

Aus der Medizinischen Universitätsklinik
Abteilung Neurologie
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Antiinflammatorische Wirkung von Glatirameracetat:
Rolle des PI(3)K-AKT-GSK3 Signalwegs**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2008

Vorgelegt: von Dan Wang
geboren in Harbin China

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1. Antiinflammatorische Wirkung von Glatirameracetat: Rolle des PI(3)K-AKT-GSK3 Signalwegs	1
2. Antiinflammatory effects of glatirameracetate: role of the PI(3)K-AKT-GSK3 pathway	3
I. Einleitung	5
1. Multiple Sklerose	5
1.1. Allgemeines	5
1.2. Pathologie	5
1.3. Immunologie	6
1.4. Klinik und Verlaufsformen	15
1.5. Glatirameracetat (Copaxone)	17
1.5.1. Geschichte	17
1.5.2. Die Substanz	18
1.5.3. Wirkmechanismen	18
2. Intrazellulärer Signalweg PI3K-AKT-GSK3	21
3. Zielsetzung der Arbeit und Fragestellung	23
II. Material und Methoden	24
1. Materialien	24
2. Methoden	27
2.1. Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC)	27
2.2. Anreicherung der Monozyten über Adhärenz	29
2.3. Anreicherung der Monocyten über magnetische <i>Beads</i>	30
2.4. Zellkultur und –stimulation	30

2.5. Zytotoxizitätsuntersuchungen nach Stimulationsansätzen	33
2.6. Durchführung der Messungen mit ELISA	35
2.7. Durchflußzytometrie	39
3. Statistische Auswertung	41
III. Ergebnisse	42
1. Monozytenisolierung aus peripheren mononukleären Blutzellen	42
1.1. Kombination aus Ficoll-Dichtgradienten und Adhärenz	42
1.2. Kombination aus Ficoll-Dichtgradienten und magnetische Beads	42
2. Nachweis der Reinheit isolierter Monozyten	43
2.1. Die Reinheit isolierter Monozyten über Adhärenz	43
2.2. Die Reinheit isolierter Monozyten über magnetische <i>Beads</i>	44
3. Nachweis intrazellulärer Zytokine	45
3.1. Nachweis der IL-6-Konzentration	45
3.2. Nachweis der IL-10-Konzentration	47
4. Untersuchung der PI(3)K-AKT-GSK3 Signalwege	49
5. Nachweis extrazellulärer LDH-Enzymaktivität	51
IV. Diskussion	53
1. Isolation hochreiner Monozyten	53
2. Nachweis von IL-6- und IL-10-Produktion	54
2.1. Nachweis von IL-6-Produktion	55
2.2. Nachweis von IL-10-Produktion	56
3. Untersuchung der PI(3)K-AKT-GSK3 Signalwege	58
4. Einschränkung und Ausblick	60
Literaturverzeichnis	61
Danksagung	77
Lebenslauf	78

Abkürzungsverzeichnis

AICD	Activation induced cell death
Abb	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Antigen Presenting Cell(Antigenpräsentierende Zelle)
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
DC	Dendritic Cell (Dendritische Zelle)
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EAE	Experimentelle allergische Enzephalomyelitis
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al	et alii
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (Durchflusszytometrie)
FCS	Fetal Calf Serum (Serum von Kälberföten)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreuung)
HLA	Human Leukocyte Antigen
IFN	Interferon
IL	Interleukin
I/R	Ischämie/Reperfusion
IRAK	IL-1 receptor associated kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KDa	KiloDalton
LPS	Lipopolysacharid
MACS	magnetic cell sorting
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MBP	Myelinbasisches Protein
MHC	Major Histocompatibilitäts Complex(Haupthistokompatibilitätskomplex)
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MS	Multiple Sklerose
MyD88	Myeloider Differenzierungsfaktor 88

NFκB	nuclear transcription factor κB
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline (Kochsalzlösung mit Phosphatpuffer)
PE	Phycoerythrin
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
rpm	rotations per minute
RPMI	Kulturmedium, enthält: Penicillin / Streptomycin / L –Glutamin / FCS
RT	Raumtemperatur
SAPK/JNK	stress-activated protein/c-Jun NH2-terminal kinase
SSC	Side Scatter (Seitwärtsstreuung)
TCR	T-Zell-Rezeptor
TH	T-Helfer Lymphozyt
TH-1	T-Helfer-1; proinflammatorische T-Zellen
TH-2	T-Helfer-2; antiinflammatorische T-Zellen
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Regulationszelle
ZNS	Zentrales Nervensystem

Selten verwendete Abkürzungen im Text erläutert

Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose ist eine demyelinisierende Autoimmunerkrankung des ZNS, betrifft vorwiegend junge Erwachsene und führt bei einem Teil der Patienten zu schwerwiegenden Behinderungen. Neben immunsupprimierenden Therapiestrategien werden zunehmend immunmodulierende Therapeutika eingesetzt. Eines dieser Medikamente ist das Glatirameracetat (Copolymer1, Copaxoner), welches nachweislich die Schubhäufigkeit bei der schubförmig remittierenden Form der MS reduziert.

Für Glatirameracetat werden verschiedene Wirkmechanismen postuliert: Blockade der autoaggressiven Th1-Zellen und/oder Immunmodulation mit Verschiebung der T-Zell-Subpopulationen von überwiegend Th1- zu Th2-typischen Zellen und/oder Eliminierung der autoaggressiven Zellen durch vermehrte Apoptoseereignisse.

Wir suchten nach immunmodulatorischen Wirkmechanismen von GLAT an humanen Monozyten unabhängig von einer bisher beschriebenen Blockade der T-Zell oder der Antigenpräsentation. Humane Monozyten wurden aus peripheren mononukleären Blutleukozyten (PBMC) gesunder Spender mittels immunmagnetischer Depletion anderer Zellpopulationen isoliert. Die so gewonnenen Monozyten wurden mit LPS in Gegenwart und Abwesenheit von GLAT stimuliert. Im weiteren Versuch mit LPS-Stimulation, mit oder ohne GLAT, aber mit oder ohne dem PI3K Inhibitor (LY294002) kultiviert. Anschliessend erfolgte eine Analyse der Kulturüberstände auf sezernierte IL-6 und IL-10 mittels ELISA.

Die Inkubation mit GLAT resultierte in einer konzentrations-abhängigen signifikanten Reduktion der Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-6 durch Monozyten ($p < 0,05$). Im Vergleich dazu hatte GLAT keine signifikante Beeinflussung auf die Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10. Die durch GLAT induzierte IL-6-Reduktion wurde von PI3K-Inhibitor (LY294002) signifikant aufgehoben.

Diese Versuchsergebnisse zeigen, dass GLAT die proinflammatorische Zytokin-Produktion von IL-6 signifikant reduziert. Der eindeutige suppressive Effekt von GLAT auf die Produktion des Th1-Zytokins IL-6 liefert einen weiteren Beleg für die

Vermittlung antiinflammatorischer Funktionen von GLAT beim MS-Therapieeinsatz. Weitere Resultate deuten daraufhin, dass der PI3K-AKT Signalweg durch GLAT aktiviert wird und die Aktivierung des PI3K-AKT durch GLAT durch den PI3K-AKT-Inhibitor LY294002 deutlich inhibiert werden kann. Dies spricht dafür, dass antiinflammatorische Wirkung von GLAT möglicherweise durch den PI3K-AKT Signalweg vermittelt wird, was von pathogenetischem, aber auch therapeutischem Interesse ist.

Summary

Multiple sclerosis (MS), a chronic demyelinating disease of the central nervous system (CNS) is the second most important cause of disability in early and middle age in the Western world. Besides immunosuppressive treatment immunomodulators are widely and increasingly used for MS therapy. One of these drugs is the glatirameracetate (copolymer1, copaxoner, GLAT) which reduces the relapse rate of the relapsing-remitting form of MS.

Different mechanisms of action of glatirameracetate have been proposed: 1) blocking of the autoaggressive Th1-lymphocytes. 2) shifting immune reaction towards TH2-weighted cellular immune response. 3) eliminating autoaggressive lymphocytes by increased apoptosis.

We investigated mechanisms of GLAT in humane monocytes, concerning the immunomodulating effects on humane monocytes. Humane monocytes were isolated from peripheral mononuclear blood leukocytes (PBMC) of healthy donors by means of immune-magnetic depletion of other cell populations. The isolated monocytes were cultured with LPS in the presence or absence of GLAT; in another test co-cultured with LPS, with either GLAT or LY294002 (PI3K inhibitor) or with both or neither of GLAT und LY294002 for 24 hours and the concentrations of IL-6 and IL-10 were measured in the supernatants by ELISA.

The culture with GLAT resulted in a significant decrease of the production of IL-6 by monocytes ($p < 0.05$), dependent on concentration of GLAT. In comparison to it, GLAT had no significant effects on the production of IL-10 by monocytes. The decrease of the production of IL-6 induced by GLAT was significantly reversed by LY294002 (PI3K inhibitor).

These results show that GLAT significantly reduces the production of the proinflammatory cytokine IL-6. The suppressive effect of GLAT on the production of IL-6 (Th1 cytokine) by monocytes could be interpreted as further evidence for the antiinflammatory function of GLAT during the therapeutic application for MS. Further experiments indicate that the PI3K-AKT pathway is possibly activated by GLAT and

that the activation of the PI3K-AKT pathway by GLAT can be inhibited by PI3K-AKT inhibitor (LY294002). Together, this work suggests that the anti-inflammatory effect of GLAT possibly through the PI3K-AKT pathway is of pathogenetic, but also therapeutic interest.

I. Einleitung

1. Multiple Sklerose

1.1. Allgemeines

Die Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste entzündlich-demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) in Nordeuropa und Nordamerika. (Hafler *et al.*, 2005; Sospedra u. Martin, 2005). Die Ursache der Multiplen Sklerose (MS) ist bis heute nicht geklärt; aufgrund von klinischen, immunologischen und genetischen Daten geht man jedoch von einer multifaktoriellen Erkrankung aus.

Die pathogenetischen Konzepte sowie die therapeutischen Möglichkeiten der Multiplen Sklerose (MS) befinden sich seit einigen Jahren in grundlegendem Wandel. Fortschritte in der Biotechnologie haben zusammen mit Entwicklungen in der MR-Tomographie und Verbesserungen im klinischen Studiendesign zu einer Vielzahl prüfbarer Therapiemöglichkeiten geführt, wobei der Einsatz der zugelassenen immunmodulatorischen Agentien (β -Interferone, Glatiramerazetat) gegenwärtig einen besonderen Stellenwert hat. Trotz dieser Fortschritte ist die MS bis heute nicht heilbar und das Ziel einer nebenwirkungsarmen und hocheffizienten Therapie bislang nicht erreicht (Hohlfeld *et al.*, 2001; Jai *et al.*, 2006; François *et al.*, 2008).

1.2. Pathologie

Bei der Multiplen Sklerose (MS) handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Pathophysiologisches Hauptmerkmal der MS sind Läsionen der weißen Substanz des ZNS, sogenannte Entmarkungsherde (Plaques). Die Mark- bzw. Myelinscheide wird im ZNS durch Oligodendrozyten gebildet, die sich um das Axon wickeln, als Isolator fungieren und für die Reizleitung eine wichtige Rolle spielen. Ein akuter Schub ist histologisch charakterisiert durch in der weißen Substanz verstreut liegende perivaskuläre entzündliche Infiltrate, die hauptsächlich aus antigenspezifischen autoreaktiven T-Zellen und Makrophagen bestehen (Martino *et al.*, 1998; Sospedra, Martin, 2005;). Wiederholte Episoden einer akuten Entzündungsreaktion im ZNS führen schließlich

zur Schädigung der Myelinscheiden (Entmarkung) und damit zur Störung der neuronalen Erregungsleitung. Bei der chronischen MS findet man in den inaktiven Herden keinen aktiven Myelinabbau, es herrscht eine reaktive fibrilläre Gliose der Astrogliazellen vor, wodurch eine Verhärtung eintritt, die der Krankheit ihren Namen gegeben hat. In diesen chronisch inaktiven Läsionen ist die Anzahl der Oligodendrozyten deutlich reduziert oder sie fehlen komplett. Zur Unterscheidung von aktiven und inaktiven Entmarkungsherden werden vor allem drei Kriterien herangezogen: Bei aktiven Entzündungsherden findet man eine erhöhte Zelldichte, eine unscharfe Begrenzung der Plaques von der Umgebung und die Präsenz von Abbauprodukten (Neutralfett) in den Makrophagen. Der Entstehung der Plaques liegen unterschiedliche pathogenetische Mechanismen zugrunde. Diese Beobachtung haben Konsequenzen für das Verständnis der MS Pathogenese und das Design zukünftiger Therapieansätze. Die Entmarkungsherde treten vor allem an bestimmten Prädilektionsherden auf: bevorzugt periventrikulär, im Hirnstamm, im Kleinhirn, im Rückenmark und im Nervus bzw. Tractus opticus. Neben der Entmarkung spielt die axonale Schädigung eine Rolle vor allem in aktiven MS-Läsionen. Der Entstehungsmechanismus ist noch weitgehend unbekannt; es konnte jedoch in Studien eine Assoziation der Axonschädigung mit der Anzahl von Makrophagen und CD8-positiven T-Lymphozyten in den Läsionen gezeigt werden (Lassmann et al., 1997; Bitsch et al., 2001; Dhib-Jalbut et al., 2007).

1.3. Immunologie

Die Pathomechanismen der Multiplen Sklerose (MS) sind bislang noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt. Nosologisch zählt die MS zu den Autoimmunkrankheiten, da nach dem heutigen Kenntnisstand bei der MS autoreaktive T-Lymphozyten (bzw. T-Zellen) Entzündungsreaktionen hervorrufen, die zu einer Demyelinisierung der Axone führen (Steinman, 1996; Greter et al., 2005). Um die komplexen Vorgänge dieser immunologischen Reaktion besser verstehen zu können, werden hier zunächst mögliche Autoantigene sowie die Zellen des Immunsystems, die bei der MS eine Rolle bei der Auslösung einer Entzündungsreaktion spielen und die Entzündungsmediatoren vorgestellt. Anschließend wird ein zusammenfassender Überblick über den Ablauf der zugrunde liegenden Autoimmunreaktion gegeben. Zu den bislang am besten untersuchten Proteinen, die als Auslöser der

Autoimmunreaktion bei MS in Frage kommen, zählen Bestandteile des Myelins wie das basische Myelinprotein (engl.: *myelin basic protein* = MBP), das Proteolipidprotein (PLP) sowie das myelinassoziierte Glykoprotein (MAG) und das Myelin-Oligodendroglia-Glykoprotein (MOG), die an der Myelinoberfläche lokalisiert sind (Brunner et al., 1989; Chekhonin et al., 2003). Einige allgemein verbreitete virale Proteine, wie z.B. Masern-, Hepatitis B-, Influenza- und Adenoviren, weisen in ihrer Aminosäuresequenz eine große Ähnlichkeit zu diesen Komponenten der Myelinscheide auf. Durch sogenanntes molekulares Mimikry (Kreuzreaktion zwischen viralen oder bakteriellen Antigenen und Autoantigenen) könnte eine unspezifische Aktivierung bzw. Autoimmunisierung der T-Zellen gegen das Myelin erfolgen (Wucherpfennig u. Strominger, 1995; Greter et al., 2005). Die im Zentrum der Immunantwort stehenden T-Zellen sind in der Lage, über ihren spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) Antigene zu erkennen, wenn sie ihnen von körpereigenen, d.h. HLA-identischen Zellen dargeboten werden. HLA-Klasse-I-Moleküle (mit den Gen-Loci HLA-A, -B, -C) finden sich auf nahezu allen Körperzellen, präsentieren vorwiegend endogen produzierte (z.B. virale) Peptide und werden von einer T-Lymphozyten-Subpopulation erkannt, die den Oberflächenmarker CD8 trägt und meist eine zytotoxische Effektorfunktion besitzt. HLA-Klasse-II-Moleküle (mit den Gen-Loci HLA-DP, -DQ, -DR) sind dagegen in der Regel nur auf sogenannten professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wie Monozyten/Makrophagen und B-Lymphozyten (bzw. B-Zellen) vorhanden, können auf anderen Zellen aber z.T. durch die Zytokine Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) induziert werden. Sie werden von CD4-positiven T-Zellen, sogenannten T-Helferzellen erkannt, welche unerlässlich für die Auslösung der Immunantwort sind und nach Aktivierung ihrerseits anderen Immunzellen wie Makrophagen, B-Lymphozyten und zytotoxischen Lymphozyten zu Effektorfunktionen verhelfen. Eine besondere Stellung bezüglich des Immunsystems nimmt das ZNS ein (Wekerle et al., 1986; Dhib-Jalbut et al., 2006; Cassan et al., 2007). Es gilt als „immunprivilegiertes“ Organ, weil das Eindringen von Immunglobulinen, Entzündungsmediatoren und Zellen des Immunsystems erschwert ist (Cassan et al., 2007). Erstens besitzt das ZNS keine lymphatische Drainage, welche den Lymphknoten wie in anderen Organen Antigene zuführen könnte. Zweitens werden im ZNS normalerweise keine HLA-Klasse-II-Moleküle exprimiert (und nur wenig HLA-Klasse-I-Moleküle), ohne die aber Antigene von den T-Zellen nicht erkannt werden können. Und drittens ist das ZNS durch die

Blut-Hirn-Schranke abgedichtet. Die Blut-Hirn-Schranke wird gebildet von einer durch „tight junctions“ abgedichteten Endothelzellschicht mit einer darunterliegenden Basalmembran und einem anschließenden dichten Filz von Astrozyten-Fußfortsätzen. Durch die genannten Umstände kann unter physiologischen Bedingungen eine Immunreaktion nicht innerhalb des ZNS initiiert werden. Allerdings sind außerhalb des ZNS aktivierte T-Zellen in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. In dem Fall, dass diese T-Zellen ein Antigen erkennen, das im ZNS vorkommt, kann eine lokale Schrankenstörung mit perivaskulärem Ödem und entzündlicher Infiltration auftreten. Über die Sekretion von IFN- γ und TNF- α können diese T-Zellen im ZNS die Expression von HLA-Klasse-II-Molekülen auf Astrozyten und Mikrogliazellen induzieren und diese Zellen damit zur Antigenpräsentation befähigen. Durch die Effektormechanismen der aktivierten Immunzellen und die Sekretion toxischer Substanzen kann es schließlich zu Gewebsschädigungen und neurologischen Ausfällen kommen. Die Hypothese einer Immunpathogenese der MS basiert im wesentlichen auf folgenden Beobachtungen (Fierz, 1997, Lassmann et al., 1998. Neumann, 2003; Sospedra und Martin, 2005; Dhib-Jalbut et al., 2006):

1) Von wesentlicher Bedeutung für das Konzept einer Immunpathogenese der MS sind verschiedene Tiermodelle, vor allem die experimentelle allergische Enzephalomyelitis (EAE), die entweder durch Immunisierung eines Versuchstieres (meist Nagern) mit homogenisiertem ZNS-Material bzw. gereinigten Komponenten davon (z.B. myelinbasischem Protein, MBP) oder aber durch Übertragung aktivierter enzephalitogener T-Zellen erzeugt wird. Bei Wahl geeigneter Tierspezies und bestimmter Versuchsbedingungen ähnelt die EAE der MS in Hinblick auf den Verlauf und die Immunhistologie der Läsionen (Lassmann et al., 1993, 1998, Wekerle et al., 1994; Friese et al., 2006).

2) Da das HLA-System eine Schlüsselrolle in der Auslösung und Regulation von Immunreaktionen einnimmt, ist die Assoziation der MS zum HLA-System als Hinweis auf eine Beteiligung des Immunsystems an der Pathogenese der Erkrankung zu werten. Diese Assoziation betrifft vor allem die Gen-Loci DR und DQ der HLA-Klasse-II-Moleküle. Während 50-70% der MS-Kranken HLA-DR2-positiv sind, trifft dies nur für 20-30% der Gesamtbevölkerung zu (Wucherpfennig et al., 1991; Bacellos et al., 2003). Des weiteren könnten Variationen in den Genen, die den T-Zellantigenrezeptor kodieren, so verändert sein, dass sie zu einer fehlgerichteten Immunantwort führen. Es wurden Assoziationen der MS sowohl mit Genen der T-

Zellrezeptor- α -Kette auf Chromosom 14 als auch der β -Kette auf Chromosom 7 gefunden (Oksenberg et al., 1989; Harbo et al., 2007).

3) Die Analyse der MS-Läsionen ergibt, dass die zelluläre Infiltration der frischen Plaques hauptsächlich aus Makrophagen und T-Zellen besteht. Die Anzahl dieser T-Zellen ist im Vergleich zu Normalpersonen erhöht. Wie der immunhistologische Nachweis von Interleukin-2(IL-2)-Rezeptoren auf diesen Zellen zeigt, sind sie zumindest teilweise in aktiviertem Zustand. Eine Expression von HLA-Klasse-II-Molekülen (HLA-DR) ist sowohl auf den T- und B-Zellen als auch auf Makrophagen, Endothelzellen und Astrozyten in den MS-Läsionen nachweisbar. Dies deckt sich mit den oben beschriebenen Mechanismen einer durch aktivierte T-Lymphozyten initiierten Entzündungsreaktion (Traugott et al., 1983, 1985; Olsson et al., 1992; Zhang et al., 1994; Dhib-Jalbut et 2007).

