

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Neuro-Kopf-Zentrum

Einfluss von Glatirameracetat auf die zelluläre Funktion von B-Lymphozyten

Martina Betz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. M.S. Weber
2. Univ.-Prof. Dr. J.G. Duyster

Die Dissertation wurde am 16.01.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 23.05.2012 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS	4
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	5
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1. EINLEITUNG	8
1.1 Epidemiologie, Verlaufsformen und Klinik	8
1.2 Diagnostik	12
1.3 Ätiologie und Pathogenese.....	13
1.4 Immunpathologische Erkenntnisse	14
1.4.1 Pathophysiologische Bedeutung von T-Zellen.....	14
1.4.2 Pathophysiologische Bedeutung von B-Zellen	17
1.5 Therapie	19
1.5.1 Glatirameracetat	19
1.5.2 Anti CD20 vermittelte B-Zelldepletierung als potentielles Therapiekonzept	21
1.6 Fragestellung	23
2. MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 MATERIAL	25
2.1.1 Geräte.....	25
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	25
2.1.3 Chemikalien und Kits	26
2.1.4 Antikörper	27
2.1.5 Puffer und Lösungen.....	27
2.1.6 Kulturmedium für Zellkultur	28
2.1.7 Versuchstiere.....	29
2.2 METHODEN.....	29
2.2.1 Präparation	29
2.2.2 Herstellen von Knochenmarks- und Milzsuspension	29

2.2.3 Kultivierung der Zellen	31
2.2.4 Zellaufreinigung mittels MACS-Separation	32
2.2.5 Quantitative Zytokinmessung mittels ELISA	34
2.2.6 Durchflusszytometrie zur Ermittlung der Oberflächenmarker auf B-Zellen.....	35
4. ERGEBNISSE	39
4.1. FACS Analysen an isolierten Milz-B-Zellen und B-Vorläuferzellen.....	39
4.1.1 Einfluss von Glatirameracetat auf die Expression der B-Zell-Aktivierungsmarker CD 25 und CD69.....	41
4.1.2 Einfluss von Glatirameracetat auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD 86 auf B-Zellen	47
4.1.3 Einfluss von Glatirameracetat auf die Expression des Latency Associated Peptide (LAP)	53
4.2 ELISA Analysen der Kulturüberstände von B-Zellen	57
5. DISKUSSION	60
6. ZUSAMMENFASSUNG	68
7. SUMMARY	70
8. LITERATURVERZEICHNIS	71
9. DANKSAGUNG.....	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Expanded disability scale (EDSS)	11
Tabelle 2: Kriterien zur Diagnose des MS nach McDonald et al. (2001)	13
Tabelle 3: Schema der Zellkulturen.....	32
Tabelle 4: Verwendete Oberflächenantigene	37
Tabelle 5: Antikörperkonzentrationen bei der Oberflächenfärbung für die FACs Analysen...	37
Tabelle 6: Messergebnisse IL-6 ELISA	59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Geographische Verteilung der Erkrankungshäufigkeit der MS weltweit	9
Abbildung 2: Verlaufsformen der MS	10
Abbildung 3: Bei der Antigenpräsentation entscheidende Zytokine für die weitere Entwicklung der T-Zelle	16
Abbildung 4: Evaluation der B-Zellreinheit	39
Abbildung 5: Plazierung des Gates bei den Knochenmarksanalysen.....	41
Abbildung 6: Expression von CD25 nach LPS Stimulation.....	42
Abbildung 7: Expression von CD25 nach IL-4 Stimulation	44
Abbildung 8: Expression von CD69 nach LPS Stimulation.....	45
Abbildung 9: Expression von CD69 nach IL-4 Stimulation	46
Abbildung 10: Expression von CD80 nach LPS Stimulation.....	48
Abbildung 11: Expression von CD80 nach IL-4 Stimulation	49
Abbildung 12: Expression von CD86 nach LPS Stimulation.....	51
Abbildung 13: Expression von CD86 nach IL-4 Stimulation	52
Abbildung 14: Kinetik der LAP Expression von IL-4 stimulierten B-Vorläuferzellen	54
Abbildung 15: Expression von LAP nach LPS Stimulation	55
Abbildung 16: Expression von LAP nach IL-4 Stimulation:.....	57
Abbildung 17: IL-6 ELISA-Ergebnisse.....	59

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APC	Antigen Präsentierende Zelle (engl.: <i>antigen presenting cell</i>)
BDNF	vom Gehirn stammender neurotropher Faktor (engl.: <i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
BSA	bovines Serumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumine</i>)
CD	Zelldifferenzierungsmarker (engl.: <i>cluster of differentiation</i>)
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4 (engl.: <i>cytotoxic T- lymphocyte- associated protein 4</i>)
EAE	experimentelle autoimmune Encephalomyelitis
EDSS	erweiterte Skala für den Behinderungsstatus (engl: <i>expanded disability status scale</i>)
ELISA	enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (engl: <i>enzyme-linked immunosobent-assay</i>)
FACS	Fluoreszenz aktivierter Zellsorter (engl.: <i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FS	funktionelles System
FSC	Vorwärtsstreuwinkel (engl: <i>forward scatter</i>)
GA	Glatirameracetat
HLA	humanes Leukozytenantigen (engl.: <i>human leukocyte antigen</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
INF- β	Interferon beta
LAP	Latenz assoziiertes Peptid (engl.: <i>latency associated protein</i>)
LPS	Lipopolysaccharid

MAb	monoklonaler Antikörper
MACS	Magnetisch aktivierte Zellsortierung (engl.: <i>magnetic activated cell sort</i>)
MBP	Myelin-Basisches Protein (engl.: <i>myelin basic protein</i>)
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: <i>major histocompatibility complex</i>)
MRT	Magnetresonanz-Tomographie
MS	Multiple Sklerose
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PE	Phykoerythrin
PML	progressive multifokale Leukencephalopathie
PP-MS	primär progrediente Multiple Sklerose
RR-MS	schubförmig remittierende Multiple Sklerose
SP-MS	sekundär progrediente Multiple Sklerose
SSC	Seitwärtsstreuwinkel (engl.: <i>side scatter</i>)
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	transformierender Wachstumsfaktor (engl.: <i>transforming growth factor</i>)
TH	T-Helfer
TNF	Tumornekrosefaktor
VEP	visuell evoziertes Potential
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Bereits im Jahre 1837 beschrieb Sir Robert Carswell (1793-1857) und etwas später, 1842, Jean Cruveilhier (1791-1874), unabhängig voneinander, die pathologischen Veränderungen und die klinischen Aspekte der Multiple Sklerose (MS) [Pearce, 2005]. In den darauf folgenden 170 Jahren finden sich eine beträchtliche Anzahl an wissenschaftlichen und klinischen Forschungsarbeiten, um Ursachen und Pathogenese der MS genauer zu verstehen und so eine Behandlung zu ermöglichen. Vor allem mithilfe der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE) bei Maus und Ratte, welche in klinischer und pathophysiologischer Hinsicht große Ähnlichkeit mit der Inflammation bei der MS aufweist, konnten neue Einsichten in immunologische Mechanismen und Pathogenese gewonnen werden. Trotz dieser Bemühungen ist die Genese der Erkrankung jedoch ungeklärt. Heute wird die MS als entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) angesehen, bei deren Entstehung eine Autoimmunreaktion gegen Myelinscheiden vermutet wird. [Compston, 2000; Brenner et al., 2001].

1.1 Epidemiologie, Verlaufsformen und Klinik

Mit einer Prävalenz von 5 bis 24:10000 (2008; www.atlasofms.org) im nördlichen Europa und Nordamerika, ist die MS eine der häufigsten entzündlichen Erkrankung des ZNS.

Wie in **Abbildung 1** dargestellt, zeigen Inzidenz und Prävalenz weltweit eine erhebliche Variabilität. Die höchsten Prävalenzraten finden sich im nördlichen Europa, in Nordamerika und im südlichen Australien [Noseworthy et al., 2000]. Verallgemeinert kann man sagen, dass das Vorkommen mit zunehmender Entfernung vom Äquator in nördliche und südliche Breiten zunimmt. Generell werden so allerdings Regionen mit unverhältnismäßig hohem oder niedrigem Vorkommen der MS unterrepräsentiert [Compston, 2008].

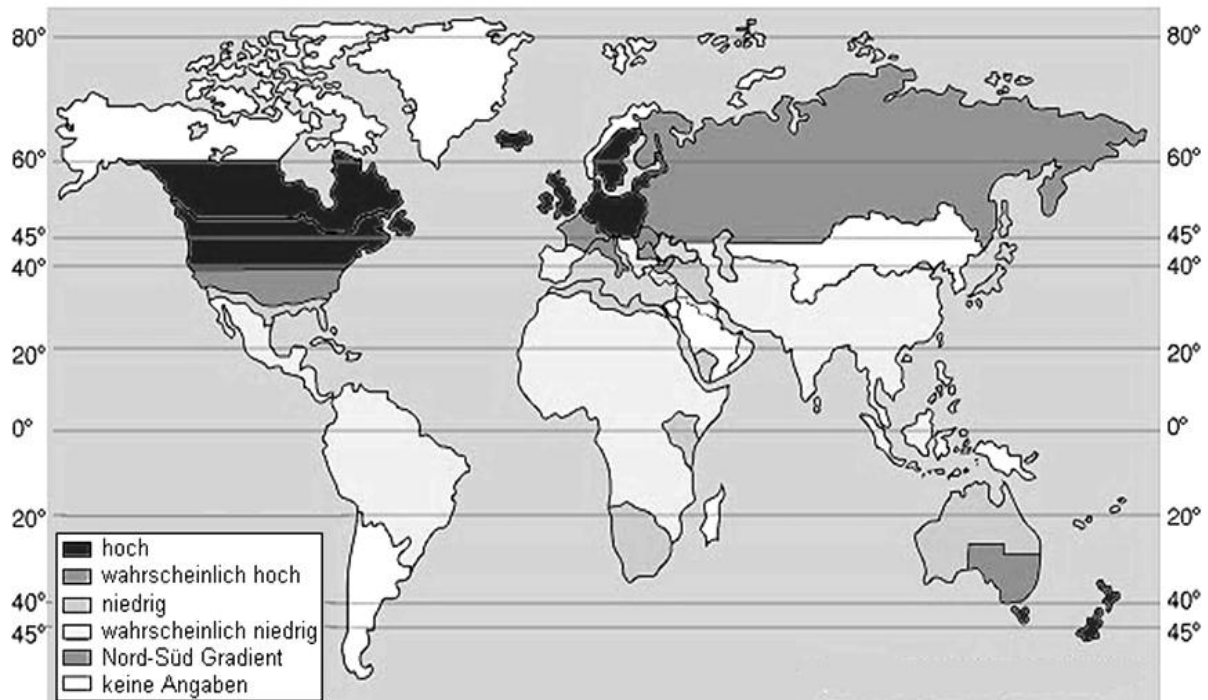


Abbildung 1: Geographische Verteilung der Erkrankungshäufigkeit der MS weltweit

Das klinische Erscheinungsbild der Erkrankung sowie der Verlauf ist variabel, wie in **Abbildung 2** dargestellt wird. Zumeist ist der Beginn schubförmig-remittierend (engl.: *relapsing-remitting*, RR-MS), so dass sich die Symptome nach den Erkrankungsschüben weitgehend zurückbilden. Zwischen den Schüben wird keine klinische Krankheitsprogression verzeichnet. Das Auftreten neuer Schübe ist unregelmäßig und unvorhersehbar, überschreitet jedoch selten die Anzahl von 1-5 Schübe pro Jahr [Compston, 2008]. Mit 80% ist die RR-MS die am häufigsten vorkommende Verlaufsform, wobei ca. 2/3 der Erkrankten Frauen sind. Das mittlere Manifestationsalter der RR-MS liegt meist zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr [Noseworthy et al., 2000]. Bei ca. 50% der Betroffenen, geht die Krankheit im Laufe von ca. zehn Jahren in eine sekundär progrediente Verlaufsform (*secondary-progressive*, SP-MS) über. Diese ist durch eine graduelle Progression der Behinderung mit oder ohne überlagerter Schübe charakterisiert [Hauser et al., 2006]. Bei 20% der betroffenen Patienten findet sich eine primär progrediente Verlaufsform (*primary-progressive*, PP-MS), die von Beginn an eine schleichende, kontinuierliche klinische Verschlechterung aufweist [Noseworthy et al., 2000]. Sowohl bei der PP-MS als auch bei der SP-MS liegt der Beginn der Progression um das 40. Lebensjahr [Confavreux, 2006]. Die Ursachen der unterschiedlichen Erkrankungsverläufe sind

bis heute letztlich ungeklärt; des Weiteren gibt es bislang keine zuverlässige prognostische Marker, die den interindividuellen Krankheitsverlauf vorher sagen können.

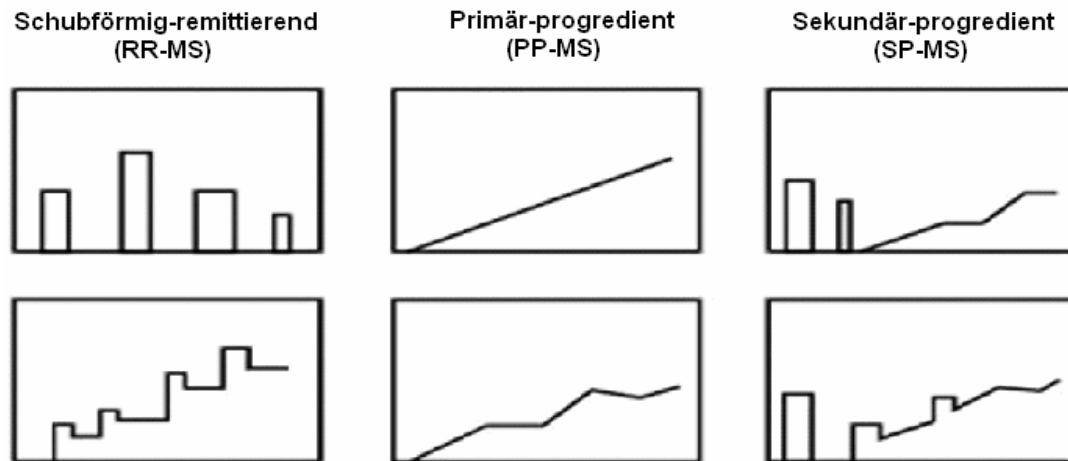


Abbildung 2: Verlaufsformen der MS

Nachdem die entzündlichen Läsionen prinzipiell an jeder Stelle des ZNS auftreten können, gibt es grundsätzlich keine Symptome, die nicht vorkommen können. Zu Beginn der Erkrankung finden sich häufig Lähmungen, Sensibilitätsstörungen, einseitige Neuritis optica, Doppelbilder und das Zeichen nach Lhermitte [Noseworthy et al., 2000]. Dabei handelt es sich um eine durch Nackenbeugung hervorgerufene Missempfindung in den Extremitäten oder dem Rumpf, was meist mit einer demyelinisierenden entzündlichen Läsion im Rückenmark (RM) korreliert [Kempster, 2008]. Im weiteren Verlauf zeigen sich zusätzlich Koordinationsstörungen, Blasenfunktionseinschränkungen, neuropsychologische Auffälligkeiten und Fatigue [Noseworthy et al., 2000]. Mit der Erkrankungsdauer akkumulieren irreversible Symptome, die vor allem durch axonale Schäden hervorgerufen werden [Kornek et al., 2000]. Es wird angenommen, dass in unterschiedlichen Krankheitsstadien verschiedene Mechanismen axonale Schäden hervorrufen. Hierbei steht bei der RR-MS die Entzündung im Vordergrund, wohingegen bei der SP-MS der entzündlich hervorgerufene degenerative axonale Schaden das Krankheitsbild dominiert, das Fortschreiten der Erkrankung aber anderen Mechanismen zugeschrieben wird [Coles et al., 1999; Bjartmar et al., 2003]. Insgesamt ist der Krankheitsverlauf heterogen, mit einem breitem Spektrum interindividueller Unterschiede bezüglich Klinik,

Lokalisation, Anzahl der Läsionen und Therapieansprechen. Das Ausmaß der Symptomatik kann anhand der *expanded disability status scale* (EDSS, Kurtzke 1983) angegeben werden (**Tabelle 1**). Dabei werden Beeinträchtigungen acht funktioneller Systeme (FS) berücksichtigt: pyramidale Funktion, zerebelläre Funktion, Hirnstammfunktion, Sensorik, Darm- und Blasenfunktion, Funktion des visuellen Systems, zerebrale Funktion und eine Gruppe anderer Funktionen.

Tabelle 1: Expanded disability scale (EDSS)

Wert	Beschreibung
0.0	Unauffällige neurologische Untersuchung
1.0	Keine Einschränkung, minimale Symptome in einem FS
1.5	Keine Einschränkung, minimale Symptome in mehr als einem FS
2.0	Minimale Einschränkung in einem FS
2.5	Milde Einschränkung in einem FS oder Minimale Einschränkung in zwei FS
3.0	Moderate Einschränkung in einem FS oder milde Einschränkung in drei bis vier FS
3.5	Voll gehfähig, aber moderate Einschränkung in einem FS und mehr als minimale Einschränkung in mehreren anderen FS
4.0	Voll gehfähig ohne Hilfe, selbstständig, trotz relativ schwerer Einschränkung um 12 Stunden am Tag auf; kann ohne Hilfe oder Pause 500m gehen
4.5	Voll gehfähig ohne Hilfe, die meiste Zeit des Tages auf, in der Lage, den ganzen Tag zu arbeiten, aber andererseits Einschränkung der vollen Aktivität oder minimale Hilfe nötig; kann ohne Hilfe oder Pause 300m gehen
5.0	Gehfähig ohne Hilfe oder Pause über 200m; Einschränkungen beeinträchtigen alltägliche Tätigkeiten
5.5	Gehfähig ohne Hilfe oder Pause über 100m; Einschränkungen schließen manche alltäglichen Tätigkeiten aus
6.0	Intermittierend oder einseitig dauerhaft Gehhilfe nötig, um mit oder ohne Pause 10m gehen zu können
6.5	Dauerhaft beidseitige Gehhilfe nötig, um ohne Pause 20m gehen zu können
7.0	Auch mit Hilfe nur bis zu fünf Metern gehfähig; auf den Rollstuhl angewiesen; im Rollstuhl alleine mobil und etwa 12 Stunden auf
7.5	Nur wenige Schritte möglich; auf den Rollstuhl und zum Teil auch hier auf Hilfe angewiesen; nicht den gesamten Tag auf; evtl. motorgetriebener Rollstuhl notwendig
8.0	Hauptsächlich im Bett liegend oder im Rollstuhl sitzend; selbständige Körperpflege möglich; Arme im Allgemeinen noch funktionsfähig
8.5	Hauptsächlich im Bett liegend; Funktion der Arme eingeschränkt; selbständige Körperpflege eingeschränkt
9.0	Bettlägerig, sprechen und essen möglich
9.5	Bettlägerig, völlig hilflos; unfähig, effektiv zu kommunizieren oder zu essen/ zu schlucken
10.0	Tod in Folge der Multiplen Sklerose

Der Krankheitsverlauf erstreckt sich in der Regel über mehrere Jahrzehnte [Brønnum-Hansen et al., 2004]. Ein hohes Alter zu Erkrankungsbeginn, häufige Schübe in den ersten zwei Erkrankungsjahren, männliches Geschlecht und ein von Beginn an progressiver Ablauf korrelieren mit einem schweren klinischen Verlauf und einer schnelleren Akkumulation von irreversiblen Behinderungen [Confavreux, 2006; Noseworthy et al., 2000].

1.2 Diagnostik

Die MS ist eine Ausschlussdiagnose, da keine hochspezifischen Labortests zur Verfügung stehen und es keine krankheitsspezifischen Symptome gibt. Um die Diagnose einer sicheren MS stellen zu können, müssen Diagnosekriterien, die insbesondere das wiederholte Auftreten von Beschwerden beinhalten, beim individuellen Patienten bestehen. Die zeitlich unabhängig voneinander auftretenden und in verschiedenen neurologischen Funktionssystemen vorkommenden Symptome gelten hierbei als typischer Ausdruck der Dissemination in Raum und Zeit der Erkrankung. Um eine frühere und verlässlichere Diagnose zu stellen wurden 2001 von McDonald et al. die „McDonald Criteria“ entwickelt (**Tabelle 2**). Diese inzwischen 2005 und 2010 revidierten Kriterien werden international zur Diagnosestellung herangezogen. In erster Linie wird hierbei neben der Klinik des Patienten die Bildgebung (kraniale und spinale Kernspintomographie, MRT) zur Diagnostik verwendet, um die geforderte Dissemination in Raum und Zeit zu belegen. Unterstützt wird die Diagnosestellung durch elektrophysiologische Messung von visuellen und somatosensiblen evozierten Potentialen (VEP und SEP) und laborchemischen Untersuchungen des Liquor cerebrospinalis. Ziel ist eine frühe und sichere Diagnose, um falsch positive Krankheitsbefunde zu vermeiden und eine frühe Therapieplanung beginnen zu können [Polman et al., 2005].

Tabelle 2: Kriterien zur Diagnose des MS nach McDonald et al. 2001 (revidiert 2005, 2010)

KLINISCHE PRÄSENTATION (SCHÜBE)	OBJEKTIVIERBARE KLINISCHE LÄSION	WEITERE ERFORDERLICHE KRITERIEN
2 oder mehr	2 oder mehr	<ul style="list-style-type: none"> Keine; klinische Evidenz ausreichend
2 oder mehr	1	<ul style="list-style-type: none"> räumliche Dissemination im MRI oder positiver Liquorbefund und ≥ 2 MS typ. Läsionen im MRI oder weiterer klinischer Schub
1	2 oder mehr	<ul style="list-style-type: none"> zeitliche Dissemination im MRI oder zweiter klinischer Schub
1 (monosymptomatische Präsentation)	1	<ul style="list-style-type: none"> räumliche Dissemination im MRI oder ≥ 2 MS typ. Läsionen im MRI mit positivem Liquorbefund und zeitliche Dissemination im MRI oder zweiter klinischer Schub
0 (PP-MS)	1	<ul style="list-style-type: none"> positiver Liquorbefund und räumliche Dissemination im MRI <ul style="list-style-type: none"> - 9 T2 Läsionen im Gehirn - oder 2 Läsionen im Rückenmark (RM) - oder 4-8 cerebrale + 1 RM-Läsionen - oder positive VEPs + 4-8 cerebrale MRT Läsionen - oder positive VEPs + 4 cerebr. MRT Läsionen + 1 RM-Läsion und zeitliche Dissemination im MRI oder kontinuierliche Progression für 1 Jahr

1.3 Ätiologie und Pathogenese

Auf der Grundlage von Migrations- und Infektionstudien, gelten Umwelteinflüsse, und hier am ehesten Viren, als mögliche Triggerfaktoren bei der Entstehung der MS [Hauser et al., 2006]. Man vermutet, dass eine Abfolge von Infektionen zu einer chronischen systemischen Aktivierung des Immunsystems führt. Es könnte weiterhin sein, dass dadurch eine Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf den Endothelien von Gehirn und Rückenmark verursacht wird, was Leukozyten ermöglicht in das ZNS einzudringen. Falls darunter aktivierte Lymphozyten myeline Strukturen als Antigen erkennen, wird eine Ereignis-Kaskade ausgelöst, die in einer Entzündungsreaktion und Demyelinisierungen resultiert [Frohman et al., 2006].

Auch genetische Faktoren haben einen unbestrittenen Einfluss auf die Suszeptibilität gegenüber der MS und tragen zur Entstehung der Erkrankung bei [Noseworthy et al., 2000]. Unter anderem lässt sich dies aus einem gehäuften familiären Auftreten, mit einer Rekurrenzzrate von 20%, ableiten [Compston, 2008]. Mehrfach bestätigt wurde auch die Assoziation bestimmter Humaner Leukozyten Antigen (HLA)-Komplexe mit

einem erhöhten MS Risiko [Noseworthy et al., 2000; Compston, 2008]. Zusammenfassend kann man annehmen, dass auf eine bestimmte genetische Grundlage spezifische Umwelteinflüsse einwirken müssen, um im Zusammenspiel eine MS zu verursachen.

Das pathologische Kennzeichen der MS sind entzündliche ZNS Läsionen, die als „Entmarkungsherde“ (demyelinisierende Plaques) bezeichnet werden. Die Plaques bestehen aus einem hypozellulären Areal, gekennzeichnet durch den Verlust an Myelin, später folgt die Bildung von glialem Narbengewebe. Sie weisen je nach Aktivität der Demyelinisierung eine unterschiedliche Zusammensetzung der entzündlichen Infiltrate auf [Compston, 2008]. Im Allgemeinen können B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen, entzündungsfördernde Zytokine, Plasmazellen und myelinspezifische Antikörper nachgewiesen werden. Histologische Untersuchungen haben gezeigt, dass sich die entzündlichen Infiltrate in aktiven Läsionen, je nach ihrer Zusammensetzung, in vier Gruppen einteilen lassen (I-IV). Innerhalb eines Patienten weisen dabei die Läsionen offenbar eine homogene Zusammensetzung auf [Lucchinetti et al., 2000]. Bevorzugte Lokalisationen der Läsionen sind der Nervus opticus, die periventrikuläre weiße Substanz, Hirnstamm, Kleinhirn und die weiße Substanz des Rückenmarks. Oftmals umgeben sie eine oder mehrere mittelgroße Venen [Noseworthy et al., 2000; Compston, 2008].

