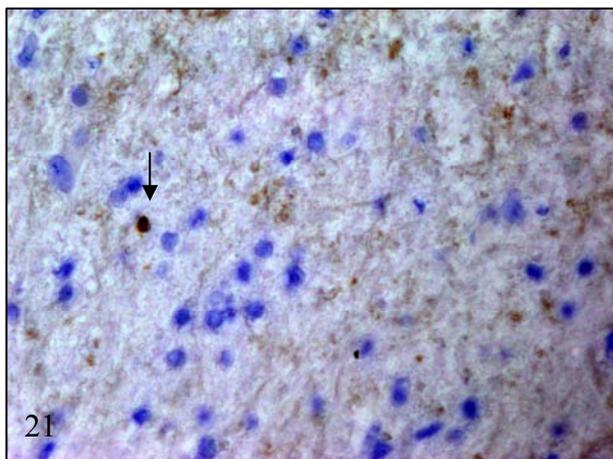
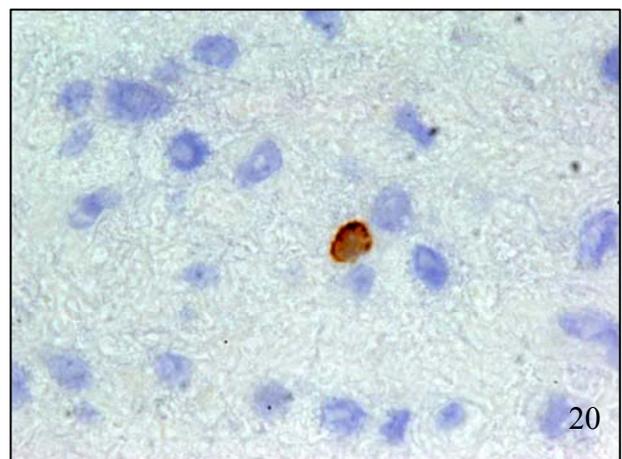
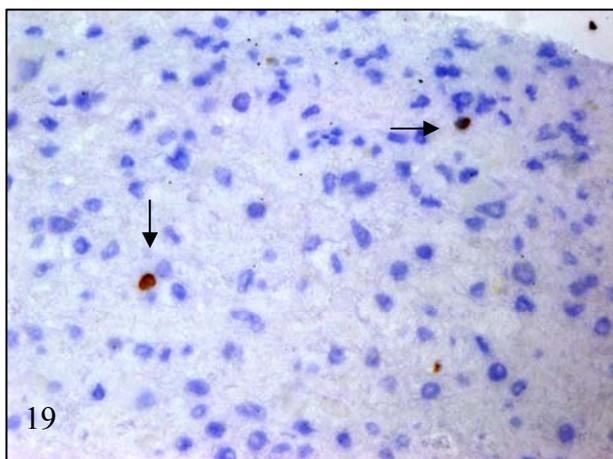
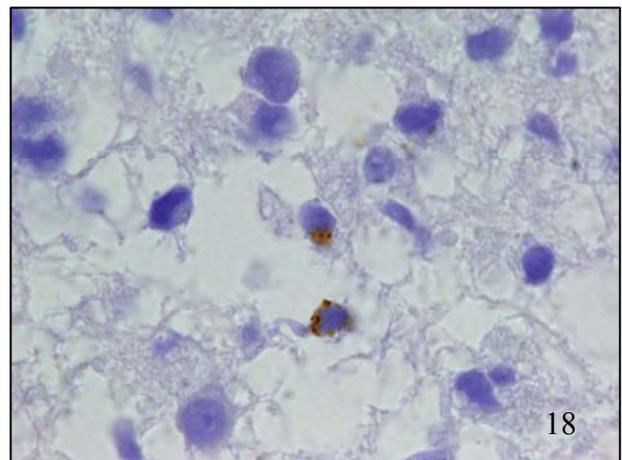
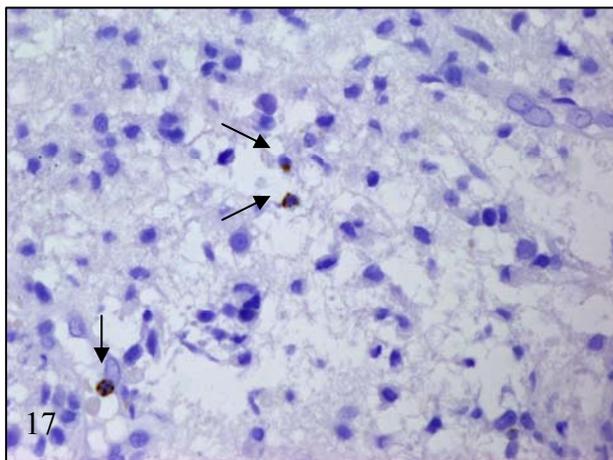


Abb.17-22: Geringe Infiltration GrB-positiver zytotoxischer T-Lymphozyten (→) mit punktförmiger Reaktivität im Zytoplasma

Abb.17 und 18: Infiltration in frühaktiver Läsion (400fache und 1000fache Vergrößerung)

Abb.19 und 20: Infiltration in inaktiver Läsion (400fache und 1000fache Vergrößerung)

Abb.21 und 22: Infiltration in PPWM (400fache und 1000fache Vergrößerung)