4) Verschiedene immunologische Laborparameter deuten auf eine Immunpathogenese der MS hin. Unter humoralen Parametern ist vor allem die regelmäßig anzutreffende intrathekale Immunglobulinproduktion zu nennen, die sich bei isoelektrischer Fokussierung der Liquorproteine als oligoklonale Banden darstellen (Tourtellotte u. Walsh, 1984; Kuenz et al., 2008). Außerdem gibt es Hinweise für eine intrathekale Aktivierung des Komplementsystems. Auch über eine Beteiligung des zellulären Anteil des Immunsystems berichten zahlreiche pathologische Befunde: Bei 30-50% der Patienten ist die Zellzahl im Liquor erhöht, wobei es sich hauptsächlich um T-Zellen handelt, die zu einem beträchtlichen Teil aktiviert sind (Hafler et al., 1985; Sanders et al., 1986; Frohman et al., 2006). Die klonale Expansion und Persistenz von MBP-spezifischen T-Zellen im Blut konnte bisher nur bei einzelnen MS-Patienten gezeigt werden (Hohlfeld et al., 1995; Wucherpfennig et al., 1994; Hafler et al., 2005; Dhib-Jalbut et 2007). Die oben erwähnten Beobachtungen führen zu folgender Hypothese: Die Immunpathogenese der MS resultiert aus einer T-Zellreaktion, bei der irrtümlicherweise ZNS-Strukturen als Antigene erkannt werden. Die im Blut und Liquor von MS-Patienten gefundene erhöhte Anzahl von autoreaktiven T-Zellen sind gegen zahlreiche ZNS-Myelinbestandteile gerichtet. Wie es zu der initialen Autosensibilisierung der T-Zellen gegen diese Myelinbestandteile kommt, ist jedoch nach wie vor unklar. Man weiß lediglich, dass auch im peripheren Blut von Gesunden autoreaktive T-Zellen nachweisbar sind. Es wird vermutet, dass diese beispielsweise im Rahmen einer Virusinfektion aktiviert werden, wenn das Virus Antigene aufweist, die den

Myelinbestandteilen ähneln. Eine weitere Hypothese vertritt die Ansicht, diese autoreaktiven T-Zellen könnten auch durch das Wegfallen hemmender Regulationsmechanismen stimuliert werden. Ähnlich anderen Autoimmunerkrankungen ist vermutlich das Zusammentreffen mehrerer Faktoren notwendig, um den gewebedestruierenden Prozeß auszulösen. Weitgehend geklärt ist, wie diese aktivierten Myelin-reaktiven T-Zellen (CD4+-T-Zellen) aus dem peripheren Blut durch die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS gelangen und dort zur Autoaggression und damit zur Demyelinisierung führen: Die aktivierten T-Zellen werden mit dem Blutstrom angeschwemmt, verlangsamen ihr Tempo und docken an Adhäsionsmolekülen (u.a. zunächst an Selektin, dann an sog. intrazellulären Adhäsionsmolekülen) an, die in der Gefäßwand sitzen und deren Gegenstück sich auf den T-Zellen befindet. Chemotaktische Signale aus dem ZNS-Parenchym ermöglichen daraufhin die Einwanderung der T-Zellen in das ZNS. Dort angekommen müssen die T-Zellen reaktiviert und zur Vermehrung, d.h. zur Bildung von Zell-Klonen angeregt werden, bevor sie die Autoimmunreaktion auslösen können. Hierzu müssen sie auf das Autoantigen treffen, das ihnen beispielsweise von einer Mikrogliazelle präsentiert wird. Gekennzeichnet sind diese reaktivierten T-Zellen, von denen es einen TH1-Typ und einen TH2-Typ gibt, durch die Ausschüttung ganz bestimmter Zytokine.

TH1-Zellen beeinflussen hauptsächlich die zelluläre Immunität und sezernieren proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-6, Interferon- γ , Lymphotoxin und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), die alle an der zur Demyelinisierung führenden Entzündungsreaktion beteiligt sind. Mit Hilfe dieser Zytokine werden aus dem peripheren Blut eingewanderte oder bereits im ZNS vorhandene Makrophagen und Mikrogliazellen aktiviert, d.h.:

1. die Fähigkeit dieser Zellen zur Phagozytose wird gesteigert,
2. die Bildung von Entzündungsmediatoren - vor allem von TNF- α - wird veranlasst
3. es kommt zu einer gesteigerten Synthese und Aktivierung von Komplementfaktoren (Sanders et al., 1986; Hafler et al., 2005; Sospedra and Martin, 2005). Alle unter 1.-3. genannten Vorgänge bewirken eine direkte Schädigung der Myelinscheiden. Damit fungieren Makrophagen und Mikrogliazellen als die eigentlichen Effektorzellen des entzündlichen Demyelinisierungsprozesses.

TH2-Zellen beeinflussen die humorale Immunität und produzieren vor allem die Zytokine Interleukin-4 (IL-4), und Interleukin-10 (IL-10). Auch Antikörper, freigesetzt von B-Zellen, die zuvor vom TH2-Typ der reaktivierten T-Zellen aktiviert wurden, können das Komplementsystem aktivieren und so die Myelinscheiden direkt schädigen. Die autoreaktiven T-Zellen können aber auch zirkulierenden Autoantikörpern aus dem peripheren Blut den Durchtritt durch die Blut-Hirn-Schranke ermöglichen, woraufhin diese, im ZNS angekommen, ebenfalls das Komplementsystem aktivieren und so die Myelinscheiden direkt schädigen. Daneben haben TH2-Zellen bei MS aber auch günstige Eigenschaften: Sie produzieren, wie oben erwähnt, die Interleukine IL-4 und IL-10, die wiederum die TH1-Zellen hemmen und damit antiinflammatorisch wirken.

TH1/TH2-Balance: Antigen-präsentierende Zellen

In den letzten Jahren ist dabei intensiv die Rolle der Antigen-präsentierenden Zellen, insbesondere der dendritischen Zellen (DZ) untersucht worden. DZ als funktionell potenteste APZ sind entscheidend für die Induktion der primären Immunantwort und die Initiierung der T-Zell-Immunität in-vivo verantwortlich (Sung et al., 2008; Nowak et al., 1999). Für DZ wird angenommen, daß in Abhängigkeit spezifischer Vorläuferzellen unterschiedliche Subtypen existieren, die sich u.a. in der Expression von Oberflächenmarkern (u.a. Expression des CD11c Integrins) unterscheiden. Dabei induzieren die sogenannten DZ1-Zellen eine TH1-Immunantwort, wohingegen DZ2 eine TH2-Immunantwort induzieren (Klanginsirikul et al., 2002; Kapsenberg 1999). DZ haben eine Schlüsselfunktion bei der Aktivierung naiver CD4+T-Zellen und CD8+T-Zellen. Das Erkennen von MHC-Peptid-Komplexen auf DZ durch antigenspezifische T-Zell-Rezeptoren (TZR) stellt das „Signal 1“ der DZ-T-Zell Interaktion dar. Im weiteren ist das „Signal 2“ zur Unterhaltung der T-Zell-Aktivierung nötig, wobei es sich um die Interaktion zwischen kostimulatorischen Molekülen, die von DZ exprimiert werden und ihren Liganden auf der T-Zell-Oberfläche handelt. In Abhängigkeit von der DZ-Subpopulation werden verschiedene Zytokine produziert, welche bestimmen, ob anschließend eine TH-1- oder die TH-2-Antwort generiert wird („Signal 3“). Beim Menschen polarisieren CD11c+DZ (DZ1) naive T-Helfer-Zellen vornehmlich in Richtung eines TH-1-Profiles, wohingegen CD11c-DZ (DZ2) die T-Zellen vor allem zur Produktion und Freisetzung von TH-2-typischen Zytokinen

stimulieren (Macatonia 1995; Gratchev et al., 2001; Mariotti et al., 2008). Der DZ kommt jedoch nicht nur eine regulative Funktion bei der Festlegung der TH1- oder TH2-Zellantwort zu, sondern sie sind möglicherweise auch für die Ausprägung regulatorischer T-Zellen mitverantwortlich. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass eine repetitive Stimulation von naiven CD4⁺ T-Zellen mit allogenen, immaturren DZ zur Differenzierung von T-Zellen mit den unten beschriebenen regulatorischen Eigenschaften (Treg) führt (Jonuleit 2000; 2001b; Mahnke et al., 2007).

TH1/TH2-Balance: Zytokine

Die regulatorischen Mechanismen, die für das Zustandekommen und die Balance des TH1/TH2-Zytokinmilieus verantwortlich sind, werden jedoch nicht ausschließlich von der Interaktion von T-Zellen mit APZ gesteuert. Zunächst wurde die Regulation von unterschiedlichen CD4⁺T-Zellen den verschiedenen T-Zellsubpopulationen selbst zugeschrieben. Demnach üben TH1- bzw. TH2-Klonen gegenseitig einen negativen Regulationseffekt aufeinander aus. Hierfür spricht, daß IFN- γ als klassischer Vertreter eines TH1-Zytokins das Wachstum von TH2-Klonen hemmt (Gajewski 1988; Gattoni et al, 2006). Umgekehrt wurde das TH-2-Zytokin IL-10 als Inhibitor der TH-1- Zytokine beschrieben (Fiorentino 1989; Re et al., 2004). In den vergangenen Jahren wurden weitere Zytokine identifiziert, die einen regulativen Einfluß auf die T-Zellantwort ausüben. Neben IL-18 greifen auch andere Zytokine wie IL-12 und IL-10 regulativ in die TH1/TH2 Balance ein. Für die Polarisierung der T-Zellantwort stellt sich die Frage, ob sich Zellpopulationen charakterisieren lassen, die z.B. durch den Einfluß von Zytokinen oder durch direkten T-T-Zell-Kontakt einen regulativen Einfluß auf T-Zellen ausüben.

TH1/TH2-Balance: Regulatorische T-Zellen

Vor wenigen Jahren gelang es zunächst Sakaguchi und Mitarbeitern, eine eigene Subpopulation von CD4⁺ T-Zellen im Mausmodell mit regulatorischen Eigenschaften zu charakterisieren (Sakaguchi 1995). Diese CD4⁺-Subpopulation weist nur eine geringe Fähigkeit zur Proliferation auf und ist in der Lage, hohe Konzentrationen an IL-10 aber kaum IL-2 und kein IL-4 zu produzieren. Die als T-regulatory Cells 1 bezeichneten Zellen verhindern darüber hinaus eine antigen-spezifische Proliferation

von CD4+ Zellen und verhindern im Mausmodell die Entwicklung einer Colitis ulcerosa (Sakaguchi 1995; Groux 1997; Cools et al., 2007).

Nachdem zunächst im Tiermodell eine Subpopulation von CD4+T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften beschrieben wurde, konnten Jonuleit und Enk aus peripherem Blut beim Menschen eine Population von CD4+T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften (Treg) isolieren (Jonuleit 2001a). Diese T-Zellen exprimieren die α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25+) sowie CD45RO, Histokompatibilitäts-Leukozyten-Antigen (HLA-) DR und das intrazelluläre zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Antigen 4 (CTLA-4). Diese Zellen expandieren nicht nach Stimulation und unterdrücken die Expansion von konventionellen T-Zellen. Darüber hinaus produzieren sie offenbar kein IL-2, IL-4 oder TGF- β sondern lediglich IL-10. Die Elimination von Treg im Tiermodell führt zur Induktion von Autoimmunerkrankungen, wie u.a. einer Autoimmungastritis oder – thyroiditis. Offenbar ist die Suppression der autoreaktiven T-Zellantwort eine herausragende Aufgabe von CD4+/CD25+ Treg. Möglicherweise kommt dieser neu beschriebenen Subpopulation von T-Zellen damit nicht nur in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen und in der Transplantations-immunologie eine entscheidende Rolle zu. Treg spielen hypothetisch auch bei der Auseinandersetzung mit einer Reihe von Antigenen, die über Inhalation oder Ingestion aufgenommen werden eine entscheidende Rolle, indem sie eine chronische Aktivierung des Immunsystems mit entsprechender Entzündungsreaktion regulieren. (Sakaguchi 1995, 1996; Cools et al., 2007).

Tabelle 1.3. Wichtige pro- und antiinflammatorische Zytokine

Proinflammatorische Zytokine	Antiinflammatorische Zytokine
TNF- α	löslicher TNF-Rezeptor
IL-1	IL-1 Rezeptorantagonist
IL-2	löslicher IL-2 Rezeptor
IL-6	löslicher IL-6 Rezeptor
	TGF-β
	IL-10

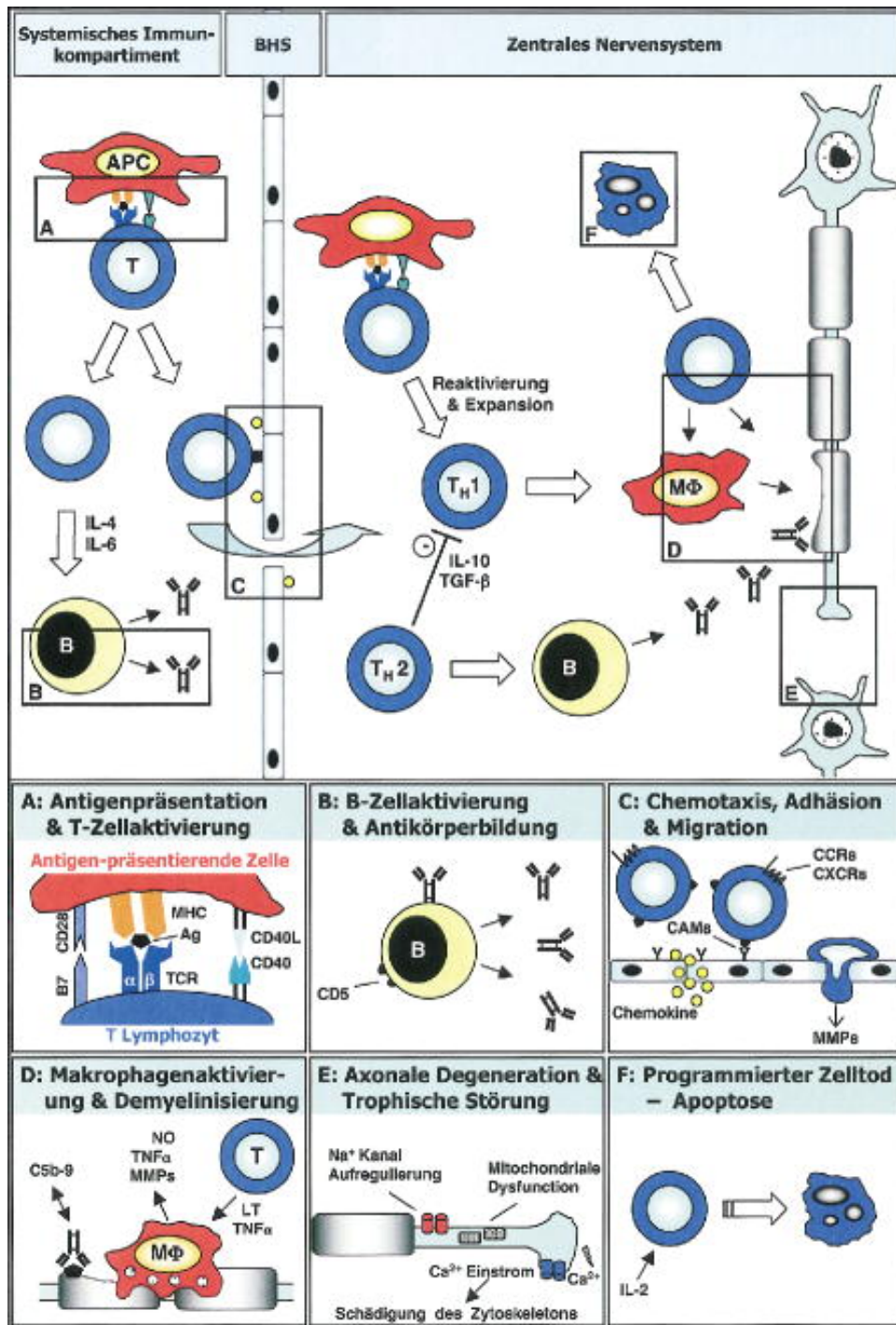


Abb.1.3. Schematische Darstellung der MS-Pathogenese (Wiendl et al., 2003). Im systemischen Immunkompartiment erkennen autoreaktive T-Zellen (T) über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) ein spezifisches (Auto-)Antigen (Ag), das über das Haupthistokompatibilitätsmolekül (MHC) und die gleichzeitige Präsentation kostimulatorischer Signale (CD28-B7, CD40-CD40L) auf der Zelloberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie beispielsweise Monozyten oder Makrophagen, präsentiert wird (*dargestellt in A*). Aktivierte T-Lymphozyten können die Blut-Hirn-Schranke (BHS) überqueren, um in das zentrale Nervensystem (ZNS) zu gelangen. Der Mechanismus

transendothelialer Migration wird durch die Interaktion zwischen zellulären Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und deren Rezeptoren, sowie Matrixmetalloproteinasen (MMPs) vermittelt (*dargestellt in C*). Im ZNS erfolgt eine Reaktivierung und Expansion von T-Zellen, die bei Mikroglia Zellen/Makrophagen (MF) eine vermehrte phagozytotische Aktivität, Produktion von Zytokinen, wie beispielsweise dem Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Lymphotoxin (LT), und der Freisetzung toxischer Mediatoren, wie Stickoxid (NO) induzieren und somit die Demyelinisierung und axonale Schädigung vorantreiben. Autoantikörper (Abs), die die BHS überqueren oder im ZNS lokal von B-Lymphozyten oder Mastzellen (B*) produziert werden, tragen zu diesem Prozess bei. Die Bindung von Abs an Autoantigene aktiviert die Komplementkaskade, die zur Bildung des terminalen lytischen Komplexes (C5b-9) und der nachfolgenden Lyse der Zielstruktur führt (*dargestellt in B und D*). Die Aufregulierung von Na⁺- und Ca²⁺-Kanälen auf der Axonoberfläche, die Fehlfunktion von Mitochondrien und der Verlust trophischer Signale tragen zur axonalen Deintegration und Degeneration bei (*dargestellt in E*). Die entzündliche Reaktion wird durch antiinflammatorische Zytokine, wie beispielsweise Interleukin (IL)-10 oder dem transformierenden Wachstumsfaktor (TGF)- β , reguliert. Darüber hinaus induziert IL-2 einen programmierten Zelltod (Apoptose) bei enzephalitogenen T-Lymphozyten (*dargestellt in F*).

1.4. Klinik und Verlaufsformen

Das typische Erkrankungsalter liegt zwischen dem 15. und 40. Lebensjahr. Die Erkrankung befällt Frauen doppelt so häufig wie Männer (Mitrovic et al., 1999; Delilović-Vranić et al., 2005). Die klinisch sehr variable Symptomatik ist abhängig von der Lokalisation der Entmarkungsherde (jeweils in abnehmender Häufigkeit, s. Tabelle 1.4.1). Allgemein anerkannt ist die Einteilung der Verlaufsformen nach Lublin et al., 1996 (s.u. Tabelle 1.4.2).

Tabelle 1.4.1: Symptome zu Beginn der Krankheit in %

1) Beer und Kesselring, 1988, N = 688; 2) Poser et al., 1986, N = 3248; 3) Matthews, 1985; 4) Paty und Poser, 1984, N = 461

Klinik in %	1)	2)	3)	4)
Sensibilitätsstörungen	41,3	42	40	33
Sehstörungen	36,9	33	34	30
Gangstörungen	31,8			18
Paresen	23,4	44	39	ca. 16
Schwindel	8,0		5	
Sphinkterstörungen	5,5	9	5	
Feinmotorikstörungen	3,9			
Müdigkeit	1,6			
Epileptische Anfälle	0,7			
Psychische Störungen	0,6	4		

Tabelle 1.4.2: Klinische Verlaufsformen der Multiplen Sklerose (modifiziert nach [Lublin et al., 1996])

Schubförmig-remittierend (Relapsing Remitting [RR])
= klar zeitlich abgrenzbarer Krankheitsschub mit kompletter od. inkompletter Remission; keine Krankheitsprogression im Schubintervall
Sekundär chronisch-progredienter Verlauf (Secondary Progressive [SP])
= initial schubförmiger Verlauf mit Übergang in einen chronisch progredienten Verlauf; superponierte Schübe od. temporäre Verbesserungen können auftreten, aber kein progressionsfreies Intervall
Primär chronisch-progredienter Verlauf (Primary Progressive [PP])
= von Krankheitsbeginn an chronisch progredienter Verlauf ohne Auftreten von Schüben; gelegentlich temporäre Plateaus bzw. Verbesserungen
Schubförmig-progredienter Verlauf (Relapsing Progressive [RP])
=primär progrediente Verlaufsform kombiniert mit eindeutig abgrenzbaren Schüben

Tabelle 1.4.3: Prognostisch günstige und ungünstige Faktoren für den Verlauf der MS-Erkrankung. (modifiziert nach Weinshenker et al., 1991)

Prognostisch günstig	Prognostisch ungünstig
niedriges Erkrankungsalter (<40.LJ)	Erkrankung nach dem 40. LJ
schubförmiger Verlauf	primär / sekundär chronischer Verlauf
monosymptomatischer Verlauf zu Beginn	Betroffensein multipler Systeme zu Beginn
Beginn m. sensiblen oder Sehstörungen	zerebelläre, psychiatrische od. RM-Symptome zu Beginn
Dauer des ersten Schubs < sechs Monate	Blasenstörungen zu Beginn
lange Remission nach erstem Schub	
geringe Schubfrequenz zu Beginn	
Schwangerschaft	
leere Familienanamnese	

1.5. Glatirameracetat (Copaxone)

1.5.1. Geschichte

Die Entwicklung von Glatirameracetat, auch Copolymer1 oder Copaxoner, beruht auf der Forschung des Weizmann Instituts in Israel. 1968 versuchten die Forscher, ein Mittel zu finden, mit dem man beim Versuchstier eine der MS ähnliche Erkrankung auslösen konnte. Zu diesem Zweck stellten sie eine Proteinkombination künstlich her, die in ihrer Zusammensetzung dem MBP des menschlichen Gehirns ähnelt. Erst 1971 (Teitelbaum et al. 1971) entdeckte man, dass GLAT keine Erkrankung auslöst, sondern im Gegenteil die Entwicklung der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis beim Versuchstier verhindert. Im Dezember 1996 wurde GLAT in den USA zur Behandlung der MS die Zulassung erteilt, seit 2001 ist es auch in Deutschland zugelassen.

1.5.2. Die Substanz

Glatirameracetat (Copaxone) ist ein synthetisches Polypeptid, das aus den vier Aminosäuren L-Alanin (42,7 %), L-Lysin (33,8 %), L-Glutamin (14,1 %) und L-Tyrosin (9,5%) in gleichbleibenden Anteilen zusammengesetzt wird. Das Verhältnis der Aminosäuren ist dem MBP nachempfunden. Die entstehenden Moleküle sind hydrophil und damit hochpolar. 68% der Polypeptide haben ein Molekulargewicht zwischen 2500 und 28000 Dalton. Glatirameracetat (GLAT) (Entwicklungsname: Copolymer-1, Handelsname: Copaxone) ist ein immunomodulatorischer Arzneistoff, kann bei schubförmig verlaufender Multipler Sklerose die Schubrate verringern und die Progression der Erkrankung verlangsamen.