1.4 Immunpathologische Erkenntnisse

1.4.1 Pathophysiologische Bedeutung von T-Zellen

Lange Zeit galt die MS als T-Lymphozytenvermittelte Autoimmunerkrankung prädisponierter Personen. Neuere Befunde legen jedoch nahe, dass es sich um eine komplexe Autoimmunreaktion mit Beteiligung vieler verschiedener Zellgruppen handelt. Dennoch kommt den T-Zellen hierbei eine entscheidende Rolle zu.

Es wurde gezeigt, dass autoreaktive T-Zellen bei MS Patienten ein Zytokinmuster aufweisen, welches im Vergleich zu gesunden Personen der entzündungsfördernden Immunantwort der T-Helfer Zellen 1 (Th1 Zellen) entspricht [Frohman et al., 2006]. Th1 Zellen sind durch die Produktion proinflammatorischer Zytokine (INF- γ , IL-2, IL-12, TNF) charakterisiert. Sie generieren eine Immunantwort, die mit der Aktivierung

von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen einhergeht und vorwiegend zu zellulär vermittelten inflammatorischen Reaktionen führt. Im Gegensatz dazu produzieren Th2 Zellen antiinflammatorische Zytokine (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, transforming growth factor (TGF-beta)) [Ziemssen et al., 2002]. Th2 Zellen unterstützen B-Zellen, vermitteln dadurch eine humorale Immunantwort und sind wichtig bei der Abwehr extrazellulärer Pathogene [Korn et al., 2009].

In den letzten Jahren wurde mit den Th17 Zellen, bei denen es sich um vorrangig IL-17 produzierende CD4⁺ Zellen handelt, eine weitere Subpopulation der Th Zellen entdeckt und charakterisiert. Den Th17 Zellen wird einerseits eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr zugeschrieben, auf der anderen Seite fördern sie jedoch chronische Entzündungen und autoimmune Reaktionen [Korn et al., 2009]. Neben der Entdeckung der proinflammatorischen Th17 Zellen wurde mit den CD4⁺CD25⁺Foxp3 T-Zelle ihr antiinflammatorischer Gegenspieler gefunden, der insbesondere die Proliferation von proinflammatorischen T-Zell Populationen unterdrücken kann [Zhou et al., 2008]. Die Differenzierung von naiven T-Zellen zu den verschiedenen Th- Subpopulationen wird bei ihrer Aktivierung in der Peripherie initiiert. Die T-Zellaktivierung ist ein komplexes Phänomen, welches damit beginnt, dass der T Zell Rezeptor (TCR) einen Komplex aus Peptid und Hauptgewebekompatibilitätskomplex Klasse II (MHC II) auf der Oberfläche einer Antigen präsentierenden Zelle (engl.: *antigen precenting cell*, APC) erkennt [Davis, 1988]. Eine optimale Aktivierung der T-Zelle ist nur zu erreichen, wenn zudem kostimulatorische Moleküle auf APC und T-Zelle hierbei miteinander interagieren [Bugeon, 2000]. Zum Beispiel sind hier vor allem die zur B7 Familie gehörenden kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 eine essentielle Komponente in der Initiierung einer T-Zell-vermittelten Immunantwort [Carreno, 2002]. Das bei der Antigenpräsentation vorhandene Zytokinmilieu entscheidet des Weiteren maßgeblich über den weiteren Entwicklungsweg der naiven CD4⁺ T-Zellen (**Abbildung 3**). IL-12 fördert die Aufrechterhaltung einer proinflammatorischen Th1 Immunantwort, wohingegen IL-4 und IL-10 die Differenzierung zur antiinflammatorischen Th2 Zelle fördert. Die Zytokine IL-6 und TGF-beta zusammen fördern die Differenzierung der naiven T-Zellen zu proinflammatorischen Th17 Zellen. Dagegen bewirkt TGF-beta allein die Entwicklung zu regulatorischen CD4⁺CD25⁺Foxp3 T-Zellen (Treg) [Korn et al., 2009].

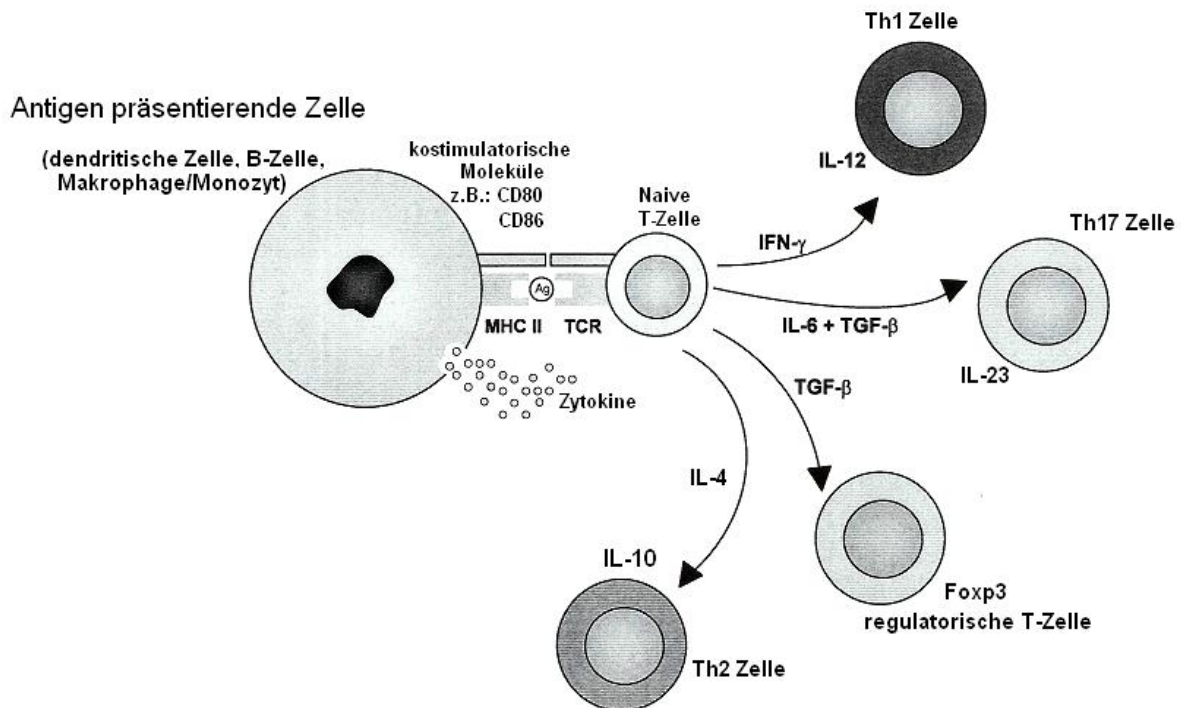


Abbildung 3: Bei der Antigenpräsentation entscheidende Zytokine für die weitere Entwicklung der T-Zelle

Im peripheren Immunkompartiment erkennen T-Zellen mithilfe ihres TCR, ihre von APCs durch MHCII präsentierten Antigene. Durch Interaktion zwischen kostimulatorischen Signalen wird die T-Zelle aktiviert und ein spezifisches Zytokin Milieu beeinflusst den weiteren Differenzierungsprozess der naiven T-Zellen: IL-12 fördert eine Th1 Differenzierung, während IL-10 die Entwicklung zu antiinflammatorischen Th2 fördert. Eine Kombination von IL-6 und TGF-beta lenkt die Entwicklung der naiven T-Zellen zu proinflammatorischen Th17 Zellen, wohingegen TGF-beta alleine eine Differenzierung zu regulatorischen FoXP3 Zellen vermittelt.

T-Zellen, die proinflammatorische Zytokine produzieren, vor allem die Th17 Zellen, sind von signifikanter Bedeutung in der Pathogenese der MS. Studien zeigen, dass Th17 Zellen deutlich vermehrt in aktiven und chronisch aktiven MS Läsionen im ZNS gefunden werden und sich durch die Sekretion von IL-17, IL-6 und TNF-alpha auszeichnen [Tzartos et al., 2008]. Es wird außerdem angenommen, dass bei MS Patienten Zellen mit regulatorischen Eigenschaften in Frequenz und Funktion reduziert sind. Auf der Grundlage dieses Ungleichgewichts können die aktivierten, autoreaktiven T-Zellen im ZNS nun eine Entzündungsreaktion hervorrufen woraus letztlich die Demyelinisierung resultiert [Frohman et al., 2006].

1.4.2 Pathophysiologische Bedeutung von B-Zellen

Autoimmunität kann aus einem fehlgeleiteten Erkennen körpereigener Strukturen durch T- und B-Zellen resultieren [Yanaba et al., 2008]. Eine Beteiligung von B-Zellen und deren Antikörper (AK) am Krankheitsgeschehen der MS erscheint dadurch naheliegend, dass sich bei ca. 90% der MS Patienten oligoklonale Banden in der Protein-Elektrophorese des Liquors nachweisen lassen, welche hauptsächlich aus IgG zusammengesetzt sind. Diese bleiben über Jahre hinweg stabil bestehen und deuten auf eine fokussierte intrathekale Immunantwort gegen unbekannte Antigene hin [Compston, 2008]. Bei aus dem ZNS von MS Patienten isolierten B-Zellen wurde eine somatische Hypermutation und klonale Expansion beobachtet, was zu einer höheren Affinität der B-Zelle führt. Dies hat auch zu Folge, dass die sich aus B-Zellen entwickelnde Plasmazellen hoch affine Antikörper bilden. Dies lässt vermuten, dass speziell im ZNS eine Immunantwort auf ein spezifisches Antigen stattfindet [Archelos et al., 2000; Frohman et al., 2006]. Es wurde gezeigt, dass es sich bei diesen B-Zellen zum Großteil um Memory B-Zellen handelt. Es konnten aber auch Plasmablasten nachgewiesen werden. Dies sind AK bildende Zellen, die sich noch in einem proliferierenden Stadium der Differenzierung befinden [Meinl et al., 2006]. Ihre Anzahl korreliert mit der intrathekalen IgG Produktion und den im MRT nachweisbaren ZNS Läsionen [Cepok et al., 2005]. Es werden verschiedene Wege diskutiert, wie diese Plasmablasten in das ZNS gelangen. Einerseits könnten peripher differenzierte Blasten über die Blut-Hirn Schranke direkt in das ZNS übertreten. Andererseits wäre es möglich, dass im ZNS befindliche Gedächtniszellen restimuliert werden und zu antikörperbildenden Zellen differenzieren. Der Antigenkontakt könnte hierbei entweder außerhalb des ZNS oder aber in Follikel ähnlichen Aggregaten in den Meningen stattfinden [Meinl et al., 2006]. Solche Follikel ähnlichen Strukturen wurden unter anderem im ZNS von SP-MS Patienten nachgewiesen [Serafini et al., 2004] und des Weiteren auch im subarachnoidalen Raum bei Mäusen mit EAE [Magliozzi et al., 2004]. Es wurde gezeigt, dass eine Assoziation solcher ektoper lymphatischer Gewebsformationen mit einem schweren klinischen Verlauf und vermehrter Gewebsdestruktion im ZNS besteht [Magliozzi et al. 2007]. Eine Differenzierung der B-Zellen innerhalb des ZNS lässt sich ferner durch den Nachweis von Zentroblasten im Liquor von MS Patienten vermuten [Corcione et al., 2004]. Die Plasmablasten entwickeln sich teilweise zu langlebigen

Plasmazellen, welche durch ihre AK Produktion für die oligoklonalen Banden in der Elektrophorese verantwortlich sind [Meinl et al., 2006]. Allgemein finden B-Zellen in MS Läsionen ein Milieu an zellulären und löslichen Faktoren vor, welches sich günstig auf ihre Aktivierung und ihren Erhalt auswirkt [Uccelli et al., 2005]. Es wird angenommen, dass AK und Komplement vermittelte Phagozytose eine Hauptursache für die Demyelinisierung und Zerstörung der Myelinscheiden in den Plaques darstellen [Archelos et al., 2000; Sospedra, 2005]. Diese Annahme könnte eventuell nur auf bestimmte MS Fälle zutreffen. Wie bereits erwähnt können die entzündlichen Läsionen histologisch in vier Gruppen eingeteilt werden. Hierbei lassen sich nur im häufigsten histologischen Bild, dem Typ II, B-Zellen und AK in großer Zahl nachweisen [Lucchinetti et al., 2000]. Nicht zuletzt der Nutzen des Plasmaaustauschs bei Patienten, in deren Läsionen sich B-Zellen und AK nachweisen lassen, unterstützt die Ansicht, dass Antikörper hier eine bedeutende Rolle spielen [Keegan et al., 2005].

B-Zellen werden nicht nur als Quelle der Antikörper angesehen. So schreibt man ihnen auch zu, als APC zum Krankheitsgeschehen der MS beizutragen. Sie exprimieren MHC II konstitutiv auf ihrer Oberfläche und zählen so zu den professionellen APCs. Wie bereits erwähnt, benötigt eine effektive Aktivierung von naiven T-Zellen APCs, die das Antigen gebunden an MHC II präsentieren. Auch für die Initiierung der entzündlichen Autoimmunantwort im ZNS von MS Patienten ist es nötig, dass natives myelines Antigen von APCs prozessiert wird [Slavin et al. 2001; Tompkins et al. 2002]. Somit ist es sehr gut möglich, dass antigenspezifische B-Zellen für die Aktivierung und Expansion der autoreaktiven T-Zellen bei der MS verantwortlich sind und durch ihre Zytokinsekretion die weitere Differenzierung der T-Zellen beeinflussen [Constant, Sant'Angelo, 1995; Constant, Schweizer, 1995]. Es konnte gezeigt werden, dass die Beschaffenheit des Antigens Einfluss darauf nimmt welche Lymphozytensubpopulation als APCs am deutlichsten das Geschehen beeinflusst. So stellte sich die B-Zelle als eine sehr effektive APC dar, insbesondere wenn Proteine als Antigen fungieren, wohingegen sich Dendritische Zellen bei Peptidfragmenten als Antigen als die zentralen APCs herausstellten [Constant et al. 1995]. Es scheint, dass B-Zellen auch die Proliferation von antigen-spezifischen autoreaktiven T-Zellen, nach deren Aktivierung durch andere APCs, stimulieren können [Ronchese, 1995]. Des Weiteren häufen sich die Anzeichen, dass B-Zellen hierbei auch regulatorische Funktionen ausüben. So scheinen bestimmte B-

Zellpopulationen, insbesondere naive B-Zellen durch antiinflammatorische Zytokine lokal andere APCs zu regulieren [Fillatreau et al., 2002] und deren Reifung und proinflammatorische Differenzierung zu verhindern [Smedt et al., 1997]. Vor allem der IL-10 und TGF-beta Produktion wird eine bedeutende Rolle in der Suppression von autoimmunen und inflammatorischen Erkrankungen zugeschrieben [Meinl et al., 2006; Yanaba et al., 2008]. Es wurde gezeigt, dass von B-Zellen gebildetes IL-10 die EAE abzumildern vermag und dass Mäuse, deren B-Zellen kein IL-10 produzieren können einen schwereren Verlauf der EAE erleiden [Fillatreau et al., 2002]. Zusätzlich wird angenommen, dass B-Zellen für die Mobilisierung und möglicherweise Aktivierung von Treg Zellen mitverantwortlich sind [Mann et al., 2007].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass B-Zellen sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen aufweisen und somit unterschiedliche Rollen in der Entstehung einer Autoimmunreaktion des ZNS einnehmen können.

1.5 Therapie

Zurzeit gibt es sieben zugelassene Medikamente zur Behandlung der MS. Dabei handelt es sich um drei Interferonpräparate, Glatirameracetat, Natalizumab, Mitoxantron und FTY720. Im Folgenden werden insbesondere Glatirameracetat, welches in unseren Untersuchungen verwendet wurde und Rituximab als zugelassene und potentiell zukünftige MS Therapeutika genauer beschrieben. Des Weiteren werden für Rituximab im Rahmen klinischer Studien und präklinischer Modelle erhobene Befunde dargestellt, die Rückschlüsse auf die Funktion von B-Zellen im Rahmen der MS erlauben.

1.5.1 Glatirameracetat

Das pathologische Konzept, die MS als autoimmune Entzündungserkrankung anzusehen wird letztlich auch durch das Ansprechen auf immunmodulatorische und immunsuppressive Behandlungen unterstützt [Sospedra, 2005].

Glatirameracetat (GA, Copolymer-1, Copaxone®) ein synthetisches Gemisch zufällig angeordneter Polymere aus L-Glutaminsäure, L-Lysin, L-Alanin und L-Tyrosin, ist neben den am häufigsten eingesetzten Interferon- β (INF- β) ein weiteres Medikament

zur Therapie der RR-MS [Sospedra, 2005]. Es hat eine Länge von ungefähr 40 bis 100 Aminosäuren und ein mittleres molekulares Gewicht von 4,700 bis 13,000 Daltons [Johnson et al., 1995; Arnon, 2007]. Ursprünglich wurde es 1967 entwickelt. Es sollte dem Myelin-Basischem Protein (MBP) ähneln, welches ein Hauptbestandteil von Myelinscheiden ist, um auf diese Weise eine EAE zu induzieren. Es stellte sich jedoch überraschenderweise heraus, dass es schützende Effekte hat und das Auftreten einer EAE verhindern kann. Dies zeigte sich auch bei der Induktion einer EAE mit verschiedenen enzephalitogenen Antigenen (MBP, Proteolipid Protein (PLP) und myelines oligodentroytäres Glykoprotein (MOG)), in verschiedenen Spezies [Arnon, 1996; Gilgun-Sherki et al. 2003; Neuhaus et al., 2001]. Als Medikament für die RR-MS Therapie ist es seit 1996 in den USA, in Deutschland seit 2001, zugelassen. Täglich subkutan angewendet, mit einer Standardddosis von 20mg, hat es auf den Krankheitsverlauf positive Auswirkungen [Johnson et al., 1995]. Es vermittelt eine Reduktion der Krankheitsaktivität, mit signifikant weniger Schüben [Johnson et al., 1995; Arnon, 1996; Johnson et al., 1998]. GA zeichnet sich außerdem durch eine gute Verträglichkeit und ein günstiges Nebenwirkungsprofil aus [Arnon, 1996; Johnson et al., 1998].

Die klinischen Effekte, so nimmt man an, werden vor allem durch eine allmähliche Verschiebung von einer Th1 zu einer Th2 Immunantwort hervorgerufen [Neuhaus et al., 2000]. Wie genau GA die Th2 Differenzierung fördert, ist Thema vieler aktueller Untersuchungen. Bislang ging man davon aus, dass GA zunächst an verschiedene MHC II Komplexe bindet [Arnon, 2007]. Diese kompetitive Bindung würde die Präsentation von myelinen Antigenen verändern und somit Auswirkungen auf reaktive T-Zellen haben [Teitelbaum et al., 1996]. Man nahm weiter an, dass die GA spezifischen Th2 Zellen in das ZNS wandern und dort mit, von lokalen APCs präsentierten Myelin-Antigenen kreuzreagieren und dadurch reaktiviert werden. In diesem Konzept ging man nun davon aus, dass lokal entzündungshemmende Zytokine freigesetzt werden, die einen günstigen Effekt auf das Milieu haben, andere enzephalitogene T-Zellen inhibieren und so das Entzündungsgeschehen herabregulieren [Aharoni et al., 1998; Neuhaus et al., 2001; Ziemssen, 2005]. Neuere Arbeiten legen allerdings nahe, dass für die immunmodulatorische Wirkung des GAs keine Kreuzreaktät zwischen T-Zellen und Myelinstrukturen notwendig ist [Weber et al., 2007]. Vielmehr deutet einiges darauf hin, dass APCs, unabhängig von antigenspezifischen T-Zellen, der Hauptangriffspunkt für die GA vermittelte

Immunmodulation darstellen. So wurde gezeigt, dass GA die Eigenschaften von Dendritischen Zellen und Monozyten so verändert, dass diese eine Th2 ähnliche Immunantwort stimulieren können [Vieira et al., 2003; Kim et al., 2004; Weber et al., 2004]. In weiteren Studien zeigte sich, dass GA behandelte Monozyten auf gewisse Stimuli, wie entzündungsfördernde Zytokine weniger stark reagieren und die Differenzierung naiver T-Zellen zu Th2 Zellen fördern. Des Weiteren wurden vermehrt regulatorische T-Zellen gebildet [Weber et al., 2004; Weber et al., 2007].

1.5.2 Anti CD20 vermittelte B-Zelledepletierung als potentielles Therapiekonzept

Durch die Anwendung und klinische Prüfung des monoklonalen Antikörpers gegen CD20, Rituximab (Roche Pharma, Reinach, Schweiz) ist es gelungen, B-Zellen spezifisch und gezielt zu eliminieren. Rituximab wird als Arzneistoff vor allem in der Krebsimmuntherapie vorwiegend bei der Behandlung von malignen B-Zell Lymphomen eingesetzt. Die Wirksamkeit wurde aber auch bei anderen Erkrankungen, wie zum Beispiel Autoimmunerkrankungen geprüft. Bei der MS gründet sich die therapeutische Strategie, B-Zellen zu depletieren, auf die angenommenen proinflammatorischen Funktionen der B-Zellen im Krankheitsgeschehen. Durch eine Depletion werden B-Zell vermittelte Antigen Präsentation, das Zytokin Netzwerk, die AK Produktion und die Aktivierung von T-Zellen und Makrophagen beeinflusst [Duddy, 2006]. In randomisierten placebokontrollierten Studien über 48 Wochen konnten sowohl signifikant weniger kontrastmittelaufnehmende ZNS Läsionen, als auch eine verringerte Schubrate, in den mit Rituximab behandelten Patientenkollektiv, beobachtet werden. Dass sich bereits nach vier Wochen ein Therapieeffekt abzeichnete, legt die Vermutung nahe, dass nicht die Hemmung der Antikörpersynthese, sondern wahrscheinlicher die Unterbindung direkter Effekte der B-Zellen im Krankheitsgeschehen beeinflusst werden [Hauser et al., 2008]. Auch bei einem bestimmten Patientenkollektiv mit PP-MS, das aktiv entzündliche ZNS Läsionen aufwies, konnten günstige Effekte der B-Zell Depletion nachgewiesen werden [Hawker et al., 2009]. Im Allgemeinen wurde die Therapie gut vertragen, es wurde mittlerweile aber über Patienten mit Auftreten opportunistischer Infektionen, einschließlich Fälle von progressiver multifokaler Leukenzephalopathie berichtet [Menge et al., 2009; Stüve et al., 2009]. Des Weiteren scheint Rituximab in Einzelfällen Autoimmunerkrankungen zu fördern wie dies für

Colitis ulcerosa und Psoriasis beschrieben wurde [Dass et al., 2007; Goetz et al., 2007]. Dadurch wird deutlich, dass unter bestimmten Bedingungen die B-Zell-Elimination negative Auswirkungen haben kann [Yanaba et al., 2008]. Insbesondere könnten MS Patienten, bei denen die Entstehung von entzündlichen Läsionen im geringeren Maße auf der Rekrutierung von B-Zellen und AK in das ZNS beruht, von einer peripheren B-Zell Depletion nicht maßgeblich profitieren. Eine aktuelle Studie verdeutlicht dies am Tiermodell [Weber et al., 2010]. Bei Mäusen wurde entweder mit dem rekombinanten MOG Protein (rMOG) oder mit enzephalitogenem MOG(35-55) Peptid eine EAE initiiert. Hierbei ist entscheidend, dass B-Zellen ausschlaggebend für die EAE Induktion mit Proteinen sind, nicht aber bei der Peptide Induktion [Lyons et al., 1999]. Es zeigte sich nun, dass eine EAE, ausgelöst durch rMOG durch B-Zell Depletion verhindert bzw. abgemildert wurde. Nach der Depletion nahmen Th1 und Th17 Zellzahlen ab. Dies entspricht der Annahme, dass B-Zellen als APCs zu Differenzierung naiver T Zellen in Th1 und Th17 Zellen beitragen, völlig gegenteilig hierzu, zeigte sich bei Peptid induzierter EAE eine durch B-Zell Depletion hervorgerufene Verschlechterung. In beiden Fällen konnte eine Abnahme der regulatorischen Foxp3 Zellen verzeichnet werden, sowie eine Zunahme proinflammatorischer Monozytenfunktionen. Dieses gegensätzliche Ergebnis legt deutlich nahe, dass eine Depletion unaktivierter B-Zellen in Abwesenheit inflammatorischer B-Zellen unvorteilhaft sein könnte und somit die gezielte Immunmodulation pathogener B-Zellfunktionen ein therapeutisches Alternativkonzept darstellen könnte.