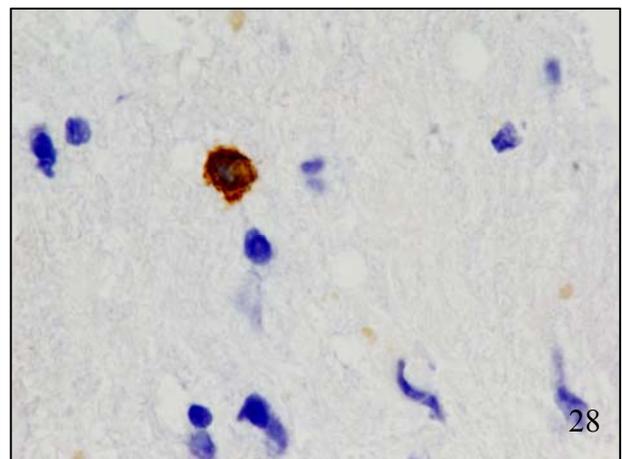
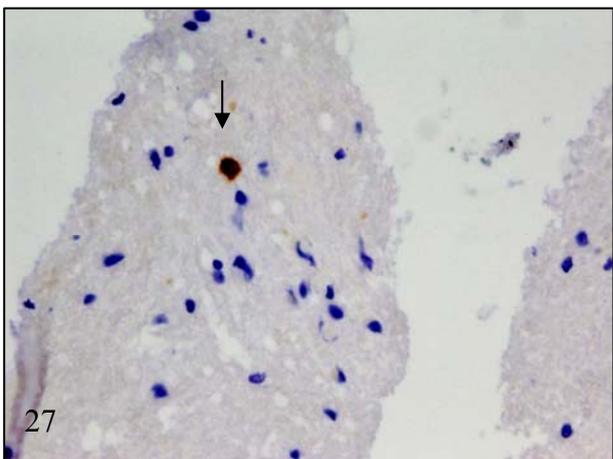
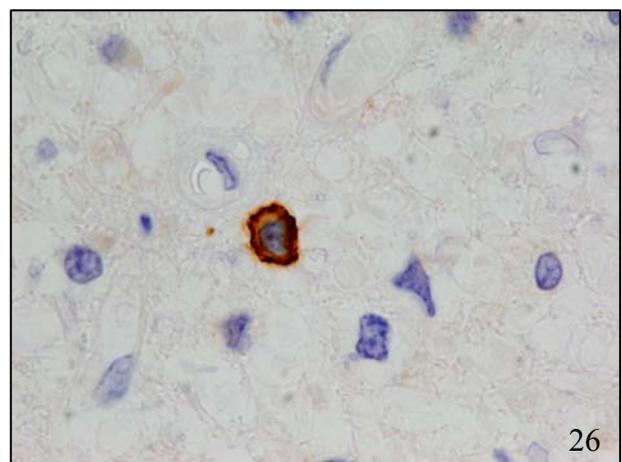
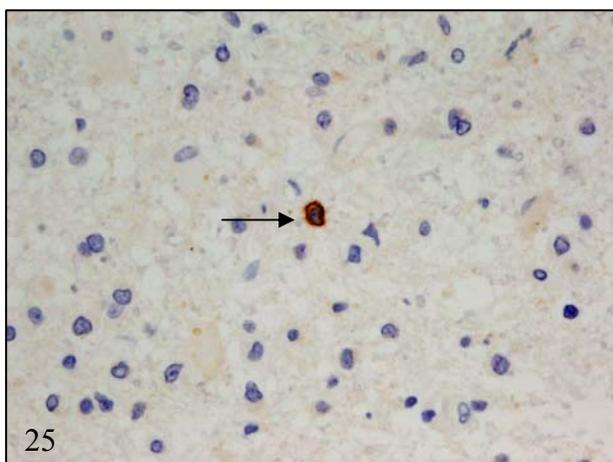
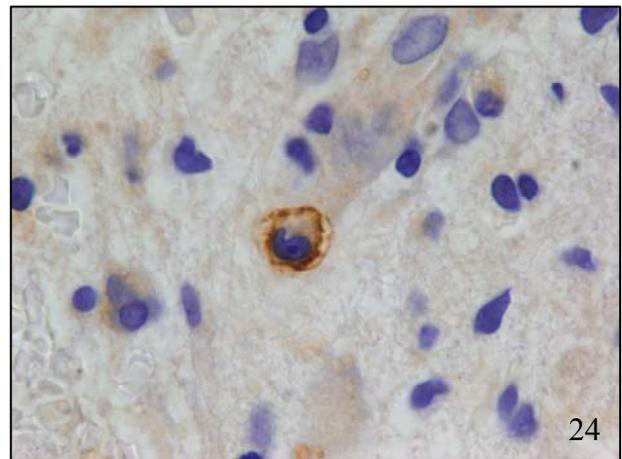
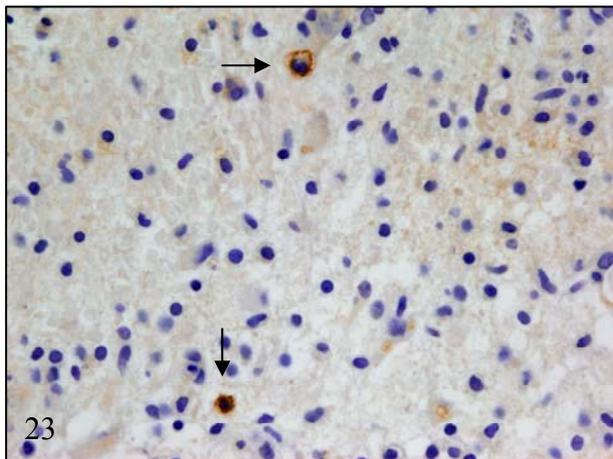


Abb.23-28: Vereinzelt Infiltration CD20-positiver B-Lymphozyten (→)

Abb.23 und 24: Infiltration in frühaktiver Läsion (400fache und 1000fache Vergrößerung)

Abb.25 und 26: Infiltration in inaktiver Läsion (400fache und 1000fache Vergrößerung)

Abb.27 und 28: Infiltration in PPWM (400fache und 1000fache Vergrößerung)