1.5.3. Wirkmechanismen

Die Wirkmechanismen von GLAT (COP1) werden heute noch nicht vollständig verstanden. In verschiedenen experimentellen Modellen gelang es durch GLAT akute und chronische Verläufe der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) zu therapieren. Zelluläre Untersuchungen an Tier und Mensch legen nahe, dass ein wesentliches Wirkprinzip in der Verschiebung der Immunantwort von sog. T-Helfer-1(TH1)-Mustern zu TH2-Mechanismen liegt. In kontrollierten klinischen Studien konnte die Wirkung von GLAT bei schubförmiger MS klinisch und kernspintomographisch nachgewiesen werden (Schrempf et al., 2007).

Antigen präsentierende Zellen (APC) binden auf ihrer Zelloberfläche Antigen im Komplex mit MHC-II-Molekülen. T-Zellen sind in der Lage, die so präsentierten Antigene zu erkennen und eine entsprechende Immunreaktion in Gang zu setzen. Ebenso wie das Autoantigen MBP bindet GLAT an eben jene MHC-Moleküle, wobei GLAT offenbar eine größere Affinität zum MHC-Molekül hat als MBP und es somit kompetitiv aus der Bindung verdrängt (Kreuzreaktivität) (Fridkis-Hareli et al. 1994, Racke et al. 1992; Blanchette et al., 2008). Aus dieser Bindung können drei verschiedene Wirkmechanismen resultieren: (s.u. Abb.1.5.3.1 und Abb.1.5.3.2)

a) Bei einem komplett agonistischen Verhalten von GLAT mit MBP am T-Zell-Rezeptor der Th1-Zelle käme es durch die wiederholte Aktivierung in Abwesenheit von kostimulatorischen Signalen (CD28/B7-1 Bindungen) zu einer Induktion des

durch Aktivierung induzierten Zelltods (AICD). Die Th1-Zellen würden in den programmierten Zelltod übergehen und wären eliminiert (Aktas u. Ari et al., 2001).

b) Denkbar ist auch eine partiell agonistisch/antagonistische Wirkung von GLAT am T-Zell-Rezeptor von MBP-spezifischen Zellklonen. In Studien, bei denen vornehmlich das produzierte Zytokinmuster unter der Behandlung mit Copaxoner untersucht wurde, konnte eine Verschiebung der Zytokinsekretion von pro- zu anti-inflammatorischen Zytokinmustern nachgewiesen werden (Miller et al., 1998 Schrempf et al., 2007). Es wäre eine durchaus plausible Erklärung, unter den Wirkmechanismen von GLAT den Th1 zu Th2-Shift zu vermuten (Kim et al., 2004; Weber et al., 2004 und 2007). Man nimmt an, daß es durch GLAT zu einer Induktion von Suppressor-Zellen kommt: Mit GLAT vorbehandelte Mäuse wurden zum Teil resistent gegen die Auslösung einer EAE; diese Resistenz konnte durch den Transfer von T-Zellen aus den Lymphknoten dieser Tiere auf naive Tiere übertragen werden (Bernard et al., 1976; Jee et al., 2007).

c) Bei der dritten Möglichkeit müßte man von einem kompletten Antagonismus ausgehen. Die T-Zell-Rezeptoren der Th1-Zellen würden blockiert für andere (auch körpereigene) Antigene, und ihre proinflammatorische Wirkung könnte nicht weiter zur Geltung kommen. So käme es zu einer Hemmung dieser Zellen. Teitelbaum et al., 1988 und Schrempf et al., 2007 konnten nachweisen, dass die Zytokinsekretion von MBP-spezifischen Zellklonen, deren zytotoxische Aktivität und auch die Proliferation durch GLAT gehemmt werden. Da es sich bei GLAT um ein Gemisch aus verschiedenen Proteinbestandteilen handelt, muß man mit einer großen Vielfalt an reaktionsbereiten Epitopen rechnen. Deshalb sind all diese oben genannten Wirkungen denkbar. Wahrscheinlich handelt es sich beim Wirkmechanismus des GLAT um eine Mischung aus dem oben genannten.

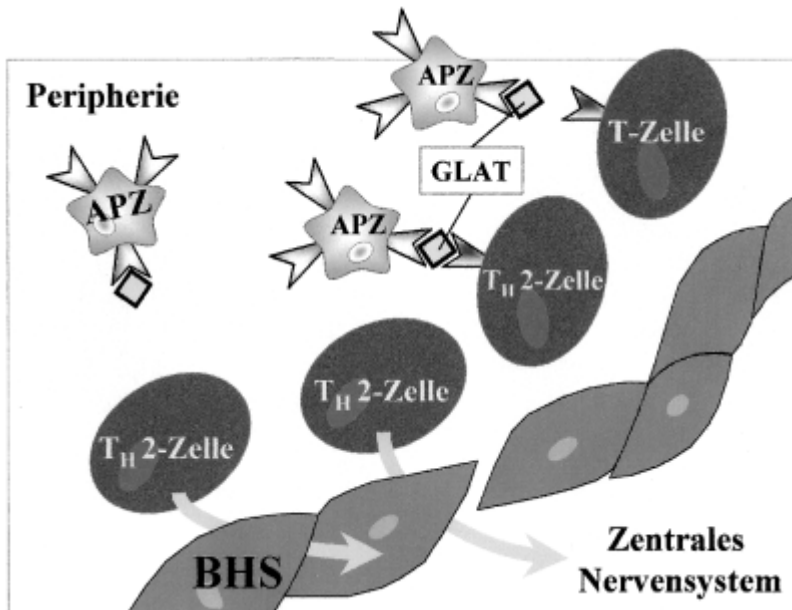


Abb.1.5.3.1 Putative Wirkung von GLAT im Immunsystem (R.Gold et al.,2002). Das von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) dargebotene Antigen GLAT wird von T-Zellen erkannt, die dadurch aktiviert und überwiegend zu TH2-Zellen polarisiert werden.

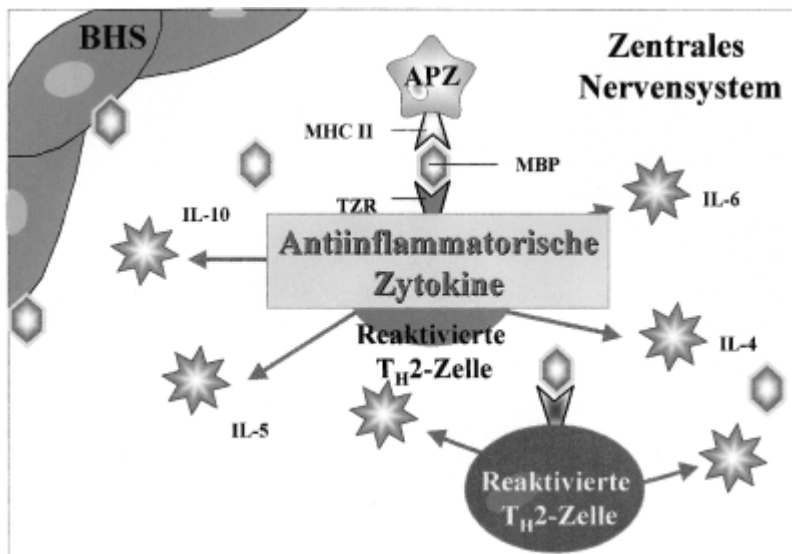


Abb.1.5.3.2. Putative Wirkung von GLAT im Nervensystem. Aktivierte, GLAT-spezifische Zellen überwinden die Blut-Hirn-Schranke (BHS) und entfalten lokal nach Antigenkontakt mit dem kreuzreagierenden MBP ihre immunmodulatorische Wirkung durch Sekretion von TH2-Zytokinen.

2. Intrazellulärer Signalweg PI3K-Akt-GSK3

Die Phosphoinositide-3-Kinasen (PI3Ks) sind eine Gruppe von Signal transduzierenden Enzymen, die die zelluläre Aktivierung regulieren, und an inflammatorischen Antworten, Chemotaxis, sowie Apoptose beteiligt sind. Es wurde entdeckt, dass ein Kohlehydrat-Ligand, Glukan den endogenen PI3K/AKT Signalweg stimulieren kann. Nach aktuellen Angaben stellt sich die Rolle des PI3K/AKT Signalwegs als eine negative Rückkopplung oder als ein kompensatorischer Regulator septischer und inflammatorischer Antworten dar. Darüberhinaus zeigen diese Angaben, dass die Modulation des PI3K/AKT Signalwegs die durch septische und Ischämie/Reperfusion (I/R) Schädigung assoziierte Morbidität und Mortalität reduzieren kann. Daher könnte die Manipulation des endogene PI3K/AKT Signalwegs einen neuen und ungewöhnlichen Therapieansatz für die Behandlung wichtiger Krankheiten repräsentieren. Die TLRs wurden als eine der wichtigsten Zellrezeptor-Familien bei der Induktion unmittelbarer pro-inflammatorischer Antworten auf eine große Vielfalt von Pathogenen, von Viren über Bakterien bis hin zu Pilzen, identifiziert. (Hibi et al., 1993; Kyriakis et al., 1994; Rouse et al., 1994; Raingeaud et al., 1995; Hua et al., 2007).

Nach Stimulation rekrutieren Toll like Rezeptoren (TLRs) ein Adaptor Protein, MyD88, das anschließend andere Moleküle aktiviert, wie Mitglieder der Interleukin(IL-1)-Rezeptor-assoziierte Kinase(IRAK)-Familie. Diese Enzyme triggern Signalwege wie MEMO-I-kB, Kinase-NF-kB und die stressaktivierten Kinasen (Jnk und p38 MAPK), die zu transkriptionaler Regulation einer Zytokingruppe führen, wie Tumor-Nekrose Faktor, IL6, IL-12, welche dann die Th1-Antwort fördern(Übersicht in Barnes and Karin, 1997; Martin et al., 2005). TLRs induzieren PI3K durch noch wenig verstandene Mechanismen. PI3K ist wahrscheinlich in der Anfangsphase der TLR-Signalisierung aktiv, im Gegensatz zu andere Modulatoren wie IRAK-M und SOCS-1, die vermutlich erst zu einen späteren Zeitpunkt der TLR Signalisierung tätig werden. Dendritische Mäuse Zellen mit fehlendem Ia-PI3K Signalweg produzieren zuviel IL-12 im Gegensatz zu normalen dendritischen Mäuse Zellen. Ein PI(3)K-Inhibitor erhöht IL-12 Produktion als Antwort auf eine TLR Aktivation. Diese Angaben deuten daraufhin, dass entscheidende nachgeschaltete Ziele (down stream targets) von PI3K die proinflammatorische Zytokin-Produktion regulieren. GSK3 (Glykogen Synthase Kinase 3) spielt eine entscheidende Rolle hierbei. GSK3 ist in Ruhezellen aktiv und kann nach Phosphorylierung durch andere Protein-

Kinasen wie AKT, die durch PI3K-Aktivierung induziert ist, inaktiviert werden. Folglich führt TLR-abhängige PI3K-Aktivierung zur Inhibition der GSK3-Aktivität. Die Inhibition der durch TLRs aktivierten PI3K oder Akt induziert eine Erhöhung der IL-12-Produktion sowie eine Sekretionsreduktion der anti-inflammatorische Zytokin IL-10 (Martin et al.2005; Hua et al., 2007).

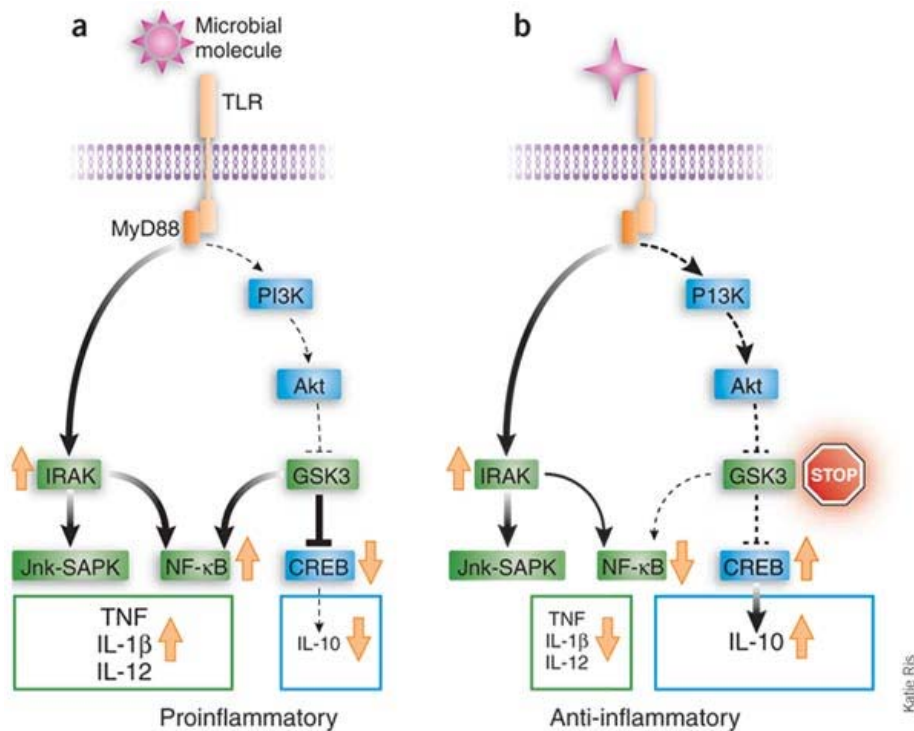


Abb.2. TLR-Aktivierung induziert multiple Signalwege, die proinflammatorische Antworten vermitteln (Martin et al., 2005). (a) Nach bestimmten mikrobiellen Stimuli erfolgt eine vorherrschende Aktivierung des IRAK-NF-κB-Signalwegs und eine proinflammatorische Zytokinantwort. In der Situation, gibt es eine geringe PI3K Stimulation und GSK3 verbleibt hauptsächlich in einer basalen Aktivierung, was die Expression von IL-12 fördert. (b) Alternative Situationen, wahrscheinlich induziert durch andere pathogene Stimuli, führen zu einer erhöhten Aktivierung von PI3K und anschließender Inhibition von GSK3, und dadurch zu einer reduzierten IL-12-Produktion. Dies kann das Gleichgewicht zugunsten einer Th2-Antwort verschieben, d.h. antiinflammatorisch wirken.

3. Zielsetzung der Arbeit und Fragestellung

Die in den letzten Jahren gewonnenen Erkenntnisse über die Immunpathologie der MS haben zur Entwicklung und zum Einsatz von GLAT in der MS-Therapie geführt. In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass GLAT die Schubfrequenz der MS signifikant reduziert und auch zu einer Abnahme der im MRT nachweisbaren Läsionen führt. In welcher Weise aber genau die zur Zeit bekannten immunologischen Regulationsvorgänge durch die Gabe von GLAT moduliert werden ist nicht bekannt.

Auf dem Hintergrund der oben dargestellten Arbeiten ergeben sich folgende Fragestellungen für diese Arbeit:

1. Welche Methode eignet sich für diese Arbeit am besten zur Monozyten-Isolierung aus PBMC?
2. Auf welche Weise induziert GLAT die Verschiebung von Th1- zur Th2-Reaktion, d.h. von proinflammatorischen zu antiinflammatorischen Zytokinmustern?
3. Wie modifiziert GLAT Antigen-präsentierende Zellen, d.h. welche Auswirkung hat GLAT auf Monozyten/Makrophagen?

II. Material und Methoden

1. Materialien

Geräte	Hersteller
Sterilbank Laminair Hera Safe	Thermo Scientific
CO ₂ -Brutschrank (37°C)	Heraeus, Fellbach
ELISA-X-plus-Reader	SUNRISE, Tecan
Kühlschränke (4°C und -20°C)	AEG
Standard Lichtmikroskop	Zeiss
Magnetrührgerät	IKA-Labortechnik
Neubauer Zählkammer	Neubauer
Vortexer	Jahnke & Kunkel
Verschiedene Pipetten (0,5 bis 1000 µl)	Finn und Eppendorf
Durchflusszytometer FACScan	Becton Dickinson
Software CELLQuest	Becton Dickinson
Zentrifuge Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, D

Verbrauchsmaterialien

Verschiedene Pipettenspitzen	Greiner
Monovetten (EDTA-Röhrchen 9 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson
Gewebekulturplatten (24-, 48 Vertiefungen/Platte)	Greiner
15ml, 50 ml Conical Tubes	Falcon
96-Napf Polystyrol-Flachboden-Microtiterplatte	NUNC, Wiesbaden
Zellkulturflaschen	Costar, New York, USA

Puffer, Lösungen, Chemikalien und Stimulanzen

Histopaque 1,077 g/ml	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Gibco, Berlin
Zellkulturmedien:	

- RPMI 1640 mit L-Glutamin	Gibco BRL/Life Technologies
- 10% foetales Rinderserum (FBS)	PAN Biotech, Aidenbach
- Penicillin/Streptomycin(10000 IE/10000 µg/ml)	Biochrom
BSA	Serva, Heidelberg
Phosphat Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich
Substrat für ELISA, Reagenz A und B	Becton Dickinson Pharmingen
Tween20	Sigma
Dynal Monozyte Negative Isolation Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Lipopolysaccharid (LPS)	Lörrach, D
Copaxone (Glatirameracetat)	Gry-Pharma, TEVA
LY294002 (PI(3)K Inhibitor)	Cayman Chemikaliel
USA	

Lösungen und Puffer für ELISA:

ELISA Stopplösung	28 ml H ₂ SO ₄ , ad 500 ml H ₂ O
Reagenz-Lösungen	1% BSA in PBS, PH 7,2-7,4
Substrat Reagenz A und B	1:1 Mixtur von Reagenz A(H ₂ O ₂) und Reagenz B-(Tetramethylbenzidine)
Waschpuffer	0,05% Tween 20 in PBS, PH 7,2-7,4

Puffer für Dynal Monozyten Negative Isolation:

Puffer 1:	PBS mit 0,1% BSA und 2 mM EDTA, pH 7,4
Puffer 2:	PBS pH 7,4
Puffer 3:	RPMI 1640 mit 10% Fetal Calf Serum (FCS)

Fluoreszenz-markierte Antikörper

Spezifität	Herkunft	Markierung	Firma
Anti-Human CD14	Maus	FITC/PE	Becton Dickinson
Isotypen-Kontrolle IgG	Maus	FITC/PE	Becton Dickinson

Kulturmedium: 500 ml RPMI 1640 mit 50 ml FBS und 5ml Penicillin-Streptomycin

Probanden

Für die Experimente wurde das periphere Blut von 56 gesunden Probanden verwendet.

2. Methoden

2.1. Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) über Dichtegradientenzentrifugation

Die Isolierung der PBMC findet mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten statt.

Zunächst wird je 50 ml peripher venöses Blut von freiwilligen gesunden Spendern mit 9 ml-EDTA-Monovetten abgenommen, welches innerhalb der nächsten Stunde weiterverarbeitet wird (Gerinnungshemmer EDTA). In zwei 50 ml fassende Röhrchen werden je 20 ml Blut vorsichtig auf 20 ml Ficoll-Lösung (Dichte 1,077 g/ml) geschichtet, ohne dass sich die Flüssigkeiten vermischen. Dann werden die Röhrchen in der Zentrifuge bei 2000 U/min (entspricht 700 g) 20 min lang ohne Bremse zentrifugiert.

Durch die spezifischen Dichteunterschiede zwischen Ficoll (Dichte 1,077 g/ml) und den verschiedenen Blutbestandteilen entsteht folgende Schichtung: Am Boden des Röhrchens befindet sich ein Zellpellet aus Erythrozyten und Granulozyten. Darüber folgt eine Schicht aus Ficoll, auf der ein dünner Ring mit peripheren mononukleären Blutzellen schwimmt, die Interphase. Zuoberst findet man eine trübe Schicht Serum, welche Thrombozyten und andere kleinste Bestandteile des Blutes enthält (Jacobs 1996).

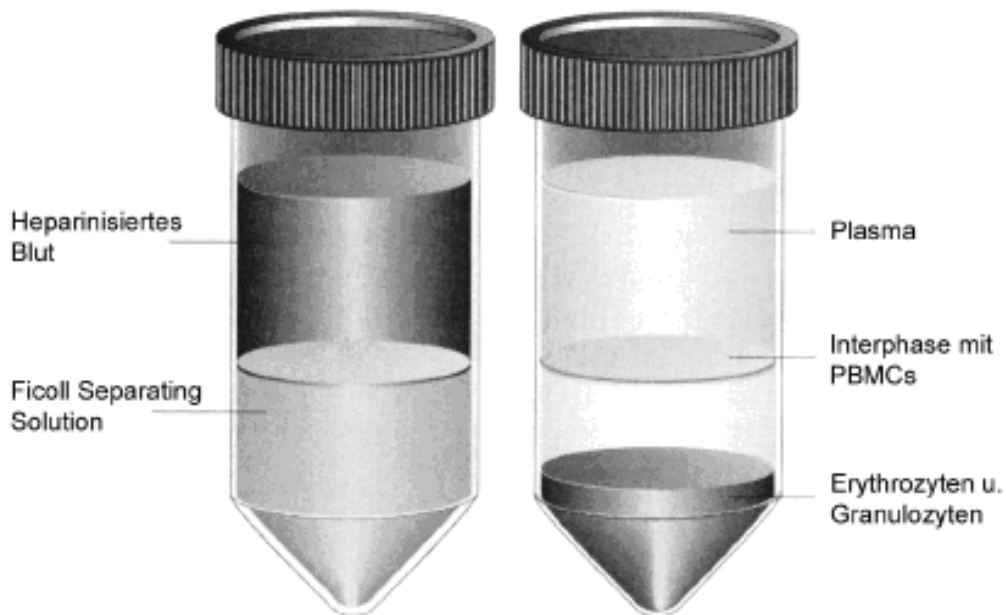


Abb.2.1: Darstellung der Schichtung von Vollblut auf Ficoll-Lösung vor der Zentrifugation links, Schichtung von Ficoll mit den einzelnen Blutbestandteilen rechts (Jakocs 1996)

Der schmale Interphase-Ring, der auch die benötigten Lymphozyten enthält, wird vorsichtig abpipettiert und in ein weiteres 50 ml-Röhrchen mit 20 ml Kulturmedium gegeben. Es wird bei 1200 U/min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet erneut wie oben beschrieben mit Kulturmedium gewaschen, um verbliebene Ficoll-Reste zu entfernen.