1.6 Fragestellung

B-Zellen sind auf verschiedene Weise in die Pathogenese der MS involviert. Sie sind nicht nur als Plasmazellen die Quelle Myelin-spezifischer Antikörper, sondern scheinen darüber hinaus eine zentrale Funktion als APCs für die Aktivierung enzephalitogener T Zellen zu haben. Dies legen nicht zuletzt klinische MS Studien nahe, die vielversprechende Ergebnisse für die anti-CD20 vermittelte Depletion von B-Zellen erbrachten. Diese Therapieoption birgt jedoch auch einige Unsicherheiten. So mehren sich Hinweise, dass B-Zell-Subpopulationen eine anti-inflammatorische regulatorische Rolle spielen könnten. Dem histologischen Bild entsprechend, könnten B-Zellen in Patienten mit Typ II MS eine wichtige pathogene Rolle spielen, während die übrigen MS Patienten zu einem deutlich geringeren Anteil oder gar nicht profitieren könnten. Aufgrund dieser Tatsache liegt das Anliegen nahe, spezifisch auf pathogene B-Zellpopulationen bzw. pathogene B-Zellfunktionen immunmodulatorisch einwirken zu können. Bisher gibt es keine Information darüber, ob Glatirameracetat zelluläre B-Zellfunktionen zu modulieren vermag. In Studien wurde jedoch gezeigt, dass das in der MS Therapie bewährte Medikament die immunmodulatorische Aktivität von verschiedenen anderen APCs beeinflusst und dadurch eine Th2 Immunantwort sowie das vermehrte Entstehen regulatorischer T-Zellen vermittelt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher die Wirkung von GA auf die zelluläre Funktion von B-Lymphozyten zu untersuchen.

Hierzu waren folgende Fragen von Relevanz:

- welchen Einfluss hat Glatirameracetat auf die Oberflächenmarker der B-Zelle und die von ihr produzierten Zytokine?
- lässt sich hierdurch eine Veränderung der B-Zelle in ihrer Funktion als Antigenpräsentierende Zelle ableiten?
- übt Glatirameracetat lediglich auf reifende Vorläuferstufen der B-Zelle, z.B. im Knochenmark, einen modulierenden Einfluss aus, oder vermag es auch differenzierte B-Zellen in ihrer Funktion zu modulieren?

Sollte es möglich sein pathogene B-Zellpopulationen gezielt immunmodulatorisch zu beeinflussen und nicht pathogene B-Zellen in ihrer regulatorischen Funktion zu fördern, könnten sich hieraus neue Therapieoptionen als Alternative zur unselektiven Depletion von B-Zellen ergeben. Des Weiteren könnte Glatirameracetat ggf. nach Beendigung der Depletierung das Wiederauftreten pathogener B-Zellen reduzieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Durchflusszytometer, CyAn	<i>Dako, Hamburg, BRD</i>
ELISA-Reader, Genios	<i>Tecan, Crailsheim, BRD</i>
Lichtmikroskop	<i>VWR, Darmstadt, BRD</i>
Inkubator	<i>Binder, Tuttlingen, BRD</i>
MACS® Separator	<i>Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD</i>
Multifuge 3SR Plus	<i>Heraeus, Newport Pagnell, GB</i>
Multikanalpipette	<i>Thermo scientific, Waltham, USA</i>
Neubauer Zählkammer	<i>Optik Labor, Friedrichsdorf, BRD</i>
Pico Fuge	<i>Stratagene, La Jolla, US</i>
Pipetten, Research, 20µl, 200µl, 1000µl	<i>Eppendorf, Hamburg, BRD</i>
Pipettierhilfe, accu-jet®	<i>Brand GmbH + Co KG, Wertheim, BRD</i>
Sterilbank	<i>Kojair Tec Oy, Vilppula, FIN</i>
Vortex	<i>VWR, Darmstadt, BRD</i>
Wasserbad	<i>Memmert, Schwabach, BRD</i>
Waage	<i>Sartorius, Göttingen, BRD</i>

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

6-well-Zellkulturplatte, Cellstar®	<i>Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, BRD</i>
96-well-Zellkulturplatte, (Flach- und Rund-Böden), Cellstar®	<i>Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, BRD</i>
Cell Strainer 70µm Ø	<i>BD Biosciences, Heidelberg, BRD</i>
Einmalpipetten, Falcon®	<i>BD Biosciences, Heidelberg, BRD</i>
ELISA-Platten, Costar®	<i>Vitaris AG, Baar, SWI</i>
FACS-Röhrchen, Falcon®	<i>BD Biosciences, Heidelberg, BRD</i>

MACS® LS-Säulen	<i>Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD</i>
MACS® Pre – Separation Filters	<i>Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD</i>
Petrischalen	<i>Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, BRD</i>
Pipettenspitzen verschiedene Größen	<i>Eppendorf, Hamburg, BRD</i>
Zentrifugenröhrchen 15ml, 50ml	<i>TPP, Trasadingen, SWI</i>

2.1.3 Chemikalien und Kits

0,5 M EDTA pH 8.0	<i>Calbiochem, Bad- Soden, BRD</i>
2-Mercaptoethanol	<i>Invitrogen, Karlsruhe, BRD</i>
Anti – Biotin Micro Beads	<i>Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD</i>
Anti – Biotin Multi Sort Kit	<i>Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD</i>
Anti – hLAP (TGF- β 1)	<i>R&D Systems, Minneapolis, USA</i>
Bowines Serumalbumin Pulver	<i>Sigma – Aldrich, Deisenhofen., BRD</i>
Copaxone® Injektionslösung	<i>Teva Pharmaceuticals, Kansas City, USA</i>
DMEM mit 4, 5 g/l D-Glucose	<i>PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT</i>
Ethanol	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD</i>
Fötale Kälberserum (FCS)	<i>GIBCO, Paisley, UK</i>
Isofloran, Florene®	<i>Abbott, Wiesbaden, BRD</i>
L-Glutamin	<i>GIBCO, Paisley, UK</i>
LPS von E. coli	<i>Sigma – Aldrich, Deisenhofen, BRD</i>
MAb to CD40 (mouse)	<i>Alexis Biochemicals, Lausen, SWI</i>
Mouse Lineage Panel	<i>BD Biosciences, Heidelberg, BRD</i>
Mouse IL-12 p70 für ELISA	<i>R&D Systems, Minneapolis, USA</i>
Penicillin/ Streptomycin	<i>GIBCO, Paisley, UK</i>

Peroxidase Solution B	<i>KPL, Gaithersburg, USA</i>
PBS without Ca & Mg	<i>PAA Laborartories GmbH, Pasching, AT</i>
Recombinant Mouse Interleukin – 4	<i>AbD serotec, Düsseldorf, BRD</i>
RPMI 1640 Kulturmedium	<i>PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT</i>
Schwefelsäure 1N	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD</i>
Sodium – Pyruvat	<i>Sigma - Aldrich, Deisenhofen, BRD</i>
Streptavidin – HRP	<i>R&D Systems, Minneapolis, USA</i>
TMB Peroxidase Substrat	<i>KPL, Gaithersburg, USA</i>
Tryptanblau	<i>GIBCO, Paisley, UK</i>
Tween 20	<i>Sigma – Aldrich, Deisenhofen., BRD</i>

2.1.4 Antikörper

Primärantikörper:

Anti-Mouse B220- FITC	<i>BD Biosciences, Heidelberg, BRD</i>
Anti- Mouse CD 25- PE	<i>eBioscience, San Diego, USA</i>
Anti- Mouse CD 69- Per-CP	<i>BD Biosciences, Heidelberg, BRD</i>
Anti-Mouse CD 80- PE	<i>BD Biosciences, Heidelberg, BRD</i>
Anti-Mouse CD 80- APC	<i>BD Biosciences, Heidelberg, BRD</i>
Anti- Mouse CD 86- PE	<i>BD Biosciences, Heidelberg, BRD</i>
Anti- Mouse CD 86- APC	<i>BD Biosciences, Heidelberg, BRD</i>
Anti-human LAP (TGF-β1)	<i>R&D Systems, Minneapolis, USA</i>

Sekundärantikörper:

Anti – Goat IgG- APC	<i>R&D Systems, Minneapolis, USA</i>
Anti- Biotin PE	<i>Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD</i>
Anti- Biotin APC	<i>Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD</i>

2.1.5 Puffer und Lösungen

ELISA-wash-Puffer

0,05% Tween 20 in PBS

FACS-Puffer

2% FCS in PBS

MACS-Puffer

2ml 0,5 M EDTA pH 8.0

2,5g Bovines Serumalbumin

500ml PBS

2.1.6 Kulturmedium für Zellkultur

Kulturmedium

RPMI 1640

L-Glutamin

Penicillin / Streptomycin

Sodium - Pyruvat

5% FCS

Mercaptoethanol

Unter sterilen Verhältnissen wurden in 500 ml RPMI 1640 jeweils 5 ml Penicillin / Streptomycin, L-Glutamin und Sodium Pyruvat, 500µl 2-Mercaptoethanol und 50ml FCS durch einen sterilen Filter hineinfltriert. Das FCS wurde vor Gebrauch zur Inaktivierung der Komplementproteine für 30 min im Wasserbad bei 56°C inkubiert.

2.1.7. Versuchstiere

Für alle Experimente wurde 8-10 Wochen alte, weibliche Mäuse der Mauslinie Bl/6 aus artgerechter Tierzucht für Forschungszwecke von Charles River in Sulzfeld, BRD bezogen. Die Haltung erfolgte im Mausstall des Klinikums Rechts der Isar entsprechend den gesetzlichen Richtlinien.

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation

Zur Präparation wurden die Mäuse mit Isofloran narkotisiert und anschließend durch Genickbruch getötet. Ihr Fell wurde mit 70% Ethanol desinfiziert. Zur Entnahme der Milz wurden Fell und Unterhaut von der Körperfaszie getrennt, die Bauchhöhle eröffnet und die Milz entnommen. Zur Gewinnung des Knochenmarks, wurden die Hinterbeine rückenmarksnah abgetrennt und anschließend die Haut entfernt. Die entnommenen Organe wurden direkt auf Eis in gekühltes DMEM gegeben und dort bis zur Weiterverarbeitung unter der Sterilbank aufbewahrt.

2.2.2 Herstellen von Knochenmarks- und Milzsuspension

Knochenmarkssuspension

Die abgetrennten Hinterläufe wurden unter der Sterilbank mit Schere und Pinzette von Muskelgewebe frei präpariert und Femur und Tibia voneinander getrennt. Die so gereinigten Knochen wurden in gekühltes DMEM gegeben. Anschließend wurden die Knochen mit einer Pinzette aufgenommen und die Metaphysen möglichst knapp mit einer Schere abgeschnitten und so der Knochenmarksraum eröffnet. Mit einer 5ml Spritze mit aufgesetzter 24G Nadel wurde der Knochenmarksraum nun mehrmals mit DMEM durchgespült, um sämtliche Knochenmarkszellen herauszulösen. Die Spüllösung wurde in einer Petrischale aufgefangen und die Knochenmarksgewebestücke mit dem Stempel einer Einmalspritze grob zerkleinert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit der elektrischen Pipetierhilfe mehrfach auf und ab

pipettiert. Danach wurde die Zellsuspension durch einen 70µm Cellstrainer in ein 50ml Röhrchen passiert, um Knochenmarksfett und Gewebestücke abzufiltern und eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Die so gewonnene Zellsuspension wurde mit DMEM aufgefüllt und zentrifugiert (8min, 1250 Umdrehungen in der Minute, bei 4C°). Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen weitere zweimal mit DMEM gemischt und zentrifugiert. Zuletzt wurde das Zellpellet in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen konnten nun auf bereits beschriebene Weise gezählt und zu weiteren Verwendung auf die gewünschte Zellkonzentration verdünnt werden.

Milzsuspension

Unter der Sterilbank wurden die frisch entnommenen Milzen mit dem Kolben einer 5ml Einmalspritze durch einen 70µm Falcon-Cellstrainer gedrückt und mit DMEM aufgefüllt. Die so gewonnene Zellsuspension wurde 8 min mit 1250 Umdrehungen pro Minute bei 4C° zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Entfernen der Erythrozyten wurde das Zellpellet in 1ml Ammoniumchlorid pro Milz resuspendiert und bei Raumtemperatur 2 min inkubiert. Hierbei werden selektiv die Erythrozyten lysiert, während die anderen Zellen unbeschadet bleiben. Nach Ablauf der 2 min wurde die Suspension mit 35ml Medium aufgefüllt, zentrifugiert (8 min, 1250 Umdrehungen in der Minute bei 4C°) und anschließend der Überstand verworfen. Um mögliche Ammoniumchlorid Rückstände zu vermeiden wurden die Zellen ein weiteres Mal in 35ml DMEM resuspendiert und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zuletzt in 5ml Medium resuspendiert, wie im Anschluss beschrieben gezählt und konnte anschließend zur Weiterverarbeitung auf die gewünschte Zell-Konzentration mit Medium verdünnt werden.

Zellzählung mit der Zellkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension wurde eine Probe von 10µl davon entnommen und mit 90µl Trypanblau-Lösung verdünnt. Trypanblau färbt tote Zellen, lebende Zellen hingegen bleiben ungefärbt. Die verdünnte Zellsuspension wurde in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und mit Hilfe eines Lichtmikroskops die Anzahl

an lebenden Zellen pro Einheit der Zählkammer bestimmt. Es wurden mehrere Einheiten ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor konnte die Anzahl an Zellen pro ml berechnet werden.

Formel: Zahl Z x 10 x 10000 x Verdünnung \triangleq Zellzahl / ml

2.2.3 Kultivierung der Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in der Sterilbank durchgeführt. Die Zellen wurden in Cellstar® Lochplatten in RPMI 1640-Kulturmedium bei 37°C, 5% CO₂ und Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre kultiviert.

Knochenmarkszellen und Milzzellen wurden mit einer Konzentration von 2,5 Mio. Zellen pro ml ausgesät, aufgereinigte B-Zellen aus Knochenmark oder Milzzellen wurden mit einer Konzentration von 2,0 Mio. Zellen pro ml verwendet. Es wurden jeweils 200µl der Zellsuspensionen in 96-Loch-Platten mit flachem Boden gegeben. Den Zellen wurden aufsteigende Konzentrationen von Glatirameracetat (0 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml) zugefügt. Anschließend wurden LPS (10 ng/ml und 100ng/ml), IL-4 (40ng/ml), monoklonale Antikörper (MAb) gegen CD-40 (10µg/ml) und MAb CD-40 + IL-4 (10µg/ml + 40ng/ml) als Stimulation hinzu gegeben (siehe **Tabelle 3**).

Tabelle 3: Schema der Zellkulturen

A-D zeigt die ansteigende Konzentration des GA. 1-3 die verschiedenen zugesetzten Stimulationen und deren Konzentration.

	1	2	3
A	Negativ Kontrolle	LPS: 10 ng/ml	IL-4: 40 ng/ml
B	GA: 25 µg/ml	LPS: 10 ng/ml GA: 25 µg/ml	IL-4: 40 ng/ml GA: 25 µg/ml
C	GA: 50 µg/ml	LPS: 10 ng/ml GA: 50 µg/ml	IL-4: 40 ng/ml GA: 50 µg/ml
D	GA: 100 µg/ml	LPS: 10 ng/ml GA: 100 µg/ml	IL-4: 40 ng/ml GA: 100 µg/ml

Es wurden, je nach Zellmenge, mehrere Platten nach dem gleichen Schema vorbereitet, um so an Tag 2 und an Tag 5 möglichst viele Proben analysieren zu können. Beim Auswerten der Proben zeigte sich, dass gewonnene Ergebnisse von Tag 5 weitgehend mit denen von Tag 2 übereinstimmten, jedoch weniger stark ausgeprägt waren. Auch Ergebnisse unter der höheren LPS Konzentration waren vergleichbar mit denen, unter niedriger Konzentration und erbrachten somit keinen Vorteil.

Aufgrund dieser Verhältnisse, werden im Ergebnissteil nur Ergebnisse präsentiert, die unter 10 ng/ml LPS und IL-4 Stimulation gewonnen wurden. Darstellung und Beschreibung der übrigen Daten werden vernachlässigt.

2.2.4 Zellaufreinigung mittels MACS-Separation

Die Magnetisch aktivierte Zellsortierung (engl.: *magnetic activated cell sort*, MACS) wird verwendet, um spezifische Zellpopulationen anhand von Oberflächenmarkern zu isolieren. Dies ermöglicht die quantitative Ausbeute hochreiner Zellpopulationen aus verschiedenen Geweben. Dazu werden für einen Zelltyp spezifische monoklonale

Antikörper verwendet, die mit einem Zweitantikörper gekoppelt werden, an den kleine superparamagnetische Partikel (20-100nm im Durchmesser, sogenannte Microbeads) gebunden sind. Zum Aufreinigen wird die Zellsuspension über eine Säule geleitet, die ferromagnetische Matrix enthält und sich in einem starken Magnetfeld befindet. Die mittels der gekoppelten Antikörper magnetisch markierten Zellen verbleiben in der Säule, während die unmarkierten Zellen die Säule mit der Flüssigkeit verlassen.

Die MACS-Technik kann zur positiven Selektion (gewünschte Zellen werden markiert und aus dem Zellgemisch sortiert) und zur negativen Selektion (alle nicht gewünschten, markierten Zellen werden aus dem Zellgemisch entfernt) verwendet werden.

MACS Separation von B-Zellen (Negativ Selektion)

Die zu trennenden Zellsuspensionen wurden nach einem Filtrationsschritt und zweimaligen Waschen in DMEM, gezählt und in eiskaltem MACS-Puffer in 50 ml Falcon-Röhrchen aufgenommen.

Nach Zentrifugation (alle bei 1250 Umdrehungen pro Minute, 4°C und 10 min) wurden die Überstände verworfen und das Zellpellet in 10µl MACS Puffer und 2µl Antikörper (CD5, CD11b, anti-Gr-1, 7-4, Ter-119) je 1 Mio. Zellen resuspendiert. Das Zell-Antikörper-Gemisch wurde für 15 min im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit, wurde zum Entfernen von ungebundenen Antikörpern die Zellsuspension mit 20 ml MACS Puffer aufgefüllt und anschließend zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und das Zellpellet mit 3µl MACS Puffer und 2µl anti-biotin MicroBeads je 1 Mio. Zellen resuspendiert. Wiederum wurde das Zellgemisch für 15 min bei 4°C inkubiert und anschließend mit 20ml MACS Puffer aufgefüllt und zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände verworfen und das Zellpellet in 500µl MACS Puffer pro 10⁸ Zellen resuspendiert und auf Eis gestellt.

Nun wurden die Säulen für die Zellseparation vorbereitet. Dazu wurden LD- Säulen in die magnetische Haltevorrichtung geklemmt und mit einem MACS® PreSeparation Filter versehen. Die Säulen wurden mit 3-5ml MACS Puffer gespült. Über die so vorbereiteten Säulen wurden die Zellsuspensionen gegeben und anschließend mit 3 x 5ml MACS Puffer nachgespült. Die in 15ml Tubes aufgefangene Negativfraktion wurde zentrifugiert, in 2ml Medium aufgenommen und gezählt. Zur

Reinheitsbestimmung wurden eine Probe der B-Zellen mit B220-FITC gefärbt und in einem Durchflusszytometer analysiert. Die Reinheit, ausgedrückt als FITC-positive Zellen, betrug immer > 96%.

2.2.5 Quantitative Zytokinmessung mittels ELISA

Der enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (engl: *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) basiert auf einer spezifischen Antigenerkennung durch Antikörper. Beim hier verwendeten Sandwich – Elisa wird ein Kunststoffträger, einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit einem Fang-Antikörper beschichtet. Dieser vermag das zu bestimmende Antigen zu binden. Die gebundenen Biomoleküle können durch einen zweiten enzymgekoppelten Nachweisantikörper detektiert werden. Zur Erzeugung einer Standardkurve werden gleichzeitig Lösungen mit bekannten Konzentrationen des Antikörpers aufgetragen. Das an den Nachweisantikörper gekoppelte Enzym katalysiert nach Zugabe eines chromogenen Substrats eine Farbreaktion. Die Farbintensität der einzelnen Proben wird photometrisch gemessen. Anhand der Standardkurve ist es möglich die Konzentration des Antikörpers in den einzelnen Proben zu ermitteln.

Für die Zytokinmessung von IL-6 wurden kommerziell erhältliche ELISA Kits verwendet. Zur Bestimmung der Zytokinproduktion wurden nach 24h (IL-6) Zellkulturüberstände abgenommen und bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. Zur Durchführung des ELISA wurden die Kavitäten einer 96-Loch-Platte zunächst mit 100µl des entsprechenden Antigens, in einer Verdünnung von 1:200 in PBS, beschichtet. Die Antikörper binden über Nacht bei 4°C an der Platte. Am nächsten Tag wurde die 96-Loch-Platte dreimal mit 250 µl/Kavität Elisa Wasch Puffer gewaschen. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit 2% BSA in PBS mit 250µl pro Kavität für mindestens 60 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Danach schloss sich wiederum das dreimalige Waschen der Platte an. Nach dem Waschen wurden jeweils 100µl der Zellkulturüberstände und der Standardreihe aufgetragen und die Platte für 120h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Um ungebundenen Antikörper von der Platte zu spülen, erfolgte ein weiterer dreimaliger Waschvorgang. Anschließend wurde der Nachweisantikörper in einer 1:200 Verdünnung in PBS mit 100µl pro Kavität aufgetragen. Wiederum wurde die Platte

für 120h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach einem erneuten Waschgang, wurde ein Streptavidin HRP (Horseradish-Peroxidase) – konjugierter-Anti-Mouse-Antikörper im Verhältnis 1:200 verdünnt in PBS, in die Kavitäten gegeben und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Platte folgte die Entwicklung des ELISA über eine Farbreaktion. Dabei wurden TMB Peroxidase Substrate und TMB Peroxidase Substrate Solution B im Verhältnis 1:1 gemischt und jeweils 100µl/ Kavität auf die Platte gegeben. Nach einigen Sekunden bis mehreren Minuten kommt es zur Bildung einer blauen Farbe. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 50µl/ Kavität 1M H₂SO₄ abgestoppt. Durch das Abstoppen kommt es zu einem Farbumschlag von Blau zu Gelb. Die optische Dichte des gelben Farbtons konnte nun bei 450nm im ELISA- Reader quantifiziert werden.

2.2.6 Durchflusszytometrie zur Ermittlung der Oberflächenmarker auf B-Zellen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können physikalische und biochemische Eigenschaften von Zellen auf der Grundlage von Emission und Lichtbrechung untersucht werden. Man erhält Informationen über zelluläre Charakteristika auf Einzelzellniveau innerhalb einer größeren Zellpopulation.

Hierfür wird eine vorab mit Antikörpern behandelte Zellsuspension in die partikelfreie schnell fließende Trägerflüssigkeit eines Durchflusszytometers gebracht. Hydrodynamisch fokussiert, fließen die Zellen einzeln durch einen scharf gebündelten Laserstrahl. Jede Zelle erzeugt Signale, indem sie Licht streut und Fluoreszenz emittiert. Die Strahlung wird über Linsen, Spiegel und Filter auf Photodetektoren geleitet und verstärkt.

Der Vorwärtsstreuwinkel (engl.: *forward scatter*, FSC) erfasst Licht, das im 180° Winkel durchgelassen wurde und misst damit die Größe der Partikel. Durch Detektion der seitlichen Streuung im Seitwärtsstreuwinkel (engl.: *side scatter*, SSC) wird die Granularität und Komplexität bestimmt. Anhand des SSC und FSC können Lymphozyten von anderen Zellen und Zellschrott unterschieden werden.

Durch Markierung mit einem fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörper können Antigene auf der Oberfläche von Zellen nachgewiesen werden. Sind die Zellen mit Fluoreszenzmolekülen verbunden, werden diese durch den Laserstrahl (Argonlaser, $\lambda=488$ nm) angeregt und geben die absorbierte Energie in Form von Licht höherer

Wellenlänge wieder ab. Wenn sich die Wellenlänge des emittierten Lichtes ausreichend unterscheidet, kann die Intensität unterschiedlicher Fluorochrome gleichzeitig bestimmt werden. Die Emission wird mit einem wellenlängenspezifischen Detektor gemessen. Die Lichtdetektoren wandeln Lichtimpulse in elektronische Signale um. Die erhobenen Daten werden an einen Rechner übermittelt, der die Messwerte jeder Zelle darstellt und speichert. Zur Auswertung der Daten wird die Intensität der verschiedenen Lichtsignale angezeigt. Anhand dessen ist es möglich, gezielt Zellpopulationen zu identifizieren und diese separat zu analysieren.

Analysierte Oberflächenmarker

Die verschiedenen Entwicklungsstadien von Lymphozyten sind charakterisiert durch bestimmte Kombinationen von spezifischen Molekülen auf ihren Zelloberflächen, welche für die Funktion der Zelle essentiell sind. Diese Antigene werden als Zelldifferenzierungsmarker (engl.: *cluster of differentiation*, CD) bezeichnet. Mit monoklonalen Antikörpern, können diese Oberflächeneigenschaften detektiert werden. Besondere Bedeutung hat die CD-Klassifikation für die Charakterisierung der Leukozyten. Je nach Zelltyp (B-Zelle, T-Zelle), Differenzierungsgrad (reife versus unreife Zellen) und Aktivierungszustand tragen die Leukozyten verschiedene Differenzierungsantigene. Durch Messung der Fluoreszenzintensität der fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörper mittels FACS, konnten die Oberflächenmoleküle der B-Zellen genauer bestimmt werden. **Tabelle 4** zeigt in unseren Versuchen verwendete Oberflächenmarker.