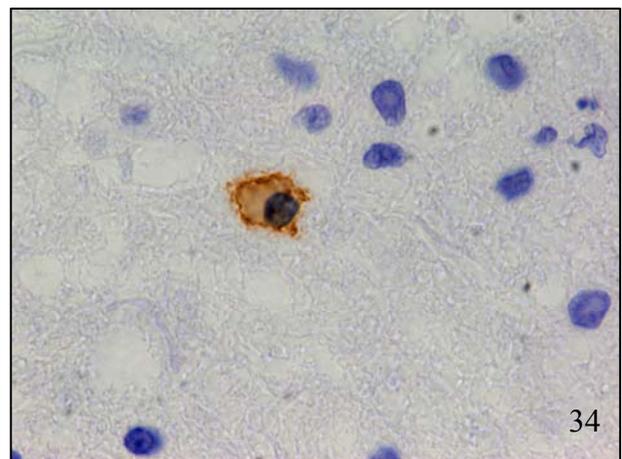
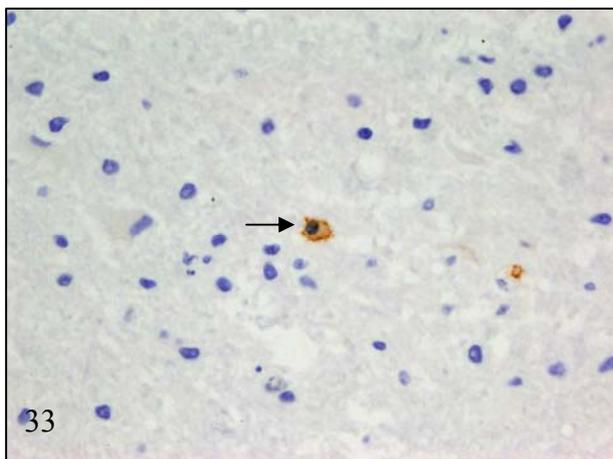
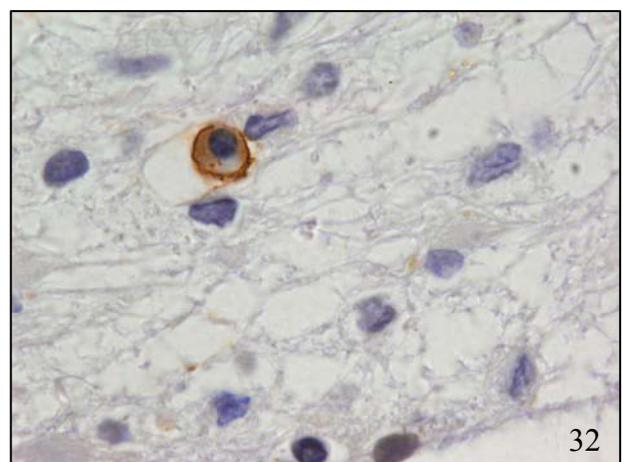
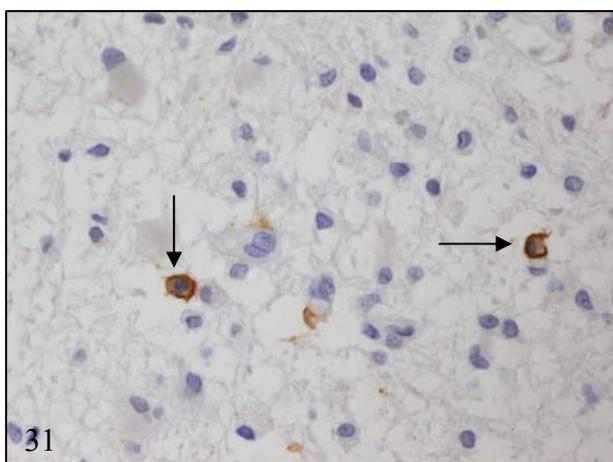
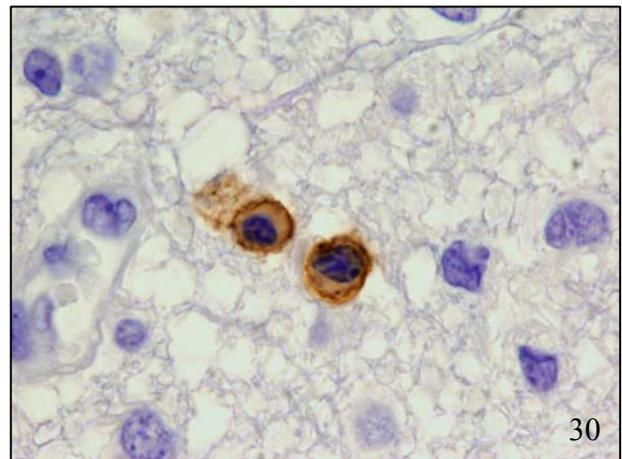
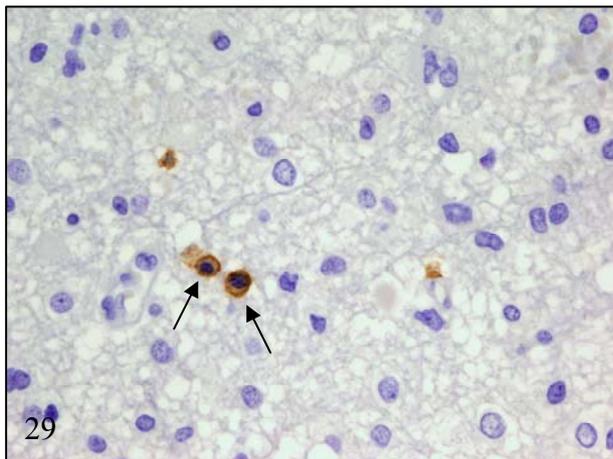


Abb.29-34: Geringe Infiltration CD138-positiver Plasmazellen (→) mit membranöser Reaktivität  
 Abb.29 und 30: Infiltration in frühaktiver Läsion (400fache und 1000fache Vergrößerung)  
 Abb.31 und 32: Infiltration in inaktiver Läsion (400fache und 1000fache Vergrößerung)  
 Abb.33 und 34: Infiltration in PPWM (400fache und 1000fache Vergrößerung)

## 7 Literaturverzeichnis

Albert LJ, Inman RD (1999): Molecular mimicry and autoimmunity. *N Eng J Med* 341, 2068-2074

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Molekularbiologie der Zelle*, 4. Auflage, Wiley VCH Verlag, Weinheim 2004

Al-Omaishi J, Bashir R, Gendelman HE (1999): The cellular immunology of multiple sclerosis. *J Leukoc Biol* 65(4), 444-452

Alter A, Duddy M, Hebert S, Biernacki K, Prat A, Antel JP, Yong VW, Nuttall RK, CJ Pennington, Edwards DR et al. (2003): Determinants of human B cell migration across brain endothelial cells. *J Immunol* 170, 4497-4505

Asakura K, Miller DJ, Pease LR, Rodriguez M (1998): Targeting of IgMkappa antibodies to oligodendrocytes promotes CNS remyelination. *J Neurosci* 18(19), 7700-7708

Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schroder R, Deckert M, Schmidt S, Ravid R, Rajewsky K (2000): Clonal expansion of CD8+ T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 192(3), 393-404

Barkhof F, Brück W, De Groot CJ, Bergers E, Hulshof S, Geurts J, Polman CH, van der Valk P (2003a): Remyelinated lesions in multiple sclerosis: magnetic resonance image appearance. *Arch Neurol* 60(8), 1073-1081

Barkhof F, Rocca M, Francis G, van Waesberghe JHTM, Uitdehaag BMJ, Hommes OR, Hartung HP, Durelli L, Edan G, Fernández O et al. (2003b): Validation of diagnostic resonance imaging criteria for multiple sclerosis and response to interferon beta-1a. *Ann Neurol* 53(6), 718-724

Barnett MH, Prineas JW (2004): Relapsing and remitting multiple sclerosis: Pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* 55(4), 458-468

Battistini L, Piccio L, Rossi B, Bach S, Galgani S, Gasperini C, Ottoboni L, Ciabini D, Caramia MD, Bernardi G et al. (2003): CD8+ T cells from patients with acute multiple sclerosis display selective increase of adhesiveness in brain venules: a critical role for P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* 101, 4775-4782

Baumgarth N (2000): A two-phase model of B-cell activation. *Immunol Rev* 176, 171-180

Beck RW (1995): The optic neuritis treatment trial: three-year follow-up results. *Arch Ophthalmol* 113(2), 136-137

Ben-Hur T, Ben-Menachem O, Furer V, Einstein O, Mizrachi-Kol R, Grigoriadis N (2003): Effects of the proinflammatory cytokines on the growth, fate, and motility of multipotential neuro precursor cells. *Mol Cell Neurosci* 24, 623-631

Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A (2002): Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 298, 2199-2202

Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, Lose EJ (1992): Biology of the syndecans: A family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol* 8, 365-393

Bernfield M, Hinkes MT, Gallo RL (1993): Developmental expression of the syndecans: possible function and regulation. *Dev Suppl*, 205-212