Nach letztmaligem Dekantieren wird das Zellpellet mit Kulturmedium aufgefüllt, so dass eine Flüssigkeit mit insgesamt 1 ml Volumen entsteht. Die Zellzahl wird dann mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen werden mit einer Pipette unter sterilen Bedingungen durchgemischt und eine 10 µl umfassende Probe der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau gemischt (Verdünnungsfaktor 1:10). Trypanblau ist in der Lage, in tote Zellen einzudringen; damit kann eine Aussage über die Vitalität der Zellen und somit über die Qualität der Präparation gemacht werden.

Nun kann man in der Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,1 mm, Fläche 0,0025 mm²) die Anzahl der vitalen Zellen auszählen und mittels der folgenden Formel die Zellkonzentration berechnen:

$$X/4 \times n \times 10^4 = \text{Zellzahl /ml}$$

X = Zellzahl aus den 4 großen Quadraten

n = Verdünnungsfaktor

Die Gesamtzellzahl der isolierten PBMC wurde durch Multiplizieren mit der Mediummenge in Milliliter berechnet, in der die Zellen resuspendiert wurden. (Gewinnzellzahl ca. $1-3 \times 10^8$)

2.2. Anreicherung der Monozyten über Adhärenz

Die Anreicherung humaner Monozyten der isolierten PBMC erfolgte durch Adhärenz der Monozyten an PLL-beschichteten Kulturflaschen.

Zuerst wurden Zellkulturflaschen mit PLL 100 µg/ml beschichtet und für min. 3 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach PLL Absaugen und dreimaliger Spülung mit 10 ml RPMI-Zellkulturmedium wurde jede Flasche mit 2-5 ml Zellkulturmedium gefüllt und im Brutschrank für nachfolgende Arbeitsschritte vorbereitet. Die über Ficoll-Gradient isolierten PBMC wurden in RPMI 1640 (serumfrei) resuspendiert und für 2 h in 75 cm³ PLL-beschichteten Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Anschließend wurden die nicht-adhären Zellen mit dem Kulturmedium heruntergespült und die adhären Zellen für weitere 10 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach konnten die nicht-adhären Zellen mit warmem PBS von den Flächen gespült werden. Die Flaschen der verbleibenden adhären Zellen wurden mit jeweils 5 ml Trypsin 25% überführt, um die adhären Zellen von der Oberfläche abzulösen. Danach wurden die mit Kultur-medium abgspülten Zellen in 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt und in Kultur-medium bei 600 x g gewaschen. Das Pellet wurde danach in RPMI 1640 Kultur- medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt sowie die Vitalität durch Suspension in Trypan-Blau überprüft. Die Monozyten wurden mittels Durchflußzytometrie auf ihre Reinheit überprüft (s.u.). Anschließend wurden die Monozyten mit LPS und GLAT je nach Versuchsbedingungen für 24 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert.

2.3. Anreicherung der Monocyten über magnetische *Beads*

Die negative Anreicherung von Monocyten aus PBMC erfolgte durch spezifische Entfernung der anderen Zell-Populationen (B-Zellen, NK-Zellen, T-Zellen, Erythrozyten, Granulozyten) mit Hilfe von Antikörper-gekoppelten magnetischen *Beads* (*Monocyte Negative Isolation Kit*, Dynal, Invitrogen, Karlsruhe). Für die Isolierung wurden 1×10^8 Zellen (PBMC) eingesetzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 250 g) gewaschen und in 2 ml Rinderserumalbumin (BSA)-Puffer (0,1% BSA + 2mM EDTA in PBS) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 μ l Blocking Reagent und 200 μ l Antikörper-Mix (Dynal) wurden die Zellen 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden in BSA-Puffer durch Zentrifugation gewaschen und anschließend in 9 ml BSA-Puffer resuspendiert. Zu der Zellsuspension wurden 1 ml *Magnetbeads* zugegeben und für 30 min bei 4°C auf einem Rotor inkubiert. Nach vorsichtiger Resuspendierung konnten mit Hilfe eines Magnet-Halters (Dynal) die an die *Beads* gekoppelten B- und T-Lymphozyten sowie NK-Zellen aus den PBMC entfernt werden. Die Reinheit der isolierten Monozyten wurde mit Hilfe von Antikörper-Markierung des Monozyten-Markers CD14 und anschließender Messung im Durchflußzytometer bestimmt. Aufgereinigte Monozyten wurden in RPMI 1640 Medium, supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) (PAN Biotech, Aidenbach), resuspendiert. Es erfolgte zunächst die Zellzählung mittels Trypanblau-Färbung, dann wurde unmittelbar die Zellkultur in 48-Well-Platten (1.5×10^5 Zellen /Well) überführt.

2.4. Zellkultur und –stimulation

2.4.1. Zellkultur

Für die Zellkultur wurden zuerst 48 Well-Platten verwendet wobei in die Vertiefungen jeweils $1,5 \times 10^5$ Zellen in 300 μ l Kulturmedium (RPMI 1640 mit 10% FCS, 100 μ g/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin) gegeben wurden. Die Zellen wurden 24 h in einem Brutschrank bei 37°C und einer halbfeuchten Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. Als stimulierendes Antigen wurde LPS von *Escherichia coli* (Serotyp: R515(Re), AXXORA, Lörrach) in einer Konzentration von 100 ng/ml für weitere 24 h verwendet.

2.4.2. Stimulationsvorgang aufgereinigter Monozyten

Ansätze LPS und GLAT

Die Zellkultur-Überstände jeder Vertiefung der 48-Well-Platten wurden am nächsten Tag vorsichtig entfernt und das Zellkulturmedium erneuert. Die Zellen wurden mit reinen Lipopolysacchariden (LPS, von E.coli, Serotype R515(Re), AXXORA, Lörrach) in 100ng/ml stimuliert und gleichzeitig mit GLAT (von Teva Kompany hergestellt) in unterschiedlichen Konzentrationen (0, 5, 10 und 20 µg/ml) für 24 Stunden koinkubiert. Jeweils eine entsprechende Menge von LPS, GLAT und Kulturmedium wurden in die Vertiefungen nach Stimulationsplan zugegeben, um die vorbestimmte Konzentration zu erhalten.

Als Negativkontrolle wurden zwei Vertiefungsreihen verwendet, in der weder LPS noch GLAT, sondern nur RPMI 1640 zugegeben wurde. Zu jeder Substanzgabe mit jeweils gleicher Konzentration wurden zwei Vertiefungsreihen zum Vergleich verwendet. Nach Ablauf der 24-stündigen Inkubation wurden die Zellkultur-Überstände geerntet und bei -70°C gelagert. Die Detektion und Konzentration an Zytokinen wurden in den Proben mittels eines spezifischen ELISA ermittelt.

Die schematische Darstellung der Stimulation mit LPS und der gleichzeitigen Zugabe von GLAT wurden in (s.u) Tabelle 2.4.2.a dargestellt.

Ansätze PI3K Inhibitor LY-294002(AXXORA), LPS und GLAT

Zu den Ansätzen wurden nach Stimulationsplan LY-294002(AXXORA), LPS und GLAT zugegeben. Die schematische Darstellung der Stimulation mit LPS, mit oder ohne GLAT und mit oder ohne LY294002 wurden in Tabelle 2.4.2.b dargestellt.

Tabelle.2.4.2.a Pipettierschema bei den Ansätzen von LPS und GLAT(GA)

		LPS			
		0 µg/mL (RPMI1640)	0,01µg/mL	0,1µg/mL	1 µg/mL
G L A T	0 µg/mL	x 2 Wells	x 2 Wells	x 2 Wells	x 2 Wells
	5 µg/mL	x 2 Wells	x 2 Wells	x 2 Wells	x 2 Wells
	10 µg/mL	x 2 Wells	x 2 Wells	x 2 Wells	x 2 Wells
	20 µg/mL	x 2 Wells	x 2 Wells	x 2 Wells	x 2 Wells

Tabelle.2.4.2.b Pipettierschema bei den Ansätzen von LPS, GLAT (GA) und LY294002

Vertiefungen Ansätze	2 Vertiefungen	2 Vertiefungen	2 Vertiefungen	2 Vertiefungen
LY294002 0µM LPS 10ng/ml GA 20µg/ml	je Medium- RPMI 1640	je LPS + LPS	je GA + GA	je GA + LPS
LY294002 10µ M LPS 10ng/ml GA 20µg/ml	je LY 294002	je LY294002+LPS	je LY294002+GA	je LY294002 + GA +LPS
LY294,002 20 µM LPS 10ng/ml GA 20µg/ml	je LY 294002	je LY294002+LPS	je LY294002+GA	je LY294002 + GA + LPS

2.5. Zytotoxizitätsuntersuchungen nach Stimulationsansätzen der Zellkultur

2.5.1. Trypanblau-Exklusionstest

Die Vitalität von Zellen kann mit dem Trypanblau-Exklusionstest bestimmt werden. Grundlage dieser Methode ist das unterschiedliche Verhalten toter und lebender Zellen gegenüber Trypanblau. Dieser makromolekulare saure Farbstoff kann durch die intakte Zellmembran lebender Zellen nicht penetrieren (Trypanblau-negative Zellen), hingegen dringt er in geschädigte oder tote Zellen ein und bindet sich dort an Proteine (Trypanblau-positive Zellen). Das Ergebnis der Vitalitätsprüfung wird durch viele Parameter, wie Färbedauer, Temperatur, Farbstoffkonzentration und pH-Wert (maximale Aufnahme bei pH 7.5) beeinflusst, so daß für eine bessere Vergleichbarkeit diese Parameter konstant gehalten werden müssen (Lindl und Bauer, 1994).

Für die Bestimmung der Vitalität und der Zellzahl werden zu 800 µl Medium, 100 µl Trypanblaulösung und 100 µl Zellsuspension pipettiert. Die Auswertung erfolgt mikroskopisch bei einer 10 fachen Vergrößerung mit einer Neubauer Zählkammer, wobei 4 Quadrate ausgezählt werden.

Die Anzahl der lebenden Zellen und die Vitalität lassen sich mit folgenden Formeln berechnen:

$$\frac{\text{lebende Zellen}}{\text{ml}} = \frac{(\text{Gesamtzellzahl} - \text{Trypanblau-positive Zellen})}{4} \times 10^4$$

$$\text{viability (\%)} = \frac{(\text{Gesamtzellzahl} - \text{Trypanblau-positive Zellen})}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100$$

2.5.2. Messung der extrazellulären Laktatdehydrogenase-Aktivität

Die Laktatdehydrogenase ist ein stabiles zytoplasmatisches Enzym, welches in jeder Zelle vorkommt. Bei Zerstörung der Zellmembran wird es in den Extrazellulärraum freigesetzt und kann dort als ein Parameter für Zytotoxizität bestimmt werden. Die Bestimmung der extrazellulären LDH-Aktivität erfolgt mit einem LDH-Kit, dessen Testprinzip in Abbildung 2.5.2 dargestellt ist.

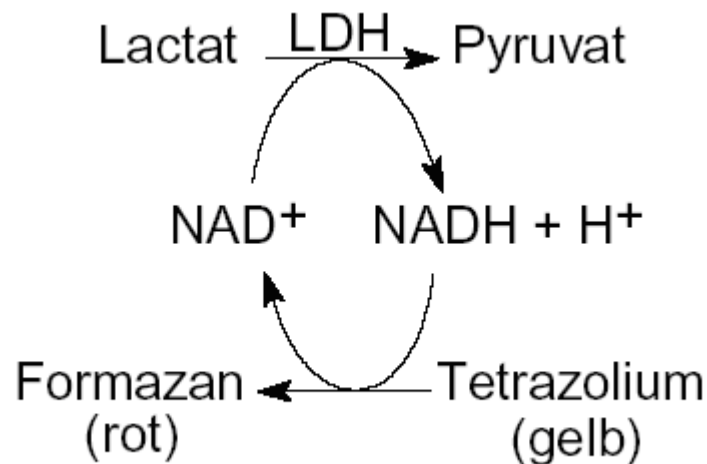


Abb.2.5.2. Testprinzip der LDH-Aktivitätsbestimmung

Humane Monozyten werden in einem 6-well-dish mit einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen in 4 ml phenolrotfreiem RPMI-Vollmedium ausplattiert. Nach 24 h werden die Zellen mit den entsprechenden Substanzen für 24 h bzw. mit 0.5% Triton X-100 als Positivkontrolle für 1 h inkubiert. Die Zellen werden durch Zentrifugation (5 min. bei $200 \times g$) vom Medium abgetrennt

Die LDH-Aktivität im Medium wird mit Hilfe eines LDH-Kits bestimmt. Dafür werden in einer 96-well-Mikrotiterplatte je 100 μl Probe, blank (phenolrotfreies RPMI-Vollmedium) bzw. LDH-Standard (5.73 - 183.3 U/l) mit je 100 μl Reaktionslösung für 7 min. im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 50 μl 1N HCl je well erfolgt die Messung im ELISA-Reader bei 492 nm. Die so erhaltenen LDH-Werte werden auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe bezogen.

-RPMI-Vollmedium: 10% FCS, 2 mM Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin in RPMI 1640 (ohne Phenolrot)

-PBS: 135 mM NaCl, 9 mM NaH_2PO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , 2.7 mM KCl

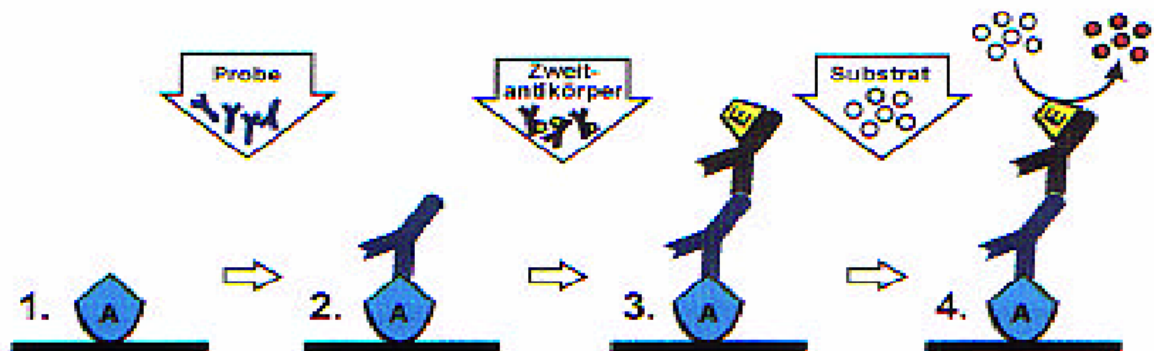
-Reaktionslösung 100 Tests: 125 μl Lösung I + 5.63 ml Lösung II
(laut Hersteller) I = Katalysator, II = Farbstoff

2.6. Durchführung der Messungen mit ELISA

Detektion der Zytokinproduktion durch aktivierte Monozyten mittels ELISA

Mit Hilfe des enzymgekoppelten Immunadsorptionstests ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) kann man die Zytokine im Zellkulturüberstand messen und dadurch ihre Produktion und Freisetzung durch aktivierte Monozyten nachweisen.

A



B

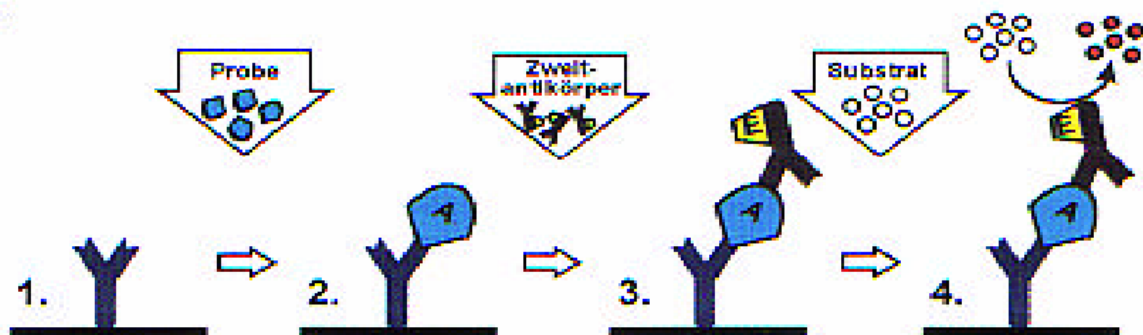


Abbildung 2.6.1: Funktion der ELISA:

A: An eine Oberfläche gebundenes Antigen (1.) wird von dem in der Probe befindlichen Antikörper erkannt (2.). Mit Enzym (E) markierter Zweit-Antikörper bindet an den Komplex (3.), und die Reaktion wird durch Farbumschlag des hinzugegebenen Substrats sichtbar gemacht und quantifiziert (4.).

B: Sandwich-ELISA: Ein gebundener spezifischer Antikörper (1.) bindet das in der Probe befindliche Antigen (A; 2.). Der markierte Zweit-Antikörper erkennt ein weiteres Epitop des Antigens (3.).

Das Prinzip des Tests beruht auf der Bindung von Zytokinen an spezifische Antikörper, mit denen vorher die Plastikvertiefungen einer 96-Well Platte beschichtet wurden, um dann die Zytokine mittels eines enzymabhängigen Farbwechsels nachzuweisen. Mit der sogenannten Sandwich-ELISA-Methode können Interleukine

(IL) sowie lösliche Interleukinrezeptoren (sIL -R) mit hoher Spezifität und Sensitivität quantitativ nachgewiesen werden. (s. Abbildung 2.6.1)

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde die IL-6 und IL-10 (Interleukin 6, 10) Freisetzung in das Kulturmedium von durch zum einen mit LPS und GLAT, und zum anderen mit LPS, GLAT und LY294002 stimulierten Monozyten gemessen. Die Monozytenisolierung, sowie der Stimulationsvorgang wurden in *Material und Methoden, Kapitel. 2.1., 2.2. und 2.3.* beschrieben. Die Zellkulturüberstände wurden jeweils gesammelt und bis zur Messung bei -20 Grad eingefroren.

Der Nachweis von IL-6-Produktion mittels ELISA (R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt)

IL-6 ist ein Protein aus 184 Aminosäuren (teilweise glykosyliert) und kann von vielen Zelltypen produziert werden, z.B. von B- und T-Zellen, Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen, Mastzellen, sowie von vielen verschiedenen Tumorzelllinien. Es wirkt als Differenzierungsfaktor für B-Zellen und als Aktivierungsfaktor für T-Zellen. So stimuliert es in Verbindung mit IL-4 die Umwandlung von B-Zellen in immunglobulinproduzierende Plasmazellen und in Gegenwart von IL-2 die Differenzierung von T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen.

Die Messung der IL-6 Konzentration in Zellkulturüberständen von stimulierten Monozyten wurde mittels Human IL-6 ELISA Development Kit durchgeführt.

Um die IL-6-Konzentrationen in den gemessenen Proben zu bestimmen, wurde eine IL-6 Standardlösung in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, indem eine Verdünnungsreihe des konzentrierten Standards (Ausgangskonzentration 600 pg/ml) im Standard/Proben-Verdünner hergestellt wurde. Dank diesem Vorgehen konnte man 7 unterschiedliche Standardkonzentrationen vorbereiten, was auf der Abb.2.6.2 schematisch dargestellt wurde.

Verdünnungsreihe aus einer IL-6 Standardlösung

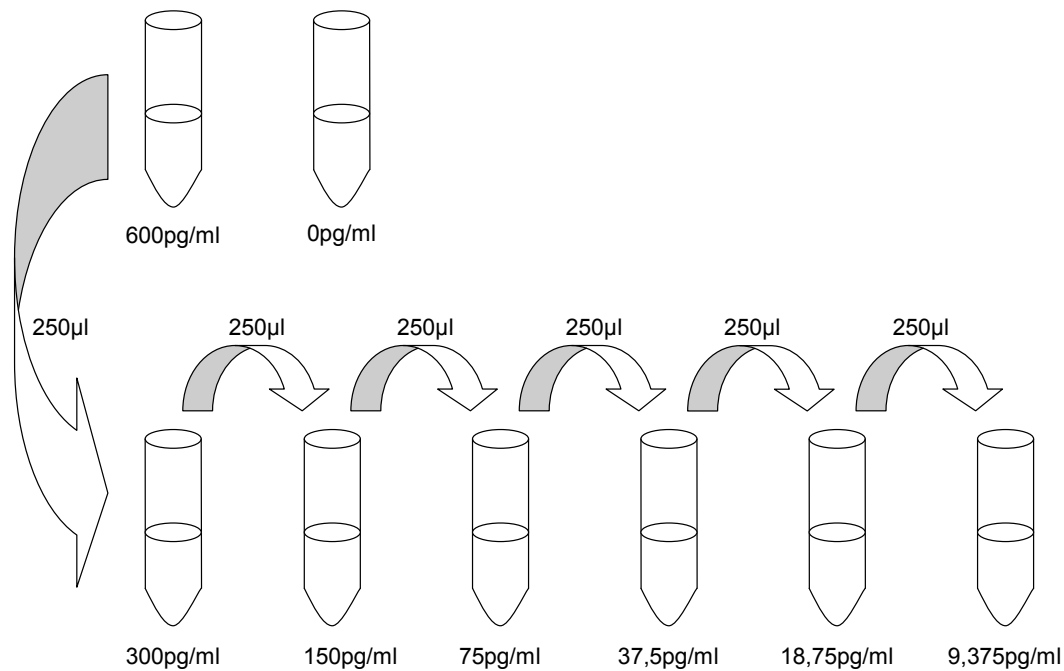


Abb.2.6.2

Herstellung einer Verdünnungsreihe aus einer IL-6 Standardlösung. In 7 Gefäße wurde jeweils 250 µl Standard/Probe-Verdünner vorgelegt und 250 µl des konzentrierten Standards zum ersten Röhrchen zugegeben. Nach dem sorgfältigen Mischen wurde 250 µl in das nächste Gefäß übertragen bis der Vorgang insgesamt 5 mal wiederholt wurde. Dadurch konnte eine Verdünnungsreihe von 300 bis 9,375 pg/ml hergestellt werden.