Tabelle 4: Verwendete Oberflächenantigene

Antigen	Zelluläre Expression	Funktion
B220 (CD45R)	B-Lymphozyten während gesamter Entwicklung von pro-B-Lymphozyten bis zur Plasmazelle.	
CD 25	aktivierte T-Zellen, Tregs, B-Zellen u. Monozyten	α -Kette des IL-2 Rezeptors
CD 69	aktivierte T- und B- Zellen, aktivierte Makrophagen u. NK-Zellen	unbekannt, frühes Aktivierungsgen: Aktivierungsmarker
CD 80	aktivierte Monozyten und B-Zellen, Dendritische Zellen	kostimulatorisches Molekül
CD 86	Monozyten und dendritische Zellen, aktivierte B- und T- Lymphozyten	kostimulatorisches Molekül
LAP (TGF- β 1)	B- und T-Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen	bildet intrazellulär einen Komplex mit TGF- β und verbleibt nach dessen Sekretion an der Zelloberfläche bestehen

Oberflächenfärbung

Zu färbende Zellproben wurden in eine 96-Loch Platte mit Rundboden überführt und 2mal mit FACS Puffer (PBS + 2% FCS) gewaschen, wobei die Platte zwischen jedem Waschschrift für drei Minuten bei 1250 Umdrehungen pro Minute bei 4°C zentrifugiert wurde. Anschließend wurden die Zellen mit 100 μ l des primären Antikörpers für verschiedene Oberflächen Rezeptoren in einer gegebenen Konzentration (siehe **Tabelle 5**) gemischt und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert.

Tabelle 5: Antikörperkonzentrationen bei der Oberflächenfärbung für die FACS Analysen

Antikörper	Konzentration in PBS
Anti- Mouse B220- FITC	1:100
Anti- Mouse CD 25- PE	1:100
Anti- Mouse CD 69- Per-CP	1:100
Anti-Mouse CD 80- PE / APC	1:50
Anti- Mouse CD 86- PE / APC	1:50
Anti- hLAP(TGF- β 1)	1:50
Anti- goat IgG - APC	1:50
Anti - LAP	1:11

Anschließend wurden die Zellen zweimalig mit FACS Puffer gewaschen. Die Detektion der Oberflächenantigene erfolgte entweder über einen direkt an den Primärantikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff (B220 – FITC, CD25-PE, CD 69-PerCP, CD 80-PE/APC, CD86-PE/APC) oder über einen Farbstoff gekoppelten Sekundärantikörper (Anti-Biotin-PE/APC oder anti-goat IgG APC conjugated donkey IgG). Durch die Bindung von mehreren Sekundärantikörpern an den antigenspezifischen Primärantikörper kommt es zu einer stärkeren Markierung als bei der direkten Methode und damit zu einer Amplifikation des Farbsignals. Somit konnte mit dieser Methode das Signal des Primärantikörpers (anti-hLAP(TGF- β)) verstärkt werden.

Gegebenenfalls wurde der Sekundärantikörper zu den entsprechenden Proben gegeben und wiederum für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde überschüssiger, nicht gebundener Antikörper durch zweimaliges Waschen entfernt. Die gefärbten Zellen wurden in 200µl FACS-Puffer gelöst und konnten nun dem Durchflusszytometer zugeführt werden.

Pro Analyse wurden 10.000 Zellen aufgenommen. Die Daten wurden mit dem Programm *summit* (Hersteller Dako) analysiert. Dabei wurden sie als zweidimensionales Punktfeld – Graphen (Zytogramme, engl.: *dot plots*), bei denen jeder Punkt einer Zelle entspricht, oder als Histogramm, wobei ein Messwert gegen die Häufigkeit der Zellen aufgetragen wird, dargestellt. Aufgrund von Größe und Granularität konnten die Lymphozyten ausgewählt werden und erhobene Daten beziehen sich auf diese Lymphozytenpopulationen. Die Auswahl der Lymphozytenpopulation (Gate-Setzung) erfolgte auf Basis von nicht stimulierten Zellen. Für alle Versuche wurden die gleichen Auswertungs-Parameter verwendet. Das Setzen von Quadranten in den Zytogrammen ermöglichte die Interpretation und prozentuale Aufteilung der Punktwolken. Die dargestellten Zahlenwerte entsprechen somit relativen Werten aufgrund der willkürlichen Gate-Setzung. Durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) konnte die relative Fluoreszenzintensität und damit die Expressionsdichte der markierten Antigene auf der Oberfläche der zu analysierenden Zellen quantifiziert werden.

4. Ergebnisse

4.1. FACS Analysen an isolierten Milz-B-Zellen und B-Vorläuferzellen

Um den Einfluss der GA-Behandlung auf den Aktivierungs- und Funktionsstatus der B-Lymphozyten und eventuell hervorgerufene Veränderungen zu untersuchen, wurden bestimmte Oberflächenmerkmale der mit steigenden GA Konzentrationen kultivierten Zellen durchflusszytometrisch analysiert (siehe **Tabelle 4**).

Die für die in vitro Kulturen isolierten B-Zellen, wurden anhand der FCS-/SSC-Eigenschaften und durch immunphänotypische Färbung mit Antikörper gegen B220 im FACS auf ihre Reinheit analysiert. Der Anteil der B-Zellen lag nach der Aufreinigung im Mittel bei $97,42\% \pm 0,76\%$. (**Abbildung 4**)

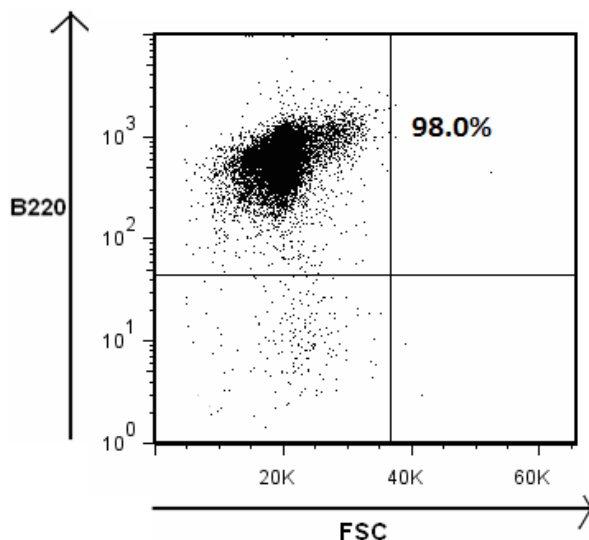


Abbildung 4: Evaluation der B-Zellreinheit

Repräsentative Darstellung der B-Zell-Reinheit nach Aufreinigung. Die FACS Auswertung nach Negativselektion der B-Zellen, zeigt eine Zellpopulation, die zu 98% positiv für den B-Zell Marker B220 ist.

Untersucht wurde die Expression der Oberflächenmoleküle CD25, CD69, CD80, CD86 und des Latenz assoziierten Peptids (engl.: *Latency Associated Peptides*, LAP). Verglichen wurden unbehandelte Zellen, mit Zellen, die mit Dosierungen von 25µg/ml, 50µg/ml und 100µg/ml GA inkubiert wurden. Auf diese Weise konnten dosisabhängige Effekte beobachtet und bewertet werden. Um die GA Effekte sowohl unter spezifischer, wie auch unspezifischer Aktivierung des Immunsystems zu

beobachten, wurden den Zellenkulturen unterschiedliche Stimulantien, in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Hierbei stellten sich LPS, sowie IL-4, als die besten Substanzen dar, eine Aktivierung des Immunsystems in vitro nachzuahmen. Beide gelten als polyklonale B-Zell Aktivatoren. LPS, ein Bestandteil der Bakterienwand gram-negativer Bakterien, ist ein sehr potentes Immunstimulant und aktiviert B-Zellen unspezifisch. Die Stimulation mit dem antiinflammatorischen Zytokin IL-4 dagegen, entspricht einer spezifischeren Aktivierung durch von Th2 Zellen sezernierte Interleukine. Hohe Dosierungen von LPS und IL-4 brachten vergleichbare Ergebnisse und keinen Vorteil gegenüber den niedrigeren Dosierungen von 10ng/ml LPS und 40ng/ml IL-4. Geringere Dosierungen dagegen (1ng/ml LPS) vermochten keine ausreichende Stimulation auszulösen. CD40 und CD40+IL-4 Stimulation, welche ebenfalls eine spezifische Aktivierung der B-Zellen bewirken sollten, verursachten eine überschießende Stimulation, wodurch der GA Effekt nicht mehr eindeutig zu ermitteln war. Somit ergaben sich 10ng/ml LPS und 40ng/ml IL-4 als die optimalen Konzentrationen, um eine ausreichende Stimulation zu bewirken und gleichzeitig eventuelle Überschreibungen von GA Effekten durch zu starke Stimulation zu vermeiden. Im folgendem wird nun jeweils eine solche Analyse der verschiedenen Oberflächenmoleküle (CD25, CD69, CD80, CD86, LAP) auf isolierten B-Lymphozyten und auf Knochenmarkszellen, welche mit steigender GA Konzentration inkubiert und entweder mit 10ng/ml LPS oder 40ng/ml IL-4 stimuliert wurden, repräsentativ für mehrere Versuche, als Zytogramm dargestellt. Um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten, wurden zur Auswertung der Knochenmarkszellen nur B220 positive Zellen, die im FSC/ SSC Bereich für vitale Lymphozyten lagen, für die Auswertungen herangezogen, wie in **Abbildung 5** demonstriert. Somit konnten vor allem vitale B-Zellen analysiert werden.

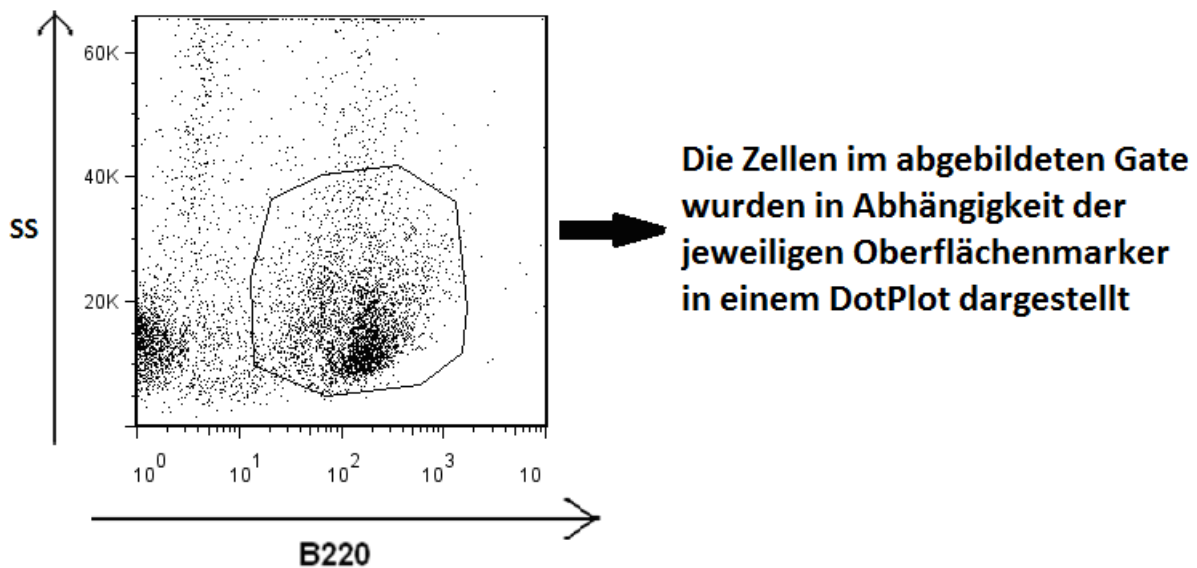


Abbildung 5: Plazierung des Gates bei den Knochenmarksanalysen

Um innerhalb der Knochenmarkszellen B-Zellen zu analysieren, wurde ein Gate über vitale B220 positive B-Zellen gelegt und nur darin enthaltene Zellen in Hinblick auf die entsprechenden Oberflächenmarker analysiert.

4.1.1 Einfluss von Glatirameracetat auf die Expression der B-Zell-Aktivierungsmarker CD 25 und CD69

Zunächst untersuchten wir, ob GA aufgereinigte B-Zellen direkt stimulieren kann und Einfluss auf deren Aktivierungsstatus ausübt. Hierzu wurden die Zellen nach 48-stündiger und 120-stündiger Kultivierung gegen das als früher Aktivierungsmarker [Sancho et al. 2005] geltende Oberflächenprotein CD69 und den späten Aktivierungsmarker [Zola, 2000] CD25 (IL2R) gefärbt und im FACS analysiert. Beim Auswerten der Proben zeigte sich, dass gewonnene Ergebnisse nach 5-tägiger Inkubation weitgehend mit denen von 2-tägiger Inkubation übereinstimmten, jedoch weniger stark ausgeprägt waren. Die dargestellten Zytogramme illustrieren, repräsentativ für vier Versuche, jeweils eine solche FACS Analyse von Tag 2.

Wie in **Abbildung 6** repräsentativ dargestellt, exprimieren, auf Grundlage der gewählten Auswertungsparameter, 23.3% der unbehandelten, mit 10ng/ml LPS stimulierten B-Zellen den Aktivierungsmarker CD25 auf ihrer Oberfläche. Mit steigenden GA Konzentrationen (25µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml) ergaben sich mit

25.5%, 24.2% und 23.1% kaum abweichende Werte der Oberflächenexpression des Aktivierungsmarkers.

Bei den unbehandelten, mit 10ng/ml LPS stimulierten B-Vorläuferzellen konnte CD25, in der dargestellten Auswertung, auf 48.8% der B-Lymphozyten nachgewiesen werden. Auch hier ließen sich nur geringe Veränderungen der Expressionswerte bei GA behandelten Zellen nachweisen. Dennoch war hierbei eine mit steigender GA-Konzentration, dosisabhängig zunehmende Tendenz der Expression des Oberflächenmoleküls festzustellen. Unter dem Einfluss von 25µg/ml, 50µg/ml und 100µg/ml GA, exprimierten 50.4%, 51.7% und 52.7% der B220 gefärbten Knochenmarkzellen den Aktivierungsmarker. Im Mittel aller vier Versuche betrug die Zunahme der CD25 Expression zwischen unbehandelten und mit 100µg/ml GA behandelten B-Vorläuferzellen + 4.4%.

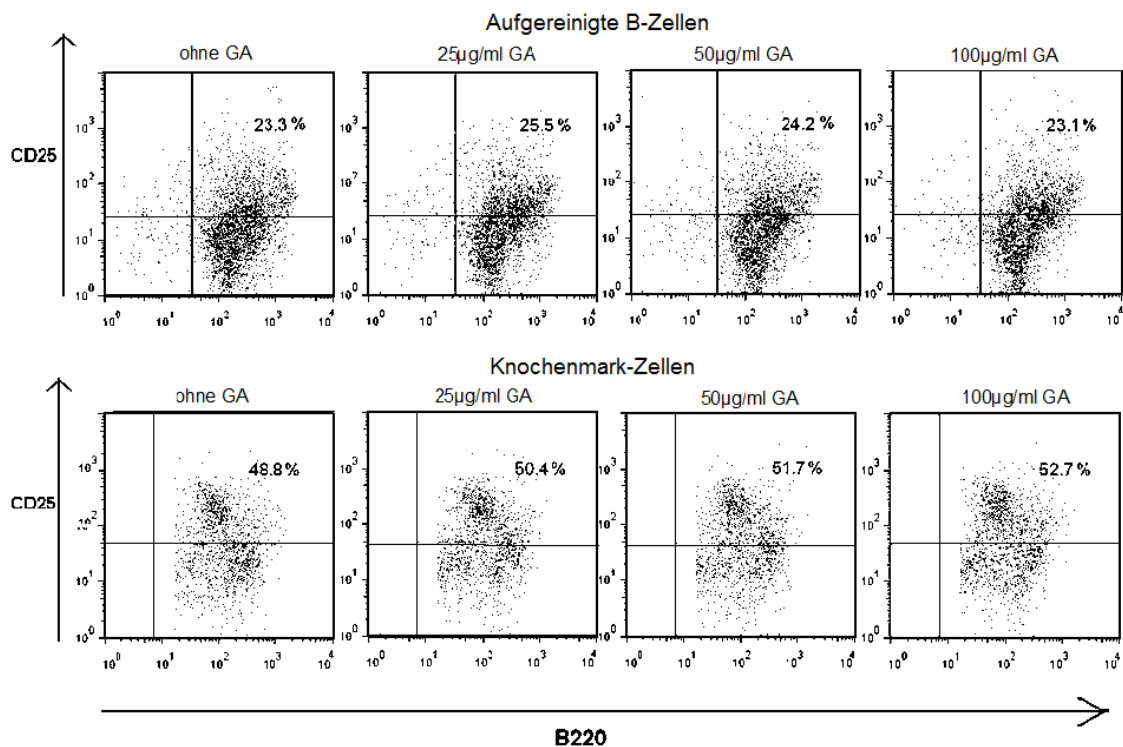


Abbildung 6: Expression von CD25 nach LPS Stimulation

Repräsentative Ergebnisse für mit 10ng/ml LPS stimulierten Milz-B-Zellen und B-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit steigenden GA Konzentrationen (0µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml). Obere Reihe: CD25 Expression LPS stimulierter Milz-B-Zellen. Untere Reihe: CD25 Expression LPS stimulierter B-Vorläuferzellen. Im rechten oberen Feld der Zytogramme sind die Prozentwerte der B220/CD25 positiven Zellen angegeben.

Wie in **Abbildung 7** dargestellt, zeigten unter Stimulation mit 40ng/ml IL-4 sowohl die unbehandelten B-Zellen mit 13.9%, als auch die unbehandelten B-Vorläuferzellen mit 33.1% eine geringere Expression des CD25-Moleküls, als unter LPS Stimulation. Unter GA Behandlung jedoch, stieg die Expression des CD25 Aktivierungsmarkers auf aufgereinigten B-Zellen. Mit 25µg/ml GA behandelten B-Zellen exprimierten das Oberflächenmolekül in 27.1%. Die Zunahme der Oberflächenmarkerexpression zwischen unbehandelten und mit 25 µg/ml behandelten B-Zellen betrug im Durchschnitt aller Versuche +13.4%. Unter weiterer GA Dosissteigerung zeigte sich nur eine noch leicht zunehmende Tendenz der Expression des Oberflächenmarkers. So wiesen in dem dargestellten Beispiel 28.8% der mit 50µg/ml behandelten B-Zellen und 30.9% der mit 100µg/ml GA behandelten aufgereinigten B-Lymphozyten das CD25 Molekül auf ihrer Oberfläche auf.

Bei den mit 40ng/ml IL-4 stimulierten B-Vorläuferzellen dagegen, veränderten sich die Expressionswerte unter GA Behandlung nur in sehr geringen Ausmaß. Hier konnte man sogar mit steigender GA Konzentration eine tendenzielle Abnahme der Expression des CD25 Oberflächenmarkers feststellen.

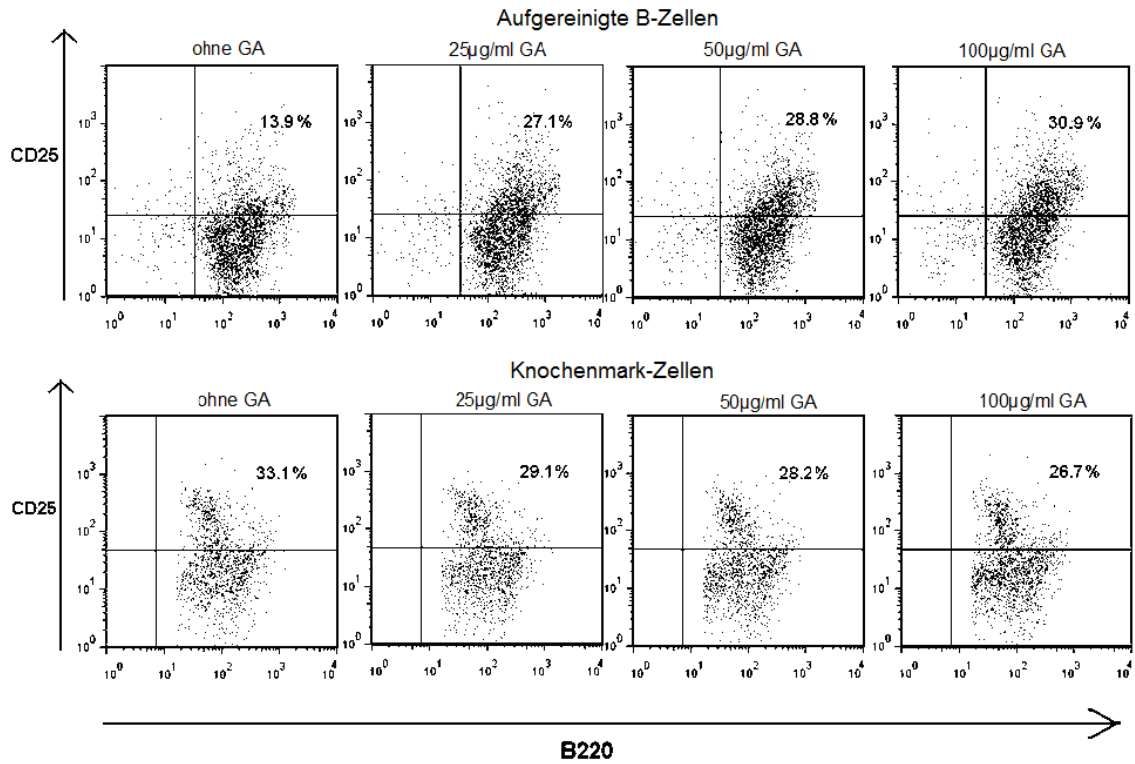


Abbildung 7: Expression von CD25 nach IL-4 Stimulation

Repräsentative Ergebnisse für mit 40ng/ml IL-4 stimulierte Milz-B-Zellen und B-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit steigenden GA Konzentrationen (0µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml). Obere Reihe: CD25 Expression IL-4 stimulierter Milz-B-Zellen. Untere Reihe: CD25 Expression IL-4 stimulierter B-Vorläuferzellen. Im rechten oberen Feld der Zytogramme sind die Prozentwerte der B220/CD25 positiven Zellen angegeben.

Wie aus **Abbildung 8** zu entnehmen, konnte mit 3.9%, nur bei einer sehr geringen Anzahl von mit 10ng/ml LPS stimulierten, GA unbehandelten B-Lymphozyten der frühe Aktivierungsmarker CD69 festgestellt werden. Auch durch Inkubation mit steigenden GA Konzentrationen änderte sich die CD69 Expression mit 4.3%, 4.2% und 5.1% kaum und blieb konstant auf niedrigen Werten.

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den mit 10ng/ml LPS stimulierten B-Vorläuferzellen. Hier wurden bei 15% der nicht mit GA behandelten Zellen das CD69 Oberflächenmolekül detektiert. Ähnlich wie bei den B-Zellen veränderten sich die Expressionswerte unter Behandlung mit steigenden GA Konzentrationen, mit folgenden Werten: 15.4%, 14.5% und 16.1% nur unwesentlich.

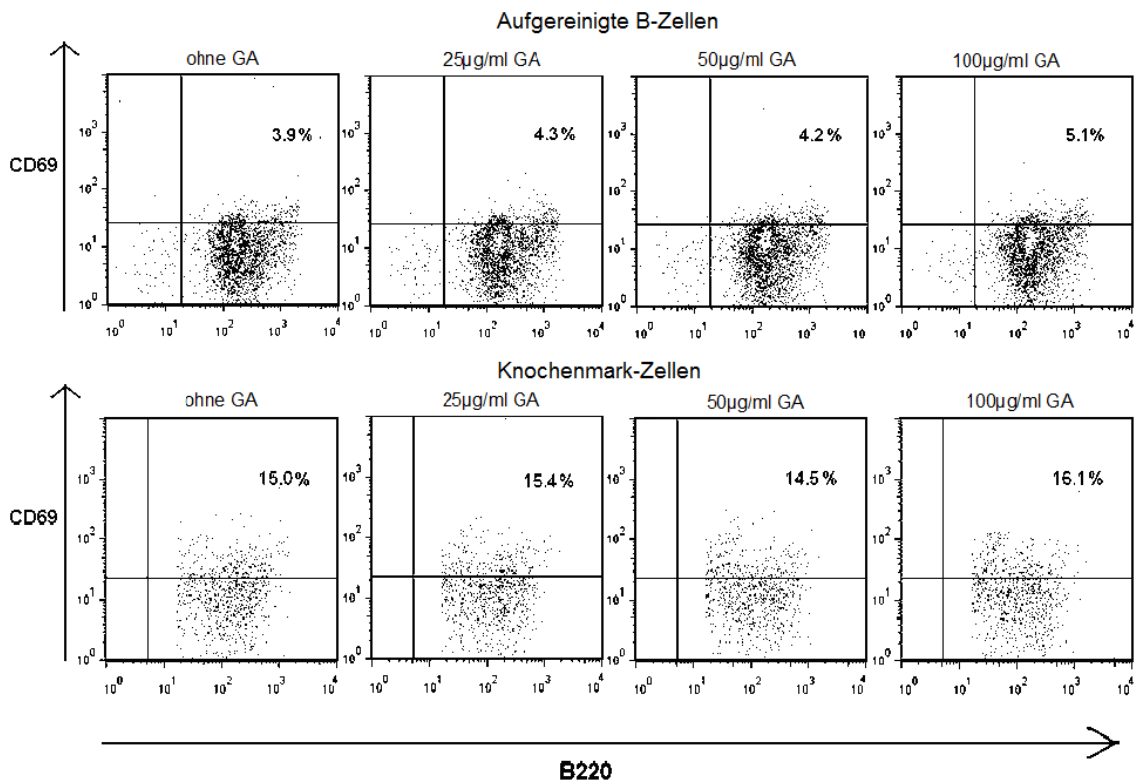


Abbildung 8: Expression von CD69 nach LPS Stimulation

Repräsentative Ergebnisse für mit 10ng/ml LPS stimulierte Milz-B-Zellen und B-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit steigenden GA Konzentrationen (0µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml). Obere Reihe: CD69 Expression LPS stimulierter Milz-B-Zellen. Untere Reihe: CD69 Expression LPS stimulierter B-Vorläuferzellen. Im rechten oberen Feld der Zytogramme sind die Prozentwerte der B220/CD69 positiven Zellen angegeben.