Berthelot L, Laplaud DA, Pettré S, Ballet C, Michel L, Hillion S, Braudeau C, Connan F, Lefrère F, Wiertlewski S et al. (2008): Blood CD8+Tcell responses against myelin determinants in multiple sclerosis and healthy individuals. *Eur J Immunol* 38(7), 1889-1899

Bertram J, Kuwert E (1982): HLA antigen frequencies in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 7, 74-79

Bevan MJ (2004): Helping the CD8(+) T cell response. *Nat Rev Immunol* 4, 595-602

Biddison WE, Cruikshank WW, Center DM, Pelfrey CM, Taub DD, Turner RV (1998): CD8+ myelin peptide-specific T cells can chemoattract CD4+ myelin peptide-specific T cells: importance of IFN-inducible protein 10. *J Immunol* 160(1), 444-448

Bieber AJ, Kerr S, Rodriguez M (2003): Efficient central nervous system remyelination requires T cells. *Ann Neurol* 53, 680-684

Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Brück W (2000): Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 123(6), 1174-1183

Bjartmar C, Kinkel R, Kidd G, Rudick RA, Trapp BD (2001): Axonal loss in normal appearing white matter in a patient with acute MS. *Neurology* 57(7), 1248-52

Booss J, Esiri MM, Tourtellotte WW, Mason DY (1983): Immunohistochemical analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 62, 219-232

Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH (2001): Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting. *Cytometry* 46, 23-27

Brück W, Schmied M, Suchanek G, Brück Y, Breitschopf H, Poser S, Piddlesden S, Lassmann H (1994): Oligodendrocytes in the early course of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 35, 65-73

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

Canella B, Raine CS (1995): The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 37, 424-435

Champs Study Group (2002): MRI predictors of early conversion to clinically definite MS in the CHAMPS placebo group. *Neurology* 59(7), 998-1005

Charcot J (1868): Histologie de la sclérose en plaque. *Gaz Hôp* 41, 554-566

Cho MS, Lee MK, Yang WI, Yoon JH (1997): Granzyme B immunoreactivity in T/natural killer cell lymphomas. *Yonsei Med J* 38(5), 285-293

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

Cepok S, Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Stei S, Büsow K, Sommer N, Hemmer B (2005a): Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of immune response in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 115, 1352-1360

Cepok S, Rosche B, Grummel V, Vogel F, Zhou D, Sayn J, Sommer N, Hartung HP, Hemmer B (2005b): Short-lived plasma blasts are the main B cell effector subset during the course of multiple sclerosis. *Brain* 128, 1667-1676

Coles AJ, Wing MG, Molyneux P, Paolillo A, Davie CM, Hale G, Miller D, Waldmann H, Compston A (1999): Monoclonal antibody treatment exposes three mechanisms underlying the clinical course of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 46, 296-304

Colombo M, Dono M, Gazzola P, Roncella S, Valetto A, Chiorazzi N, Mancardi GL, Ferrarini M (2000): Accumulation of clonally related B lymphocytes in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Immunol* 164, 2782-2789

Colombo M, Dono M, Gazzola P, Chiorazzi N, Mancardi GL, Ferrarini M (2003): Maintenance of B lymphocyte-related clones in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Eur J Immunol* 33, 3433-3438

Confavreux C, Hutchinson M, Hours MM, Cortinovis-Tourniaire P, Moreau T (1998): Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. Pregnancy in multiple sclerosis group. *N Engl J Med* 339(5), 285-91

Corcione A, Casazza S, Ferretti E, Giunti D, Zappia E, Pistorio A, Gambini C, Mancardi GL, Uccelli A, Pistoia V (2004): Recapitulation of B cell differentiation in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 11064-11069

Costes V, Magen V, Legouffe E, Durand L, Baldet P, Rossi JF, Klein B, Brochier J (1999): The Mi15 monoclonal antibody (anti-syndecan-1) is a reliable marker for quantifying plasma cells in paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens. *Hum Pathol* 30, 1405-1411

Cottrell DA, Kremenutzky M, Rice GPA, Koopman WJ, Hader W, Baskerville J, Ebers GC (1999): The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. The clinical features and natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 122, 625-639

Crawford MP, Yan SX, Ortega SB, Mehta RS, Hewitt RE, Price DA, Stastny P, Douek DC, Koup RA, Racke MK, Karandikar NJ (2004): High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. *Blood* 103, 4222-4231

Cross AH, Trotter JL, Lyons J (2001): B cells and antibodies in CNS demyelinating disease. *J Neuroimmunol* 112, 1-14

Dalton CM, Brex PA, Miszkiel KA, Hickman SJ, MacManus DG, Plant GT, Thompson AJ, Miller DH (2002): Application of the new McDonald criteria to patients with clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 52, 47-53

Duddy M, Bar-Or A (2006): B-cells in multiple sclerosis. *Int MS J* 13(3), 84-90

Duquette P, Pleines J, Girard M, Charest L, Senecal-Quevillon M, Masse C (1992): The increased susceptibility in women to multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 19(4), 466-471

Elenius K, Jalkanen M (1994): Function of the syndecans: a family of cell surface proteoglycans. *J Cell Sci* 107, 2975-2982

Esiri MM (1977): Immunoglobulin-containing cells in multiple sclerosis plaques. *Lancet* 1977,2, 478-480

European Study Group on Interferon  $\beta$ -1b in Secondary Progressive MS (1998): Placebo controlled multicentre randomised trial of interferon  $\beta$ -1b in treatment of secondary progressive multiple sclerosis. *Lancet* 352, 1491-1497

Fayette J, Durand I, Bridon JM, Arpin C, Dubois B, Caux C, Liu YJ, Banchereau J, Brière F (1998): Dendritic cells enhance the differentiation of naïve B cells into plasma cells in vitro. *Scand J Immunol* 48(6), 563-570

Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM (2002): B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 3(10), 944-950

Flügel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne D, Li Z, Ellwart J, 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(5), 547-560

Foote AK, Blakemore WF (2005): Inflammation stimulates remyelination in areas of chronic demyelination. *Brain* 128, 528-539

Friese MA, Fugger L (2005): Autoreactive CD8+T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? *Brain* 128, 1747-1763

Gay FW, Drye TJ, Dick GW, Esiri MM (1997): The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. Identification and characterization of the primary demyelinating lesions. *Brain* 120, 1461-1483

Genain CP, Canella B, Hauser SL, Raine CS (1999): Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med* 5(2), 170-175

Gerritse K, Deen C, Fasbender M, Ravid R, Boersma W, Claassen E (1994): The involvement of specific anti-myelin basic protein antibody-forming cells in multiple sclerosis immunopathology. *J Neuroimmunol* 49, 53-159

Gilden DH, Burgoon MP, Kleinschmidt-DeMasters BK, Williamson RA, Ghausi O, Burton DR, Owens GP (2001): Molecular immunologic strategies to identify antigens and B cell responses unique to multiple sclerosis. *Arch Neurol* 58, 43-48

Gilliet M, Liu YJ (2002): Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 195, 695-704