Um IL-6 zu quantifizieren, wurden die Vertiefungen einer 96-well-ELISA-Platte über Nacht bei Raumtemperatur mit 2 µg/ml Human IL-6-Antikörper inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Platte drei mal unter Zugabe von 300 µl PBS-Tween (0,05% Tween 20 in PBS, pH 7,2-7,4) je well mittels eines Waschgerätes und nachfolgendem Ausklopfen auf einem saugfähigen Zellulosehandtuch gewaschen. Nach Zugabe von 300 µl Blockierungspuffer pro well, um die unspezifischen Bindungen zu blockieren, und Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur wurden nach dreimaligem Waschen je 100 µl der mit RPMI1640 verdünnten Proben und die Standardlösung aufgetragen und bei 37°C zwei Stunden lang inkubiert. Nach

dreimaligem Waschen mit PBS-Tween wurden je 100 µl des verdünnten biotinylierten Detektions-Antikörpers (200 ng/ml) zugefügt. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurde der ungebundene Zweitantikörper ausgewaschen, und anschließend 100 µl Streptavidin-HRP je well zugefügt. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln erfolgte das dreimalige Waschen der Platte und anschließend die Füllung jeder Vertiefung mit 100 µl Substrat-Lösung (1:1 Mixtur von Color Reagent A und Color Reagent B) und die Inkubation für 20 min bei RT im Dunkeln. In dieser Zeit lief die Farbreaktion ab, die durch Zugabe von jeweils 50 µl Stopp-Lösung unterbrochen wurde.

Die Farbintensität, welche proportional zum Anteil des gebundenen Zytokins ist, wurde kolorimetrisch mittels ELISA-Reader als Absorption bei der Wellenlänge 450 nm gemessen. Aus den Duplikaten wurde jeweils die mittlere Absorption berechnet. Die Absorption der Standardlösungen diente zur Herstellung einer Standardkurve, indem auf der x Achse die IL-6-Konzentration und auf der y Achse die gemessene Absorption bei 450 nm aufgetragen wurde. Von der auf diese Weise aufgezeichneten Standardkurve wurde die IL-6-Konzentration in den gemessenen Proben abgelesen.

Der Nachweis von IL-10-Produktion mittels ELISA (R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt)

Interleukin-10 agiert (sowie IL-4 und IL-11) als sog. anti-inflammatorisches Zytokin, indem es die Makrophagensfunktion hemmt und somit überschießende Entzündungsreaktionen verhindert.

Die Messung der IL-10-Konzentration in Zellkulturüberständen von stimulierten Monozyten wurde mittels Human IL-10 ELISA Development Kit durchgeführt. Der Arbeitsvorgang erfolgte wie in *Material und Methoden* bei den Nachweis von IL-6-Production, beschrieben. Nur wurden hier Human IL-10-Antikörper angesetzt.

2.7. Durchflußzytometrie

2.7.1. Meßprinzip

Die Durchflußzytometrie ermöglicht die Differenzierung suspendierter Einzelzellen nach morphologischen Eigenschaften (Zellgröße und Granularität), sowie nach der spezifischen Bindung von Fluorochrom-markierten, monoklonalen Antikörpern (AK) gegen Zell-assoziierte Antigene.

In einem Durchflußzytometer werden Zellsuspensionen mittels hydrodynamischer Fokussierung so durch einen Laserstrahl (488 nm, Argon-Laser) geschossen, daß von jeder einzelnen Zelle ein Signal detektiert werden kann. Jede Zelle erzeugt Streulicht, das durch einen *Photomultiplier* verstärkt und in einen elektrischen Impuls umgewandelt wird. Hierbei ist das Vorwärts-Streulicht (*forward scatter, FSC*) proportional zur Größe einer Zelle und das Seitwärts-Streulicht (*sideward scatter, SSC*) ein Maß für die Granularität der Zelloberfläche. Zusätzlich kann jede Zelle mit unterschiedlichen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert werden, die gegen bestimmte Proteine auf der Zelloberfläche gerichtet sind. Der Einsatz von bis zu vier Fluorochromen (z.B. FITC, PE, ECD, PeCy5) ist durch den Einsatz von Bandfiltern möglich, die die jeweils anderen Wellenlängen "abschotten". Jedes Fluoreszenzsignal wird über einen eigene *Photomultiplier* verarbeitet. So kann anhand der Fluoreszenz nicht nur die Anzahl der Zellen bestimmt werden, die ein bestimmtes Protein auf der Oberfläche exprimieren, sondern über die mittlere Fluoreszenz-Intensität (*mean fluorescence intensity*) auch eine Aussage über die Expressionsstärke auf der einzelnen Zelle gemacht werden. In parallelen Proben mit unspezifischen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern des gleichen Isotyps wird die unspezifische Bindung detektiert und die Fluoreszenz automatisch kompensiert.

2.7.2. Durchführung der Fluoreszenzfärbung

Monozyten aus PBMC im Kulturmedium (RPMI 1640, 10% FCS, 1% P/S)

FACS-Puffer

1 x PBS, 10% FCS

Fluoreszenzmarkierte spezifische Antikörper und Monozytenoberflächenantigene

CD14-Antigen

IgG-PE oder IgG-FITC

Becton Dickson, Deutschland

Anti-human IgG-PE/IgG-FITC Isotype Kontrol

Becton Dickinson, Deutschland

Die Monozyten aus PBMC wurden in der Neubauer-Kammer gezählt und ein entsprechendes Volumen, welches ca. 50.000 Zellen enthält, wurde in die Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden anschließend 5 min. bei 1200 rpm in RT zentrifugiert, der Überstand vollständig abgenommen und die Zellpellets vom Boden des Reaktionsgefäßes gelockert. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt, um die Phagozytose der Antikörper während der Inkubationszeit zu unterbinden. Zu den Ansätzen wurden PE(FITC)-konjugierter anti-CD14-Antikörper und PE(FITC)-konjugierter Isotyp zugegeben. Nach der Antikörperzugabe wurden die Ansätze für wenige Sekunden stark gemischt und auf Eis im Dunkeln ca. 30 min. inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Röhrchen mit FACS-Puffer aufgefüllt und 5 min. bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand möglichst vollständig abgenommen, das Zellpellet vom Boden des Reaktionsgefäßes abgelöst und wieder auf Eis gestellt. Pro Röhrchen wurden 400µl FACS-Puffer zugesetzt. Die gefärbten Zellsuspensionen wurden bis zur Messung (nicht länger als 8 Stunden) im Dunkeln auf Eis gelagert. Die Messung wurde am FACSCalibur und FACScan-Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson (Deutschland) durchgeführt und mit Hilfe von Software CellQuest ausgewertet.

Für die Meßmaske wurden folgende Fenster erstellt:

DotPlot FSC (forward scanner detector) gegen SSC (side scanner detector)
(Zellgröße gegen Granularität)

EinDotPlot FL1 gegen FL3 (Fluoreszenzkanäle für verschiedene
Fluoreszenzspektren)

Histogram-Plot FL3

Nachdem die Geräteeinstellungen (für Monzyten aus PBMC) richtig konfiguriert worden waren, wurde die untersuchte Zellpopulation im FSC/SSC-Plot „gegated“ (G1). Als erstes wurde die Probe mit Isotypkontrolle im FSC gegen SSC DotPlot und FL3 Histogram-Plot gemessen. Dabei wurden im DotPlot die Quadranten und im Histogram-Plot der Marker so platziert, dass sich im DotPlot alle markierten Zellen im unteren, linken Bereich und im Histogram-Plot links von dem Marker befinden. Diese Quadrant- und Markerplatzierung wurde für die weiteren Messungen verwendet, um die unspezifische Antikörperbindung während der Auswertung auszuschließen.

Nach der Isotypkontrolle wurden die spezifisch gefärbten Zellsuspensionen gemessen, ausgewertet und statistisch bearbeitet.

3. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte (SEM) dargestellt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des T-Tests, wobei die Fehlerwahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet wurde. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede der Ergebnisse aus Berechnung und Messung erfolgte mittels Tukey's HSD oder Tamhane's T2 post hoc test (nicht-parametrischer Test für multiple Tests) und Two-independent-samples t test. Zur statistischen Datenanalyse wurde das Softwarepaket SPSS 11.0 für Windows (SPSS, Chicago, IL) verwendet.

III. Ergebnisse

1. Monozytenisolierung aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)

1.1. Kombination aus Ficoll Dichtgradientenzentrifugation und Adhärenz

Monozyten wurden, wie bereits im Methodenteil beschrieben, aufgrund ihrer Adhärenzfähigkeit von den übrigen mononukleären Zellen separiert. Nach einer Ficoll-Dichtgradienten-Zentrifugation wurden die MNC in FCS freies Medium aufgenommen und in PLL-beschichteten Kulturflaschen verteilt. Die nicht adhärennten Zellen wurden mit PBS von der Flaschen-Oberfläche heruntergespült und auf diese Weise von den adhärennten Monozyten separiert. Die adhärennten Monozyten wurden daraufhin 3-10 min mit Trypsin 25% von der Flaschen-oberfläche abgelöst und mit Kulturmedium heruntergespült. Die so gewonnenen Monozyten besaßen eine Reinheit von bis zu 72%. Mit dieser Methode konnten aus 50 ml Voll-Blut 3×10^6 Zellen gewonnen werden. Die Monozyten-Reinheit lag bei insgesamt 17 Isolationen zwischen 65% und 78% mit einem Mittelwert \pm Standardabweichung von $72 \% \pm 5,68$. Die Zellvitalität betrug $75\% \pm 3,3$.

1.2. Kombination aus Ficoll-Dichtgradientenzentrifugation und Negativ-Selektionierung mittels magnetischer *Beads*

In einem ersten Schritt wurden aus Vollblut mononukleäre Zellen (MNC) durch eine Ficoll Dichtgradientenzentrifugation angereichert. Die so gewonnenen Zellen wurden einer Negativ-Selektionierung mittels magnetischer *Beads* unterzogen, um die anderen Zell-Populationen (B-Zellen, NK-Zellen, T-Zellen, Erythrozyten, Granulozyten) aus der MNC-Population zu entfernen. Die so gewonnenen Zellen wurden mit fluoreszenzgekoppelten CD14-Antikörpern markiert und die Anteile von Monozyten durch eine FACS Analyse bestimmt.

Die Monozytenreinheit betrug $92\% \pm 5,26$. Mit dieser Methode konnten aus 50 ml Voll-Blut $1-3 \times 10^7$ Zellen gewonnen werden. Die Zellvitalität betrug $90\% \pm 3,2$.

2. Nachweis der Reinheit isolierter Monozyten

Gereinigte Monozyten (*Kapitel 2.1.-2.3*) wurden entweder mit PE(FITC)-konjugiertem anti-CD14-Antikörper oder mit dem entsprechenden PE(FITC)-konjugierten Isotyp markiert. Hierzu wurden 1×10^6 Zellen in 100 μ l 0,1% BSA (in PBS) resuspendiert und in einem Kunststoff-Röhrchen mit 20 μ l Antikörper-Lösung für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden jeweils 500 μ l PBS zu den Proben gegeben, diese durchmischt und im Durchflußzytometer vermessen. Abb. 2.1 und Abb. 2.2 zeigen beispielhaft die Anreicherung von Monozyten aus PBMC von Probanden.

2.1. Die Reinheit isolierter Monozyten über Adhärenz

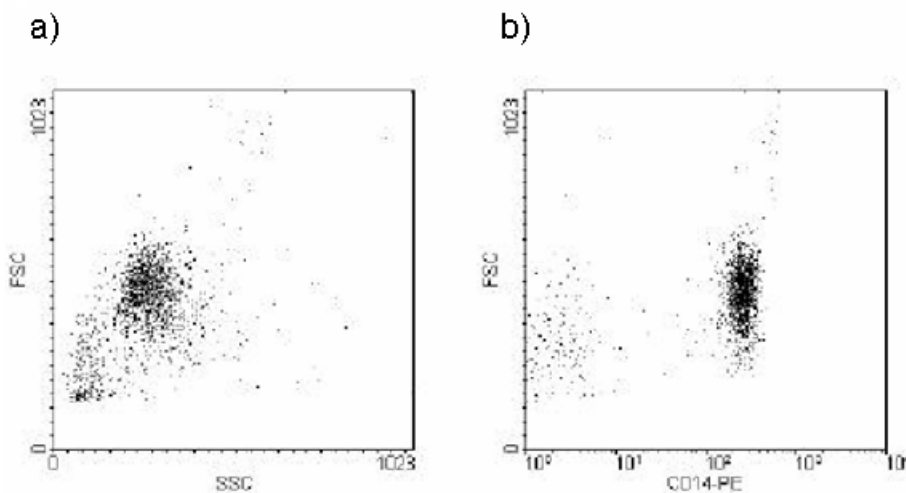
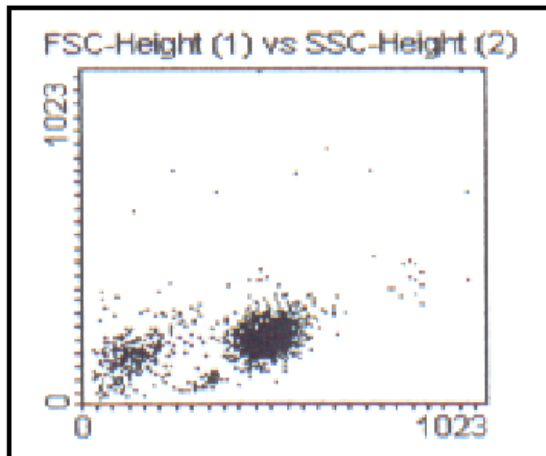


Abb. 2.1: Durchflußzytometer: a) – b) aufgereinigte Monozyten eines Probanden. Die Histogramme a) zeigt die Zellen nach FSC und SSC aufgetrennt. Eine bessere Unterscheidung von Monozyten und Lymphozyten ist in b) zu erkennen (Auftrennung nach FSC und Fluoreszenz). Nach Kompensation der Isotypkontrolle wurde die Monozyten-Anteile als 78% (gereinigte Monozyten) bestimmt.

2.2. Die Reinheit isolierter Monozyten über magnetische *Beads*

A.



B.

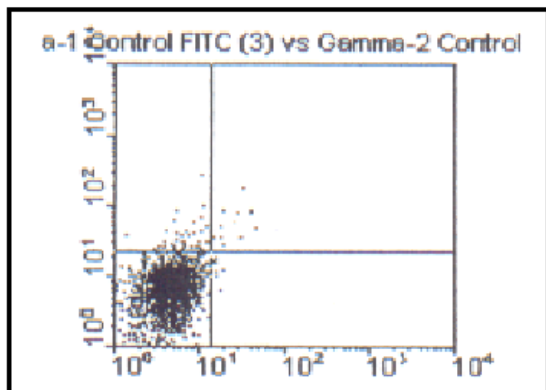


Abbildung. 2.2.

Monozyten wurden wie im Text beschrieben isoliert. Die CD14 positiven Monozyten stellen sich als FITC-positiv dar. In diesem repräsentativen Experiment beträgt die Monozytenreinheit ca. 92%. A. Im oberen Plot sind der Vorwärtsscatter (x-Achse) und der Seitwärtsscatter (y-Achse) dargestellt. B. Das untere Bild zeigt die Isotypenkontrolle.

3. Nachweis intrazellulärer Zytokine

3.1. Nachweis der IL-6 bei den Ansätzen mit LPS und GLAT

Die Bestimmung der IL-6-Menge in den Monozyten-Kulturüberständen mittels ELISA erfolgte wie in *Material und Methoden, Kapitel 2.6.*, beschrieben.

Zur Analyse der erhaltenen Ergebnisse und zur IL-6 Konzentrationsbestimmung in den gemessenen Proben wurde zunächst jeweils eine Eichgerade als Standard erstellt. Diese wurde auf Abbildung 3.1.a dargestellt.

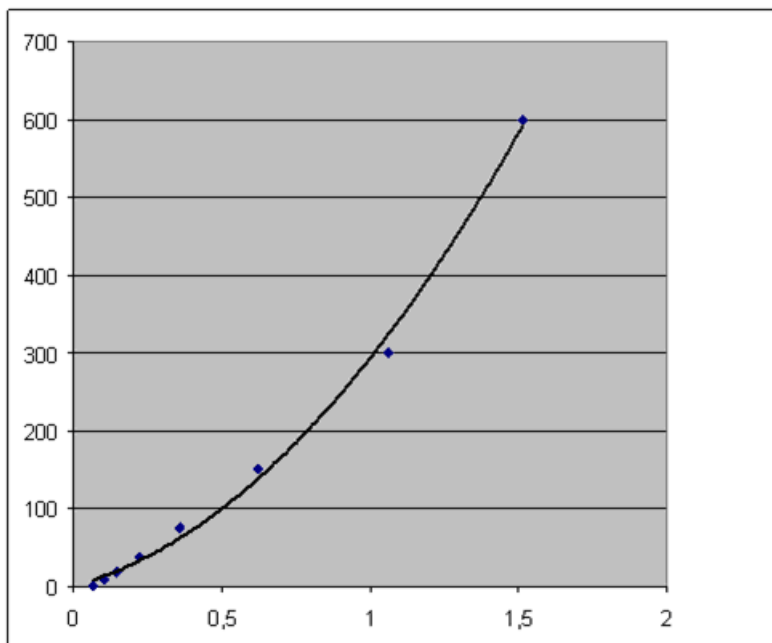


Abb.3.1.a. Eichgerade für IL-6 ELISA

IL-6-Konzentration (pg/ml, x) gegen Absorption des Standards(y)

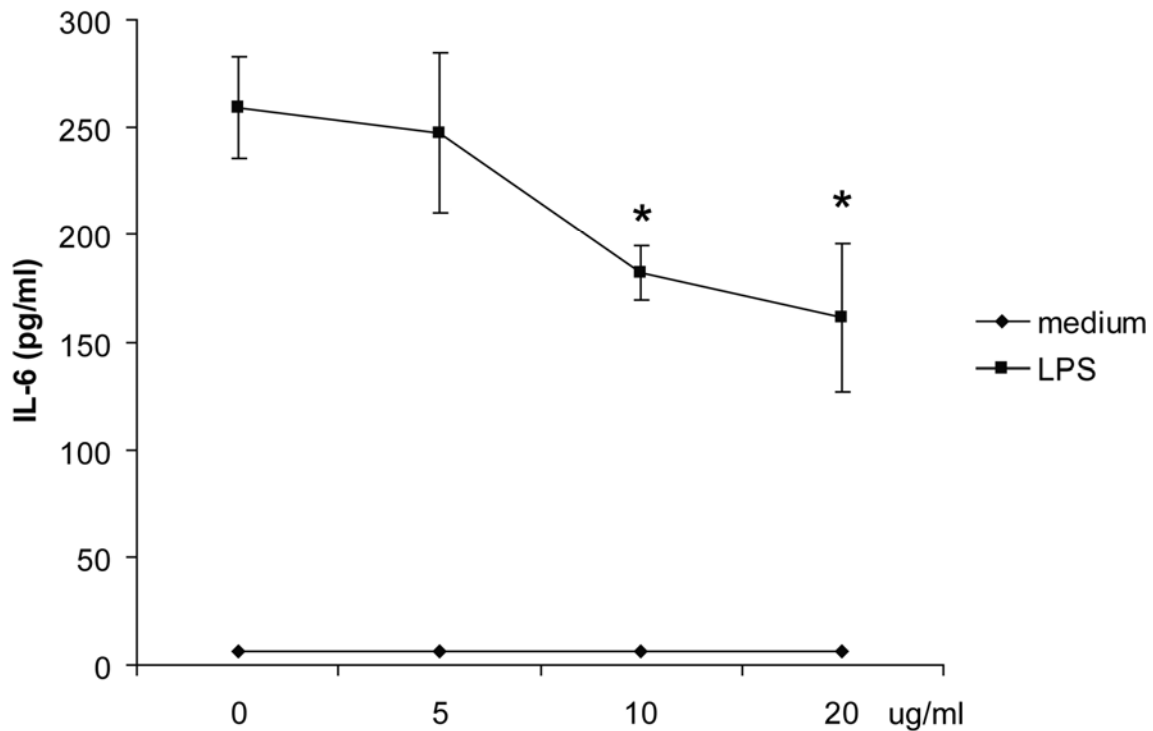


Abb.3.1.b. Einfluß von GLAT ($\mu\text{g/ml}$, x) auf die IL-6 Produktion (pg/ml , y) nach 24 h Inkubationszeit

Isolierte humane Monozyten waren mit LPS 100 ng/ml in Präsenz von GLAT in 0, 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ für 24 Stunden inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen zur IL-6-Detektion (pg/ml , y) mittels ELISA. *: $p < 0,05$, $n=5$ (n-Wert stellt die Zahl der Versuche dar).

Abbildung 3.1.b. zeigt die IL-6-Konzentration im Kulturüberstand der Monozyten-Probe nach Stimulationsansatz mit LPS, mit oder ohne GLAT, oder allein mit GLAT, welche durch Vergleich der Absorption der Probe mit IL-6-Eichgerade errechnet wurde. Durch die Zugabe von LPS erfolgte eine massive IL-6-Ausschüttung der Monozyten. Die höchsten Werte der IL-6-Produktion wurden bei den allein mit LPS stimulierten Monozyten gemessen. Die Produktion von IL-6 in dem allein mit GLAT inkubierten Kulturüberstand erwies sich als minimal und lag unter der Nachweisgrenze des ELISA-Systems in allen untersuchten Ansätzen. GLAT induzierte keine IL-6 Freisetzung der Monozyten im Gegensatz zu LPS.

Nach Zugabe von LPS in Präsenz von GA in 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ in die Zellkultur reduziert sich die IL-6-Produktion der Monozyten. Bei GLAT in 5 $\mu\text{g/ml}$ sank die IL-6-Konzentration ab, aber statistisch nicht signifikant. Als die GLAT-Konzentration in 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ anstieg, sank die IL-6 Produktion signifikant ab ($p < 0,05$).

Für die Aufgabe wurden 5 Versuche durchgeführt, alle zeigten gleiche Ergebnisse.

3.2. Nachweis der IL-10-Konzentration bei den Ansätzen mit LPS, GLAT

Die Bestimmung der IL-10-Menge in den Monozyten-Kulturüberständen mittels ELISA erfolgte wie in *Material und Methoden, Kapitel 2.6.*, beschrieben.

Zur Analyse der erhaltenen Ergebnisse und zur IL-10 Konzentrationsbestimmung in den gemessenen Proben wurde zunächst jeweils eine Eichgerade als Standard erstellt. Diese wurde auf Abbildung 3.2.a. dargestellt.