Ähnliche Ergebnisse, wie in **Abbildung 9** dargestellt, konnten für die mit 40ng/ml IL-4 stimulierten Zellen evaluiert werden. Auch hier zeigten B-Lymphozyten ohne GA Behandlung, mit 4.5% eine von Grund auf sehr geringe CD69 Expression. Durch Zugabe von steigenden GA Konzentrationen zu den Kulturen, ergaben sich diskrete Veränderungen der CD69 Oberflächenexpression. Dennoch konnten bei der höchsten gewählten GA Konzentration (100µg/ml) mit 6,4% auch die höchsten Expressionwerte von CD69 gemessen werden.

Bei den B-Vorläuferzellen ergab sich eine deutliche Zunahme. Unbehandelte mit 40ng/ml stimulierte Zellen exprimierten nur in 9.2% CD69 auf ihrer Oberfläche. Mit GA Behandlung ließen sich erhöhte Expressionen messen. Wiederum findet sich mit 14,8% unter Inkubation mit der höchsten gewählten GA Konzentration, auch die höchste Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 auf den Zellen.

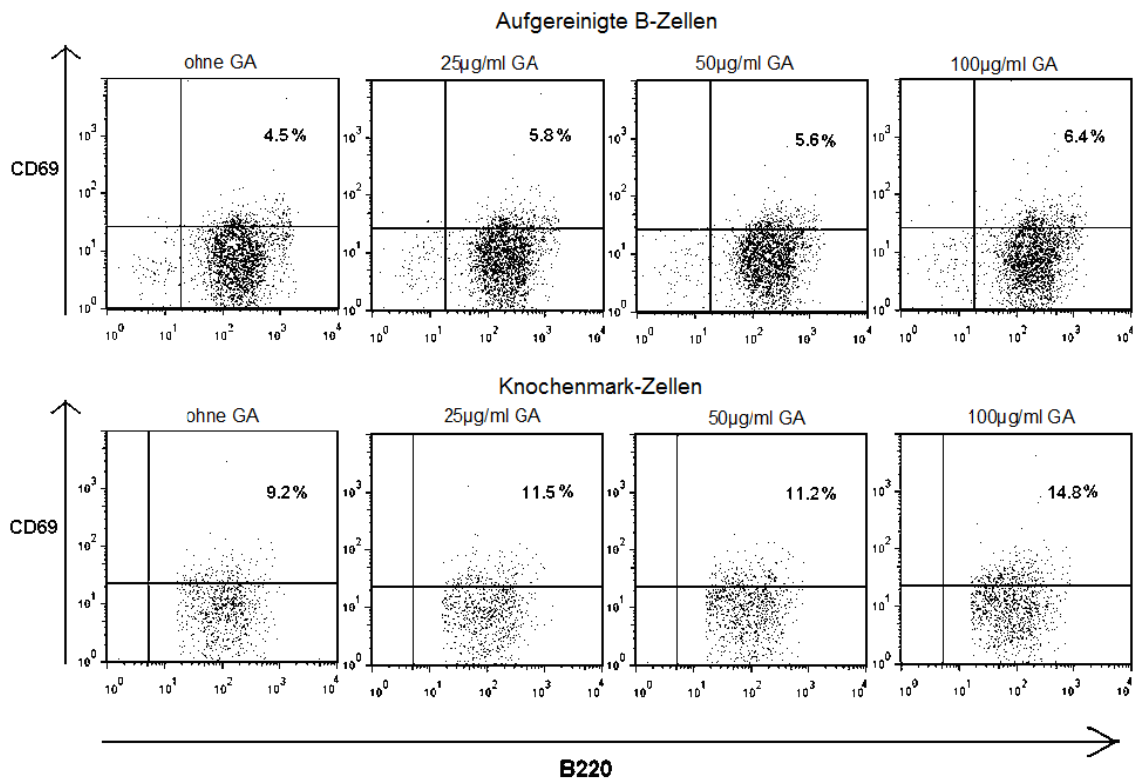


Abbildung 9: Expression von CD69 nach IL-4 Stimulation

Repräsentative Ergebnisse für mit 40ng/ml IL-4 stimulierte Milz-B-Zellen und B-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit steigenden GA Konzentrationen (0µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml). Obere Reihe: CD69 Expression IL-4 stimulierter Milz-B-Zellen. Untere Reihe: CD69 Expression IL-4 stimulierter B-Vorläuferzellen. Im rechten oberen Feld der Zytogramme sind die Prozentwerte der B220/CD69 positiven Zellen angegeben

4.1.2 Einfluss von Glatirameracetat auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD 86 auf B-Zellen

Nachdem wir mittels der Oberflächenmoleküle CD25 und CD69 den Aktivitätsstatus der B-Zellen bestimmt hatten, untersuchten wir als nächstes, ob auch eine eventuelle Auswirkung auf die Expression der kostimulatorischer Moleküle CD80 und CD86 auf der B-Zelloberfläche besteht. Neben der Aktivierung stellen diese kostimulatorischen Moleküle einen bedeutenden Faktor in der effektiven Stimulation der T-Zellen dar. CD80 (Syn. B7-1) spielt vor allem bei der Aktivierung naiver T-Zellen durch APCs eine Rolle. Erst durch Bindung dieses Moleküls mit den T-Zellen wird eine effektive T-Zell-Antwort möglich. CD86 (Syn. B7-2) ist ein dem CD80 im Aufbau sehr ähnliches Molekül. Wie CD80 bindet es auch an Liganden auf der T-Zelloberfläche und liefert ein kostimulatorisches Signal bei der T- Zellaktivierung [Lenschow et al. 1996]. Im Folgenden wird jeweils eine solche Analyse repräsentativ für vier Versuche dargestellt und beschrieben.

B-Zellen exprimierten ohne zusätzliche GA Behandlung und mit 10ng/ml LPS Stimulation das CD80-Oberflächenmolekül zu einem relativ geringen Anteil von 13.9% (**Abbildung 10**). Unter GA Behandlung zeigte sich eine dosisabhängige Steigerung hin zu höheren Expressionswerten des CD80 Moleküls auf der Zelloberfläche. So weisen die mit 25µg/ml GA inkubierten Zellen in 18.2%, die mit 50µg/ml GA inkubierten B-Lymphozyten in 19.6% und die mit 100µg/ml GA behandelten B-Zellen eine CD80 Expression von 23.60% auf.

Die Auswertungen bezüglich der CD80 Expression auf mit 10ng/ml LPS stimulierten B-Vorläuferzellen, ergaben ein ähnliches Bild. Auch hier erhöhte sich die Expression des kostimulatorischen Moleküls unter GA Behandlung. Betrug die Expression bei Behandlung mit 25µg/ml GA noch 15.8% auf der B-Zelloberfläche, so stieg sie bei der höchsten gewählten Konzentrationsstufe von 100 µg/ml GA auf 25.1%.

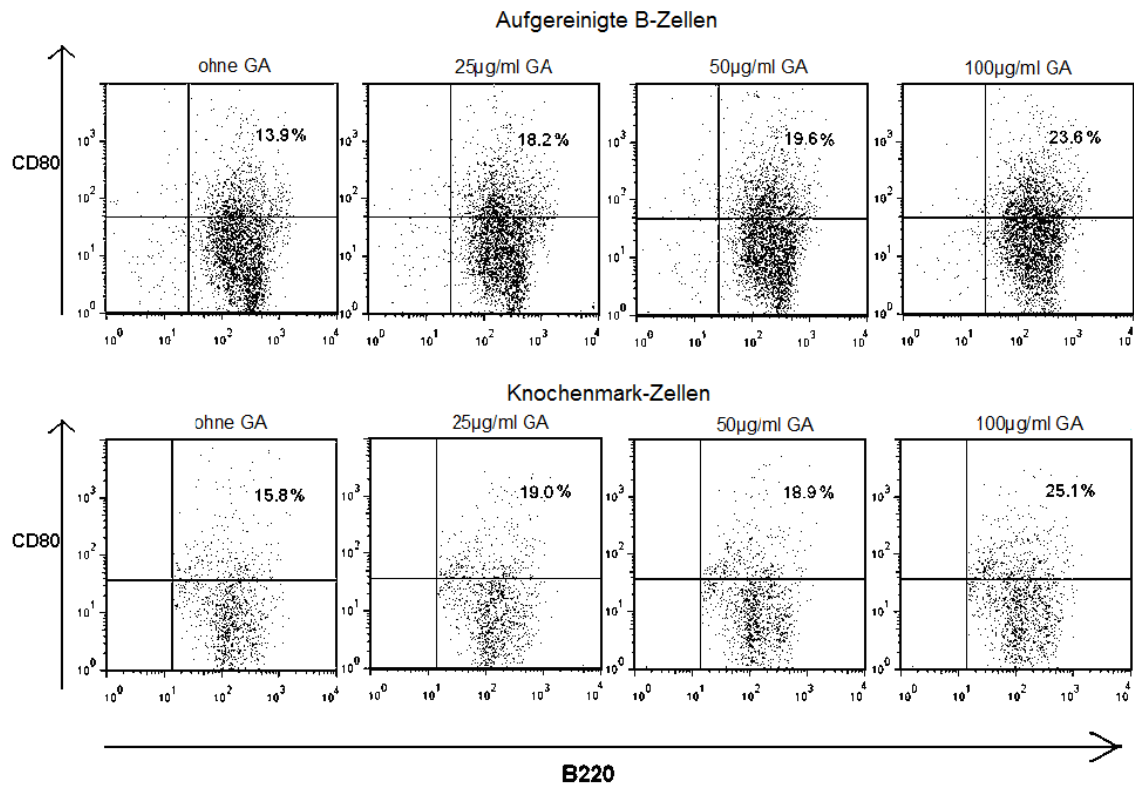


Abbildung 10: Expression von CD80 nach LPS Stimulation

Repräsentative Ergebnisse für mit 10ng/ml LPS stimulierte Milz-B-Zellen und B-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit steigenden GA Konzentrationen (0µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml). Obere Reihe: CD80 Expression LPS stimulierter Milz-B-Zellen. Untere Reihe: CD80 Expression LPS stimulierter B-Vorläuferzellen. Im rechten oberen Feld der Zytogramme sind die Prozentwerte der B220/CD80 positiven Zellen angegeben.

Abbildung 11 verdeutlicht dass sich auch unter Stimulation mit 40ng/ml IL-4, eine sehr ähnliche Situation ergab. Wiederum zeigten die B-Lymphozyten ohne zusätzliche GA Behandlung unter IL-4 Stimulation mit 14.2% eine relativ geringe Expression des CD80 Oberflächenmoleküls, vergleichbar mit der Situation unter LPS Stimulation. Mit zunehmender GA Dosis, stieg die CD80 Expression auf der Oberfläche der B-Zellen von 18.2% auf 22.6% an und erreichten mit der höchsten gewählten GA Dosis von 100 µg/ml mit 28.8% auch die deutlichste Expression des kostimulatorischen Moleküls.

Die mit 40ng/ml IL-4 stimulierten B-Vorläuferzellen ohne zusätzliche GA Behandlung wiesen zu 24.3% das CD80 Oberflächenmolekül auf. Unter zunehmenden GA Konzentrationen zeigte sich hier nur eine diskrete steigende Tendenz mit dem Maximalwert von 28.5% bei Inkubation mit 100µg/ml GA.

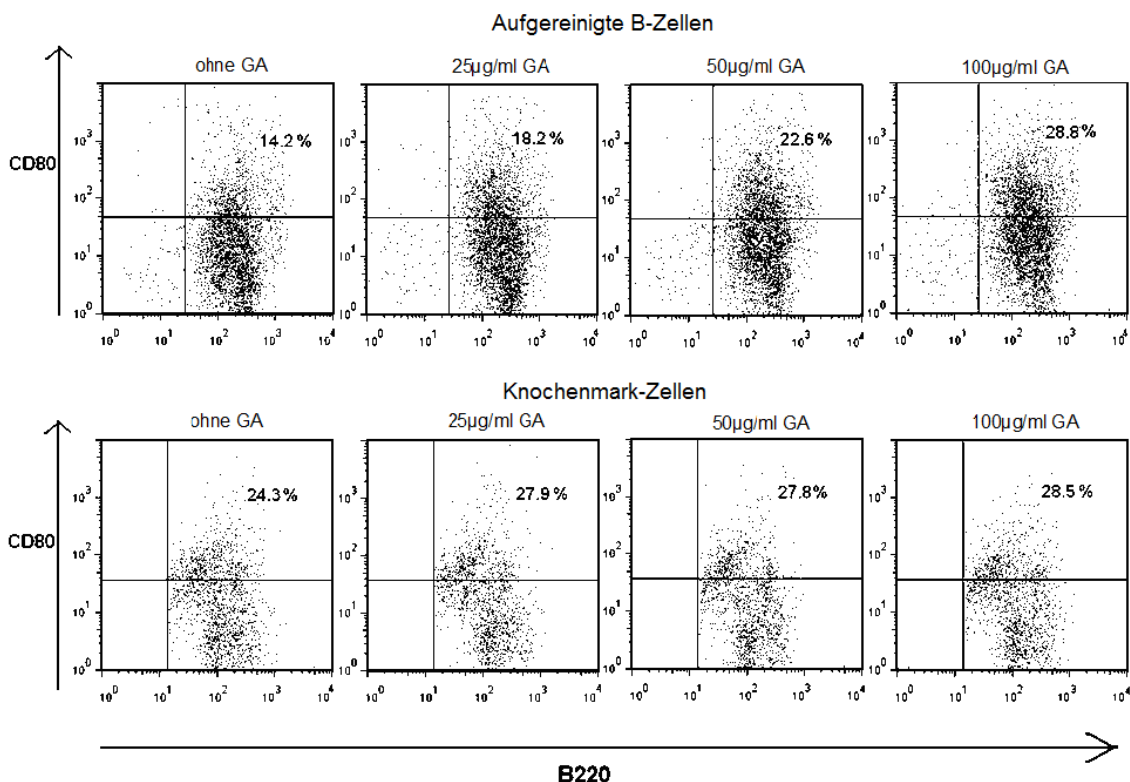


Abbildung 11: Expression von CD80 nach IL-4 Stimulation

Repräsentative Ergebnisse für mit 40ng/ml IL-4 stimulierte Milz-B-Zellen und B-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit steigenden GA Konzentrationen (0µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml). Obere Reihe: CD80 Expression IL-4 stimulierter Milz-B-Zellen. Untere Reihe: CD80 Expression IL-4 stimulierter B-Vorläuferzellen. Im rechten oberen Feld der Zytogramme sind die Prozentwerte der B220/CD80 positiven Zellen angegeben

Im Vergleich zum CD80 Molekül, bei welchem eine GA-dosisabhängige Veränderung der Expressionswerte in den für vier Versuche repräsentativen Abbildungen gezeigt werden konnte, waren die Veränderungen für das kostimulatorische CD86 auf den B-Zellen deutlich geringer ausgeprägt. Unter Stimulation mit 10ng/ml LPS zeigten die B-Zellen ohne GA Behandlung mit 9.3% eine recht geringe Expression des kostimulatorischen Oberflächenmarkers. Mit zunehmender GA Konzentration zeigte sich eine diskrete, jedoch dosisabhängige Steigerung der Expression der Oberflächenmoleküle. Wie aus **Abbildung 12** zu entnehmen, stiegen die Expressionswerte von 11.5% bei Inkubation mit 25µg/ml GA, über 12.3% bei Inkubation mit 50µg/ml GA auf 13.0% bei Inkubation mit 100µg/ml GA.

Bei mit 10ng/ml LPS stimulierten und GA unbehandelten B-Vorläuferzellen wies ein Anteil von 22.8% CD86 auf ihrer Oberfläche auf. Hier vermochte GA nicht die Expression des kostimulatorischen Oberflächenmoleküls zu modulieren und so zeigten sich mit 22.3%, 19.4% und 20.4% unter steigendem GA Einfluss keine deutlichen Veränderungen der Expressionswerte.

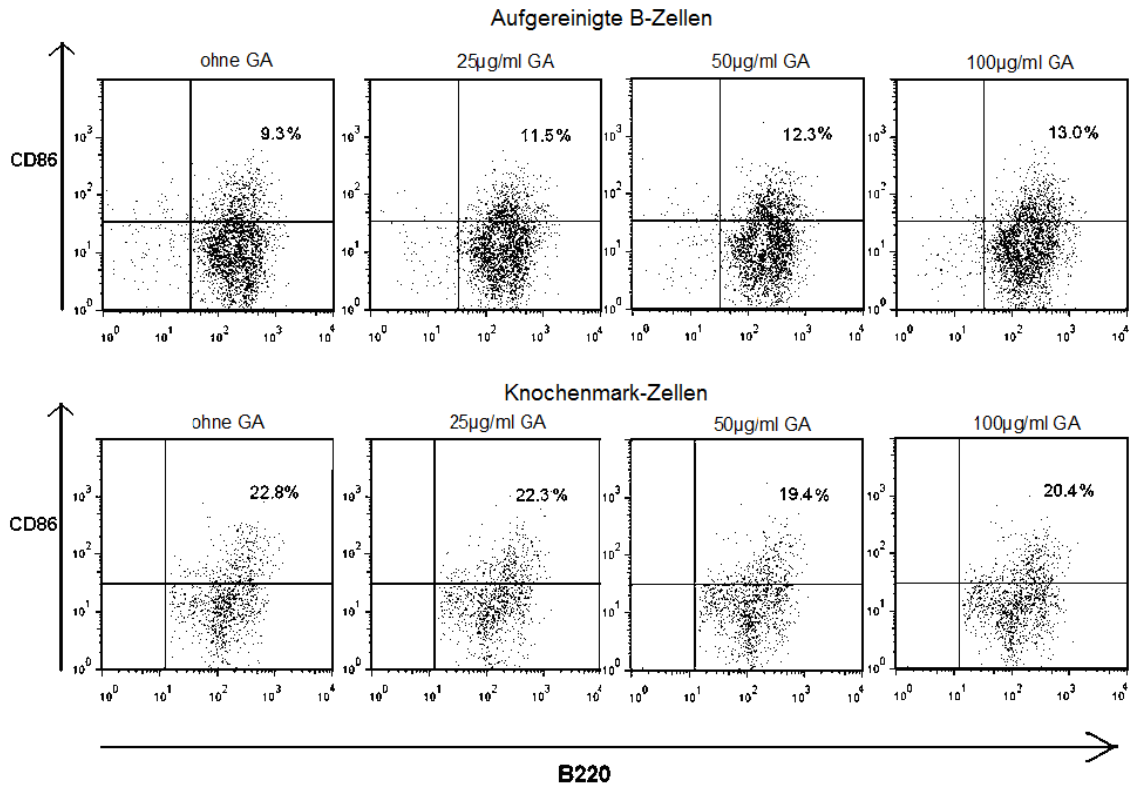


Abbildung 12: Expression von CD86 nach LPS Stimulation

Repräsentative Ergebnisse für mit 10ng/ml LPS stimulierte Milz-B-Zellen und B-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit steigenden GA Konzentrationen (0µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml). Obere Reihe: CD86 Expression LPS stimulierter Milz-B-Zellen. Untere Reihe: CD86 Expression LPS stimulierter B-Vorläuferzellen. Im rechten oberen Feld der Zytogramme sind die Prozentwerte der B220/CD86 positiven Zellen angegeben.

In **Abbildung 13** ist die CD86 Expression unter Einfluss von 40ng/ml IL-4 dargestellt. Hier wies ein deutlich größerer Anteil von 46.2% der B-Lymphozyten ohne GA Behandlung das kostimulatorische Oberflächenmolekül auf. Anders als bei LPS Stimulation, zeigte sich mit den Werten 50.9%, 49.5% und 48.8% bei IL-4 Stimulation und steigender GA Konzentration, zwar eine diskret erhöhte Expression von CD86, jedoch war diese unabhängig von der Dosis des Medikaments GA.

Wie unter LPS Stimulation, zeigte bei den mit 40ng/ml IL-4 stimulierten B-Vorläuferzellen ein ähnlich großer Anteil von 23.0% ohne zusätzliche GA Behandlung das CD86 Molekül auf ihrer Oberfläche. Wie bei den B-Zellen beschrieben, ließen sich unter steigender GA Behandlung nur diskrete Veränderungen feststellen, ohne dosisabhängigen Tendenzen zu zeigen.

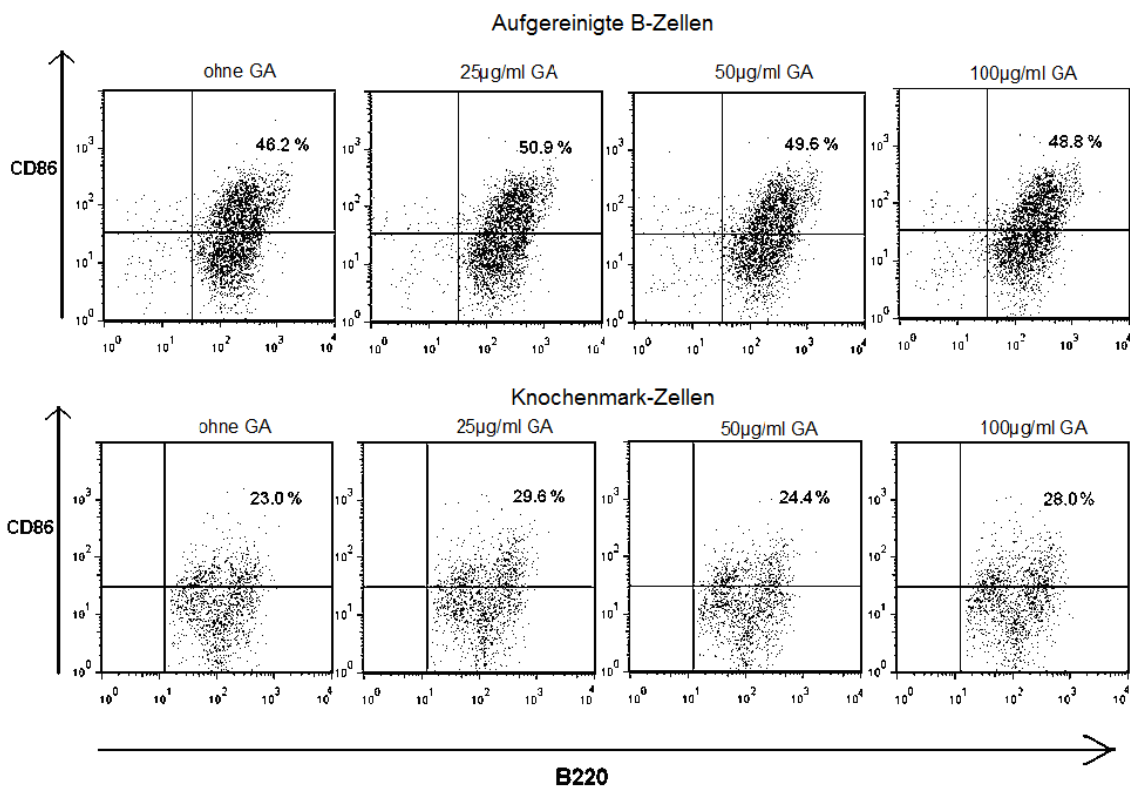


Abbildung 13: Expression von CD86 nach IL-4 Stimulation

Repräsentative Ergebnisse für mit 40ng/ml IL-4 stimulierte Milz-B-Zellen und B-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit steigenden GA Konzentrationen (0µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml). Obere Reihe: CD86 Expression IL-4 stimulierter Milz-B-Zellen. Untere Reihe: CD86 Expression IL-4 stimulierter B-Vorläuferzellen. Im rechten oberen Feld der Zytogramme sind die Prozentwerte der B220/CD86 positiven Zellen angegeben

4.1.3 Einfluss von Glatirameracetat auf die Expression des Latency Associated Peptide (LAP)

Nachdem wir den Aktivierungsstatus der B-Zellen und die Expression kostimulatorischer Moleküle unter GA-Einfluss untersucht hatten, wollten wir weiter prüfen, ob auch die Zytokinproduktion der B-Lymphozyten durch GA moduliert wird. Hierzu untersuchten wir zunächst die TGF-beta Sekretion der B-Zellen. TGF-beta ist ein multifunktionelles Zytokin, das verschiedene biologische Effekte beeinflusst und maßgeblich zur Modulation der Immunantwort beiträgt. Eine sehr wichtige Eigenschaft des TGF-beta ist seine immunregulatorische Wirkung, mit der es unter anderem die Proliferation, Differenzierung und Aktivierung anderer Immunzellen reguliert. Noch in der Zelle bildet TGF-beta einen Komplex mit einem Latency Associated Peptide (LAP). Vor Sezernierung ist dieser Komplex an der Zelloberfläche nachweisbar. TGF-beta selbst kann weder in der Zelle noch als Teil der LAP/TGF-beta Komplexes an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Daher wird anstelle des TGF-beta, das LAP Molekül, dessen Dichte dem des TGF-beta Gehalts entspricht nachgewiesen [Letterio, 1998].