Glynn P, Linington C (1989): Cellular and molecular mechanisms of autoimmune demyelination in the central nervous system. *Crit Rev Neurobiol* 4(4), 367-385

Gran B, Hemmer B, Vergelli M, McFarland HF, Martin R (1999): Molecular mimicry and multiple sclerosis: degenerate T cell recognition and the induction of autoimmunity. *Ann Neurol* 45, 559-567

Gulbins E, Jekle A, Ferlinz K, Grassmé H, Lang F (2000): Physiology of apoptosis. *Am J Physiol* 279, 605-615

Hameed A, Lowrey DM, Lichtenheld M, Podack ER (1988): Characterization of three serine esterases isolated from human IL-2 activated killer cells. *J Immunol* 141, 3142-3147

Hammond SR, English D, de Wyt C, Maxwell IC, Millingen KS, Stewart-Wynne EG, McLeod JG, McCall MG (1988): The clinical profile of MS in Australia: A comparison between medium-frequency and high-frequency prevalence zones. *Neurology* 38, 980-986

Haring JS, Pewe LL, Perlman S (2002): Bystander CD8 T cell-mediated demyelination after viral infection of the central nervous system. *J Immunol* 169, 1550-1555

Hauser SL, Bhan AK, Gilles F, Kemp M, Kerr C, Weiner HL (1986): Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 19, 578-588

Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, Bar-Or A, Panzara M, Sarkar N, Agarwal S et al. (2008): B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* 358, 676-688

Hayashi K, Hayashi M, Jalkanen M, Firestone JH, Trelstad RL, Bernfield M (1987): Immunocytochemistry of cell surface heparan sulfate proteoglycan in mouse tissues: a light and electron microscopic study. *J Histochem Cytochem* 35, 1079-1088

Hein T, Hopfenmüller W (2000): Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany. *Nervenarzt* 71(4), 288-94

Hellings N, Baree M, Verhoeven C, D'Hooghe MB, Medaer R, Bernard CC, Raus J, Stinissen P (2001): T- cell reactivity to multiple sclerosis antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. *J Neurosci Res* 63, 290-302

Höftberger R, Aboul-Enein F, Brück W, Lucchinetti CF, Rodriguez M, Schmidbauer M, Jellinger K, Lassmann H (2004): Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol* 14(1), 43-50

Hollifield RD, Harbige LS, Pham-Dinh D, Sharief MK (2003). Evidence for cytokine dysregulation in multiple sclerosis: Peripheral blood mononuclear cell production of pro-inflammatory and antiinflammatory cytokines during relapse and remission. *Autoimmunity* 36, 133-141

Howe CL, Bieber AJ, Warrington AE, Pease LR, Rodriguez M (2004): Antiapoptotic signaling by a remyelination-promoting human antimyelin antibody. *Neurobiol Dis* 15(1), 120-131

Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Öhlén C, Goverman J (2001): A pathogenic role for myelin-specific CD8+ T cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med* 194(5), 669-676

Iglesias A, Bauer J, Litzemberger T, Schubart A, Linington C (2001): T – and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Glia* 36, 220-234

Imrell K, Landtblom AM, Hillert J, Masterman T (2006): Multiple sclerosis with and without CSF bands: Clinically indistinguishable but immunogenetically distinct. *Neurology* 67, 1062-1064

Jiang H, Zhang SI, Pernis B (1992): Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 256, 1213-1215

Jurewicz A, Biddison WE, Antel JP (1998): MHC class I-restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide-specific CD8 T lymphocytes. *J Immunol* 160, 3056-3059

Jurewicz A, Matysiak M, Tybor K, Kilianek L, Raine CS, Selmaj K (2005): Tumor necrosis-factor- induced death of adult human oligodendrocytes mediated by apoptosis inducing factor. *Brain* 128(11), 2675-2688

Kabat EA, Glusman M, Knaub V (1948): Quantitative estimation of albumin and gamma globulin in normal and pathologic cerebrospinal fluid by immunochemical methods. *Am J Med* 4, 653-662

Kagi D, Ledermann B, Burki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, Podack ER, Zinkernagel RM, Hengartner H (1994): Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369, 31-37

Karandikar NJ, Crawford MP, Yan X, Ratts RB, Brenchley JM, Ambrozak DR, Lovett-Racke AE, Frohman EM, Stastny P, Douek DC et al. (2002): Glatiramer acetate (Copaxone) therapy induces CD8+ T cell responses in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest* 109, 641-649

Keegan M, König F, McClelland R, Brück W, Morales Y, Bitsch A, Panitch H, Lassmann H, Weinshenker B, Rodriguez M et al. (2005): Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. *Lancet* 366, 579-582

Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WEF, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle RL, Bartke I, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H, Hohlfeld R (1999): Activated human t-cells, b-cells and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: A neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med* 189(5), 865-870

Killestein J, Eikelenboom MJ, Izeboud T, Kalkers NF, Ader HJ, Barkhof F, Van Lier RAW, Uitdehaag BMJ, Polman CH (2003): Cytokine producing CD8+ T cells are correlated to MRI features of tissue destruction in MS. *J Neurimmunol* 142, 141-148

Kim S, Liva SM, Dalal MA, Verity MA, Voskuhl RR (1999): Estriol ameliorates autoimmune demyelinating disease. *Neurology* 52, 1230

Knopf PM, Harling-Berg CJ, Cserr HF, Basu D, Sirulnick EJ, Nolan SC, Park JT, Keir G, Thopson EJ, Hickey WF (1998): Antigen-dependent intrathecal antibody synthesis in the normal rat brain: tissue entry and local retention of antigen-specific B cells. *J Immunol* 161, 692

Koh DR, Fung-Leung WP, Ho A, Gray D, Acha-Orbea H, Mak TW (1992): Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8<sup>-/-</sup> mice. *Science* 256, 1210-1213

Kornek B, Storch MK, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, Olsson T, Linington C, Schmidbauer M, Lassmann H (2000): Multiple Sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis. A comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am J Pathol* 157, 267-276

Krähenbühl O, Rey C, Jenne D, Lanzavecchia A, Groscurth P, Carrel S, Tschopp J (1988): Characterization of granzymes A and B isolated from granules of cloned human cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 141, 3471-3477

Krumbholz M, Theil D, Derfuss T, Rosenwald A, Schrader F, Monoranu CM, Kalled SL, Hess DM, Serafini B, Aloisi F et al. (2005): BAFF is produced by astrocytes and upregulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *J Exp Med* 201, 195-200

Krumbholz M, Theil D, Cepok S, Hemmer B, Kivisäkk P, Ransohoff RM, Hofbauer M, Farina C, Derfuss T, Hartle C et al. (2006): Chemokines in MS: CXCL12 and CXCL13 upregulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain* 129, 200-211

Kuhlmann T, Lingfield G, Bitsch A, Schuchardt J, Brück W (2002): Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 125, 2202-2212