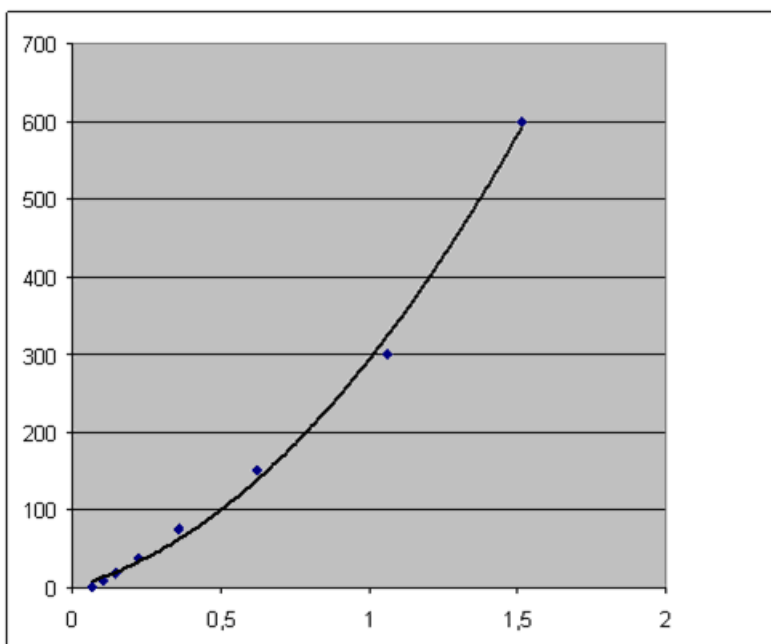


Abb.3.2.a Eichgerade für IL-6 ELISA

IL-10 Konzentration (pg/ml, x) gegen Absorption des Standards(y)

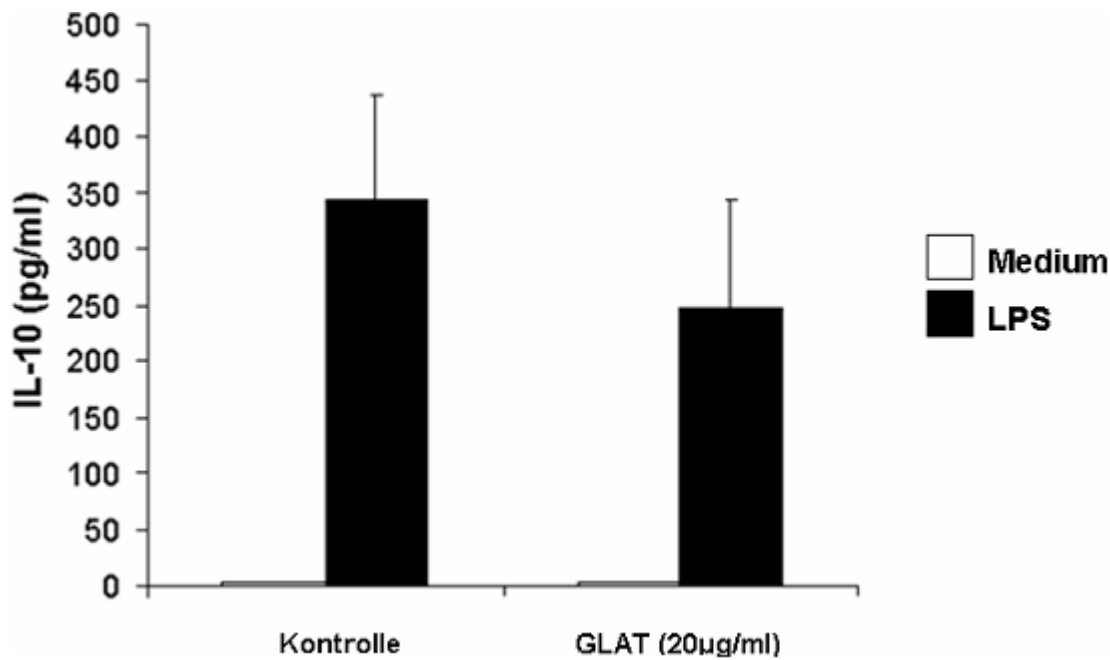


Abb 3.2.b. Einfluß von GLAT auf die IL-10-Produktion nach 24 h Inkubationszeit

Isolierte humane Monozyten wurden mit LPS 100 ng/ml in Präsenz von GLAT in 0, 5, 10, 20 µg/ml für 24 Stunden inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen zur IL-10-Detektion (pg/ml, y) mittels ELISA. $P > 0,05$, $n=4$ (n -Wert stellt die Zahl der Versuche dar)

Primäre Monozyten wurden, wie unter *Kapitel 2.1-2.3* beschrieben, isoliert, kultiviert und mit LPS in Gegenwart von GLAT behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und die IL-10-Produktion im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt.

Die Ergebnisse aus den Versuchen sind in Abbildung 3.2.b. zusammengefasst. Im Gegensatz zur IL-6-Produktion reagieren primäre Monozyten bei IL-10-Produktion nicht signifikant auf GLAT-Zugabe. Zunehmende GLAT-Konzentrationen bewirkten keine erhöhte IL-10-Produktion. Vor und nach GLAT-Zugabe in die mit oder ohne LPS stimulierte Monozytenkultur blieb die IL-10-Produktion nach wie vor unverändert ($p > 0,05$).

4. Untersuchung der PI3K-AKT-GSK3 Signalwege

4.1. Nachweis der IL-6-Produktion bei den Ansätzen mit LPS, GLAT und LY 294002 (PI3K Inhibitor)

Die Bestimmung der IL-6-Menge in den Monozyten-Kulturüberständen mittels ELISA erfolgte wie in *Material und Methoden, Kapitel 2.6*, beschrieben.

Zur Analyse der erhaltenen Ergebnisse und zur IL-6-Konzentrationsbestimmung in den gemessenen Proben wurde zunächst jeweils eine Eichgerade als Standard erstellt. Diese wurde in Abbildung 4.1.a. dargestellt.

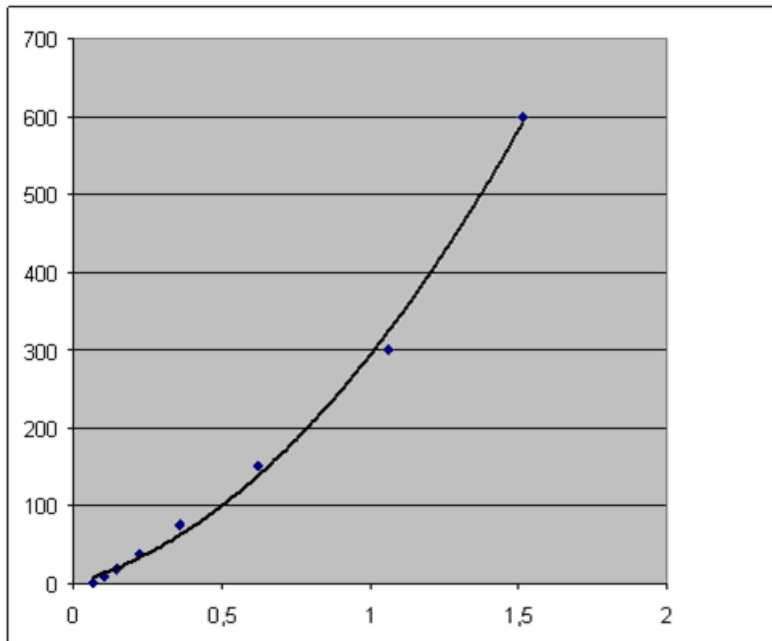


Abb.4.1.a Eichgerade für IL-6 ELISA

IL-6-Konzentration (pg/ml, x) gegen Absorption des Standards(y)

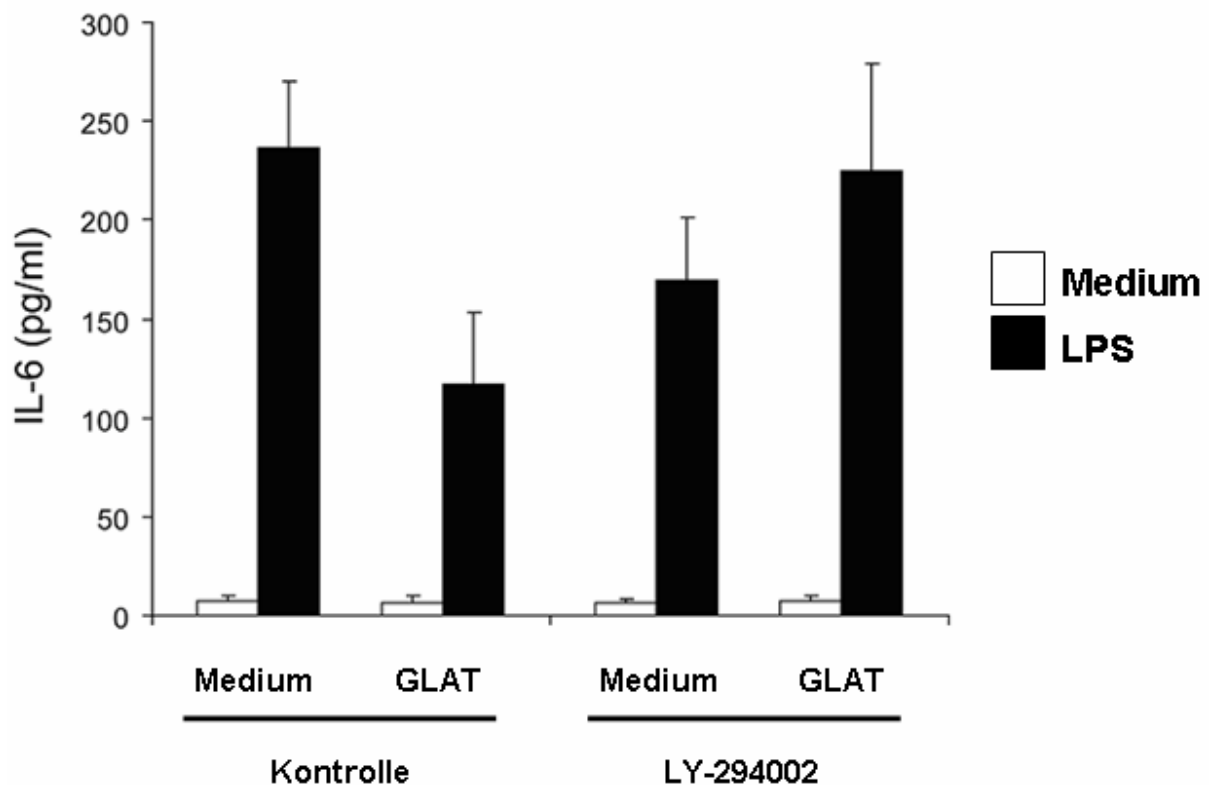


Abb.4.2.b Einfluß von GLAT und LY294002 auf die IL-6-Produktion nach 24 h Inkubationszeit

Graphische Darstellung der IL-6 Produktion der humanen Monozyten. Humane Monozyten wurden aus peripheren mononukleären Blutleukozyten (PBMC) isoliert, danach mit LPS und GLAT 20 µg/ml, in Präsenz oder Absenz von LY294002 20 µM für 24 Stunden inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen zur IL-6-Detektion (pg/ml y) mittels ELISA.

Primäre humane Monzyten wurden, wie unter *Kapitel 2.1.-2.3.* beschrieben, isoliert, kultiviert und mit LPS in Gegenwart von GLAT, mit oder ohne LY294002, oder allein mit LY294002 behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und die IL-10-Produktion bestimmt. Abbildung 4.2.b. zeigt die IL-6-Konzentration im Kulturüberstand der Monozyten-Probe nach Stimulation von LPS im Präsenz von GLAT, mit oder ohne LY294002, welche durch Vergleich der Absorption der Probe mit IL-6-Eichgerade errechnet wurde.

Bei der Kontrollgruppe reagieren die Monozyten nach alleiniger LPS-Stimulation mit erhöhter IL-6-Produktion, während bei zusätzlicher Zugabe von GLAT 20 µg/ml in die Zellkultur die IL-6-Konzentration signifikant sank. Dieser Unterschied erwies sich als statistisch signifikant ($p < 0,05$). Bei Inkubation mit GLAT allein war die IL-6 Produktion minimal und lag unter der Nachweisgrenze des ELISA-Systems. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigt die Zugabe von LY294002 in Präsenz von GLAT und LPS im Kulturüberstand eine Überwindung der zuvor durch GLAT ausgelöster Reduktion der IL-6-Produktion, d.h. es zeigt sich ein signifikanter Wiederanstieg der IL-6-Produktion ($p < 0,05$), wobei bei Zugabe von LY294002 mit LPS ohne GLAT die IL-6-Produktion der Monozyten absank. LY294002 allein oder mit GLAT induziert kein mittels ELISA nachweisbare IL-6-Produktion. Die IL-10-Produktion wurde hier durch die GLAT-Zugabe wie in *Kapitel 3.2.* bereits beschrieben, nicht beeinflusst.

5. Nachweis extrazellulärer LDH-Enzymaktivität bei den Stimulationsansätzen in der Monozytenkultur

Primäre humane Monozyten wurden, wie unter *Kapitel 2.1.-2.3.* beschrieben, isoliert, kultiviert und mit LPS in Gegenwart von GLAT behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und die Enzymaktivitäten bestimmt. Die extrazelluläre LDH-Aktivität diente als Zytotoxizitätsmarker. Bestimmung der LDH-Aktivität in der Monozytenkultur durch eine Behandlung mit LPS und GLAT wurden mittels ELISA erfaßt. Die Ergebnisse aus den durchgeführten Versuchen sind (s.u.) in *Abbildung 5.* zusammengefasst.

Die Messungen der extrazellulären LDH-Aktivität ergaben, daß Konzentrationen von 20 µg/ml GLAT in LPS-stimulierter Zellkultur für Monozyten gering zytotoxisch sind. Eine zunehmende GLAT-Konzentration ging nicht mit einer Erhöhung der LDH-Enzymaktivität einher. Vor und nach der Zugabe von GLAT in die mit oder ohne LPS-stimulierte Zellkultur veränderte sich die LDH-Aktivität nicht signifikant ($p > 0,05$), nach wie vor lag sie durchschnittlich unter ca. 20%.

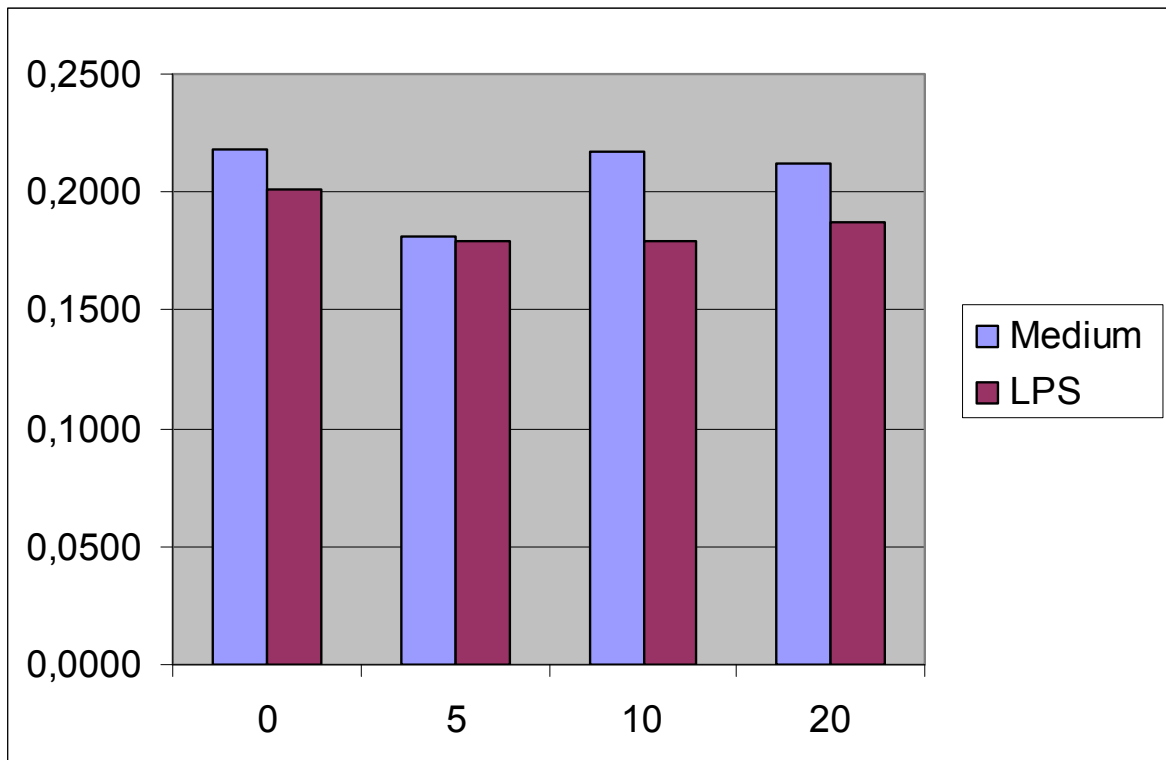


Abb.5. Einfluß von GLAT auf die Freisetzung von LDH in Monozytenkultur nach 24 h Inkubationszeit. GLAT-Konzentration (0, 5, 10, 20 µg/ml, x) gegen LDH-Aktivität (y)
Für die Bestimmung der LDH-Aktivität wurden 5×10^5 Monozyten ausplattiert und nach 24 h mit 5 - 20 µg/ml GLAT und LPS 100 ng/ml für 24 h, bzw. mit 0.5% Triton x-100 als Positivkontrolle für 1 h behandelt. Die LDH-Aktivität wurde in 100 µl Medium mit einem LDH-Kit bestimmt (*Kapitel 2.5.2*). Die so erhaltenen Werte wurden auf die Positivkontrolle, die auf 100% gesetzt wurde, normiert. LDH-Freisetzungen > 50% wurden als zytotoxisch, < 50% als nicht bis gering zytotoxisch definiert.

IV. Diskussion

1. Isolation hochreiner Monozyten

In der Literatur sind verschiedene Techniken zur Isolation von gereinigten Monozyten beschrieben. Wie im Methodenteil ausführlich beschrieben, wurde zur Isolation von Monozyten deren Adhärenzfähigkeit an glatte Oberflächen genutzt. Auf diese Weise wurden Monozyten von den nicht adhärenierten Zellen separiert. Mit dieser Methode konnten aus 50 ml Voll-Blut 3×10^6 Zellen gewonnen werden. Die Monozyten-Reinheit betrug $72\% \pm 5,68\%$. Die Zellvitalität zeigte $75\% \pm 3,3$. Jedoch standen die Monozyten in unzureichender Zahl in Suspension zur Verfügung. Auch bezüglich der Monozyten-Reinheit und Zellvitalität waren sie ungeeignet für weitere Verwendung. Die Adhärenz-Methode erwies sich als zu zeitaufwendig und erbrachte keine befriedigenden Reinheitsgrade. Der Nachteil der angewendeten Adhärenz-Methode liegt in der aufwendigen Loslösung der adhärenierten Monozyten von ihrer Unterlage. In der Literatur sind verschiedene Möglichkeiten der Ablösung erläutert. So beschreibt Nielsen die Verwendung von Lidocain, Trypsin, Kälte von 4°C und EDTA zur Ablösung von Monozyten von Plastikoberflächen. Weder EDTA, Trypsin noch Kälte führten in mehreren Versuchen zu einer hinreichenden Ablösung der Monozyten von den PLL-beschichteten Unterlagen. Darüberhinaus führt Trypsin aufgrund seiner enzymatischen Aktivität zu einer Beseitigung aller Zelloberflächenmarker und macht dadurch die Zellen für eine FACS-Analyse unbrauchbar. Aufgrund ihrer stärkeren Adhärenz an PLL-beschichteten Plastikoberflächen wurde ein höherer Zellverlust für das Ablösen von ihrer Unterlage berechnet. Zudem befinden sie sich in einem aktivierten Zustand. Da nicht aktivierte Monozyten isoliert werden sollten, wurde auf eine Plastikadhärenz verzichtet, da es hierbei regelmäßig auch zur Kontaktaktivierung kommt.

Eine Schwierigkeit dieser Arbeit war die Non-Adhärenz der isolierten Monozyten an Plastikoberflächen. Durch zusätzliche Vorbehandlung der Plastikoberflächen mit PLL konnte eine Monozyten-Adhärenz beobachtet werden. Vermutlich liegt diese Differenz an der spezifischen Eigenheit der verwendeten Kulturflaschen.

An Antikörper gebundene magnetische Microbeads ermöglichen eine sowohl positive als auch negative Selektion von Monozyten. Bei der negativen Selektion werden

Antikörper mit spezifischer Bindung an alle nicht-monozytären Zellen verwendet und gereinigte Monozyten nach Durchfluß durch das magnetische System gewonnen. Ein Nachteil der positiven Selektion ist die Aktivierung der Monozyten durch Antikörperbindung an den LPS-Rezeptor, was sie ungeeignet für LPS-Stimulationen in Zellkulturen werden läßt. Mit Hilfe der Microbeads erreicht man eine Reinheit des isolierten Monozyten-Anteils von $92\% \pm 5,26$. Darüberhinaus befanden sich die Monozyten in einem nicht-aktivierten Zustand und waren in ausreichender Zahl in Suspension verfügbar. Mit diesem wenig zeitaufwendigen Verfahren, welches die Isolation von nicht aktivierten Monozyten ermöglichte, wurden die besten und reproduzierbarsten Ergebnisse erzielt. Dieses Verfahren wurde daher für die weiteren in vitro Analysen verwendet.

2. Nachweis von IL-6- und IL-10-Produktion

Den klinischen Effekten von Glatirameracetat (GLAT; COP1; Copaxone) auf den Verlauf der schubförmigen MS werden unterschiedlichen Immunmechanismen zugeschrieben. Diese weisen auf einen weiteren T-Zell-abhängigen Wirkmechanismus hin. Wir suchten nach immunmodulatorischen Wirkmechanismen von GLAT, letztere jedoch unabhängig von einer Blockade der Antigenpräsentation oder T-Zell-vermittelten Effekten. Die antiinflammatorischen Wirkungen von GLAT betreffend interessierte uns besonders die Rolle der PI3K-AKT-GSK3-Signalwege.