Die direkte Darstellung des LAP Oberflächenmoleküls auf B-Lymphozyten gestaltete sich zunächst schwierig. Erst die zusätzliche Verwendung von sekundären Antikörpern konnte das zu detektierende Signal verstärken und somit die vergleichende Darstellung der Expression mittels FACS ermöglichen.

Nachdem hierdurch eine gute Darstellung der FACS Analysen gelungen war, wollten wir den optimalen Zeitpunkt finden, zu welchem sich die LAP Expression am idealsten illustrieren lässt und wie sie sich im Laufe der Zeit verändert. Hierzu wurden B-Vorläuferzellen entweder mit 10ng/ml LPS oder 40ng/ml IL-4 stimuliert und mit den steigenden GA Konzentrationen (25µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml) behandelt. Nach 48h, 72h, 96h, 120h und 144h Kultivierung wurde jeweils die LAP-Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierbei zeigten nach 48h, die mit 10ng/ml LPS stimulierten Zellen die deutlichsten unterschiedlichen LAP Expressionen je nach Dosis der eingesetzten GA Konzentration.

Unter Stimulation mit 40ng/ml IL-4, wie in **Abbildung 14** dargestellt, zeigten die B220 positiven Knochenmarkszellen nach 48h bis 96h die stärkste LAP Expression, wobei ein GA dosisabhängiger Unterschied deutlich ausgeprägt war. Nach 72h stiegen die

mit 0, 25µg/ml, 50µg/ml GA behandelten Zellen noch diskret mit ihren Expressionswerten an, wohingegen die mit 100µg/ml GA behandelten Zellen bereits eine abfallende Tendenz aufwiesen. Nach 96h fielen die Expressionswerte aller, mit unterschiedlichen Konzentration GA behandelter Zellen deutlich, wie schon unter LPS Simulation beobachtet. Nach 144h wies nur noch ein geringer Prozentsatz der Zellen das Oberflächenprotein auf, der durch die GA Dosis verursachte Unterschied an Expressionswerten war nicht mehr messbar.

Nach Auswertung der Kinetik entschieden wir uns die LAP Expression nach 48-stündiger Inkubation zu bestimmen, da hier sowohl unter LPS als auch unter IL-4 Stimulation die deutlichsten Werte gemessen werden konnten.

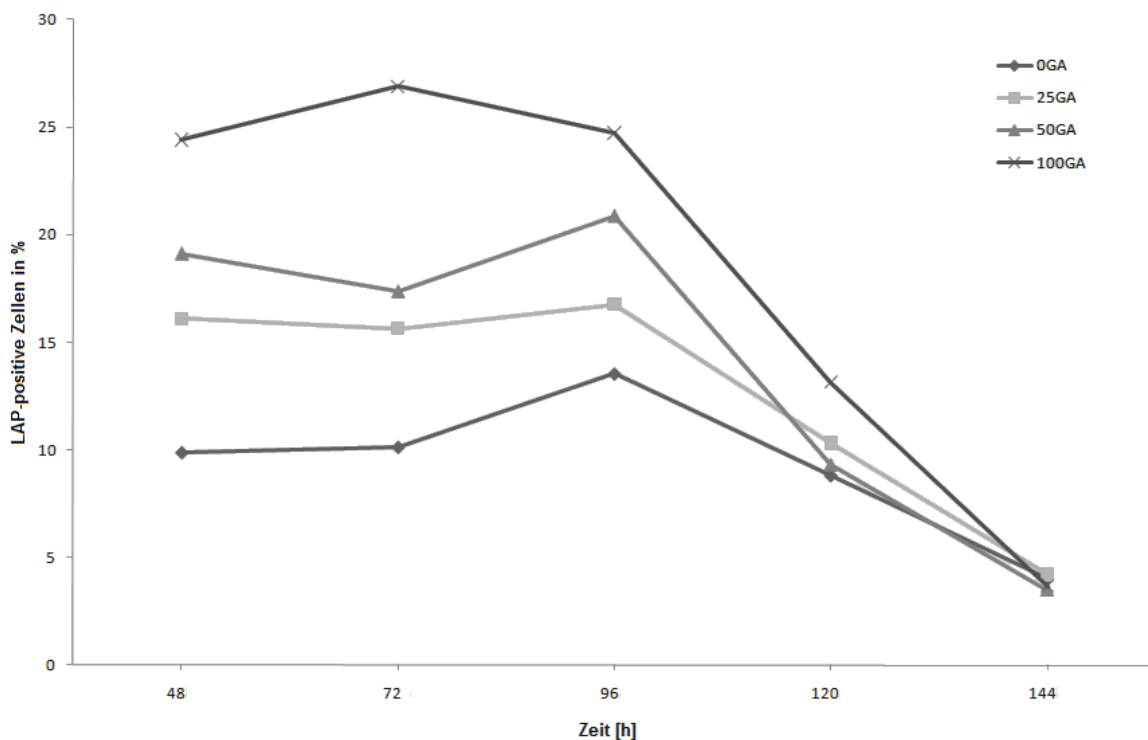


Abbildung 14: Kinetik der LAP Expression von IL-4 stimulierten B-Vorläuferzellen

Die Graphiken zeigen die LAP Expression von Knochenmarkszellen über einen Zeitraum von mehreren Tagen. Nach Stimulation mit 40ng/ml IL-4 sind jeweils nach 48h, 72h, 95h, 120h und 144h die B220/LAP positiven Zellen in einer FACS Analyse ermittelt worden und als Prozentwert auf der y-Achse dargestellt.

Nach Optimierung des Betrachtungszeitpunktes und Darstellungsparameter, konnten wir nun die LAP Expression unter GA Einfluss, nach den gleich gewählten Messparametern, wie bei den anderen Oberflächenmolekülen bestimmen.

Wie in **Abbildung 15** dargestellt, wiesen mit 10ng/ml LPS stimulierte B-Lymphozyten sowohl ohne als auch mit Behandlung mit steigenden GA Konzentrationen mit Werten von 27.0%, 30.8%, 28.5% und 31.8% relativ einheitliche Werte ihrer LAP-Expression auf. Bei den B-Vorläuferzellen dagegen, die unbehandelt eine relativ niedrige LAP-Expression mit 11.2% aufwiesen, zeigten sich deutliche, GA-dosisabhängig steigende Expressionenwerte der LAP-Oberflächenmoleküle. Mit 25µg/ml GA inkubierte Zellen trugen den Oberflächenmarker in 12.6%, die mit 50µg/ml GA behandelten Knochenmarkszellen zeigten eine Expressionrate von 15.0% und bei den mit der höchsten GA Dosis von 100µg/ml inkubierten Zellen konnte ein LAP Expression, unter den gewählten Auswertungsparametern in 20.7% nachgewiesen werden.

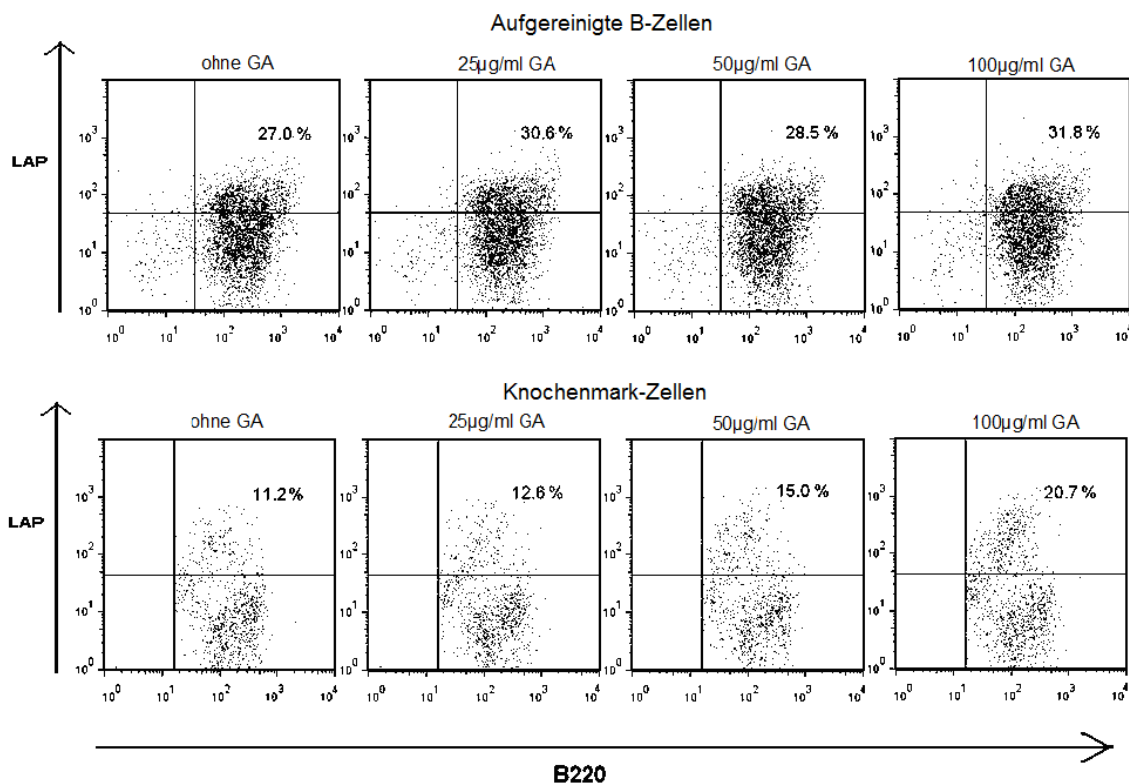


Abbildung 15: Expression von LAP nach LPS Stimulation

Repräsentative Ergebnisse für mit 10ng/ml LPS stimulierte Milz-B-Zellen und B-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit steigenden GA Konzentrationen (0µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml). Obere Reihe: LAP Expression LPS stimulierter Milz-B-Zellen. Untere Reihe: LAP Expression LPS stimulierter B-Vorläuferzellen. Im rechten oberen Feld der Zytogramme sind die Prozentwerte der B220/LAP positiven Zellen angegeben.

Aus **Abbildung 16** kann man die LAP Expression unter Stimulation mit 40ng/ml IL-4 entnehmen. Aufgereinigte B-Lymphozyten ohne GA Behandlung, die mit IL-4 stimuliert wurden, exprimierten das LAP Oberflächenmolekül mit 26.9% in einem etwas erhöhten Prozentsatz, als mit GA behandelte Zellen. Bei den mit GA inkubierten Zellen zeigte sich mit Werten von 20.0%, 18.9% und 19.0% bei steigender GA Konzentrationen keine modulierende Auswirkung der GA Dosis auf die Expressionsraten.

Ein anderes Bild zeigte sich bei den mit 40ng/ml IL-4 stimulierten B-Vorläuferzellen. Wie bereits unter LPS Stimulation beschrieben, stieg hier die Expressionsrate des LAP Oberflächenmoleküls mit steigender GA-Konzentration. Bei unbehandelten Zellen, exprimierten 11.9% aller B220 positiven Zellen LAP auf ihrer Oberfläche, mit 25µg/ml GA inkubierte Zellen wiesen Expressionwerte von 10.4% auf. Bei mit der Konzentration von 50µg/ml GA behandelten Zellen stieg die Expressionrate des LAP Moleküls auf 14.9%, und bei der höchsten verwendeten Konzentration von 100µg/ml GA erreichte die LAP Expression einen Wert von 19.3%.

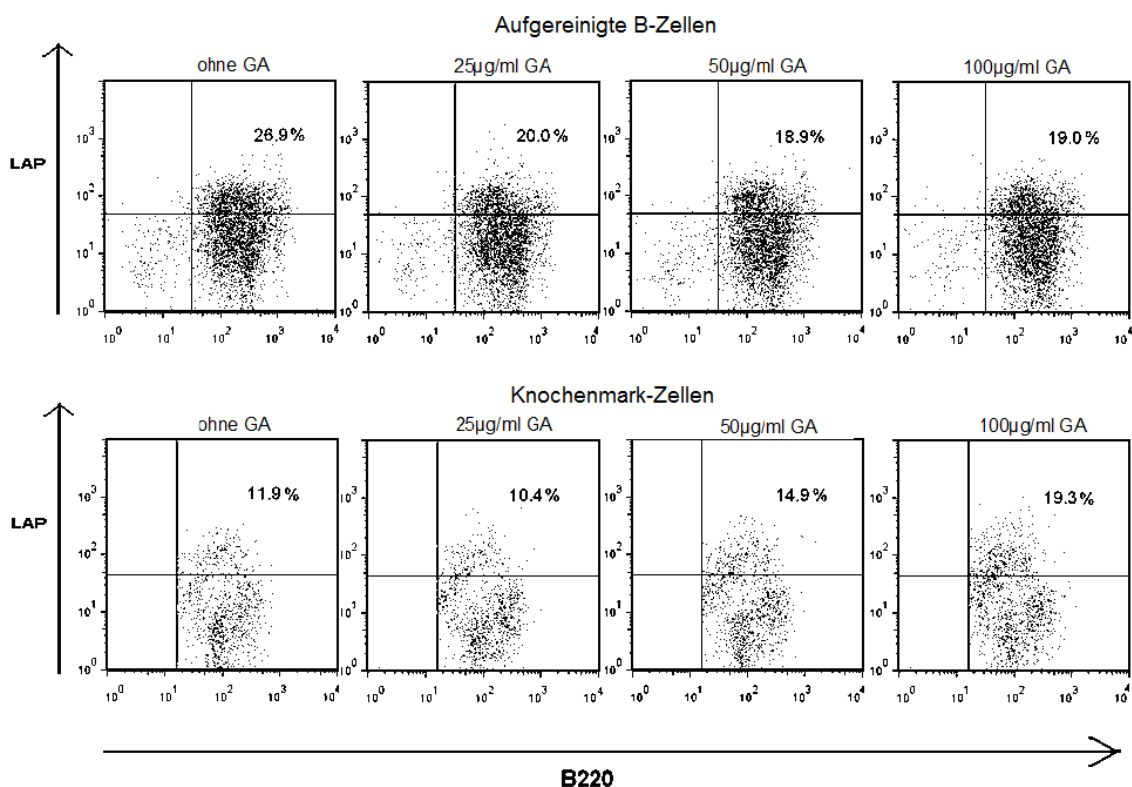


Abbildung 16: Expression von LAP nach IL-4 Stimulation:

Repräsentative Ergebnisse für mit 40ng/ml IL-4 stimulierte Milz- B-Zellen und B-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit steigenden GA Konzentrationen (0µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml). Obere Reihe: CD86 Expression IL-4 stimulierter Milz-B-Zellen. Untere Reihe: CD86 Expression IL-4 stimulierter B-Vorläuferzellen. Im rechten oberen Feld der Zytogramme sind die Prozentwerte der B220/CD86 positiven Zellen angegeben

4.2 ELISA Analysen der Kulturüberstände von B-Zellen

Nachdem wir nun den Aktivierungsstatus, die Expression von kostimulatorischen Molekülen und die LAP und somit die TGF- β Bildung untersucht hatten, wollten wir den GA Einfluss auf die Produktion weitere Zytokine mittels ELISA untersuchen. Da wie unter 1.7 beschrieben Zytokine Einfluss über den weiteren Entwicklungsweg der naiven T-Zellen haben können. Hierbei war vor allem IL-6 (Überstand nach 24h gewonnen) von Interesse, da IL-6 zusammen mit TGF- β die Differenzierung der T-Zelle zu proinflammatorischen Zellen hin fördert, wohingegen TGF- β alleine die Entwicklung von Treg Zellen unterstützt [Korn et al. 2009]. Verglichen wurden Überstände von Milz-B-Zellen, mit 10ng/ml LPS oder 40ng/ml IL-4 stimuliert, die

entweder ohne Zusatz von GA (Negativkontrollen) oder mit steigenden GA Dosen (25µg/ml, 50µg/ml und 100µg/ml) inkubiert wurden.

Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein multifunktionelles Zytokin, welches während Entzündungsgeschehen freigesetzt wird. Es reguliert eine Vielzahl biologischer Funktionen verschiedenster Zellen, so übt es z.B. regulatorische Aktivitäten auf Immunzellen aus. Als Mediator der akuten Inflammation fördert IL-6 sowohl die Prolifation und Aktivierung der T-Zellen, als auch die Differenzierung und Immunglobulinproduktion von B-Lymphozyten. Außerdem wirkt es positiv auf das Zellwachstum vieler unterschiedlicher Gewebe, darunter auch gliale und Neuronale Strukturen [Akira et al. 1993].

Mit den ELISA- Analysen, der nach 24h gewonnenen Kulturüberständen, sollten Veränderungen der IL-6 Sekretion von B-Zellen unter Einfluss verschiedener GA Dosen ermittelt werden. Die dargestellte **Abbildung 17** zeigt repräsentativ für vier durchgeführte ELISAs ein Säulendiagramm der gemessenen IL-6 Konzentrationen. In der anschließenden **Tabelle 6** sind die Werte von den vier durchgeführten Versuchen als Mittelwerte dargestellt. Es zeigten sich ohne Einfluss von GA mit durchschnittlich 6,9 pg/ml IL-6 bei Stimulation mit 10ng/ml LPS und mit durchschnittlich 0,4 pg/ml IL-6 bei Stimulation mit 40ng/ml IL-4 die geringsten Werte des Zytokins. Sowohl unter Stimulation mit 16,1 pg/ml LPS als auch unter IL-4 Stimulation mit 39,9 pg/ml stiegen die IL-6 Konzentrationen unter dem Einfluss von 25µg/ml GA auf ihre Maximalwerte. Mit zunehmender GA Konzentration (50µg/ml und 100µg/ml) ließ die IL-6 Konzentration in allen Gruppen eine rückläufige Tendenz erkennen, wobei die Werte bei IL-4 Stimulation auf durchschnittlich 31,2 pg/ml und weiter auf 18,4 pg/ml IL-6 fielen, unter LPS Stimulation nahm die IL-6 Konzentration über 14,8 pg/ml auf 9,0 pg/ml ab.

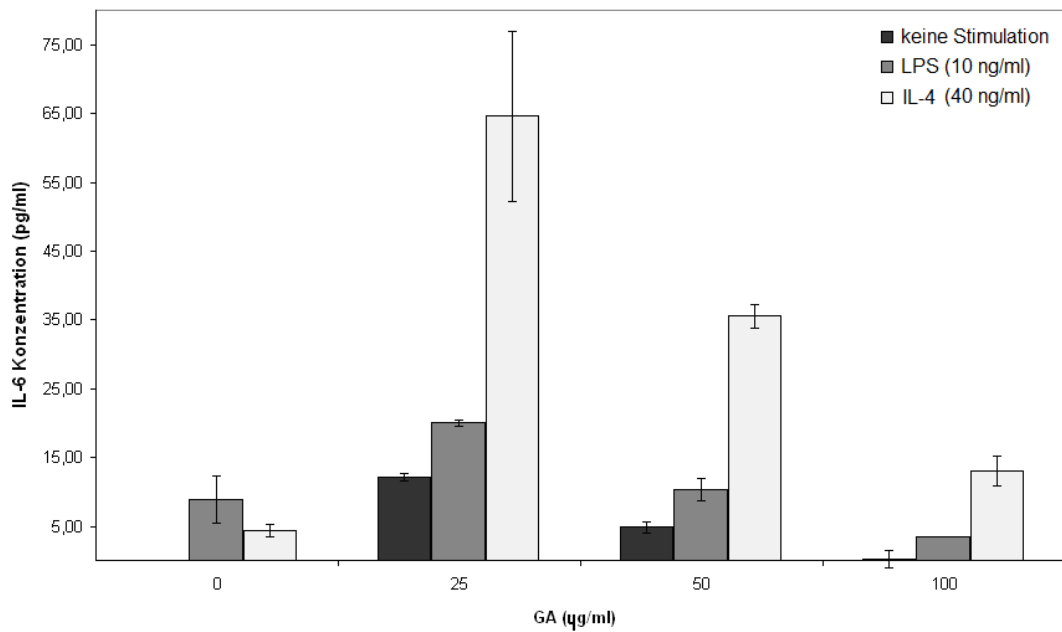


Abbildung 17: IL-6 ELISA-Ergebnisse

Repräsentatives Ergebnis einer IL-6 ELISA- Analyse. Auf der y-Achse sind die IL-6 Konzentration in pg/ml aufgetragen. Auf der x-Achse sind die unterschiedlichen GA Konzentrationen in µg/ml dargestellt. Schwarz stellt die Kontrolle ohne Stimulation dar, Grau die unter Stimulation mit 10ng/ml LPS gewonnenen Werte und Weiß die Stimulation mit 40ng/ml IL-4.

Tabelle 6: Messergebnisse IL-6 ELISA

Die Tabelle zeigt jeweils den Minimal- und den Maximalwert aller durchgeführter Messungen (n=4) und deren Mittelwert an. Dabei wurde einerseits zwischen den verschiedenen GA Konzentrationen (0, 25µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml) und andererseits den Stimulationen 10ng/ml LPS und 40ng/ml IL-4 unterschieden.

	Ohne GA		25µg/ml GA		50µg/ml GA		100µg/ml GA	
	LPS	IL-4	LPS	IL-4	LPS	IL-4	LPS	IL-4
Min.:	0,6	-0,2	3,8	2,2	9,1	0,4	2,0	1,3
Max.:	12,7	4,4	28,4	64,6	29,0	58,2	27,2	13,1
Mittelwert ±SEM:	6,9 ± 2,2	0,4 ± 1,2	16,1 ± 4,6	39,9 ± 12,3	14,8 ± 4,1	31,2 ± 10,3	9,0 ± 5,3	18,4 ± 7,2

5. Diskussion

Zunehmend finden sich wissenschaftliche Erkenntnisse die den B-Zellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der MS zuschreiben (ausführliche Darlegung siehe 1.7.2). Insbesondere die Bedeutung der B-Zelle als APC im Entzündungsgeschehen scheint substantiell. Man nimmt an, dass GA, welches zur Therapie der MS eingesetzt wird, seine protektiven Effekte über Th2 Zellen und darüber hinaus durch Modulation von regulatorischen T-Zellen, dendritischen Zellen und Monozyten ausübt [Fridkis-Hareli et al., 1994; Vieira et al., 2003; Jee et al., 2007; Weber et al., 2007]. Bisher gibt es nur indirekte Hinweise, dass die GA Wirkung auch durch einen modulierenden Einfluss auf B-Zellen hervorgerufen wird. Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir funktionelle Veränderungen von B-Zellen unter dem modulierenden Einfluss von GA feststellen. Als vorrangige Ergebnisse konnten wir zeigen, dass reife B-Zellen unter dem Einfluss von GA unter IL-4 Stimulation eine erhöhte Expression des Aktivierungsmarkers CD25 aufweisen. Außerdem ergaben sich sowohl auf reifen B-Zellen, wie auch auf unreifen B-Zellen aus dem Knochenmark, sowohl unter IL-4 als auch unter LPS Stimulation eine dosisabhängige Steigerung der Expression des kostimulatorischen CD80 Moleküls. Zudem modulierte GA die IL-6 Sekretion von reifen B-Zellen. Während niedrige GA Konzentrationen zunächst die IL-6 Sekretion förderten, war dieser Effekt bei höheren Konzentrationen nicht mehr nachzuweisen. Schließlich konnten wir zeigen, dass B-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, sowohl unter LPS als auch IL-4 Stimulation deutlich gesteigerte LAP Expressionen und damit eine gesteigerte TGF- β Produktion unter GA Behandlung aufweisen.

Zunächst stellt sich hierbei die Frage, auf welchem Weg GA die beobachteten Veränderungen hervorgerufen hat. Hat es einen direkten Einfluss auf die B-Lymphozyten ausgeübt oder finden sich Hinweise, dass die Wirkung über andere Zellen vermittelt wurde? In unseren Untersuchungen scheint die Wirkung des GAs durch einen direkten Einfluss des Medikaments auf die B-Zellen bedingt zu sein. Diese Annahme wird vor allem dadurch unterstützt, dass die Veränderungen der Oberflächenmoleküle unter GA Einfluss auf aufgereinigten B-Zellen beobachtet wurden. Da somit in den Zellkulturen zu über 98% nur B-Zellen vorhanden waren, kann man eine Interaktion anderer Zellen nahezu ausschließen. Darüber hinaus zeigten weitere Versuche unserer Arbeitsgruppe an mit GA inkubierten Milzzellsuspensionen vergleichbare Ergebnisse zu denen, die bei den aufgereinigten

B-Zellen ermittelt wurden. Diese Beobachtung legt nahe, dass die übrigen Zellpopulationen der Milz keinen fördernden Einfluss auf die von GA auf B-Zellen hervorgerufene Veränderungen ausüben. Andererseits kann man davon ausgehen, dass durch andere Zellpopulationen der Milz auch keine Abschwächung der GA Wirkung auf B-Zellen durch weitere Interaktionen vermittelt werden. Somit kann man annehmen, dass die beobachteten Modulationen der B-Zellen auf einen direkten Einfluss des GAs zurückzuführen sind, und nicht über andere Zellen vermittelt wurden.