Kummer JA, Kamp AM, van Katwijk M, Brakenhoff JP, Radosevic K, van Leeuwen AM, Borst J, Verwey CL, Hack CE (1993): Production and characterization of monoclonal antibodies raised against recombinant human granzymes A and B and showing cross reactions with the natural proteins. *J Immunol Methods* 163, 77

Kurtzke JF: Epidemiology of multiple sclerosis; in: Handbook of clinical neurology; hrsg. v. Vinken PJ, Bruyn GW, Klawans HL; Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam 1985, 259-287

Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, Schmidbauer M, Parisi JE, Lassmann H (2005): Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* 128, 2705-2712

Lalive PH, Menge T, Delarasse C, Della Gaspera B, Pham-Dinh D, Villoslada P, von Budingen HC, Genain CP (2006): Antibodies to native myelin oligodendrocyte glycoprotein are serologic markers of early inflammation in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 2280-2285

Lassmann H, Pathology of multiple sclerosis; in: McAlpine's Multiple sclerosis, hrsg. von Compston A, Ebers G, Lassmann H u.a., 3.Auflage, Churchill Livingstone, London 1998, 323-358

Linington C, Bradl M, Lassmann H, Brunner C, Vass K (1988): Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am J Pathol* 130(3), 443-454

Liu CC, Rafii S, Granelli-Piperno A, Trapani JA, Young JD (1989): Perforin and serine esterase gene expression in stimulated human T cells: Kinetics, mitogen requirements, and effect of cyclosporine A. *J Exp Med* 170, 2105-2118

Lowis GW (1990): The social epidemiology of multiple sclerosis. *Sci Total Environ* 90, 163-190

Lublin DL, Reingold SC (1996): Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey. *Neurology* 46, 907-911

Lucchinetti CF, Brück W, Rodriguez M, Lassmann H (1996): Distinct Patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity in pathogenesis. *Brain Pathol* 6(3), 259-274

Lucchinetti CF, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (1999): A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions, a study of 113 cases. *Brain* 122, 2279-2295

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

Lucchinetti CF, Mandler RN, McGavern D, Brück W, Gleich G, Ransohoff RM, Trebst C, Weinshenker B, Wingerchuk D, Parisi JE, Lassmann H (2002): A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain* 125, 1450-1461

Lucchinetti CF, Brück W, Lassmann H (2004): Evidence for pathogenic heterogeneity in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 56, 308

Madakamutil LT, Maricic I, Sercarz E, Kumar V (2003): Regulatory T cells control autoimmunity in vivo by inducing apoptotic depletion of activated pathogenic lymphocytes. *J Immunol* 170(6), 2985-92

Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, Reynolds R, Aloisi F (2007): Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 130, 1089-1104

Mallison SM, Smith JP, Schenkein HA, Tew JG (1991): Accumulation of plasma cells in inflamed sites: effects of antigen, non-specific microbial activators, and chronic inflammation. *Infect Immun* 59, 4019-4025

Manz RA, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A (2005): Maintenance of serum antibody levels. *Annu Rev Immunol* 23, 367-386

Marie P (1884): Sclerose en plaques et maladies infectieuses. *Prog Med* 12, 287-289

Martin SJ, Amarante-Mendes GP, Shi L, Chuang TH, Casiano CA, O'Brien GA, Fitzgerald P, Tan EM, Bokoch GM, Greenberg AH et al. (1996): The cytotoxic cell protease granzyme B initiates apoptosis in a cell-free system by proteolytic processing and activation of the ICE/CED-3 family protease, CPP32, via a novel two-step mechanism. *EMBO J* 15, 2407-2416

Martyn CN, Gale CR (1997): The epidemiology of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 169, 3-7

Mason DY, Cordell JL, Gaulard P, Tse AGD, Brown MH (1992): Immunohistological detection of human cytotoxic/suppressor T cells using antibodies to a CD8 peptide sequence. *J Clin Pathol* 45, 1084-1088

McDonald IW, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC et al. (2001): Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50, 121-127

Medana I, Martinic, MA, Wekerle H, Neumann H (2001): Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am J Pathol* 159, 809-815

Meinl E, Krumbholz M, Hohlfeld R (2006): B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Ann Neurol* 59, 880-892

Merrill JE (1992): Proinflammatory and antiinflammatory cytokines in multiple sclerosis and central nervous system acquired immunodeficiency syndrome. *J Immunother* 12, 167-170

Miller DM, Weinstock-Guttman B, Bethoux F, Lee JC, Beck G, Block V, Durelli L, LaMantia L, Barnes D, Sellebjerg F et al. (2000): A metaanalysis of methylprednisolone in recovery from multiple sclerosis exacerbations. *Mult Scler* 6(4), 267-273

- 
- Mews I, Bergmann M, Bunkowski S, Gulotta F, Brück W (1998): Oligodendrocyte and axon pathology in clinically silent multiple sclerosis lesions. *Mult Scler* 4(2), 55-62
- Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M (1999): Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med* 5(1), 49-55
- MSTKG (Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe) (2006): Escalating immunomodulatory therapy of multiple sclerosis: update (September 2006). *Nervenarzt* 77(12), 1506-1518
- Najafian N, Chitnis T, Salama AD, Zhu B, Benou C, Yuan X *et al* (2003): Regulatory functions of CD8+CD28-T cells in an autoimmune disease model. *J Clin Invest* 112, 1037-1048
- Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H (2002): Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci* 25(6), 313-319
- Niino M, Bodner C, Simard ML, Alatab S, Gano D, Kim HJ, Trigueiro M, Racicot D, Guérette C, Antel JP *et al.* (2006): Natalizumab effects on immune responses in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 59, 748-754
- Norment AM, Salter RD, Parham P, Engelhard VH, Littman DR (1988): Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. *Nature* 336, 79-81
- Noseworthy JH, Lucchinetti CF, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000): Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343(13), 938-952
- O'Connell FP, Pinkus JL, Pinkus GS (2004): CD138 (Syndecan-1), a plasma cell marker. Immunohistochemical profile in hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms. *Am J Clin Pathol* 121, 254-263
- Ozawa K, Suchanek G, Breitschopf H, Brück W, Budka H, Jellinger K, Lassmann H (1994): Patterns of oligodendroglia pathology in multiple sclerosis. *Brain* 117, 1311-1322

Paolillo A, Coles AJ, Molyneux PD, Gawne-Cain M, MacManus D, Barker GJ, Compston DAS, Miller DH (1999): Quantitative MRI in patients with secondary progressive multiple sclerosis treated with monoclonal antibody Campath 1H. *Neurology* 46, 751-757

Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Bruck W, Lucchinetti C, Lassmann H (2006): Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain* 129, 3165-3172

Pendlebury ST, Lee MA, Blamire AM, Styles P, Matthews PM (2000): Correlating magnetic resonance imaging markers of axonal injury and demyelination in motor impairment secondary to stroke and multiple sclerosis. *Magn Reson Imaging* 18(4), 369-78

Pittock SJ, McClelland RL, Achenbach SJ, König F, Bitsch A, Brück W, Lassmann H, Parisi JE, Scheithauer BW, Rodriguez M et al. (2005): Clinical course, pathological correlations, and outcome of biopsy proved inflammatory demyelinating disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76, 1693-1697

Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, 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

Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, Johnson KP, Sibley WA, Silberberg DH, Tourtellotte WW (1983): New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 13(3), 227-231

Pozzilli C, Marinelli F, Romano S, Bagnato F (2004): Corticosteroids treatment. *J Neurol Sci* 223(1), 47-51

Prineas JW (1975): Pathology of the early lesion in multiple sclerosis. *Hum Pathol* 6, 531-554

Prineas JW, Wright RG (1978): Macrophages, lymphocytes and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis. *Lab Invest* 38, 409-421

Prineas JW, Connell F (1979): Remyelination in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 5(1), 22-31

Qin Y, Duquette P, Zhang Y, Talbot P, Poole R, Antel J (1998): Clonal expansion and somatic hypermutation of VH genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 102, 1045-1050

Raine CS, Cannella B, Hauser SL, Genain CP (1999): Demyelination in primate autoimmune encephalomyelitis and acute multiple sclerosis lesions: A case for antigen-specific antibody mediation. *Ann Neurol* 46, 144-160

Rand KH, Houck H, Denslow ND, Heilman KM (2000): Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 (EBNA-1) associated oligoclonal bands in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 173, 32-39

Rapraeger AC (1993): The coordinated regulation of heparan sulfate, syndecans and cell behaviour. *Curr Opin Cell Biol* 5, 844-853

Ridley RC, Xiao H, Hata H, Woodliff J, Epstein J, Sanderson RD (1993): Expression of syndecan regulates human myeloma plasma cell adhesion to type I collagen. *Blood* 81, 767-774

Ritchie AM, Gilden DH, Williamson RA, Burgoon MP, Yu X, Helm K, Corboy JR, Owens GP (2004): Comparative analysis of the CD19+ and CD138+ cell antibody repertoires in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Immunol* 173, 649-656

Robertson NP, O'Riordan JI, Chataway J, Kingsley DP, Miller DH, Clayton D, Compston DA (1997): Offspring recurrence rates and clinical characteristics of conjugal multiple sclerosis. *Lancet* 349 (9065), 1587-1590

Rodriguez M (2007): Effectors of Demyelination and Remyelination in the CNS: Implications for Multiple Sclerosis. *Brain Pathol* 17, 219-229

Rodriguez M, Lennon VA (1990): Immunoglobulins promote remyelination in the central nervous system. *Ann Neurol* 27, 12-17

Sadovnik AD, Ebers GC (1993): Epidemiology of multiple sclerosis. A critical overview. *Can J Neurol Sci* 20, 17-29

Sadovnik AD, Bulman D, Ebers GC (1991): Parent-child concordance in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 29, 252-255

Sadovnik AD, Dircks A, Ebers GC (1999): Genetic counselling in multiple sclerosis: risks to sibs and children of affected individuals. *Clin Genet* 56, 118-122

Salcedo TW, Azzoni L, Wolf SF, Perussia B (1993): Modulation of perforin and granzyme messenger RNA expression in human natural killer cells. *J Immunol* 151, 2511-2520

Sanderson RD, Lalor P, Bernfield M (1989): B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul* 1(1), 27-35

Schumacher GA, Beebe G, Kibler RF, Kurland LT, Kurtzke JF, McDowell F, Nagler B, Sibley WA, Tourtelotte WW, Willmon TL (1965): Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: Report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann NY Acad Sci* 122, 552-568

Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F (2004): Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol* 14, 164-174

Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, Magliozzi R, Reynolds R, Cinque P, Andreoni L, Trivedi P, Salvetti M, Faggioni A et al. (2007): Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 204, 2899-2912

---

Sibley WA, Bamford CR, Clark K (1985): Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* 1985,1, 1313-1315

Sicotte NL, Liva SM, Klutch R, Pfeiffer P, Bouvier S, Odesa S, Wu TC, Voskuhl RR (2002): Treatment of multiple sclerosis with pregnancy hormone estriol. *Ann Neurol* 52(4), 421-428

Skulina C, Schmidt S, Dornmair K, Babbe H, Roers A, Rajewsky K, Wekerle H, Hohlfeld R; Goebels N (2004): Multiple sclerosis: Brain infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(8), 2428-2433

Smith CM, Wilson NS, Waithman J, Villadangos JA, Carbone FR, Heath WR *et al.* (2004): Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nat Immunol* 5, 1143-1148

Smyth MJ, McGuire MJ, Thia KY (1995): Expression of recombinant human granzyme B. A processing and activation role for dipeptidyl peptidase I. *J Immunol* 154, 6299-6305

Sorensen PS, Koch-Henriksen N, Ross C, Clemmesen KM, Bendtzen K, Danish Multiple Sclerosis Study Group (2005): Appearance and disappearance of neutralizing antibodies during interferon beta therapy. *Neurology* 65, 33-39

Sørensen TL, Tani M, Jensen J, Pierce V, Lucchinetti C, Folcik VA, Qin S, Rottman J, Sellebjerg F, Strieter RM *et al.* (1999): Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 103(6), 807-815

Storch MK, Piddlesden S, Haltia M, Iivanainen M, Morgan P, Lassmann H (1998): Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody and complement mediated demyelination. *Ann Neurol* 43, 465-471

Stüve O, Cepok S, Elias B, Saleh A, Hartung HP, Hemmer B, Kieseier BC (2005): Clinical stabilization and effective B-lymphocyte depletion in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of a patient with fulminant relapsing-remitting multiple sclerosis. *Arch Neurol* 62, 1620-1623

Sun D, Qin Y, Chluba J, Epplen JT, Wekerle H (1988): Suppression of experimentally induced autoimmune encephalomyelitis by cytolytic T-T cell interactions. *Nature* 332, 843-845

Sun D, Whitaker JN, Huang Z, Liu D, Coleclough C, Wekerle H, Raine CS (2001): Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J Immunol* 166, 7579-7587

Sun J, Link H, Olsson T, Xiao BG, Andersson G, Ekre HP, Linington C, Diener P (1991): T and B cell responses to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *J Immunol* 146(5), 1490-1495

Sun JC, Williams MA, Bevan MJ (2004): CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of CD8+ T cells after acute infection. *Nat Immunol* 5, 927-33

Takami T, Qi CF, Yamada T, Yamashima M, Kon SI, Ishii Y et al. : B20.3. Reactivity and specificity of L26(pan B-cell mAb) on 322 cases of fresh and paraffin-embedded lymphoproliferative diseases; in: *Leucocyte Typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference ; hrsg. von Knapp H u.a.; Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo 1989, 134-136*

Tedder TF, Engel P (1994): CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol Today* 15, 450-454

Tejada-Simon MV, Zang YC, Hong J, Rivera VM, Zhang JZ (2003): Cross-reactivity with myelin basic protein human herpesvirus-6 in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 53, 189-190

Tennakoon DK, Mehta RS, Ortega SB, Bhoj V, Racke MK, Karandikar NJ (2006): Therapeutic induction of regulatory, cytotoxic CD8+ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol* 176, 7119-7129

The IFNB Multiple Sclerosis Study Group (1993): Interferon  $\beta$ -1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 43, 655-661

Tintoré M, Rovira A, Río J, Nos C, Grivé E, Sastre-Garriga J, Pericot I, Sánchez E, Comabella M, Montalban X (2003): New diagnostic criteria for multiple sclerosis. Application in first demyelinating episode. *Neurology* 60, 27-30

Tiwari JL, Terasaki PI: Multiple sclerosis; in: HLA and disease associations; hrsg. v. Tiwari JL, Terasaki PI; Springer Verlag, New York 1985, 152-167

Tourtellotte WW, Walsh MJ, Baumhefner RW, Staugaitis SM, Shapshak P (1984): The current status of multiple sclerosis intra-blood-brain-barrier IgG synthesis. *Ann N Y Acad Sci* 436, 52-67

Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L (1998): Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Eng J Med* 338, 278-285

Traugott U (1984): Characterization and distribution of lymphocyte subpopulations in multiple sclerosis plaques vs autoimmune demyelinating lesions. *Springer Semin Immunopathol* 8, 71-95

Traugott U (1990): Evidence for immunopathogenesis; in: Handbook of Multiple Sclerosis; hrsg. v. Cook S; Marcel Dekker Inc., New York 1990, 101-127

Trotter J, DeJong LJ, Smith ME (1986): Opsonization with myelin antibody increases the uptake and intracellular metabolism of myelin in inflammatory macrophages. *J Neurochem* 47, 779-789

UBC MS/ MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group (1993): Interferon  $\beta$ -1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 43, 662-667

Ure DR, Rodriguez M (2002): Preservation of neurologic function during inflammatory demyelination correlates with axon sparing in a mouse model of multiple sclerosis. *Neuroscience* 111, 399-411

Vallittu AM, Peltoniemi J, Elovaara I, Kuusisto H, Färkkilä M, Multanen J, Erälinna JP (2005): The efficacy of glatiramer acetate in beta-interferon-intolerant MS patients. *Acta Neurol Scand* 112, 234-237

Van der Valk P, de Groot CJA (2000): Staging of multiple sclerosis lesions: Pathology of the time frame of MS. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26, 2-10

Van Oosten BW, Lai M, Hodgkinson S, Barkhof F, Miller DH, Moseley IF, Thompson AJ, Rudge P, McDougall A, McLeod JG, Ader HJ, Polman CH (1997): Treatment of multiple sclerosis with the monoclonal anti-CD4 antibody cM-T412: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, MR-monitored phase II trial. *Neurology* 49(2), 351-357

Vartanian T, Li Y, Zhao M, Stefansson K (1995): Interferon- $\gamma$  –induced oligodendrocyte cell death: Implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mol Med* 1(7), 732-743

Vidovic M, Sparacio SM, Elovitz M, Benveniste EN (1990): Induction and regulation of class II major histocompatibility complex mRNA expression in astrocytes by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Neuroimmunol* 30, 189-200

Waksman BH (1989): Multiple sclerosis. *Curr Opin Immunol* 1(4), 733-739

Walsh MJ, Tourtellotte WW (1986): Temporal invariance and clonal uniformity of brain and cerebrospinal IgG, IgA, and IgM in multiple sclerosis. *J Exp Med* 163, 41-53

Wang T, Allie R, Conant K, Haughey N, Turchan-Cholewo J, Hahn K, Rosen A, Steiner J, Keswani S, Jones M et al. (2006): Granzyme B mediates neurotoxicity through a G-protein-coupled receptor. *FASEB J* 20(8), 1209-1211

Warren KG, Catz I (1994): Relative frequency of autoantibodies to myelin basic protein and proteolipid protein in optic neuritis and multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *J Neurol Sci* 121, 66-73

Warrington AE, Asakura K, Bieber AJ, Ciric B, van Keulen V, Kaveri SV, Kyle RA, Pease LR, Rodriguez M (2000): Human monoclonal antibodies reactive to oligodendrocytes promote remyelination in a model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 6820-6825

Weinshenker BG (1994): Natural history of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 36, 6-11

Weinshenker BG (1998): The natural history of multiple sclerosis: update 1998. *Semin Neurol* 18, 301-307

Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC (1989): The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain* 112, 133-146

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(6), 878-886

Whitacre CC, Reingold SC, O'Looney PA (1999): A gender gap in autoimmunity. *Science* 283, 1277-1278

Wolf SD, Dittel BN, Hardarottir F, Janeway CA (1996): Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J Exp Med* 84, 2271-2278

Wong GH, Bartlett PF, Clark Lewis I, Battye F, Schrader JW (1984): Inducible expression of H-2 and Ia antigens on brain cells. *Nature* 310, 688-691

Wucherpfennig KW, Catz I, Hausmann S, Strominger JL, Steinman L, Warren KG (1997): Recognition of the immunodominant myelin basic protein peptide by autoantibodies and HLA-DR2-restricted T cell clones from multiple sclerosis patients. Identity of key contact residues in the B cell- and T-cell epitopes. *J Clin Invest* 100, 1114-1122

Zeine R, Cammer W, Barbarese E, Liu CC, Raine CS (2001): Structural dynamics of oligodendrocyte lysis by perforin in culture: relevance to multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 64, 380-391

Zeman AZ, Kidd D, McLean BN, Kelly MA, Francis DA, Miller DH, Kendall BE, Rudge P, Thompson EJ, McDonald WI (1996): A study of oligoclonal band negative multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 60, 27-30

Zhang J, Markovic-Plese S, Lacet B, Raus J, Weiner HL, Hafler DA (1994): Increased frequency of interleukin-2 responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 179, 973-984

Zhang Y, Da RR, Hilgenberg LG, Tourtellotte WW, Sobel RA, Smith MA, Olek M, Nagra R, Sudhir G, van den Noort S, Qin Y (2005): Clonal expansion of IgA-positive plasma cells and axon-reactive antibodies in MS lesions. *J Neuroimmunol* 167, 120-130

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir die Erstellung dieser Dissertationsschrift ermöglichten und mich begleiteten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Brück für die Anregung zu dieser Arbeit und für seine freundliche Unterstützung.

Danken möchte ich ebenfalls Frau Dr. F.B. König für die Einarbeitung in immunhistochemische Analysen, für ihre Beratung und Diskussionsbereitschaft.

Der Abteilung Medizinische Statistik der Universität Göttingen danke ich für die Beratung beim Auswerten meiner erhobenen Daten.