In der vorliegenden Arbeit wurden die isolierten Monozyten aus PBMC von gesunden Menschen mit LPS, ohne oder mit GLAT in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zytokine IL-6 und IL-10 im Überstand mittels ELISA untersucht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, dass das synthetische Polypeptid GLAT in isolierten Monozyten die Zytokin-Produktion modulieren kann. GLAT reduzierte signifikant die Th1-Zytokin IL-6-Produktion, aber es zeigte sich kein signifikanter Effekt auf die Th2-Zytokin IL-10-Produktion bei LPS-aktivierten Monozyten aus humanen peripheren mononukleären Blutzellen. Zu diesen Ergebnissen wurden die LDH Konzentrationen in den gleichen Proben mittels ELISA gemessen. Die Daten zeigten, dass kein nachweisbarer Zelltod durch die Zugabe von GLAT in der LPS stimulierte Monozyten-Kultur verursacht wurde.

GLAT geht eine starke Verbindung mit MHC-Klasse II Molekülen ein und kann sogar Cluster-Bildung der Moleküle induzieren (Blanchette et al., 2008; Fridkis Hareli et al., 1997, 1998). Darüberhinaus ist es wahrscheinlich, dass GLAT über seine Verbindung zu MHC II-Molekülen Zytokinsekretionen von APC modulieren kann. Auf den APC wurden MHC II-Moleküle in hoher Dichte gefunden. Jung et al., 2003, Bright et al., 1999 und Matsuyama et al., 1993 haben ähnlicherweise beobachtet, dass die Zytokinsekretion von Monozyten auch durch ein an den zu MHC-Klasse II-Komplex gebundenes Superantigen induziert werden kann.

2.1. Nachweis der IL-6-Produktion

Die IL-6-Produktion der Monozyten wurde durch LPS-Stimulation induziert. LPS ist ein Molekülkomplex der Zellwand gramnegativer Bakterien, der Monozyten aktivieren kann, in dem es an deren Membranmolekül CD14 bindet. Durch die Bindung zum LPS-Rezeptor CD14 erfolgt die Aktivierung der Monozyten und dadurch die Produktion einer ganzen Reihe pro- (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12) und antiinflammatorischer Zytokine (IL-10, TGF- β) und Mediatoren (NO). Interleukin-6 (IL-6) ist ein Zytokin mit einem Molekulargewicht von 26 kDa. Es wird vor allem von aktivierten Monozyten und Makrophagen, T- und B-Lymphozyten als Antwort auf IL-1 und TNF- α synthetisiert, aber auch von Astrozyten und Gliazellen (Thomson et al., 1994; Curfs et al., 2003; Ding et al., 2006). IL-6 hat ein weites Wirkungsspektrum. Es wirkt als Differenzierungsfaktor für B-Zellen und als Aktivierungsfaktor für T-Zellen. So stimuliert es in Gegenwart von IL-2 die Differenzierung von T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen. Neben vielen Wachstums- und Steuerfunktionen hat IL-6 Auswirkungen auf die Stimulation von B-Lymphozyten und damit auf die Differenzierung in antikörperbildende (IgG-bildende) Plasmazellen sowie Auswirkungen auf die Induktion von Akute-Phase-Proteinen. Es stellt mit TNF- α zusammen das am weitesten verbreitete und potenteste proinflammatorische Zytokin dar (Gadient et al., 1997; Ishihara et al., 2002). Die Rolle von IL-6 für die Pathogenese der MS ist nicht vollständig geklärt. IL-6 konnte in akuten und chronischen MS-Läsionen nachgewiesen werden. In zahlreichen Studien ist eine erhöhte Konzentration von IL-6 nachgewiesen worden (Maimone et al., 1997; Okuda et al., 1999, 2000; Fillion et al., 2003; Zhao et al., 2008).

Sowohl im Plasma als auch im Liquor von MS-Patienten konnten vor allem während eines Schubs erhöhte IL-6-Konzentrationen gemessen werden. Auch bei Patienten mit chronisch-progressiv verlaufender MS wurden in Kulturen von unstimulierten Monozyten (PBMN) erhöhte IL-6-Konzentrationen nachgewiesen. (Maimone et al., 1993; Stelmasiak et al., 2001; Ishihara et al., 2002; Angelucci et al., 2006). Bei durch Con A stimulierten Monozyten zeigte sich *in vitro* während und nach einem Schub eine vermehrte Bildung von IL-6 (Schluep et al., 1998). Die vermehrte systemische und intrathekale IL-6-Produktion ist vereinbar mit der bei MS-Patienten auftretenden B-Zell-Überaktivität und führt zu einer gesteigerten B-Zelldifferenzierung in Plasmazellen, die vermehrt gewebedestruierende Autoantikörper bilden. Es ist denkbar, dass die Reduktion der IL-6-Produktion in Monozyten auf ein immunmodulatorischen Mechanismus von GLAT zurückzuführen ist, wobei die günstige Auswirkung auf MS durch die Verschiebung von proinflammatorischer zu antiinflammatorischer Antwort Zustand kommt. Die vergleichbaren Ergebnisse von Hussien et al., 2001 und Jung et al., 2003 zeigten, dass GLAT die proinflammatorische Zytokin IL-12-Produktion bei humanen DCs sowie die TNF- α Produktion bei peritonealen Mäuse-Makrophagen senken konnte. Zusammenfassend läßt sich mit der hier beobachteten signifikanten Konzentrationsreduktion von IL-6 die immunmodulatorische Wirkung von GLAT erklären.

Zu bedenken bleibt jedoch, daß IL-6 durch sein weites Wirkungsspektrum auch von zahlreichen anderen Vorgängen im Körper beeinflußt werden kann, so daß die Interpretation von Konzentrationsschwankungen schwierig bleibt.

2.2. Nachweis der IL-10-Produktion

Interleukin-10 (IL-10), der sogenannte Zytokinsynthese-Inhibitionsfaktor, ist ein 18 kDa Zytokin, das hauptsächlich vom TH2-Typ der CD4⁺-T-Helferzellen, aber auch von aktivierten B-Zellen und Makrophagen produziert wird. IL-10 hemmt die Produktion humaner T-Zellen und die Zytokinproduktion von Makrophagen, somit also die Bildung von IL-1, IL-2, IL-6, IFN- γ und TNF- α (Kazuyuki und Tosato, 1992; Beebe et al., 2004). Des weiteren bewirkt IL-10 eine verminderte Bildung von antigenpräsentierenden Zellen durch verminderte Expression von HLA-Klasse-II-Molekülen auf ihrer Oberfläche (De Waal et al., 1991; Del Prete et al., 1993; Mitsdoerffer et al., 2005). Es bewirkt eine Hemmung der T-Zell-vermittelten

Entzündungsreaktion, d.h. es ist antiinflammatorisch wirksam (Abbas et al., 1994; Angelucci et al., 2006). Am Modell der EAE konnte gezeigt werden, dass ein drastischer Anstieg der IL-10-mRNA und ein damit einhergehender Abfall der mRNA für IL-2, IL-6 und IFN- γ nachweisbar war (Krakauer et al., 2008; Kennedy et al., 1992). Ebenfalls im EAE-Modell kam es bei IL-10 defizienten Mäusen, zu einem beschleunigten Verlauf der EAE. Die oft beschriebene Besserung der Symptome bei der EAE stellte sich bei diesen Mäusen nicht ein (Samoilova et al., 1998). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigte Cannella et al., 1996, dass IL-10 auf den Verlauf der EAE bei Mäusen keinen positiven Einfluß hatte. Zu keinem Zeitpunkt der Studie wurde die EAE durch IL-10 verbessert. Salmaggi et al., 1996 fanden bei MS-Patienten unabhängig von der Krankheitsaktivität eine geringere IL-10-Serumkonzentration als bei gesunden Probanden. Dieser Konzentrationsunterschied konnte von Özenci et al., 2000 und Nicoletti et al., 2000 nicht bestätigt werden. Bei Untersuchungen durch Krakauer et al., 2008 sowie Cua et al., 2001 fand sich eine vermehrte IL-10-mRNA-Expression sowohl im Blut als auch im ZNS von MS-Patienten mit schubförmig-remittierendem Verlauf während der stabilen Krankheitsphasen, wohingegen während eines Schubs die IL-10-Konzentration vermindert war (Ferrante et al., 1998, Schlupe et al., 1999). Bei Messungen von IL-10 im Liquor von MS-Patienten konnten diese Ergebnisse bestätigt werden (Carrieri et al., 1998; Krakauer et al., 2008). Cua et al., 2001 interpretierten die erhöhte IL-10-Konzentration im Schubintervall als notwendig für die Stabilisierung oder als mögliche Prävention vor einem erneuten Schub.

Betrachtet man die bisherigen Erkenntnisse über die Funktion und Wirkung von IL-10 und die in der Einleitung diskutierte Wirkungsweise von GLAT, dann wurde unter der Zugabe von GLAT in die mit oder ohne LPS stimulierten Zellkulturen die erhöhte IL-10-Produktion vermutet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten aber keinen Konzentrationsanstieg von IL-10 24 Stunden nach der Zugabe von GLAT in die Zellkulturen. Dieses Resultat wird von Hussien et al. bestätigt. Die gleichen Ergebnisse, nämlich keine Erhöhung der IL-10-Produktion humaner DCs durch die Zugabe von GLAT, wurden auch bei Hussien et al., 2001 beobachtet. Im Gegensatz dazu fanden sich bei Untersuchungen durch Jung et al., 2003 eine vermehrte IL-10-Produktion durch GLAT bei peritonealen Makrophagen und DCs aus Mäusen, nicht aber bei humanen

Monozyten oder DCs. Die unterschiedlichen Studienergebnisse lassen sich unter anderem auf unterschiedliches Material und Methoden zurückführen.

Die immer wieder beobachteten widersprüchlichen Studienergebnisse können durch verschiedene Faktoren bedingt sein. Zum einen gibt es bei den einzelnen Studien Unterschiede im Studiendesign (in vitro, in vivo oder ex vivo), im Arbeitsmaterial (menschliche oder tierische Zellquelle; MS-Patienten oder EAE-Tiermodell), im Zeitpunkt der Zytokinbestimmung. Zytokine werden lokal sezerniert, an fixe oder lösliche Rezeptoren gebunden, schnell von umgebenden Zellen aufgenommen und verstoffwechselt und haben somit eine kurze Halbwertszeit. Außerdem unterscheiden sich Zytokin-Konzentrationen intraindividuell, in Abhängigkeit von Alter, körperlicher Fitness bzw. Aktivität, Ernährung und psychischen Einflüssen (Özenci et al., 2000). Es ist auch denkbar, dass Unterschiede in der Probenbehandlung (z.B. Aufbewahrung der Proben bei unterschiedlichen Temperaturen, bei unterschiedlichen Ansatzkonzentrationen) für die differierenden Ergebnisse mitverantwortlich sind.

3. Untersuchung der PI3K-AKT-GSK3 Signalwege

PI3K ist eine Familie evolutionär konservierter Enzyme. Sie agieren als wichtige Signalproteine fundamentaler, zellulärer Regulationsprozesse.

Die Rolle der PI3K-AKT Signalwege bei der Inflamationsregulation wurde in verschiedenen Studien untersucht. Der PI3K-AKT-Signalweg spielt eine wichtige Rolle für neuronales Überleben. Von der PI3K gebildete Phosphatidylinositate aktivieren die Proteinkinase AKT, welche die Funktionen pro- und anti-apoptotischer Proteine über deren Phosphorylierung kontrolliert (Datta et al., 1999; Yuan und Yankner 2000; Martin et al., 2005).

Durch die konstitutiv aktive Expression der AKT, ein downstream Target von PI3K, wurden transgene Mäuse im Gegensatz zu Wild-Typ Mäuse vor einer letalen Dosis von LPS geschützt (Brommhardt et al., 2004). Die Beteiligung der PI3K-AKT in der TLR-Signalisierung durch LPS, ein TLR Agonist, wurde von Arbibe et al. und Martin et al. 2005 beschrieben. Inflammatorische *in vivo*-Modelle haben gezeigt, dass der PI3K-defiziente Phänotyp von Mäusen eine defekte Th2-assoziierte Immunität aufweist, d.h. IL-12 Level und Th1 Antwort sind übermäßig erhöht. (Fukao et al.,

2003, 2002). Die Aktivierung von PI3K förderte das Überleben von endotoxämischen Mäusen, wobei Inhibition von PI3K das Überleben von endotoxämischen Mäusen verringerte (Schabbauer, et al., 2004; Williams, et al., 2004). Guha und Mackman weisen darauf hin, dass die Produktion von TNF- α einer negativen Regulierung durch die Aktivierung der PI3K-AKT unterliegt. Die Blockierung des PI3K-AKT Signalwegs durch PI3K Inhibitoren in Monozyten erhöhte LPS-induzierte TNF- α - und Tissue Faktor Produktion, gleich sowie bei der Aktivierung von MAPKs, NF- κ B und bei der Reduzierung der Phosphorylierung von GSK3. (Mausumee Guha u. Nigel Mackman 2002). Martin et al (2005) beschreiben, dass die Blockierung des PI3K-AKT-Signalwegs durch PI3K-Inhibitoren zu verminderter IL-10-Produktion und vermehrter IL-12-Produktion führt.

GLAT moduliert den Verlauf der Multiplen Sklerose durch noch unklare Mechanismen. Die Untersuchungen von Weber et al., 2004, 2005, Duda et al., 2000 und Miller et al., 1988 zeigten, dass GLAT die Aktivierung von Myelin-spezifischen autoaggressiven T-Zellen und von Monozyten inhibiert, besonders die Th1-Zytokin-Produktion von letzteren T-Zellen. Bei der Wirkungsfolge von GLAT bestand ein Veränderung von Zytokin-Profilen, mit Verschiebung der Zytokin-Produktion von Th1- zu Th2-Zytokinen (Miller et al., 1998; Duda et al., 2000 Schremf et al., 2007). Die durch GLAT reduzierte IL-12- und TNF- α -Produktion wurden von Hussien et al., 2001 und Jung et al., 2003 beschrieben. Die an der Stimulierung der Th2-Antwort beteiligten Faktoren sind trotzdem relativ wenig verstanden.

Zusammenfassend weisen die bisherige Studienergebnisse darauf hin, dass PI3K-AKT-Signalweg und GLAT bei der Immunmodulation als antiinflammatorisch auf die Immuninteraktion wirken.

Die oben zitierten Studienergebnisse führen zu folgender Fragestellung, nämlich durch welchen Mechanismus GLAT die antinflammatorische Aktivität moduliert, und ob ein Zusammenhang zwischen immunmodulierender Wirkung von GLAT und inflammatorischer Regulation des PI3K-AKT-GSK3 Signalwegs besteht.

Unsere Hypothese ist: der PI3K-AKT Signalweg wird durch GLAT aktiviert. Die Aktivierung des PI3K-AKT Signalwegs durch GLAT wird durch PI3K-Inhibitoren inhibiert. In dieser vorliegenden Arbeit, überprüften wir diese Hypothese mit den Inkubationsansätzen LY294002, einem potenten und selektiven Phosphatidylinositol-

3-Kinase (PI3K) Inhibitor, GLAT und LPS. Mittels ELISA wurde die IL-6-Produktion im Kulturüberstand nach Zugabe von LY294002, mit oder ohne GLAT und mit oder ohne LPS untersucht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die durch GLAT induzierte signifikante Absenkung der IL-6-Produktion nach LPS-Stimulation im Monozyten-Kulturüberstand durch die Zugabe von LY294002 aufgehoben wurde ($P < 0,05$). Die durch GLAT vermittelte Suppression der IL-6-Produktion konnte durch den PI3K-Inhibitor statistisch signifikant aufgehoben werden. Diese Versuchsergebnisse bestätigen unsere Hypothese: GLAT kann den PI3K-AKT Signalweg aktivieren, und die Aktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs durch GLAT wird durch den PI3K Inhibitor (LY294002) aufgehoben. Um weitere Nachweise für die Aktivierung des PI3K-AKT Signalwegs durch GLAT zu erbringen, finden weitere Untersuchungen statt.

4. Einschränkung und Ausblick

Die Verwendung des Monozyten-Modells ist für unser Arbeitsziel geeignet, da dem Vorteil des DC-Modells in Bezug auf das Antigenpräsentationspotential erheblich höhere Kosten und ein unverhältnismäßig größerer präparativer Aufwand gegenüberstehen.

Monokausale Zusammenhänge zwischen GLAT-Zugabe und darauffolgender Veränderung der Zytokinkonzentration beim in-vitro Zell-Modell, lassen sich nur eingeschränkt aus dem komplexen interdependenten Zusammenhang isolieren bzw. isoliert betrachten.

Es ist unsere Hoffnung, mit unseren hier vorgestellten Ergebnissen sowie unseren zukünftigen Arbeiten zum besseren Verständnis der Wirkungsmechanismen von GLAT bei der MS-Therapie beitragen zu können.

Zusammenfassend könnte zukünftig ein besseres Verständnis der durch GLAT modulierten funktionellen Rolle antigenpräsentierender Zellen, ihrer gegenseitigen Wechselwirkungen und ihres Einflusses auf T-Zellen, Axone und Oligodendroglia den Weg für selektivere und effektivere Therapien bei der MS ebnen.

Literaturverzeichnis

Abbas A.K, Lichtman A.H, Pober J S (1994) Cellular and molecular immunology In: Abbas A K., Lichtman A.H., Pober, J.S (Eds.), W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto. Cytokines. S 239-256

Aharoni R, Eilam R, Domev H, Labunskay G, Sela M, Arnon R (2005) The immunomodulator glatiramer acetate augments the expression of neurotrophic factors in brains of experimental autoimmune encephalomyelitis mice. Proc Natl Acad Sci USA 102: 19045–19050

Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT (2001) Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. Nat Immunol 2: 725-31

Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, Greenfield EA, Chang TT, Sharpe AH, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT (2002) Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. Nat Med 8: 1024-32

Aktas O, Ari N, Rieks M, Hoffmann V, Schimrigk S, Przuntek H, Pöhlau D (2001) Multiple Sclerosis: modulation of apoptosis susceptibility by glatiramer acetate. Acta Neurol Scand 104: 266-270

Angelucci F, Batocchi AP, Caggiula M, Frisullo G, Patanella K, Sancricca C, Nociti V, Tonali PA, Mirabella M (2006) In vivo effects of mitoxantrone on the production of pro- and anti-inflammatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells of secondary progressive multiple sclerosis patients. Neuroimmunomodulation. 13: 76-81

Arnon R, Teitelbaum D (1988) Suppression of demyelinating diseases by synthetic copolymers. In: A Multidisciplinary Approach to Myelin Disease. G. Serlupi Creszendi (eds.). Plenum publishing Corporation. S 243-250

Bar-Or A, Gibbs E, Niino M, Aziz T, Alatab S, Shi F, Campagnolo D, Jalili, F, Rhodes S, Yamashita T, Fan B, Freedman M, Panitch H, Arnold D, Vollmer T, Oger (2007) Tracking In Vivo Immune Modulation in MS Patients Treated with Glatiramer. J

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

Barcellos LF, Oksenberg JR, Begovich AB, Martin ER, Schmidt S, Vittinghoff E, Goodin DS, Pelletier D, Lincoln RR, Bucher P, Swerdlin A, Pericak-Vance MA, Haines JL, Hauser SL; Multiple Sclerosis Genetics Group (2007) HLA-DR2 dose effect on susceptibility to multiple sclerosis and influence on disease course. Am J Hum Genet. 2003 Mar; 72(3):710-6. Epub 2003 Jan 28. Acta Neurol Scand Suppl. 187: 34-8

Bernard C, Leydon J, Mackay IR (1976) T-Cell necessity in the pathogenesis of experimental autoimmunity encephalomyelitis in mice. Eur J Immunol 6: 655-660

Blanchette F, Neuhaus O (2008) Glatiramer acetate: evidence for a dual mechanism of action. J Neurol. 255 Suppl 1: 26-36

Bright J.J, Xin, Z, Sriram, S (1999) Superantigens augment antigen-specific Th1 responses by inducing IL-12 production in macrophages. J. Leukoc Biol. 65: 665-670.

Cannella B. C (1996) IL-10 fails to abrogate experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 45: 735-746

Cantley L. C (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. Science 296: 1655-1657

Carrieri P.BB, Provitera V, De Rosa T, Tartaglia G, Gorga, F Perrella (1998) Profile of cerebrospinal fluid and serum cytokines in patients with relapsing –remitting multiple sclerosis: a correlation with clinical activity. J Neurochem 20: 373-382

Cassan C, Liblau RS (2007) Immune tolerance and control of CNS autoimmunity: from animal models to MS patients. *J Neurochem.* 100: 883-92

Chekhonin VP, Semenova AV, Gurina OI, Dmitrieva TB (2003) Myelin oligodendroglucoprotein: the structure, functions, role in pathogenesis of demyelinating disorders. *Biomed Khim.* 49: 411-23

Christiane Wilke (2003) Serum-Spiegel pro-und antiinflammatorischer Zytokine bei Multiple Sklerose-Patienten unter Interferon- β 1b-Therapie. Dissertation an der Medizinische Fakultät der Technische Universität München

Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN (2007) Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol.* 2007: 89195

Cua D J., Hutchins B., LaFace D M., Stohlamn, S-. Coffman RL (2001) Central Nervous System Expression of IL -10 inhibits Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal Immunol* 166: 602-608

Curfs JH, Meis JF, Hoogkamp-Korstanje JA (1997) A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev.* 10: 742-80

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999) Cellular survival: a Play in three Akts. *Genes Dev.* 13: 2905-27.

Del Prete G, De Carli M, Almerigogna, F, Giudizi, M.G., Biagotti, R., Romagnani, S (1993) Human IL-10 is produced by both Type 1 Helper (Th1) and Type 2 Helper (Th2) cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* 150: 353-360

Delilović-Vranić J (2005) Multiple sclerosis therapy. *Med Arh.* 59:191-5.

De Waal R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo M.G., Velde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Yssel, H., Vries, J.E de (1993) Interleukin 10 (IL-10) and viral IL -10 strongly reduce antigen-specific human T-cell proliferation by diminishing the antigen

presenting capacity of monocytes via downregulation of class II histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 174: 915-924

Dhib-Jalbut S, Arnold DL, Cleveland DW (2006) Neurodegeneration and neuroprotection in multiple sclerosis and other neurodegenerative diseases. *J Neuroimmunol* 176: 198–215

Dhib-Jalbut S (2007) Pathogenesis of myelin/oligodendrocyte damage in multiple sclerosis. *Neurology*. 68: 13-21; discussion S 43-54

Ding C, Jones G (2006) Anti-interleukin-6 receptor antibody treatment in inflammatory autoimmune diseases. *Rev Recent Clin Trials*. 1(3):193-200.

Ferrante P, Fusi ML, Saresella M, Caputo D, Biasin M, Trabattoni D, Salvaggio A, Clerici E, De Vries J.E, Aversa G, Cazzullo C.L, Clerici M (1998) Cytokine production and surface marker expression in acute and stable multiple sclerosis: Altered IL -12 production and augmented signaling lymphocytic activation molecule (SLAM)-expression lymphocytes in acute multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 43: 340-349

Fierz W (1997) Genetik und Immunologie. In: Kesselring J (ed.): Multiple Sklerose. Kohlhammer, Stuttgart; S 46-69

Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR (1989) Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170: 2081-9

François Blanchette, Oliver Neuhaus (2008) Evidence for a dual mechanism of action. *J Neurol* 255 (Suppl 1): 26–36

Fridkis-Hareli M, Strominger J.L (1998) Promiscuous binding of synthetic copolymer to purified HLA-DR molecules. *J. Immunol*. 160: 4386-4397

Fridkis-Hareli M, Teitelbaum D, Garevich E (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. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4872-4876

Fridkis-Hareli M, Teitelbaum D, Arnon R, Sela M (1995) Synthetic copolymer 1 and myelin basic protein do not require processing prior to binding to class II major histocompatibility complex molecules on living antigen-presenting cells. *Cell Immunol.* 163: 229-236.

Fridkis-Hareli M, Teitelbaum D, Pecht I, Arnon R, Sela M (1997) Binding of copolymer 1 and myelin basic protein leads to clustering of class II MHC molecules on antigen-presenting cells. *Int. Immunol.* 9: 925-934

Friese MA, Montalban X, Willcox N, Bell JI, Martin R, Fugger L (2006). The value of animal models for drug development in multiple sclerosis. *Brain* 129: 1940-1952

Frohman EM, Racke MK, Raine CS (2006) Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med.* 354: 942-55.

Fukao T, Tanabe M, Terauchi Y, Ota T, Matsuda S, Asano T, Kadowaki T, Takeuchi T, Koyasu S (2002) PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. *Nat. Immunol.* 3: 875–881

Gadient RA, Otten UH (1997) Interleukin-6 (IL-6)—A molecule with both beneficial and destructive potentials. *Prog Neurobiol* 52: 379–390

Greter M, Heppner FL, Lemos MP, Odermatt BM, Goebels N, Laufer T, Noelle RJ, Becher B (2005) Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Natur Med.* 11: 252-3

Gratchev A, Schledzewski K, Guillot P, Goerdts S (2001) Alternatively activated antigen-presenting cells: molecular repertoire, immune regulation, and healing. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 14: 272-9

Gajewski TF, Fitch FW (1988) Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol* 140: 4245-52

Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG (1997) A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389: 737-42

Guha M, N. Mackman (2001) LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* 13: 85-94.

Guha M, MA O'Connell, R Pawlinski, SF. Yan, D Stern, N Mackman (2001) Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor α expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood* 98: 1429-1439.

Guha M, Mackman N (2002) The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J. Biol. Chem.* 277: 32124-32132

Hafler D.A, Fox DA, Manning ME, Schlossmann SF, Reinherz EL, Weiner HL (1985) *In vivo* activated T lymphocytes in the peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *N Eng J Med* 312: 1405-1411

Hafler DA, Slavik JM, Anderson DE, O'Connor KC, De Jager P, Baecher-Allan C (2005) Multiple sclerosis. *Immunol Rev* 204: 208–31

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374: 1–20.

Hohlfeld R, Meinl E, Weber F, Zipp F, Schmidt S, Sotgiu S, Goebels N, Voltz R, Spuler S, Iglesias A, Wekerle H (1995) The role of autoimmune T lymphocytes in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurology* 45: 33-38

Hohlfeld R, Wiendl H (2001) The ups and downs of multiple sclerosis therapeutics. *Ann Neurol.* 49: 281–284

Hua F, Ha T, Ma J, Li Y, Kelley J, Gao X, Browder IW, Kao RL, Williams DL, Li C (2007) Protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in TLR4-deficient mice is mediated through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *J Immunol.* 178: 7317-24

Hussien Y, Sanna A, Soderstrom M, Link H, Huang YM (2001) Glatiramer acetat and IFN-beta act on dendritic cells in multiple sklerosis. *J. Neuroimmunol.* 121: 102-110

Ishihara K, Hirano T (2002) IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 13: 357–368.

Jacobs R (1996) Methoden der Immunologie. In: Schedlowski, M., Tewes, U. (Hrsg.). *Psychoneuroimmunologie.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Jacobs LD et al. (1996) Intramuscular Interferon-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol* 39: 285-294

Jai Perumal, Massimo Filippi, Corey Ford, Kenneth Johnson, Robert Lisak, Luanne Metz, Alexandros Tselis, Mark Tullman & Omar Khan (2006) Glatiramer acetate therapy for multiple sclerosis. a review. 2: 1019-1029

Jee Y, Piao WH, Liu R, Bai XF, Rhodes S, Rodebaugh R, Campagnolo DI, Shi FD, Vollmer TL (2007) CD4(+)CD25(+) regulatory T cells contribute to the therapeutic effects of glatiramer acetate in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Immunol.* 125: 34-42

Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH (2000) Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 192: 1213-22

Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk AH (2001) Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol* 22: 394-400 (Jonuleit 2001b)

Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH (2001) Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with 66 regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 193: 1285-94

Kapsenberg ML, Kalinski P (1999) The concept of type 1 and type 2 antigenpresenting cells. *Immunol Lett* 69: 5-6

Kazuyuki T, Tosato G (1992) IL -10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol* 148: 1143-1148

Kennedy MK, Torrance D.S, Picha KS, Mohler KM (1992) Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis reveals that IL -10 mRNA expression correlates with recovery. *J Immunol* 149: 2496-2505

Kim HJ, Ifergan, Antel JP, Seguin R, Duddy M, Lappier Y, Jalili F, Bar-Or A (2004) Type 2 monocyte and microglia differentiation mediated by glatiramer acetate therapy in patients with multiple sclerosis. *J Immunol.* 172: 7144-53

Klanginsirikul P, Russell NH (2002) Peripheral blood stem cell harvests from G-CSF-stimulated donors contain a skewed Th2 CD4 phenotype and a predominance of type 2 dendritic cells. *Exp Hematol.* 30: 495-501

Krakauer M, Sorensen P, Khademi M, Olsson T, Sellebjerg F (2008) Increased IL-10 mRNA and IL-23 mRNA expression in multiple sclerosis: interferon- β treatment increases IL-10 mRNA expression while reducing IL-23 mRNA expression. *Mult Scler.* 14: 622-30

Kuenz B, Lutterotti A, Ehling R, Gneiss C, Haemmerle M, Rainer C, Deisenhammer F, Schocke M, Berger T, Reindl M (2008) Cerebrospinal fluid B cells correlate with early brain inflammation in multiple sclerosis. *PLoS ONE.* 2;3: e2559

LG Filion, G Graziani-Bowering, D Matusevicius, M S Freeman (2003) Monocyte-derived cytokines in multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 131: 324–334

Lassmann H (1997) Pathologische Anatomie und experimentelle Modelle. In: Kesselring, J.(Hrsgbr.) Multiple Sklerose. Kohlhammer, Stuttgart, S 18-45

Lassmann H (1998) Neuropathology in multiple sclerosis: new concepts. *Mult Scler.* 4: 93-8. Review

Lublin F (1995) Klinische Ergebnisse der Interferon beta-1b-Studie. In: Toyka, K., Arnason, B.G.W., Hartung, HP., Li, D., Lublin, F., Miller, D. (Eds.) Interferon beta-1b zur Behandlung der Multiplen Sklerose. *Nervenarzt.* S 7-10

Lublin F, Reingold S (1996) Defining the clinical course of multiple sclerosis. *Neurology* 46: 907-911

Lucchinetti C, Brück W, Rodriguez M (1996) Distinct patterns of Multiple Sclerosis pathology indicates heterogeneity in pathogenesis. *Brain Pathol* 6: 259-274

Lucchinetti C, Brück W, Parisi J (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47: 707-717

Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpeper JA, WysockaM, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A (1995) Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 154: 5071-79

Mahnke K, Bedke T, Enk AH (2007) Regulatory conversation between antigen presenting cells and regulatory T cells enhance immune suppression. *Cell Immunol.* 250: 1-13

Maimone D, Gregory S, Arnason BGW, Reder AT (1991) Cytokine levels in the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 32: 67-74

Maimone D, Reder AT, Gregory S (1993) T-cell lymphokine-induced secretion of cytokines from patients with multiple sclerosis. *Cell Immunol* 146 (1993): 96-106

Maimone D, Guazzi CG, Annunziata P (1997) IL-6 detection in multiple sclerosis brain. *J Neurol Sci* 146: 59-65

Martin M, Rehani K, Jope RS, Michalek SM (2005) Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol* 6: 777-84

Martino G, Grohovaz F, Brambilla E, Codazzi F, Consiglio A, Clementi E, Filippi M, Comi G, Grimaldi LME (1998) Proinflammatory cytokines regulate antigenindependent T-cell activation by two separate calcium -signaling pathways in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol.* 43: 340-349

Mariotti S, Sargentini V, Marcantonio C, Todero E, Teloni R, Gagliardi MC, Ciccaglione AR, Nisini R (2008) T-cell-mediated and antigen-dependent differentiation of human monocyte into different dendritic cell subsets: a feedback control of Th1/Th2 responses. *FASEB J.* 2008 Jun 12

Matthews WB (ed) (1991) Mc Alpine's Multiple sclerosis. 2nd ed. Churchill Livingstone, London

Miller A (1998) Glatiramer acetate — Mechanisms of action. 3. Fachpresse Kolloquium Multiple Sklerose, Rottach-Egern, 29.07.1998

Miller A, Shapiro S, Gershtein R et al. (1998) Treatment of multiple sclerosis with Copolymer1 (Copaxone): implicating mechanisms of Th1 to Th2/Th3 immune-deviation. *J Neuroimmunol* 92: 113-121

Mitrovic B, Stock G, Perez HD, Dinter H (1999) Molekular Aspekte der Behandlung der Multiplen Sklerose. In: „Handbuch der molekularen Medizin“ Band 5, Erkrankungen des Zentralnervensystems. Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg S 411-445

Mitsdoerffer M, Schreiner B, Kieseier BC, Neuhaus O, Dichgans J, Hartung HP, Weller M, Wiendl H (2005) Monocyte-derived HLA-G acts as a strong inhibitor of autologous CD4 T cell activation and is upregulated by interferon-beta in vitro and in vivo: rationale for the therapy of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 159: 155-64

Mausumee Guha, Nigel Mackman (2002) The PI3K-Akt pathway limits LPS activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J. Biol. Chem,* 10: 1074

Nicoletti F, DiMarco R, Patti F, Zaccone P, L'Episcopo MR, Reggio E, Xiang M, Nicoletti A, Reggio A (2000) Short-term treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis patients with interferon (IFN)-b 1b transiently increases the blood levels of interleukin (IL)-6, IL-10 and IFN-gamma without significantly modifying those of IL-1b, IL-2, IL-4 and tumor necrosis factor-a. *Cytokine* 12/6: 682-687

Nowak N, Haberstock J, Geiger E, Bieber T (1999) Dendritic cells in allergy. *Allergy* 54: 792-803

Nurtac Ari (2003) Multiple Sklerose: Untersuchung der Apoptosehäufigkeit und der Produktion intrazellulärer Zytokine in-vitro stimulierter Lymphozyten von mit Copaxoner behandelten RRMS-Patienten. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ruhr-Universität Bochum

Olsson T, Sun J, Hillert J, Hojeberg B, Ekre HP, Andersson G, Olerup O, Link H (1992) Increased numbers of t cells recognizing multiple myelin basic protein epitopes in multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 22: 1083-1087

Oksenberg JR, Sherritt M, Begovich AB, Erlich HA, Bernard CC, Cavalli-Sforza LL, Steinman L (1989) T-cell receptor Valpha and Cbeta alleles associated with multiple sclerosis and myasthenia gravis. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 988-992

Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K (1995) Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 378: 88-91

Özenci V, Kouwenhoven M, Teleshova N, Pashenkov M, Fredrikson S, Link H (2000) Multiple sclerosis: Pro- and antiinflammatory cytokines and metalloproteinases are affected differentially by treatment with IFN- β . *J Neuroimmunol* 108: 236-243

Poser CM (1980) Exacerbations, activity and progression im multiple sclerosis. *Arch Neurol* 37: 471-474

Poser CM, Paty D.W, Scheinberg LC (1983) New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 13: 227-231

R Gold, F Heidenreich, L Kappos (2002) Immunotherapy of Multiple Sclerosis with Glatiramer Acetate Mechanisms of Action and Results from Therapeutic Trials. *Akt Neurol* 29: 345-351

Racke MK, Martin R, McFarland H, Fritz RB (1992) Copolymer1 induced inhibition to antigen specific T-cell activation: interference with antigen presentation. *J Neuroimmunol* 37: 75-84

Re F, Strominger JL (2004) IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells. *J Immunol*. 173: 7548-55

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995) Immunologic selftolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155: 1151-64

Sakaguchi S, Toda M, Asano M, Itoh M, Morse SS, Sakaguchi N (1996) T cell mediated maintenance of natural self-tolerance: its breakdown as a possible cause of various autoimmune diseases. *J Autoimmun* 9: 211-20

Salmaggi S, Dufour A, Eoli M, Corsini E, La Mantia L, Massa G, Nespolo A, Milanese C (1996) Low serum interleukin-10 levels in multiple sclerosis: further evidence for decreased systemic immunosuppression. *J Neurol* 243: 13-17

Samoilova EB, Horton JL, Chen Y (1998) Acceleration of experimental autoimmune encephalomyelitis in interleukin-10-deficient mice: Roles of interleukin-10 in disease progression and recovery. *Cell Immunol* 188: 118-124

Sanders M.E, Coski C.L, Robbins D, Shin ML, Frank MM, Joiner KA (1986) Activated terminal complement in cerebrospinal fluid in Guillain-Barre-Syndrome and multiple sclerosis. *J Immunol* 136: 4456-4459

Schabbauer G, Tencati M, Perderson B, Pawlinski R, Mackman N (2004) PI3K-Akt pathway suppresses coagulation and inflammation in endotoxemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24: 1963-9

Schluep M, Van Melle G, Henry H, Stadler C, Roz' th-Wicky B, Magistretti PJ (1998) In vitro cytokine profiles as indicators of relapse activity and clinical course in multiple sclerosis. *Mult Scler* 6: 198-202

Sospedra M, Martin R (2005) Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23: 683-747

Schrempf W, Ziemssen T (2007) Glatiramer acetate: mechanisms of action in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev.* 6: 469-75

Stefan Jung, Ines Siglienti, Oliver Grauer, Tim Magnus, Guglielmo Scarlato, Klaus Toyka (2004) Induction of IL-10 in rat peritoneal makrophages and dendritic cells by Glatiramer acetate. *J. Neuroimmunol* 148: 63-73

Stelmasiak Z, Koziol-Montewka M, Dobosz B, Rejdak K (2001) IL-6 and sIL-6R concentration in the cerebrospinal fluid and serum of MS patients. *Med Sci Monit* 7: 914-918

Suhayl Dhib-Jalbut, MD (2007) Pathogenesis of myelin/oligodendrocyte damage in multiple sclerosis. *Neurology* 68: 13-S21

Sung SS (2008) Monocyte-derived dendritic cells as antigen-presenting cells in T-cell proliferation and cytokine production. *Methods Mol Med.* 138: 97-106

Teitelbaum D, Meshorer A, Hirshfeld T. et al. (1971) Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide. *Eur J Immunol* 1: 242-248

Teitelbaum D, Aharoni R, Arnon R, Sela M (1988) Specific inhibition of the T-cell response to myelin basic protein by the synthetic copolymer COP1. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9724-9728

Tennakoon DK, Mehta RS, Ortega SB, Bhoj V, Racke MK, Karandikar NJ. Therapeutic induction of regulatory, cytotoxic CD8+ T cells in multiple sclerosis.

Thomson, A. (ed; 1994) Interleukin-6 as an antiinflammatory cytokine: Induction of circulating IL -1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *The Cytokine Handbook*, 2nd Ed. London, Academic Press. Tilg H, Trehu E, Atkins M.B, Dinarello C.A, Mier J.W. *Blood* 83: 113-118

Traugott U, Scheinberg L.C, Raine CS (1985) On the presence of Ia -positive endothelial cells and astrocytes in multiple sclerosis lesions and ist relevance to antigen presentation. *J Neuroimmunol* 8: 1-14

Traugott U, Reinherz EL, Raine CS (1983) Multiple sclerosis: distribution of T-cells, Tcell subsets and Ia-positive macrophages in lesions of different ages. *J Neuroimmunol* 4: 201-221

Traugott U, Lebon P (1988) Multiple sclerosis: involvement of interferons in lesion pathogenesis. *Ann Neurol* 24: 243-251

Van Boxel-Dezaire AH, Hoff SC, van Oosten BW, Verweij CL, Drager AM, Ader HJ, van Houwelingen JC, Barkhof F, Polman CH, Nagelkerken L (1999) Decreased interleukin-10 and increased interleukin-12p40 mRNA are associated with disease activity and characterize different disease stages in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 45: 695–703

Weber MS, Pro'd homme T, Youssef S, Dunn SE, Rundle CD, Lee L, Patarroyo JC, Stüve O, Sobel RA, Steinman L, Zamvil SS (2007) Mechanism of action of glatiramer acetate in treatment of multiple sclerosis. *Nat Med* 13: 935-43

Weber MS, Hohlfeld R, Zamvil SS (2007) Mechanism of action of glatiramer acetate in treatment of multiple sclerosis. *Neurotherapeutics* 4: 647-53

Weber MS, Starck M, Wagenpfeil S, Meinl E, Hohlfeld R, Farina C (2004) Multiple sclerosis: glatiramer acetate inhibits monocyte reactivity in vitro and in vivo. *Brain* 127: 1370-8

Wekerle H, Linington C, Lassmann H, Meverman R (1986) Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends Neurosci* 9: 271-277

Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J, Lassmann H, Linington C (1994) Animal models. *Ann Neurol* 36: 47-53

Weinshenker B.G, Ebers GC (1987) The natural history of multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 14: 255-261

Weinshenker BG, Rice GP, Noseworthy JH, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC (1991) The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 3. Multivariate analysis of predictive factors and models of outcome. *Brain* 114: 1045-1056

Weinshenker BG (1995) The natural history of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 13: 119-146

Wiendl H, Kieseier BC (2003) Disease modifying therapies in multiple sclerosis: an update on recent and ongoing trials and future strategies. *Expert Opin Invest Drugs* 12: 689-712

Williams DL, Li C, Ha T, Ozment-Skelton T, Kalbfleisch J.H, Preiszner J, Brooks L, Breuel K, Schweitzer JB, (2004) Modulation of the phosphoinositide 3-kinase pathway alters innate resistance to polymicrobial sepsis. *J. Immunol.* 172: 449-456

Wucherpfennig, KW, Zhang J, Witek C, Matsui M, Modabber Y, Ota K, Hafler DA (1994) Clonal expansion and persistence of human t cells specific for an immunodominant myelin basic protein peptide. *J Immunol* 152: 5581-5592

Wucherpfennig KW, Weiner HL, Hafler DA (1991) T-cell recognition of myelin basic protein. *Immunology Today* 12: 277-282

Wucherpfennig KW, Newcambe J, Li H, Keddy C, Cuzner ML, Hafler D (1992) T cell receptor Va-Vb repertoire and cytokine gene expression in active multiple sclerosis lesions. *J Exp Med* 175: 993-1002

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

Zhao CB, Coons SW, Cui M, Shi FD, Vollmer TL, Ma CY, Kuniyoshi SM, Shi JA (2008) new EAE model of brain demyelination induced by intracerebroventricular pertussis toxin. *Biochem Biophys Res Commun.* 370: 16-21

Danksagung

Die Anfertigung dieser Dissertation wäre nicht möglich gewesen ohne die Unterstützung der Mitglieder der Arbeitsgruppe Neurologisches Labor des Universitätsklinikum des Saarlandes. An dieser Stelle möchte ich ihnen für die vielen nützlichen Gespräche und Anregungen danken. Insbesondere möchte ich folgende Personen danken:

Herrn Prof. Dr. Klaus Fassbender danke ich für die Überlassung des aktuellen Themas. Ganz besonders bedanke ich mich bei Prof. Dr. Fassbender für die großartige Unterstützung und Hilfsbereitschaft für die Blutspenden.

Herrn Dr. Yang Liu danke ich für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung.
Frau Dr. WenLin Hao danke ich für ihre Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Experimente.

Frau Dr. Anette Franz danke ich für ihre Bereitschaft bei der Korrektur dieser Arbeit.

Außerdem bedanke ich mich für die Unterstützung von Herrn Kan Xie.

Bei Frau Nadine Commencon, Frau Anderea Schottek möchte ich mich ganz herzlich für die Unterstützung und die Einarbeitung in die grundlegende Arbeitstechniken bedanken.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei allen Probanden, und Laborkollegen, die für meine Arbeit Blut gespendet haben.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie, meiner liebe Tochter und meiner Freundin Anette Franz für die gedankliche Unterstützung und das große Verständnis danken.

LEBENS LAUF

Name: Dan Wang ♀
Geburtsort: Harbin/China
Geburtsdatum: 12.12.1969
Familienstand: verheiratet, eine Tochter
Staatsangehörigkeit: chinesisch

in China

Schule: 1988 Abitur in Harbin (China)
Studium: Sept. 1988 - Juli 1993
Studium der Humanmedizin an der Universität von Harbin
Tätigkeit: Sept. 1993 - Sept. 1998
Assistenzärztin am Muslin-Klinikum in Harbin
Sept. 1998 - Dez. 1999
Weiterbildung für TCM (Traditionelle Chinesische Medizin)

in Deutschland

Studium: Mai 2000 - Juli 2001
Studium der deutschen Sprache an der Universität Osnabrück
Okt. 2001 - Nov. 2006
Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
Homburg/Saar
Nov.2006 Ablegung des Dritten Staatsexamens
Promotion: Seit 2007 Mitarbeit in der neurologischen Arbeitsgruppe
an der Universitätsklinik in Homburg
Sprachen: Chinesisch, Deutsch, Englisch
Bes. Kenntnisse: TCM (Trad. Chin. Medizin)