In unserem Versuchsaufbau, wollten wir die physiologische Aktivierung der Immunzellen bei inflammatorischen Prozessen abbilden. Um dieses Ziel zu erreichen verwendeten wir LPS und IL-4 zur Stimulation der Zellkulturen. Durch LPS, ein Bestandteil der Bakterienwand erzeugten wir eine Induktion einer unspezifischen Immunantwort der B-Zellen. Im Gegensatz zu dieser unspezifischen Aktivierung des Immunsystems, imitierten wir durch die Stimulation mit dem antiinflammatorischen Zytokin IL-4 eine durch T-Zellen vermittelte Aktivierung der B-Zellen. Durch diese unterschiedlichen Stimulationen war es uns möglich den modulierenden Einfluss von GA auf B-Zellen während einer indirekten und einer direkten Aktivierung des Immunsystems zu vergleichen. Vor allem bei den aus KM gewonnenen B-Vorläuferzellen, aber auch größtenteils unter den isolierten Milz-B-Zellen entsprachen sich die Ergebnisse unter den beiden Aktivierungsmodalitäten. Da kein signifikanter Unterschied zwischen den Stimulationen zu beobachten war, kann man annehmen, dass ein modulierender Einfluss von GA unabhängig von der jeweiligen Stimulation und somit des Aktivierungsweges der B-Lymphozyten erkennbar wird.

Wie in der Einleitung bereits ausführlich erläutert, spielt die Differenzierung naiver Th-Zellen eine entscheidende Rolle im fortschreitenden autoimmunen Krankheitsgeschehen. Es wurde gezeigt, dass das Zytokinmilieu bei der Antigenpräsentation entscheidenden Einfluss hierauf nimmt. Den Zytokinen wird somit eine tragende Rolle als Mediatoren immunologischer und inflammatorischer Prozesse im Rahmen der MS zugeschrieben. Die Zytokine IL-6 und TGF-beta zusammen fördern hierbei die Differenzierung der naiven T-Zelle zu proinflammatorischen Th17 Zellen. Den Th17 Zellen wird ein wichtiger Anteil an der Pathogenese von autoimmunen Entzündungen des ZNS zugeschrieben, da sie chronische Entzündungen und autoreaktive Prozesse zu fördern vermögen [Korn et al., 2009] und in aktiven und chronischen Läsionen von MS Patienten vermehrt

vorzufinden sind [Tzartos et al., 2008]. Das Zytokin TGF-beta alleine dagegen bewirkt die Entwicklung zu regulatorischen CD4⁺CD25⁺Foxp3-Zellen [Korn et al., 2009]. Diese Treg Zellen, gelten als Gegenspieler der Th17 Zellen. Bei MS Patienten wird eine verminderte Funktion und Frequenz dieser regulatorischen Zellen als eine Mitursache der Erkrankung vermutet [Viglietta et al., 2004]. Wir beobachteten in diesem Zusammenhang auf B-Vorläuferzellen eine deutliche dosisabhängige Zunahme des Oberflächenmarkers LAP, was für eine gesteigerte TGF-beta Produktion unter GA Behandlung spricht. TGF-beta ist bekannt für seine Fähigkeit zyotoxische T-Zell-Antworten und die Produktion der proinflammatorischen Zytokine zu unterdrücken [Arnon, 2007]. Neben der Apoptose von Effektorzellen, wird die verstärkte Sekretion von TGF-beta, als ein wichtiger Faktor für die Herunterregulation der EAE im Anschluss an die akute Phase angesehen [Karpus, 1991]. In Studien wurde gezeigt, dass die systemische Gabe von TGF-beta in der Lage war, die klinischen Symptome verschiedener EAE-Modelle zu verringern [Johns et al., 1991; Kuruvilla et al., 1991]. Im Zusammenhang legt dies nahe, dass TGF-beta einen regulatorischen Einfluss auf das Krankheitsgeschehen bei autoimmunen Entzündungen des ZNS hat und eine Hochregulation der TGF-beta Produktion von B-Zellen durch GA Behandlung positive Auswirkung auf den Krankheitsverlauf ausüben könnte.

Die Beobachtung, dass GA im Hinblick auf die TGF-beta Produktion vor allem auf unaktivierte B-Zellen des KM eine Auswirkung zu haben scheint, könnte dem verzögerten Wirkeintritt des GAs von einigen Wochen bis zu einem Jahr bei der Behandlung des Patienten widerspiegeln. Es wurde darüber hinaus gezeigt, dass TGF-beta die Immunglobulin Produktion von Plasmazellen verhindert, indem es in die Entwicklung von B-Zell Vorstufen zu reifen und funktionellen B-Zellen eingreift [Lee et al., 1987; Kehrl et al., 1991]. Dies könnte zu der Vermutung Anlass geben, dass die gesteigerte TGF-beta Produktion, die bei unreifen B-Zellen durch GA Behandlung hervorgerufen wird, zu einer verlangsamten Reifung der B-Zellen führt. Die Produktion spezifischer Antikörper wäre dadurch vermindert und es könnte ein langsamerer Verlauf bzw. ein abgemildertes Krankheitsgeschehen resultieren.

Wir konnten in unseren Untersuchungen weiterhin eine gesteigerte Sekretion des IL-6 durch B-Zellen unter GA Einfluss messen. Eine verstärkte IL-6 Sekretion könnte in Verbindung mit dem ebenfalls erhöhten TGF-beta zu einer gesteigerten Differenzierung von Th Zellen zu TH17 Zellen führen. In unseren Untersuchungen

zeigte sich vor allem bei niedrigen GA Konzentrationen eine Zunahme der IL-6 Sekretion, dieser Effekt war bei höheren GA Konzentrationen nicht mehr nachzuweisen. Insgesamt scheint die vermehrte Sekretion von TGF-beta eher mit antiinflammatorischen B-Zellen einherzugehen, die allenfalls zu einem gewissen Teil durch die vermehrte IL-6 Produktion kompensiert werden könnte. Da in anderen Untersuchungen am EAE Mausmodell unter GA Behandlung, jedoch eine Abnahme des IL-6 im ZNS beobachtet wurde [Begum-Haque et al., 2008], könnte es sich hier auch um unterschiedliche Auswirkungen des GAs in vitro und in vivo handeln. Des Weiteren wäre denkbar, dass Zellen der verschiedenen Kompartimente Peripherie und ZNS unterschiedlich auf GA Behandlung ansprechen. Im EAE Maus Modell konnte bereits gezeigt werden, dass unter GA Therapie die Anzahl der Treg Zellen ansteigt [Jee et al., 2007] und die Th17 Bildung herabreguliert wird [Begum-Haque et al., 2008]. Man könnte somit schließen, dass zumindest in vivo die Wirkung des erhöhten TGF-beta die des IL-6 überwiegt.

Auch die von uns gemessene erhöhte Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf den reifen B-Zellen unter GA Therapie spricht für eine größere Anzahl aktivierter B-Zellen unter GA Einfluss. Es wurde gezeigt, dass CD25 positive B-Zellen höhere Konzentrationen der antiinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-10 sezernieren [Amu et al., 2010]. Vor allem IL-10 wurde als eine wichtige regulatorische Komponente in autoimmunen Vorgängen beschrieben [Fillatreau et al., 2002]. Somit könnten CD25 positive B-Zellen möglicherweise eine regulatorische B-Zell-Unterkategorie darstellen. Andererseits könnten sie jedoch auch einer pathogenen Zellpopulation angehören, da gezeigt wurde, dass CD25 positive B-Zellen eine erhöhte Fähigkeit besitzen Antigen sehr effektiv zu präsentieren [Amu et al., 2010; Brisslert et al., 2006]. Aufgrund der guten APC Funktion CD25 exprimierender B-Zellen wird vermutet, dass sie auch eine bedeutende Rolle bei der Antigen induzierten Aktivierung von T-Zellen spielen [Brisslert et al., 2006]. Die genaue Funktion des CD25 auf B-Zellen in vivo ist noch nicht komplett verstanden. Weitere Untersuchungen sind hier notwendig, um die Expression des CD25 auf B-Zellen und dessen Funktion besser zu verstehen.

Entgegen dem postulierten Konzept, dass GA eine antiinflammatorische Wirkung vermittelt, stehen weitere Beobachtungen im Rahmen unserer Untersuchungen. So könnte die von uns gezeigte deutliche Steigerung der CD80 Expression auf der B-Zelloberfläche unter GA Behandlung, eine gesteigerte T-Zell Aktivierung nach sich ziehen. Für eine effiziente T-Zell-Aktivierung müssen vor allem zwei Faktoren

vorhanden sein. Zum einen ist die Präsentation des Antigens gebunden an MHC II notwendig, zum anderen sind Interaktionen zwischen Korezeptoren auf der APC und der T-Zelle, hierbei vor allem CD80 und CD86, erforderlich [Davis, 1988; Bugeon, 2000]. Es wurde gezeigt, dass die Antigenpräsentation durch MHC II auf B-Zellen zu einer vermehrten Expression von CD80 auf diesen Zellen führt [Nabavi et al., 1992]. Veränderungen der Expressionslevel von CD80 und CD86 auf B-Lymphozyten korrelieren sogar direkt mit der T-Zell-Aktivierung [Schwartz, 2003]. Es wurde außerdem gezeigt, dass B-7 defiziente Mäuse eine abgeschwächte EAE entwickeln, somit wurde den kostimulatorischen Molekülen krankheitsfördernde Eigenschaften bei der MS zugeschrieben [Chang et al., 1999]. CD80 und CD86 sind außerdem auf Gedächtnis B-Zellen von MS Patienten hochreguliert, was darauf hindeuten könnte, dass sie dort als lokale APCs dienen und die T-Zellen-Aktivierung im ZNS aufrecht erhalten [Liu et al., 1995; Corcione et al., 2004]. Die erhöhte Expression des CD80 Oberflächenmoleküls, könnte darauf hinweisen, dass sich die B-Zellen unter GA Einfluss zu effektiveren APCs entwickeln. In unseren in vitro Untersuchungen fand sich unter GA Einfluss eine dosisabhängige Steigerung der CD80 Expression, für CD86 konnte eine solche Steigerung nur sehr diskret festgestellt werden. Bei unseren Ergebnissen bezüglich der kostimulatorischen Moleküle, liegt der Gedanke nahe, dass die gesteigerte Expression die APC Funktion von B-Zellen in Richtung proinflammatorischer Effektorfunktionen verändern könnte. Dies wirft die Frage auf, ob die hochregulierten kostimulatorischen Moleküle bedeutsam für den therapeutischen Effekt des GA sind, ein hinsichtlich der Wirkung irrelevantes Epiphänomen darstellen, oder sogar den therapeutischen Effekt partiell antagonisieren.

Auch CD40, ein weiteres kostimulatorisches Oberflächenmolekül hat eine zentrale Rolle bei der Generierung einer effektiven Immunantwort und ist somit auch bedeutsam bei der Pathogenese autoimmuner Erkrankungen [Grammer et al., 2003]. CD40 wird auf der Oberfläche verschiedenster Zellen, darunter auch B-Zellen exprimiert. Sein Ligand CD154 findet sich bei der MS vor allem auf aktivierten CD4⁺ T-Zellen [Gerritse et al., 1996]. Außerdem wird durch aktivierte APCs die CD40 Expression auf diesen hochreguliert [Iezzi et al., 2009]. Die Bedeutsamkeit der CD40/CD154 Interaktion auf APCs wird dadurch unterstrichen, dass Mäuse, die kein CD154 exprimieren können, resistent gegenüber der EAE sind [Grewal et al., 1996]. In unseren Untersuchungen versuchten wir GA behandelte Milz-B-Zellen und

Vorläufer-B-Zellen mit 10µg/ml CD40 zu stimulieren, um auch hier die Auswirkung des GA auf die Funktion der B-Zelle als APC zu untersuchen. Die Ergebnisse waren jedoch uneindeutig, was zum Teil mit einer überschießenden Stimulation zusammenhängen könnte.

Um funktionelle Auswirkungen aller bislang beschriebenen phänotypischen Veränderungen, die sich in unseren Untersuchungen unter GA Einfluss zeigten, zu bestimmen, müsste die APC Funktion der B-Zellen auf die Entwicklung naiver T-Zellen untersucht werden. Nur so kann genau ermittelt werden, auf welche Weise die Modulation der B-Zellen durch GA die Differenzierung der T-Zellen funktionell beeinflusst. Hierzu müssten GA behandelte B-Zellen mit naiven T-Zellen in Kultur gegeben werden. Durch solche Kokulturen könnte die Wirkung der zuvor mit GA behandelten B-Zellen auf naive Th-Zellen näher beobachtet werden. Von besonderem Interesse wäre die Frage, welchen weiteren Differenzierungsweg die Th-Zellen nach Kontakt mit den B-Zellen einschlagen und ob eine Veränderung in ihrer Zytokinsekretion zu verzeichnen ist. Hierbei könnte festgestellt werden welchen Einfluss die gesteigerte TGF-beta und IL-6 Produktion auf die weitere Differenzierung der T-Zellen hat. Überwiegt hierbei die TGF-beta Wirkung und es kommt vermehrt zu Treg Zellen oder werden durch das IL-6 getriggert mehr inflammatorische Th17 Zellen generiert? Auch die Auswirkung des hochregulierten CD80 Moleküls auf die T-Zellen könnte so genauer beleuchtet werden. Wird dadurch die Differenzierung der naiven T-Zellen beeinflusst? Werden durch eine verstärkte kostimulatorische Aktivierung getriggert, vermehrt inflammatorische Zytokine gebildet oder wird dennoch, durch den Rezeptorstatus der Th-Zelle bedingt eine antiinflammatorische Antwort unterstützt?

Als zusätzliche Ergänzung zu unseren Untersuchungen sollte betrachtet werden, ob die dargestellten in vitro Befunde auch in vivo zu zeigen sind. Es wäre sinnvoll zu überprüfen, ob sich die Ergebnisse beider Untersuchungsmodalitäten, in vitro und in vivo, entsprechen und somit letztendlich auf den Mensch übertragen werden können. In einer neueren in vivo Studie wurde demonstriert, dass adoptiver Transfer von B-Zellen aus GA behandelten Mäusen, bei erkrankten Tieren eine EAE mildern konnten. Darüber hinaus zeigte eine GA Behandlung bei B-Zell defizienten Mäusen mit aktiver EAE keine Wirkung [Kala et al., 2010]. Durch weitere in vivo Untersuchungen wäre es möglich die Frage zu beantworten, ob die von uns gezeigten funktionellen Veränderungen der B-Zellen hierbei eine Rolle spielen

könnten. Letztendlich bestünde die Möglichkeit, dass auf unseren Ergebnissen beruhende in vivo Versuche möglicherweise zu einem tieferen Verständnis der über B-Zellen vermittelten GA Auswirkungen auf den menschlichen Organismus und das Krankheitsgeschehen der MS führen. Zuvor sollte allerdings beachtet werden, dass die im Maus-Modell erarbeiteten Hypothesen auf die GA-Behandlung des Menschen übertragbar sind und sich in diesen widerspiegeln lassen.

Im Ausblick auf die Zukunft wäre es eine wertvolle Errungenschaft durch in vitro Versuche das Ansprechen auf eine GA Therapie vorhersagen zu können. Dies wäre insofern ein Gewinn, da bestimmte Patienten unter GA Behandlung nicht von dem Medikament zu profitieren scheinen, während bei anderen die Therapie zu einer langfristigeren Stabilisierung der Krankheit führt [Weber et al., 2004]. Die MS ist eine sehr heterogene Erkrankung mit unterschiedlichen Verlaufsformen. Sie unterscheidet sich auch histologisch durch unterschiedliche Läsionsmuster in Biopsien. Es scheint denkbar, dass GA nur bei einem bestimmten B-Zell oder T-Zell Phänotyp in MS Patienten wirkt. Falls durch GA Behandlung an B-Zellen hervorgerufene Veränderungen, z.B. nur bei einem bestimmten Patientenkollektiv auftreten würden, ließe sich hierdurch möglicherweise prognostizieren, welche Patienten von der Therapie profitieren würden. Wenn es möglich wäre von GA hervorgerufene Veränderungen in vitro, als prognostisches Instrumentarium für die Wirksamkeit einer Therapie mit diesem Medikament zu nutzen, wäre dies ein entscheidender Fortschritt in der MS-Therapie, da primäre Therapieversager möglichst noch vor Beginn einer längerfristigen Behandlung identifiziert werden könnten. Für einen solchen evidenzbasierten subtypenspezifischen Therapieansatz wäre die Entwicklung verlässlicher spezifischer Laborbefunde ein entscheidender Fortschritt. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt lässt sich jedoch noch nicht sagen, ob die durch GA an B-Lymphozyten hervorgerufenen funktionellen Veränderungen tatsächlich bedeutsam sind für die therapeutische Wirkung von GA. Dies müsste, wie bereits beschrieben, zunächst in Krankheitsmodellen und später an Patienten demonstriert werden.

Eine aktuell sehr wirksame neue Therapieoption zur Behandlung der RR-MS scheint die B-Zell-Depletion mittels dem CD20 Antikörper Rituximab darzustellen. Eine GA Behandlung nach erfolgter Depletion könnte hierbei durch die zusätzliche Wirkung auf APC und T-Zellen die Therapie ergänzen und eine Möglichkeit darstellen, die nachreifenden B-Zellen funktionell zu beeinflussen. Würden durch die Behandlung

mit GA vermehrt regulatorische B-Zellen, anstatt krankheitsfördernden B-Lymphozyten nachreifen und persistieren, könnte dies dazu führen, dass die Differenzierung der T-Zellen vermehrt zu antiinflammatorischen Th2-Zellen und Treg gelenkt würde. Somit könnte eventuell die Wirkung des Rituximab klinisch potenziert und verlängert werden. Auch ist eine B-Zell Depletion nicht über eine unbegrenzte Dauer hinweg möglich. Deswegen könnte die modulatorische Wirkung des GA die Beendigung einer Depletionstherapie erleichtern und eine gute Anschlussstherapie darstellen. Die viel versprechenden Antikörpertherapien könnten in Zukunft die Therapie der MS prägen. Allerdings sind sie mit erhöhten Risiken verbunden, die bei der aktuell bestehenden Hauptindikation zur Therapie von malignen Lymphomen vernachlässigbar erscheinen. Es sollte beachtet werden, dass es sich bei der MS zwar um eine äußerst einschränkende Erkrankung handelt, die oft mit schweren Behinderungen einhergeht, jedoch ist die MS eine Erkrankung mit einer relativ geringen Mortalität. Dies ist dem erhöhten Risikoprofil der Antikörpertherapien entgegenzustellen und umso mehr wäre eine vorhersagbare profitable Behandlung mit dem risikoarmen GA eine sehr wertvolle Errungenschaft und lohnt weitere Untersuchungen in diesem Gebiet. Insgesamt kann man festhalten, dass B-Lymphozyten in komplexer Weise in der Pathogenese autoimmuner entzündlicher ZNS Erkrankungen involviert sind. In unseren in vitro Untersuchungen konnten wir demonstrieren, dass B-Zellen, welche ein immer bedeutenderes Ziel von MS Therapien darstellen, unter GA Behandlung funktionell beeinflusst werden. In weiteren Studien muss nun bestimmt werden, ob diese Veränderungen auch in vivo bestätigt werden können und sich hierdurch therapeutische Konsequenzen in der Behandlung der MS ergeben könnten.

6. Zusammenfassung

Hintergrund: Die Multiple Sklerose zählt zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen, die bereits im frühen Erwachsenenalter zu einer dauerhaften Behinderung führen kann. Sie stellt eine chronisch-entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems dar, deren Verlauf einer breiten Heterogenität unterliegt. Während die Ätiologie bislang nicht vollständig geklärt ist, mehren sich Befunde die nahelegen, dass B-Zellen sowohl als Quelle der antikörperproduzierenden Plasmazellen, als auch als Antigen-präsentierende Zellen einen entscheidenden Beitrag zum Krankheitsgeschehen beitragen. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es daher, die Auswirkung des bereits zur Behandlung der Multiplen Sklerose eingesetzten immunmodulatorischen Medikaments Glatirameracetat auf zelluläre B-Zell-Funktionen zu untersuchen.

Methoden: Aus Knochenmark und Milz weiblicher C57Bl/6 Mäuse wurden unreife bzw. reife B-Lymphozyten mittels Magnetisch aktivierter Zellsortierung isoliert. In Zellkulturen wurden diese in Gegenwart steigender Konzentrationen von Glatirameracetat entweder mit Lipopolysaccharid oder Interleukin-4 stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mittels FACS auf die Oberflächenmoleküle CD80, CD86, CD25, CD69 und LAP (\triangleq TGF-beta Produktion) untersucht sowie die Interleukin-6 Produktion mittels ELISA bestimmt.

Ergebnisse: Als vorrangige Ergebnisse konnten wir zeigen, dass reife, aus der Milz isolierte B-Zellen unter dem Einfluss von Glatirameracetat eine erhöhte Expression des Aktivierungsmarkers CD25 aufweisen. Außerdem zeigte sich sowohl auf reifen B-Zellen, wie auch auf unreifen B-Zellen aus dem Knochenmark, eine dosisabhängige Steigerung der Expression des kostimulatorischen Moleküls CD80. Zudem modulierte Glatirameracetat die Interleukin-6 Sekretion von reifen B-Zellen; während niedrige GA Konzentrationen die IL-6 Sekretion zunächst förderten, war dieser Effekt bei höheren Konzentrationen nicht mehr nachzuweisen. Schließlich konnten wir zeigen, dass unreife B-Zellen aus dem Knochenmark, eine deutlich gesteigerte LAP Expression und damit eine gesteigerte TGF-beta Produktion unter Glatirameracetat Behandlung aufweisen.

Schlussfolgerung: Unsere Untersuchungen legen nahe, dass GA einen modulierenden Einfluss auf die APC-Funktion der B-Zellen ausübt. Insbesondere die gesteigerte TGF-beta Produktion könnte darauf hinweisen, dass GA behandelte B-

Zellen die Entwicklung regulatorischer T-Zellen fördern könnten. Welche funktionellen Konsequenzen sich im Detail aus den phänotypischen Beobachtungen im Rahmen dieses Projekts ergeben, wird sich letztlich nur in Kokulturen klären lassen, in denen GA-behandelte B-Lymphozyten naive T-Lymphozyten aktivieren. Für die klinische Relevanz der erhobenen Befunde wird bedeutsam sein, ob die in vivo GA Behandlung sowohl in präklinischen Modellen, als auch in der MS selbst ähnliche Veränderungen auf B-Zellen hervorruft.

7. Summary

Background: Multiple sclerosis is one of the most common neurological disorders that can lead to permanent disability in early adulthood. MS is a chronic inflammatory, demyelinating disease of the central nervous system. Its clinical course is heterogeneous and the aetiology is not fully understood at present. Several studies revealed that B cells might have a significant role in the pathogenesis of multiple sclerosis both as source of antibody-secreting plasma cells and as antigen presenting cells. In our work, we intended to reveal the effect of the approved MS drug glatiramer acetate on cellular B cell functions.

Methods: Immature and mature B-lymphocytes were isolated from the bone marrow and spleen of C57Bl/6 mice by Magnetic Activated Cell Sorting. B-cells were activated either with IL-4 or LPS in the presence of increasing concentrations of glatiramer acetate. After incubation, the surface molecules CD80, CD86, CD25, CD69 and LAP (\cong TGF-beta production) were analysed by FACS and the production of IL-6 was evaluated by ELISA.

Results: We found an increased expression of the activation marker CD25 on mature B lymphocytes isolated from the spleen under the influence of glatiramer acetate. Furthermore, we observed a dose-dependent increase of the costimulatory surface molecule CD80 both on mature B-cells and on progenitor cells isolated from bone marrow. Additionally, glatiramer acetate modulated the IL-6 secretion by B-cells. Finally, we revealed that under the influence of glatiramer acetate progenitor B-cells expressed increased level of LAP, representing an enhanced TGF-beta production.

Interpretation: In our studies, we show that glatiramer acetate modulates the B cell phenotype. In particular the increased production of TGF-beta could indicate that GA-treated B-cells may play an important role for development and maintenance of regulatory T cells. Ultimately, the functional consequences of the observed changes in the B-cell phenotype will be evaluated in future studies using GA-treated B-cells to activate naive T-cells. Regarding the clinical relevance of our findings it will be crucial whether the observed in vitro effects on B-cells may translate to in vivo glatiramer acetate treatment of both EAE and MS.

8. Literaturverzeichnis

- Aharoni, R.; Teitelbaum, D.; Sela, M.; Arnon, R. (1998): Bystander suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by T cell lines and clones of the Th2 type induced by copolymer 1. In: *Journal of neuroimmunology*, Jg. 91, H. 1-2, S. 135–146.
- Akira, S.; Taga, T.; Kishimoto, T. (1993): Interleukin-6 in biology and medicine. In: *Advances in immunology*, Jg. 54, S. 1–78.
- Amu, S.; Gjertsson, I.; Brisslert, M. (2010): Functional characterization of murine CD25 expressing B cells. In: *Scandinavian journal of immunology*, Jg. 71, H. 4, S. 275–282.
- Archelos, J.J.; Storch, M.K.; Hartung, H.P. (2000): The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. In: *Annals of neurology*, Jg. 47, H. 6, S. 694-706
- Arnon, R. (1996): The development of Cop 1 (Copaxone), an innovative drug for the treatment of multiple sclerosis: personal reflections. In: *Immunology letters*, Jg. 50, H. 1-2, S. 1–15.
- Arnon, R.; Aharoni, R. (2007): Neurogenesis and neuroprotection in the CNS--fundamental elements in the effect of Glatiramer acetate on treatment of autoimmune neurological disorders. In: *Molecular neurobiology*, Jg. 36, H. 3, S. 245–253.
- Begum-Haque, S.; Sharma, A.; Kasper, I. R.; Foureau, D. M.; Mielcarz, D. W.; Haque, A.; Kasper, L. H. (2008): Downregulation of IL-17 and IL-6 in the central nervous system by glatiramer acetate in experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *Journal of neuroimmunology*, Jg. 204, H. 1-2, S. 58–65.
- Bjartmar, C.; Wujek, J.R.; Trapp, B.D. (2003): Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. In: *Journal of the neurological sciences*, Jg. 206, H. 2, S. 165-171.
- Brenner, T.; Arnon, R.; Sela, M.; Abramsky, O.; Meiner, Z.; Riven-Kreitman, R.; Tarcik N, Teitelbaum D. (2001): Humoral and cellular immune responses to Copolymer 1 in multiple sclerosis patients treated with Copoxane. In: *Journal of neuroimmunology*, Jg. 115, H. 1-2, S. 152-160.
- Brisslert, M.; Bokarewa, M.; Larsson, P.; Wing, K.; Collins, L. V.; Tarkowski, A. (2006): Phenotypic and functional characterization of human CD25+ B cells. In: *Immunology*, Jg. 117, H. 4, S. 548–557.
- Brønnum-Hansen, H.; Koch-Henriksen, N.; Stenager, E. (2004): Trends in survival and cause of death in Danish patients with multiple sclerosis. In: *Brain: a journal of neurology*, Jg. 127, H. Pt 4, S. 844-850.
- Bugeon, L.; Dallman, M. J. (2000): Costimulation of T cells. In: *American journal of respiratory and critical care medicine*, Jg. 162, H. 4 Pt 2, S. S164-168.
- Carreno, B. M.; Collins, M. (2002): The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. In: *Annual review of immunology*, Jg. 20, S. 29–53.

- Cepok, S.; Rosche, B.; Grummel, V.; Vogel, F.; Zhou, D.; Sayn, J.; Sommer, N.; Hartung, H. P.; Hemmer, B. (2005): Short-lived plasma blasts are the main B cell effector subset during the course of multiple sclerosis. In: *Brain : a journal of neurology*, Jg. 128, H. Pt 7, S. 1667–1676.
- Chang, T. T.; Jabs, C.; Sobel, R. A.; Kuchroo, V. K.; Sharpe, A. H. (1999): Studies in B7-deficient mice reveal a critical role for B7 costimulation in both induction and effector phases of experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *The Journal of experimental medicine*, Jg. 190, H. 5, S. 733–740.
- Coles, A. J.; Wing, M. G.; Molyneux, P.; Paolillo, A.; Davie, C. M.; Hale, G.; Miller D.; Waldmann, H.; Compston, A. (1999): Monoclonal antibody treatment exposes three mechanisms underlying the clinical course of multiple sclerosis. In: *Annals of neurology*, Jg. 46, H. 3, S. 296–304.
- Compston, A.; Coles, A. (2008): Multiple sclerosis. In: *Lancet*, Jg. 372, H. 9648, S. 1502–1517.
- Confavreux, C.; Vukusic, S. (2006): Age at disability milestones in multiple sclerosis. In: *Brain : a journal of neurology*, Jg. 129, H. Pt 3, S. 595–605.
- Constant, S.; Sant'Angelo, D.; Pasqualini, T.; Taylor, T.; Levin, D.; Flavell, R.; Bottomly, K. (1995): Peptide and protein antigens require distinct antigen-presenting cell subsets for the priming of CD4+ T cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, Jg. 154, H. 10, S. 4915–4923.
- Constant, S.; Schweitzer, N.; West, J.; Ranney, P.; Bottomly, K. (1995): B lymphocytes can be competent antigen-presenting cells for priming CD4+ T cells to protein antigens in vivo. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, Jg. 155, H. 8, S. 3734-3741.
- Corcione, A.; Casazza, S.; Ferretti, E.; Giunti, D.; Zappia, E.; Pistorio, A.; Gambini, C.; Mancardi, G. L.; Uccelli, A.; Pistoia, V. (2004): Recapitulation of B cell differentiation in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 101, H. 30, S. 11064–11069.
- Dass, S.; Vital, E. M.; Emery, P. (2007): Development of psoriasis after B cell depletion with rituximab. In: *Arthritis and rheumatism*, Jg. 56, H. 8, S. 2715-2718.
- Davis, M. M.; Bjorkman, P. J. (1988): T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. In: *Nature*, Jg. 334, H. 6181, S. 395–402.
- Duddy, M.; Bar-Or, A. (2006): B-cells in multiple sclerosis. In: *International MS journal/ MS Forum*, Jg. 13, H. 3, S. 84-90.
- Fillatreau, S.; Sweenie, C. H.; McGeachy, M. J.; Gray, D.; Anderton, S. M. (2002): B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. In: *Nature immunology*, Jg. 3, H. 10, S. 944–950.
- Fridkis-Hareli, M.; Teitelbaum, D.; Gurevich, E.; Pecht, I.; Brautbar, C.; Kwon, O. J., Brenner, T.; Arnon, R.; Sela, M. (1994): Direct binding of myelin basic protein and synthetic copolymer 1 to class II major histocompatibility complex molecules on living antigen-presenting cells--specificity and promiscuity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 91, H. 11, S. 4872–4876.

- Frohman, E. M.; Racke, M. K.; Raine, C. S. (2006): Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. In: *The New England journal of medicine*, Jg. 354, H. 9, S. 942–955.
- Gerritse, K.; Laman, J. D.; Noelle, R. J.; Aruffo, A.; Ledbetter, J. A.; Boersma, W. J.; Claassen, E. (1996): CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 93, H. 6, S. 2499–2504.
- Gilgun-Sherki, Y.; Panet, H.; Holdengreber, V.; Mosberg-Galili, R.; Offen, D. (2003): Axonal damage is reduced following glatiramer acetate treatment in C57/bl mice with chronic-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *Neuroscience research*, Jg. 47, H. 2, S. 201-207.
- Goetz, M.; Atreya, R.; Ghalibafian, M.; Galle, P.R.; Neurath, M.F. (2007): Exacerbation of ulcerative colitis after rituximab salvage therapy. In: *Inflammatory bowel diseases*, Jg. 13, H. 11, S. 1365-1368.
- Grammer, A. C.; Slota, R.; Fischer, R.; Gur, H.; Girschick, H.; Yarboro, C.; Illei, G.G.; Lipsky, P.E. (2003): Abnormal germinal center reactions in systemic lupus erythematosus demonstrated by blockade of CD154-CD40 interactions. In: *The Journal of clinical investigation*, Jg. 112, H. 10, S. 1506–1520.
- Grewal, I. S.; Foellmer, H. G.; Grewal, K. D.; Xu, J.; Hardardottir, F.; Baron, J. L.; Janeway C.A. Jr.; Flavell, R.A. (1996): Requirement for CD40 ligand in costimulation induction, T cell activation, and experimental allergic encephalomyelitis. In: *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 273, H. 5283, S. 1864–1867.
- Hauser, S. L.; Oksenberg, J. R. (2006): The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. In: *Neuron*, Jg. 52, H. 1, S. 61–76.
- Hauser, S. L.; Waubant, E.; Arnold, D. L.; Vollmer, T.; Antel, J.; Fox, R. J.; Bar-Or, A.; Panzara, M.; Sarkar, N.; Agarwal, S.; Langer-Gould, A.; Smith C.H.; HERMES Trial Group (2008): B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. In: *The New England journal of medicine*, Jg. 358, H. 7, S. 676-688.
- Hawker, K.; O'Connor, P.; Freedman, M. S.; Calabresi, P. A.; Antel, J.; Simon, J.; Hauser, S.; Waubant, E.; Vollmer, T.; Panitch, H.; Zhang, J.; Chin, P.; Smith, C.H.; OLYMPUS trial group (2009): Rituximab in patients with primary progressive multiple sclerosis: results of a randomized double-blind placebo-controlled multicenter trial. In: *Annals of neurology*, Jg. 66, H. 4, S. 460-471.
- Iezzi, G.; Sonderegger, I.; Ampenberger, F.; Schmitz, N.; Marsland, B. J.; Kopf, M. (2009): CD40-CD40L cross-talk integrates strong antigenic signals and microbial stimuli to induce development of IL-17-producing CD4+ T cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 106, H. 3, S. 876–881.
- Jee, Y.; Piao, W. H.; Liu, R.; Bai, X. F.; Rhodes, S.; Rodebaugh, R.; Campagnolo, D.I.; Shi, F.D.; Vollmer, T. (2007): CD4(+)CD25(+) regulatory T cells contribute to the therapeutic effects of glatiramer acetate in experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, Jg. 125, H. 1, S. 34–42.
- Johns, L. D.; Flanders, K. C.; Ranges, G. E.; Sriram, S. (1991): Successful treatment of experimental allergic encephalomyelitis with transforming growth factor-beta 1. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, Jg. 147, H. 6, S. 1792–1796.

- Johnson, K. P.; Brooks, B. R.; Cohen, J. A.; Ford, C. C.; Goldstein, J.; Lisak, R. P.; Myers, L.W.; Panitch, H.S.; Rose, J.W.; Schiffer, R.B.; Vollmer, T.; Weiner, L.P.; Wolinsky, J.S. (1995): Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. In: *Neurology*, Jg. 45, H. 7, S. 1268–1276.
- Johnson, K. P.; Brooks, B. R.; Cohen, J. A.; Ford, C. C.; Goldstein, J.; Lisak, R. P.; Myers, L.W.; Panitch, H.S.; Rose, J.W.; Schiffer, R.B.; Vollmer, T.; Weiner, L.P.; Wolinsky, J.S. (1998): Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. In: *Neurology*, Jg. 50, H. 3, S. 701–708.
- Kala, M.; Rhodes, S. N.; Piao, W.-H.; Shi, F.-D.; Campagnolo, D. I.; Vollmer, T. L. (2010): B cells from glatiramer acetate-treated mice suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *Experimental neurology*, Jg. 221, H. 1, S. 136–145.
- Karpus, W. J.; Swanborg, R. H. (1991): CD4+ suppressor cells inhibit the function of effector cells of experimental autoimmune encephalomyelitis through a mechanism involving transforming growth factor-beta. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, Jg. 146, H. 4, S. 1163–1168.
- Keegan, M.; König, F.; McClelland, R.; Brück, W.; Morales, Y.; Bitsch, A.; Panitch, H.; Lassmann, H.; Weinshenker, B.; Rodriguez, M.; Parisi, J.; Lucchinetti, C.F. (2005): Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. In: *Lancet*, Jg. 366, H. 9485, S. 579–582.
- Kehrl, J. H.; Thevenin, C.; Rieckmann, P.; Fauci, A. S. (1991): Transforming growth factor-beta suppresses human B lymphocyte Ig production by inhibiting synthesis and the switch from the membrane form to the secreted form of Ig mRNA. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, Jg. 146, H. 11, S. 4016–4023.
- Kempster, P. A.; Rollinson, R. D. (2008): The Lhermitte phenomenon: variant forms and their significance. In: *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, Jg. 15, H. 4, S. 379–381.
- Kim, H.J.; Ifergan, I.; Antel, J. P.; Seguin, R.; Duddy, M.; Lapierre, Y.; Jalili, F.; Bar-Or, A. (2004): Type 2 monocyte and microglia differentiation mediated by glatiramer acetate therapy in patients with multiple sclerosis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, Jg. 172, H. 11, S. 7144–7153.
- Korn, T.; Bettelli, E.; Oukka, M.; Kuchroo, V. K. (2009): IL-17 and Th17 Cells. In: *Annual review of immunology*, Jg. 27, S. 485–517.
- Kornek, B.; Storch, M. K.; Weissert, R.; Wallstroem, E.; Stefferl, A.; Olsson, T.; Lington, 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. In: *The American journal of pathology*, Jg. 157, H. 1, S. 267–276.
- Kuruvilla, A. P.; Shah, R.; Hochwald, G. M.; Liggitt, H. D.; Palladino, M. A.; Thorbecke, G. J. (1991): Protective effect of transforming growth factor beta 1 on experimental autoimmune diseases in mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 88, H. 7, S. 2918–2921.

- Langrish, C. L.; Chen, Y.; Blumenschein, W. M.; Mattson, J.; Basham, B.; Sedgwick, J. D.; McClanahan, T.; Kastelein, R.A.; Cua, D.J. (2005): IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. In: *The Journal of experimental medicine*, Jg. 201, H. 2, S. 233–240.
- Lee, G.; Ellingsworth, L. R.; Gillis, S.; Wall, R.; Kincade, P. W. (1987): Beta transforming growth factors are potential regulators of B lymphopoiesis. In: *The Journal of experimental medicine*, Jg. 166, H. 5, S. 1290–1299.
- Lenschow, D. J.; Walunas, T. L.; Bluestone, J. A. (1996): CD28/B7 system of T cell costimulation. In: *Annual review of immunology*, Jg. 14, S. 233–258.
- Letterio, J.J. (2000): Murine models define the role of TGF-beta as a master regulator of immune cell function. In: *Cytokine & growth factor reviews*, Jg. 11, H. 1-2, S. 81-87.
- Li, Y.; Chu, N.; Hu, A.; Gran, B.; Rostami, A.; Zhang, G.-X. (2007): Increased IL-23p19 expression in multiple sclerosis lesions and its induction in microglia. In: *Brain : a journal of neurology*, Jg. 130, H. Pt 2, S. 490–501.
- Liu, Y. J.; Barthélémy, C.; Bouteiller, O. de; Arpin, C.; Durand, I.; Banchereau, J. (1995): Memory B cells from human tonsils colonize mucosal epithelium and directly present antigen to T cells by rapid up-regulation of B7-1 and B7-2. In: *Immunity*, Jg. 2, H. 3, S. 239–248.
- Lucchinetti, C.; Brück, W.; Parisi, J.; Scheithauer, B.; Rodriguez, M.; Lassmann, H. (2000): Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. In: *Annals of neurology*, Jg. 47, H. 6, S. 707–717.
- Lundmark, F.; Duvefelt, K.; Iacobaeus, E.; Kockum, I.; Wallström, E.; Khademi, M., Oturai, A.; Ryder, L.P.; Saarela, J.; Harbo, H.F.; Celius, E.G.; Salter, H.; Olsson, T.; Hillert, J. (2007): Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis. In: *Nature genetics*, Jg. 39, H. 9, S. 1108–1113.
- Lyons, J.A.; San, M.; Happ, M.P.; Cross, A.H. (1999): B cells are critical to induction of experimental allergic encephalomyelitis by protein but not by a short encephalitogenic peptide. In: *European journal of immunology*, Jg. 29, H. 11, S. 3432-3439.
- Magliozzi, R.; Columba-Cabezas, S.; Serafini, B.; Aloisi, F. (2004): Intracerebral expression of CXCL13 and BAFF is accompanied by formation of lymphoid follicle-like structures in the meninges of mice with relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *Journal of neuroimmunology*, Jg. 148, H. 1-2, S. 11–23.
- Magliozzi, R.; Howell, O.; Vora, A.; Serafini, B.; Nicolas, 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. In: *Brain: a journal of neurology*, Jg. 130, H. Pt 4, s. 1089-1104.
- Mann, M. K.; Maresz, K.; Shriver, L. P.; Tan, Y.; Dittel, B. N. (2007): B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, Jg. 178, H. 6, S. 3447–3456.

- 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. In: *Annals of neurology*, Jg. 59, H. 6, S. 880–892.
- Menge, T.; Büdingen, H-C; Dalakas, M.C.; Kieseier, B.C.; Hartung, H-P (2009): [Targeting B cells in multiple sclerosis. Current concepts and strategies]. In: *Der Nervenarzt*, Jg. 80, H. 2, S. 190-198.
- Nabavi, N.; Freeman, G. J.; Gault, A.; Godfrey, D.; Nadler, L. M.; Glimcher, L. H. (1992): Signalling through the MHC class II cytoplasmic domain is required for antigen presentation and induces B7 expression. In: *Nature*, Jg. 360, H. 6401, S. 266–268.
- Neuhaus, O.; Farina, C.; Wekerle, H.; Hohlfeld, R. (2001): Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis. In: *Neurology*, Jg. 56, H. 6, S. 702–708.
- Neuhaus, O.; Farina, C.; Yassouridis, A.; Wiendl, H.; Then Bergh, F.; Dose, T.; Wekerle, H.; Hohlfeld, R. (2000): Multiple sclerosis: comparison of copolymer-1- reactive T cell lines from treated and untreated subjects reveals cytokine shift from T helper 1 to T helper 2 cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 97, H. 13, S. 7452–7457.
- Noseworthy, J. H.; Lucchinetti, C.; Rodriguez, M.; Weinshenker, B. G. (2000): Multiple sclerosis. In: *The New England journal of medicine*, Jg. 343, H. 13, S. 938–952.
- Pearce, J. M. S. (2005): Historical descriptions of multiple sclerosis. In: *European neurology*, Jg. 54, H. 1, S. 49–53.
- Polman, C. H.; Reingold, S. C.; Edan, G.; Filippi, M.; Hartung, H.-P.; Kappos, L.; Lublin, F.D.; Metz, L.M.; McFarland, H.F.; O'Connor, P.W.; Sandberg-Wollheim, M.; Thompson, A.J.; Weinshenker, B.G.; Wolinsky, J.S. (2005): Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". In: *Annals of neurology*, Jg. 58, H. 6, S. 840–846.
- Ronchese, F.; Hausmann, B. (1993): B lymphocytes in vivo fail to prime naïve T cells but can stimulate antigen-experienced T lymphocytes. In: *The journal of experimental medicine*, Jg. 177, H. 3, S. 679-690.
- Sancho, D.; Gómez, M.; Sánchez-Madrid, F. (2005): CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. In: *Trends in immunology*, Jg. 26, H. 3, S. 136–140.
- Schwartz, R. H. (2003): T cell anergy. In: *Annual review of immunology*, Jg. 21, S. 305–334.
- 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. In: *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, Jg. 14, H. 2, S. 164-174.
- Slavin, A. J.; Soos, J. M.; Stuve, O.; Patarroyo, J. C.; Weiner, H. L.; Fontana, A.; Bikoff, E.K.; Zamvil, S.S. (2001): Requirement for endocytic antigen processing and influence of invariant chain and H-2M deficiencies in CNS autoimmunity. In: *The Journal of clinical investigation*, Jg. 108, H. 8, S. 1133–1139.
- Smedt, T. de; van Mechelen, M.; Becker, G. de; Urbain, J.; Leo, O.; Moser, M. (1997): Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. In: *European journal of immunology*, Jg. 27, H. 5, S. 1229–1235.

- Sospedra, M.; Martin, R. (2005): Immunology of multiple sclerosis. In: Annual review of immunology, Jg. 23, S. 683–747.
- Stüve, O.; Leussink, V. I.; Fröhlich, R.; Hemmer, B.; Hartung, H.-P.; Menge, T.; Kieseier, B. C. (2009): Long-term B-lymphocyte depletion with rituximab in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. In: Archives of neurology, Jg. 66, H. 2, S. 259-261.
- Teitelbaum, D.; Fridkis-Hareli, M.; Arnon, R.; Sela, M. (1996): Copolymer 1 inhibits chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis induced by proteolipid protein (PLP) peptides in mice and interferes with PLP-specific T cell responses. In: Journal of neuroimmunology, Jg. 64, H. 2, S. 209–217.
- Tompkins, S. M.; Padilla, J.; Dal C., Mauro C.; Ting, J., P.-Y.; van Kaer, L.; Miller, S. D. (2002): De novo central nervous system processing of myelin antigen is required for the initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis. In: Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), Jg. 168, H. 8, S. 4173–4183.
- Tzartos, J. S.; Friese, M. A.; Craner, M. J.; Palace, J.; Newcombe, J.; Esiri, M. M.; Fugger, L. (2008): Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. In: The American journal of pathology, Jg. 172, H. 1, S. 146–155.
- Uccelli, A.; Aloisi, F.; Pistoia, V. (2005): Unveiling the enigma of the CNS as a B-cell fostering environment. In: Trends in immunology, Jg. 26, H. 5, S. 254–259.
- Vieira, P. L.; Heystek, H. C.; Wormmeester, J.; Wierenga, E. A.; Kapsenberg, M. L. (2003): Glatiramer acetate (copolymer-1, copoxane) promotes Th2 cell development and increased IL-10 production through modulation of dendritic cells. In: Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), Jg. 170, H. 9, S. 4483-4488.
- Viglietta, V.; Baecher-Allan, C.; Weiner, H. L.; Hafler, D. A. (2004): Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. In: The Journal of experimental medicine, Jg. 199, H. 7, S. 971–979.
- Weber, M. S.; Prod'homme, T.; Patarroyo, J. C.; Molnarfi, N.; Karnezis, T.; Lehmann-Horn, K.; Danilenko, D.M.; Eastham-Anderson, J.; Slavina, A.J.; Linington, C.; Bernard, C.C.; Martin, F.; Zamvil, S.S. (2010): B-cell activation influences T-cell polarization and outcome of anti-CD20 B-cell depletion in central nervous system autoimmunity. In: Annals of neurology, Jg. 68, H. 3, S. 369–383.
- Weber, M. S.; Prod'homme, T.; Youssef, S.; Dunn, S. E.; Rundle, C. D.; Lee, L.; Patarroyo, J. C.; Stüve, O.; Sobel, R. A.; Steinman, L.; Zamvil, S.S. (2007): Type II monocytes modulate T cell-mediated central nervous system autoimmune disease. In: Nature medicine, Jg. 13, H. 8, S. 935-943.
- Weber, M. S.; Starck, M.; Wagenpfeil, S.; Meinl, E.; Hohlfeld, R.; Farina, C. (2004): Multiple sclerosis: glatiramer acetate inhibits monocyte reactivity in vitro and in vivo. In: Brain: a journal of neurology, Jg. 127, H. Pt 6, S. 1370-1378.
- Yanaba, K.; Bouaziz, J.-D.; Matsushita, T.; Magro, C. M.; St Clair, E. W.; Tedder, T. F. (2008): B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease. In: Immunological reviews, Jg. 223, S. 284–299.

- Zhou, L.; Lopes, J. E.; Chong, M. M. W.; Ivanov, I. I.; Min, R.; Victora, G. D.; Shen, Y.; Du, J.; Rubtsov, Y. P.; Rudensky, A. Y.; Ziegler, S. F.; Littman, D. R. (2008): TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. In: *Nature*, Jg. 453, H. 7192, S. 236–240.
- Ziemssen, T. (2005): Modulating processes within the central nervous system is central to therapeutic control of multiple sclerosis. In: *Journal of neurology*, Jg. 252 Suppl 5, S. v38-45.
- Ziemssen, T.; Kümpfel, T.; Klinkert, W. E. F.; Neuhaus, O.; Hohlfeld, R. (2002): Glatiramer acetate-specific T-helper 1- and 2-type cell lines produce BDNF: implications for multiple sclerosis therapy. Brain-derived neurotrophic factor. In: *Brain : a journal of neurology*, Jg. 125, H. Pt 11, S. 2381–2391.
- Zola, H. (2000): Markers of cell lineage, differentiation and activation. In: *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, Jg. 14, H. 3, S. 218–219.

9. Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand im Zeitraum von April 2008 bis Dezember 2011 am Neuro-Kopf-Zentrum des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München. Sie wäre nicht ohne die Unterstützung, den Rat und die Geduld zahlreicher Personen möglich gewesen, bei denen ich mich im Nachfolgenden bedanken möchte.

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hemmer, dem Ärztlichen Direktor des Neuro-Kopf-Zentrums München bedanken, der mir die Möglichkeit gab meine Dissertation in seiner Abteilung zu erstellen.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Betreuer und Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. Martin Weber bedanken. Zum einen für die interessante Aufgabenstellung verbunden mit der Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Andererseits für seine ausgezeichnete und immer freundliche Betreuung in Form einer jederzeit gewährten Unterstützung und für die vielen wertvollen Hinweise und Anregungen, die maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beitrugen.

Mein Dank gilt außerdem Frau Verena Grummel und Herrn Patrick Vollmer die mir mit langjähriger Erfahrung bei vielen kleinen Problemen in der täglichen Laborarbeit stets hilfreich zur Seite standen.

Ich möchte mich weiterhin bei Frau Deetje Hetzenberg bedanken. Für Ihre tatkräftige Unterstützung mit der Laborarbeit und eine immer freundliche und unterhaltsame Zusammenarbeit.

Vor allem danke ich meinem Großvater und meiner Mutter, die mich während meiner gesamten Ausbildung unterstützt haben und mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen.