

**Struktur-Funktionsanalyse des Myelin Oligodendrozyten
Glykoproteins durch Gen-Ablation mittels homologer
Rekombination**

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln**

vorgelegt von
Lennart von Hoch
aus München

Köln 2004

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. W. Stoffel

Prof. Dr. J. C. Howard

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.04

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. W. Stoffel für die interessante Themenstellung, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und die großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. J. C. Howard danke ich für die freundliche Bereitschaft, das Coreferat zu übernehmen.

Ferner möchte ich mich bedanken bei:

Ehemaligen und jetzigen Kollegen: Dr. Uwe Janssen, Dr. Carsten Poggel, Dr. Jens Stracke, Dr. Olaf Spörkel, Dr. Thomas Uschkureit, Dr. Markus Zumbansen, Dr. Michael Nix, Dipl. Biol. Stefan Meinzinger, Erika Binczek, Barbara Blöck, Britta Jenke, Claudia Taprogge, Dipl. Biol. Constanze Bröhl, Dipl. Biol. Nikolay Kolev, Dipl. Biol. Robert Günther, Dipl. Chem. Christine Kiss und Dipl. Biol. Stephan Goldenbaum für die vertrauensvolle und schöne Arbeitsatmosphäre.

Herrn Prof. Dr. H. Büssow vom Anatomischen Institut der Universität Bonn für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen und die freundliche Bereitschaft alle meine Fragen zu beantworten.

Herrn Dr. Bogdan Beirowski vom Anatomischen Institut der Universität Köln für die Elektronenmikroskopie und die Einführung in selbige.

Herrn Prof. Dr. C. Linington danke ich für das zur Verfügung gestellte Antiserum.

Dr. Hrvoje Miletic und Dr. Werner Stenzel, Institut für Neuropathologie der Universität Köln, für die große Hilfe bei zahlreichen immunologischen Methoden und ganz besonders für die motivierenden und produktiven Diskussionen über immunologische Fragestellungen.

Frau Meiers, Institut für Neuropathologie der Universität Köln, für die Hilfe bei den Paraffinschnitten und der H/E- und Luxolfärbungen.

Christian Frie, Institut für Biochemie der Universität Köln, für die Hilfe bei Einbettung, Schneiden und Färben von Gewebeschnitten.

Oliver Feierabend und Rolf Müller für Hilfe bei Problemen physikalisch-chemischer Natur.

Allen anderen die zum Gelingen dieser Arbeit auf die eine oder andere Art beigetragen haben und ganz besonders dem Hasen.

Für meinen Vater und meine Mutter

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

1.1 Das Zentrale Nervensystem	1
1.2 Nervenleitung	2
1.3 Myelin	4
1.3.1 Internodales Myelin	4
1.3.2 Paranodales Myelin	5
1.3.3 Ranvier'scher Schnürring	5
1.4 Saltatorische Erregungsleitung	6
1.5 Myelinisierung im ZNS	6
1.6 Zusammensetzung des Myelins im ZNS	7
1.7 Lipide	7
1.8 Myelinproteine	9
2. Myelin/Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG)	11
2.1 Genstruktur	12
2.2 Expressionsmuster	13
2.3 Strukturmodell	14
2.4 Funktionen	15
3. EAE, MS und MOG	16
3.1 MS	16
3.1.1 Virale Ätiologie	17
3.1.2 Autoimmunität bei der MS	19
3.2 Die Blut-Hirn-Schranke	19
3.3 Allgemeines Modell der bei MS und EAE ablaufenden Immunprozesse	20
3.4 Der Entmarkungsherd (Plaque)	22
3.5 EAE	23
3.6 MOG induzierte EAE	25
3.7 Die Entstehung von autoreaktiven T-Zellen	27
3.8 <i>Gene-targeting</i> ; gezielter Austausch von Genen durch homologe Rekombination	27

II. Aufgabenstellung **29**

III. Ergebnisse **30**

1. Generierung einer MOG-defizienten Mauslinie	30
1.1 Klonierung des <i>replacement</i> Vektors	30
1.2 Herstellung rekombinanter ES-Zell Klone	31
1.3 Nachweis der homologen Rekombination	32
1.4 Karyotypisierung	33
1.5 Embryonenmanipulation	34
1.6 Southern Blot Hybridisierungsanalyse der transgenen Mauslinie	36
1.7 Northern Blot Analyse	37

1.8 Western Blot Analyse	37
2. Analyse der MOG-defizienten (mog -/-) Maus	39
2.1 Allgemeines	39
2.2 Myelin- und Proteinanalyse	39
2.3 Lipidanalyse	40
2.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	41
2.5 Immunhistochemische Lokalisation von MOG an Paraffinschnitten	43
2.6 Immunhistochemische Lokalisation von MOG an Gefrierschnitten	44
2.7 RT-PCR Analyse	45
3. Generierung und Analyse von Myelinmutanten	48
3.1 Genotypisierung	48
3.2 Beschreibung der Phänotypen	49
3.3 RNA Analyse mittels Northern Blot-Analyse	51
3.4 Myelinanalyse	51
3.5 Lipidanalyse	53
3.6 Elektronenmikroskopie	53
3.7 Physiologische Untersuchungen	56
4. Rekombinante Expression von MOG in E.coli	61
4.1 Gewinnung von polyklonalen Antikörpern gegen rekombinantes MOG	63
5. Versuche zur Experimentellen Autoimmun Enzephalitis	65
5.1 Immunisierungsprozedur ohne Pertussis Toxin	65
5.2 Immunisierungsprozedur mit Pertussis Toxin	65
5.3 Beurteilung der klinischen Symptome	66
5.4 Etablierung des EAE Mausmodells	67
5.5 Identifizierung von Leukozyteninfiltraten	68
5.6 Einfluss von Adjuvans und Pertussis Toxin	70
5.7 Einfluss von Substanzen aus der rekombinanten Expression von rMOG1-120	70
5.8 Klinische Symptome von mog+/+ und mog-/- Mäusen	72
5.9 Analyse der Infiltrate im ZNS	73
5.10 Bestimmung von MOG-Antikörpern in Mäuseserum	75
5.11 Untersuchung von Kreuzreaktivität von Antikörpern	75
5.12 Quantifizierung von T- und B-Zellen in immunisierten Mäusegehirnen	77
5.13 T-Zell Proliferationsassay	80
5.14 CD4+ zu CD8+ T-Zellverteilung nach in vitro Stimulation	81
5.15 Analyse der IFN- γ sezernierenden Zellen in Milz, Gehirn und Rückenmark	83
5.16 Nachweis von Demyelinisierungen mit Luxol Fast Blue	85
5.17 Nachweis von Demyelinisierungen an Semidünnschnitten und durch Elektronenmikroskopie	86
5.18 Unterschiede zwischen mog+/+ und mog-/- in Semidünnschnitten und elektronenmikroskopischer Analyse	90
5.19 Elektronenmikroskopie des Nervus opticus von mog-/- Mäusen	90
5.20 Immunisierung neun Monate alter Mäuse mit rMOG	92

5.21 Immunhistochemische Untersuchungen der neun Monate alten Mäuse	94
5.22 Immunisierung von mog+/+; mog-/-; mbp-/-, plp-/- und mbp-/-, plp-/-, mog-/- Mäusen mit Myelin	97
5.23 Immunisierung von mbp-/-, plp-/- und mbp-/-, plp-/-, mog-/- Mäusen mit rMOG	98
IV. Zusammenfassung	101
V. Diskussion und Ausblick	104
1. Generierung und Analyse einer MOG defizienten Mauslinie	104
2. Generierung von mbp-/-, plp-/-, mog-/- Tripelmutanten	106
3. Generierung einer mbp-/-, mog-/- Mauslinie	106
4. rMOG induzierte EAE	108
5. Kreuzreaktion und Restexpression im Kontext mit den gemachten Ergebnissen	111
VI. Material und Methoden	117
1. Molekularbiologische Methoden	117
1.1 Plasmid-DNA-Präparation	117
1.2 Isolierung genomischer DNA	117
1.3 DNA-Sequenzierung	118
1.4 Synthese von Oligonukleotiden	118
1.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	118
1.6 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	119
1.7 Southern-Blot Hybridisierungsanalyse	119
1.8 RNA-Präparation	120
1.9 Northern-Blot Hybridisierungsanalyse	120
1.10 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	120
1.11 RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR)	121
2. Biochemische Methoden	121
2.1 Proteinexpression in E.coli	121
2.2 Affinitätsreinigung des MOG-Antiserums	122
2.3 Myelinpräparationen	123
2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	123
2.5 Proteinquantifizierung	124
2.6 Lipidanalyse	124
3. Immunologische Methoden	125
3.1 Immunisierung von Kaninchen	125
3.2 Immunisierungen von Mäusen	125
3.3 <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> ELISA	125
3.4 Western Blot Analyse	126
3.5 Kryofixierung von Mausgewebe mit Formaldehyd	127
3.6 Kryofixierung von Mausgewebe ohne Formaldehyd (Gehirn und Rückenmark)	127
3.7 Anfertigung von Kryoschnitten	128
3.8 Immunhistochemische Untersuchungen an Kryoschnitten	128
3.9 Immunhistochemische Untersuchungen an Praffinschnitten	128

3.10 Färbungen von Paraffin und Kryoschnitten mit Hämatoxylin, Eosin und Luxol Fast Blue	129
3.11 Isolierung von peripheren Lymphozyten	130
3.12 Isolierung von Immunzellen aus dem Gehirn und Rückenmark	130
3.13 <i>Fluorescence Aided Cell Sorting</i> (FACS) von Leukozyten	131
3.14 T-Zell Proliferations-assay	131
3.15 <i>Enzyme linked immuno spot assay</i> (ELISPOT)	131
4. Zellbiologische Methoden	133
4.1 Kultur von embryonalen Stammzellen	133
4.2 Elektroporation von ES-Zellen	133
4.3. Selektion und Isolierung von ES-Zellklonen	134
4.4 Karyotypisierung der ES-Zellen	135
5. Elektronenmikroskopie	136
6. Methoden zur Etablierung transgener Mauslinien	136
6.1. Mäusehaltung und Zucht	136
6.2 Blastozystenisolierung	136
6.3. Injektion und Reimplantation von Blastozysten	137
7. Methoden zur Verhaltensphysiologie	137
VII. Anhang	138
VIII. Literatur	140
Kurzzusammenfassung	153
Abstract	154

I. Einleitung

1.1 Das Zentrale Nervensystem

Das ZNS setzt sich aus vier Zelltypen zusammen, die schematisch in Abb. 1 dargestellt sind. Die Oligodendrozyten ummanteln mit ihren zahlreichen Fortsätzen segmentartig verschiedene Axone mit mehreren Membranschichten, was als Myelin bezeichnet wird.

Die Astrocyten haben ebenfalls zahlreiche Fortsätze mit denen sie mit Oligodendrozyten, anderen Astrozyten, Neuronen und Endothelzellen über Kanäle (*gap junctions*) in Verbindung stehen. Auf diese Weise bilden die zusammen als Gliazellen bezeichneten Astrozyten und Oligodendrozyten ein ausgedehntes Netzwerk in grauer und weißer Substanz (*panglial syncytium*, Mugnaini, 1986; Rash et al. 1997). Beispiele für kanalbildende Proteine sind Connexin 43 bei Astrozyten (Giaume et al. 1995) und Connexin 32 der Oligodendrozyten (Scherer et al. 1995). Astrozyten und Oligodendrozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des zellulären Milieus (Deitmer, 2001) und für die Steuerung des Neuronenwachstums (Banker, 1980; Byravan et al., 1994). Gliazellen machen einen Anteil aller Zellen im Gehirn von 65% in Nagern und 90% in Menschen aus (Pfrieger und Barres, 1995).

Dem dritten Gehirnzelltyp, der Mikroglia, kommt eine Immunfunktion zu.

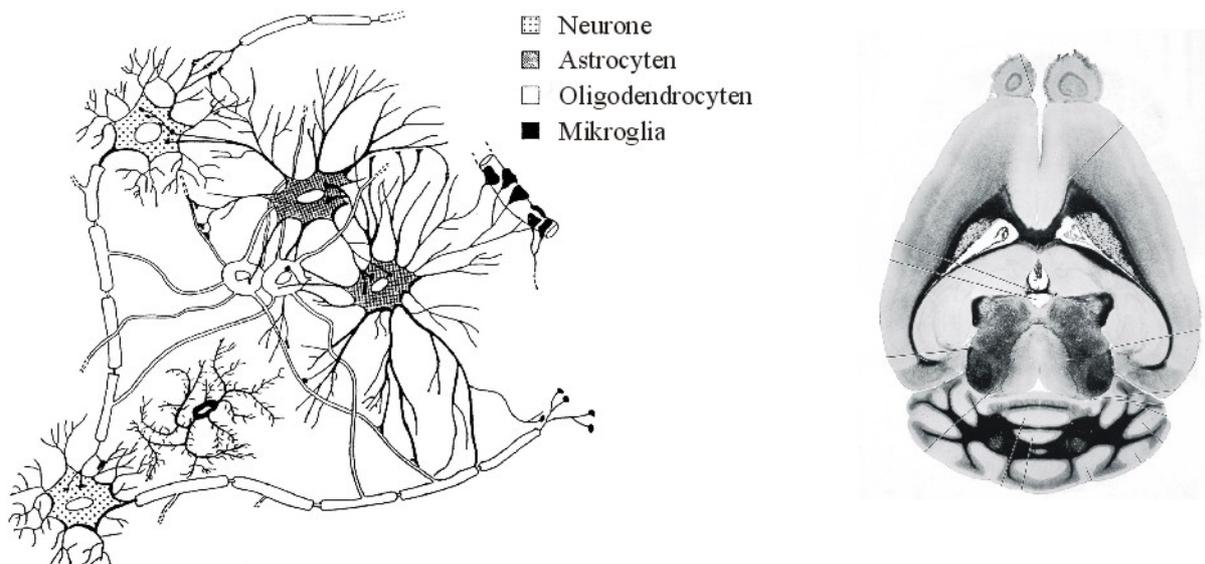


Abb.: 1 Links; Schematische Darstellung der vier Zelltypen des Nervensystems (Giaume und Venance, 1995). Rechts; Horizontalschnitt durch ein Mäusegehirn. Myelin erscheint aufgrund der Färbemethode schwarz und entspricht der weißen Substanz (Sidman et al., 1971).

1.2 Nervenleitung

Die Signalübertragung im Nervensystem erfolgt durch Neuronen. Sie bestehen prinzipiell aus einem Zellkern, den Dendriten und einem einzigen Axon (Abb. 1). Die Dendriten bilden eine vom Zellkern ausgehende verästelte Struktur. Je nach Art des Neurons kann sich eine nahezu unüberschaubare Anzahl an dendritischen Fortsätzen ergeben. Sie bilden Verbindungen zu anderen Neuronen oder Zellen, von denen sie Signale empfangen, und leiten diese zum Zellkern. Die beim Zellkern ankommenden Signale lösen bei einem Schwellenwert ein Aktionspotential aus, das über das Axon fortgeleitet wird. Das Axon ist an seinem (teilweise verästelten) Ende ebenfalls mit Zielzellen verbunden, an die die Aktionspotentiale übermittelt werden.

Die Übermittlung von Signalen im Nervensystem beruht auf einer sprunghaften Veränderung der Potentialdifferenz entlang der Nervenzellmembran. Durch Na⁺-K⁺-Pumpen werden permanent unter ATP-Verbrauch Kalium-Ionen ins Zellinnere und Natriumionen nach Außen verschoben, wodurch zwischen Zytoplasma und Extrazellularraum normalerweise ein Ruhepotential von ca. -80mV entsteht, welches hauptsächlich von der ca. 30fach höheren K⁺-Konzentration verursacht wird. Wird dieses nun auf chemische oder physikalische Weise angehoben, werden die in der Membran befindlichen spannungsgesteuerten K⁺- und Na⁺-Kanäle geöffnet und sorgen für die sprunghafte Depolarisierung der Membran, die sich in nicht myelinisierten Axonen mit bis zu 12 m/s fortpflanzt.

Dieses Aktionspotential folgt einem Alles-oder-Nichts Gesetz. Wird am Axonhügel, an der Stelle wo das Axon aus dem Zellkern entspringt, ein gewisser Potential-Schwellenwert überschritten, wird ein Aktionspotential erzeugt, das ohne Intensitätsverlust bis zu den Axonendigungen gelangt.

Die Reizweiterleitung in Dendriten scheint dagegen komplexer. Neben spannungsgesteuerten Natriumkanälen spielen auch Kalziumkanäle, passive und aktive Erregungsweiterleitung und die Verteilung dieser im Dendritenbaum eine Rolle. Außerdem findet eine vom Soma ausgehende Depolarisation in die Dendriten zurück statt, wenn am Soma ein Aktionspotential ausgelöst wird, was als *backpropagation* bezeichnet wird (siehe Review von Häusser et al., 2000).

Die Erregungsübertragung zwischen Nervenzellen erfolgt durch Synapsen, die sich an den Kontaktpunkten bilden. Der Informationsfluß geht von der prä- zur postsynaptischen Endigung, wobei das elektrische Signal an der präsynaptischen Endigung in ein chemisches Signal umgewandelt wird. Es kommt zur Ausschüttung von Neurotransmittern, Moleküle, die

an der Postsynapse Rezeptoren aktivieren, die das chemische Signal wieder in ein elektrisches umwandeln können.

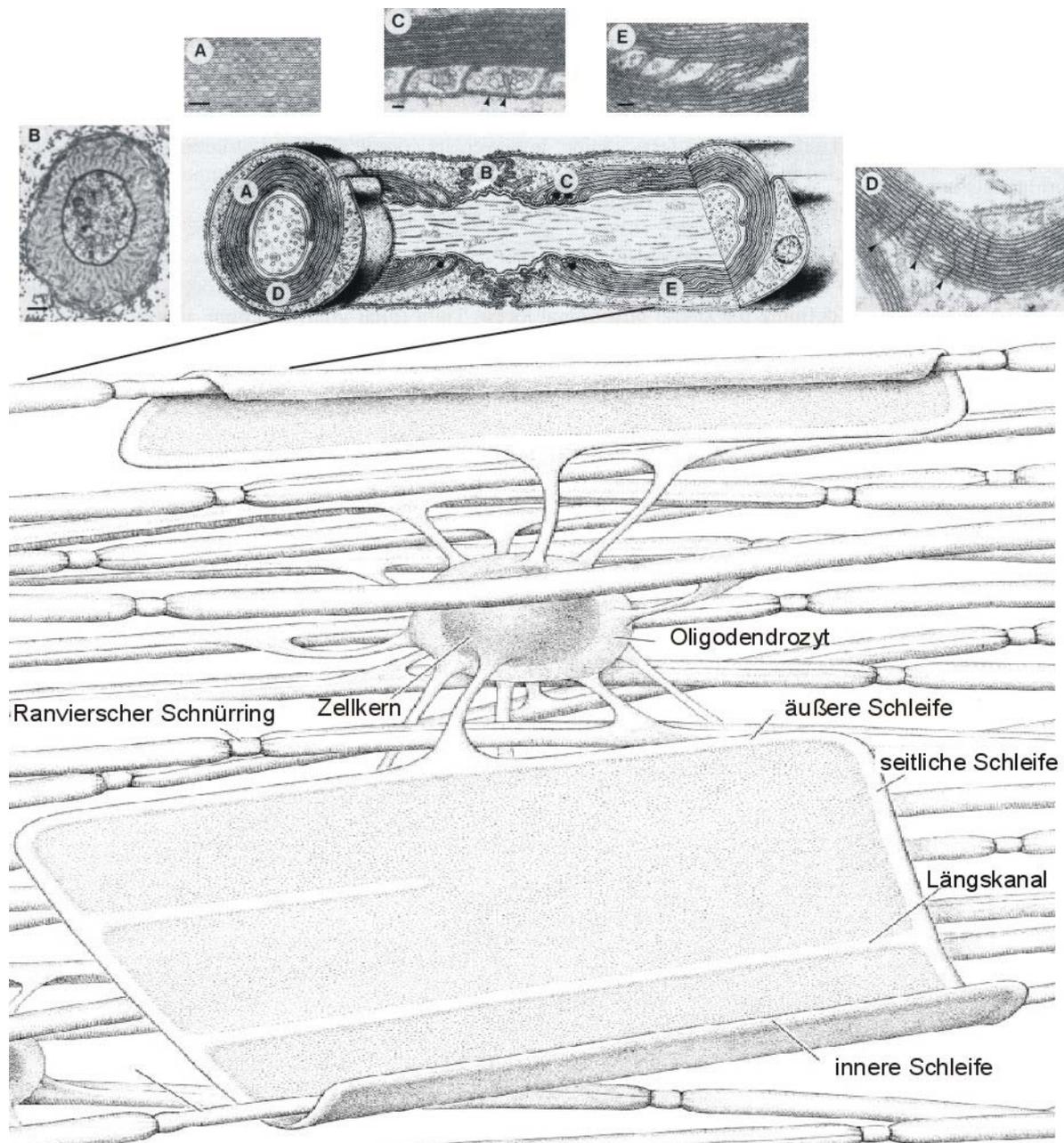


Abb.: 2 Großes Bild; Ein Oligodendrozyt, mit zur Anschaulichkeit entfaltet gezeichneter Membran, myelinisiert mehrere Axons. Darüber; peripheres Axon, von einer Schwann'schen Zelle ummantelt. Im Oligodendrozyt ist die äußerste Schicht kompaktiert, die innere nicht. A; Kompaktes, internodales Myelin. B; Ranvier'scher Schnürring mit den Mikrovilli. C; Paranodale Schleifen, die über *tight junctions* festgeheftet sind (Dreiecke). D; Radiale Komponenten, die sich von außen nach innen hindurchziehen (Dreiecke). E; Schmidt-Lanterman Einkerbungen des PNS. Skalierungsbalken: 500Å. (Kirschner und Blaurock, 1992, Morest, 1986, Morell 1984)

1.3 Myelin

In Schnitten des Gehirns und des Rückenmarks erkennt man weiße und graue Bereiche (Abb.: 1). Die graue Substanz besteht hauptsächlich aus Zellkernen der Neuronen, die weiße Substanz fast ausschließlich aus markhaltigen Nervenfasern. Bereits von Virchow (1856) wurde erkannt, dass die Farbe der weißen Substanz von einer lipidreichen Lamellensubstanz herrührt, die Axone in charakteristischer Art ummantelt, und die er mit dem aus dem griechischen Wort *myelos* (Mark) abgeleiteten Namen Myelin belegte. Myelin ummantelt das Axon, wobei sich ca. 1mm lange myelinhaltige Abschnitte, gegliedert in Internodium und Paranodium, mit nur einigen μm breiten myelinfreien Zonen abwechseln. Diese wurden von ihrem Entdecker Ranvier als Schnürringe bezeichnet, da man annahm, dass das weiche Myelin an diesen Stellen fest an das Axon "geschnürt" wurde, um ein verrutschen entlang des Axons zu verhindern (Ranvier, 1871). Tatsächlich sind die Schnürringe myelinfreie Zonen, an denen die Erregungsleitung stattfindet.

1.3.1 Internodales Myelin

Im Internodium erkennt man morphologisch drei charakteristische Strukturen; kompaktes Myelin, Schmidt-Lantermann Einkerbungen –die nur selten im ZNS beobachtet werden- (Schmidt, 1874; Lantermann, 1877) und die typischerweise nur im ZNS vorkommenden radialen Komponenten.

Kompaktes Myelin besteht aus spiralförmig dicht um das Axon gewickelten Membranschichten. Diese werden sowohl auf der extrazellulären wie auch auf der zytoplasmatischen Seite durch eine Kombination von unspezifischen van der Waals und elektrostatischen Wechselwirkungen, als auch durch spezifische durch Proteine gesteuerte Wechselwirkungen zusammengehalten (Inouye und Kirschner, 1988a,b).

Der kompakte Aufbau zeigt sich besonders in hochauflösenden elektronenmikroskopischen Aufnahmen von longitudinalen und transversalen Myelinschnitten. Die auf der zytoplasmatischen Seite zusammengehaltenen Membranen erkennt man hierbei als eine dicke dunkle Linie, die als *major dense line* bezeichnet wird und auf der extrazellulären Seite, bei guter Auflösung, eine aus zwei dünnen dunklen Linien bestehende *intraperiod line* (Napolitano und Scallen, 1969). Der Abstand zwischen zwei *major dense lines* oder zwei *intraperiod lines* entspricht somit immer der Dicke einer weiteren Schicht. Sie entspricht nach Röntgendiffraktionsmessungen 150-180 Å (Schmitt et al., 1941). Da eine Lipiddoppelschicht

des Myelins eine Dicke von ca. 50 Å besitzt, pro Schicht aber zwei Lipiddoppelschichten vorhanden sind, enthält kompaktes internodales Myelin nur sehr wenig Zytoplasma und extrazellulären Raum.

Die dichte Packung der Membranen im Internodium wird nur durch kleine zytoplasmatische Inseln, den Schmidt-Lanterman Einkerbungen unterbrochen, was auch eine Unterbrechung der *major dense line* zur Folge hat. Sie bilden einen Kanal, der sich spiralförmig vom Zellsoma bis zur innersten Schicht, die unkompaktiert bleibt, zieht.

Die radiale Komponente, das dritte Charakteristikum, ist ein Netzwerk aus Membranverbindungen, das sich entlang des Axons in radialer Richtung durch die einzelnen Membranschichten zieht. Die Membranverbindungen haben eine komplexe aus globulären Untereinheiten aufgebaute Struktur (Kosoras und Kirschner, 1990). An der radialen Komponente scheinen zwei Isoformen des Myelin Basischen Proteins (MBP) (21,5 kb, 17 kb) beteiligt zu sein, während Proteolipid Protein (PLP) in dieser nicht nachgewiesen wurde (Karthigasan et al., 1996). Myelin assoziiertes Oligodendrozyten basisches Protein (MOBP) scheint ebenfalls daran beteiligt zu sein, was anhand von MOBP defizienten Mäusen beobachtet wurde (Yamamoto et al. 1999).

1.3.2 Paranodales Myelin

Dieser Bereich ist durch die Aufweitung der dicht gepackten Myelinlamellen zu terminalen mit Zytoplasma gefüllten Schleifen gekennzeichnet. Jede wird von der darüberliegenden überschichtet und ist mit dieser über *tight junctions* festgeheftet. Weiterhin bildet jede Schleife mit dem Axolemma eine feste aber nicht geschlossene Verbindung.

1.3.3 Ranvier'scher Schnürring

An dieser ca. 2µm breiten myelinfreien Region verbreitert sich im PNS die unter der Basalmembran liegende Schicht, die unkompaktiert ist, so daß das Axon von einem Ring aus extrazellulärer Flüssigkeit um die Basalmembran umschlossen wird. Dieser Ring enthält radial verlaufende fingerähnliche Strukturen, die als Mikrovilli bezeichnet werden.

Die Oligodendrozyten haben keine Basalmembran und ihre äußerste Myelinschicht ist kompaktiert. In dem Bereich des Schnürrings befinden sich die zur Reizweiterleitung notwendigen Ionenkanäle, deren Bedeutung für die Erregungsleitung von Huxley und Stämpfli (1949) gezeigt wurde.

1.4 Saltatorische Erregungsleitung

Die zur Erregungsweiterleitung nötige Depolarisation der Axonmembran ist mit dem Aufladen eines Kondensators vergleichbar. Je geringer die Kapazität des Kondensators, desto schneller wird dieser aufgeladen. Da sich in myelinisierten Axonabschnitten nur wenige für die Erregungsweiterleitung wichtige Ionenkanäle befinden und die Myelinschicht die Axonmembran gut gegen den Extrazellulärraum isoliert, hat der internodale Bereich eine sehr niedrige Kapazität im Vergleich zu unmyelinisierten Axonen. Als Konsequenz davon pflanzt sich ein Signal schnell durch das ca. 200-2000 μm breite Internodium fort und erzeugt ein Aktionspotential am nächsten Schnürring (ca. 2 μm breit). Das Signal springt also von einem Schnürring zum anderen, was als saltatorische Erregungsleitung bezeichnet wird. Da zur Depolarisation der jeweils benachbarten Membransegmente nur sehr wenig Ionen benötigt werden, hat diese Art der Erregungsweiterleitung neben dem ca. 10 fachen Geschwindigkeitsgewinn gegenüber unmyelinisierter Weiterleitung eine große Energieersparnis zur Folge. Die Nervenleitgeschwindigkeit myelinisierter Axone kann Werte von 120 m/s erreichen, marklose Axone dagegen weisen Leitungsgeschwindigkeiten von 0,5 bis 15 m/s auf (Mutschler 1991). Die Wichtigkeit der Myelinisierung ist an Demyelinisierungserkrankungen wie der Multiplen Sklerose (MS) und an Mausmutanten mit Myelinisierungsdefekten zu sehen (Baumann und Pham-Dinh, 2001).

1.5 Myelinisierung im ZNS

Vom Zellkern des Oligodendrozyten erstrecken sich eine Vielzahl von Fortsätzen, die letztendlich auf ein Axon stoßen, welches sie dann zu ummanteln beginnen. Die Axone sind zu diesem Zeitpunkt mit der extrazellulären Flüssigkeit durch einen Kanal, das Mesaxon, verbunden. Der eigentliche Myelinisierungsprozeß beginnt mit der Unterschichtung einer Seite der Membran, die das Mesaxon bildet, unter die andere. Durch wiederholte Unterschichtung, die durch schnelle Membransynthese (täglich das zwei- bis dreifache des Oligodendrozyteneigengewichtes) der um das Axon wandernden Membranspitze erreicht wird, entstehen schließlich bis zu 50 Schichten, die komprimiert ihr Zytoplasma und die extrazelluläre Flüssigkeit des Mesaxons verlieren, und sich zu der kompakten Myelinstruktur zusammenlagern. Auf diese Weise kann ein Oligodendrozyt bis zu 50 Axone umwickeln. Die

Myelinisierung bewirkt eine Konzentration der für die Nervenleitung wichtigen Ionenkanäle in den Myelin freien Bereichen (Kaplan et al. 1997).

Die Myelinisierung beginnt bei Maus und Ratte ungefähr am zehnten Tag nach der Geburt und geht von dem 30. postnatalen Tag in eine basale Synthese über. Beim Menschen setzt sie bereits im 6. Schwangerschaftsmonat ein und endet mit dem zweiten Lebensjahr.

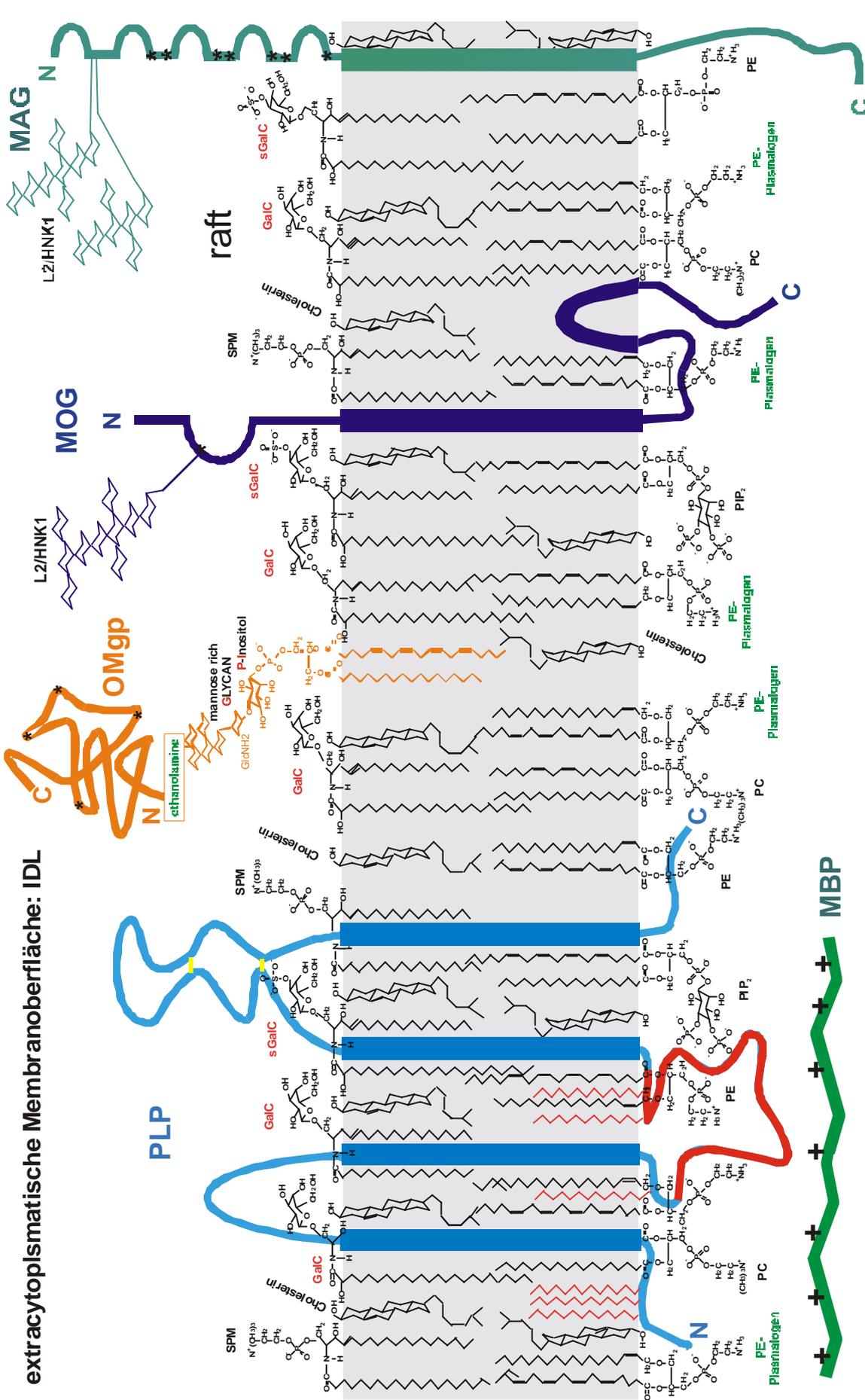
1.6 Zusammensetzung des Myelins im ZNS

Myelin unterscheidet sich von allen anderen Zelloberflächen oder intrazellulären Membranen durch sein hohes Verhältnis von Lipid zu Protein. Isoliertes Myelin enthält je nach Herkunft 70-85 % Lipid und 15-30 % Protein (Trockenmasse). Desweiteren hat es einen extrem niedrigen Wasseranteil von ca. 40 %, was aufgrund der kompakten, wenig Zytoplasma enthaltenden Struktur durchaus verständlich ist. Die Myelinmembran ist damit die lipidreichste Membran im tierischen Organismus (Norton und Cammer, 1984).

1.7 Lipide

Die Lipide des Myelins setzen sich aus Cholesterin, Phospholipid und Glykolipid in einem Verhältnis von 4:4:2-4:3:2 zusammen. Die Verteilung der Lipide ist asymmetrisch, die Phospholipide befinden sich vorwiegend auf der cytoplasmatischen Seite während die Cerebroside und Sulfatide der extrazellulären Seite zugewandt sind (Abb. 3). Zwar gibt es keine myelinspezifischen Lipide, aber man kann den hohen Galactosylceramid-, Sulfatid-, Cholesterin- und Plasmalogenanteil (des Phosphatidylethanolamin-Typs) als myelintypisch bezeichnen. Interessanterweise haben die Glycolipide der Myelinmembran eine flüssig-kristallin Phasenumwandlungstemperatur, die weit über 37°C liegt, so dass die Bildung von Lipid-Mikrodomänen mit spezifischen Proteinen angereicherten sog. *rafts* angenommen wird (Haas et al. 1995, Rietveld et al. 1998, Stoffel et al. 1997).

Im Gegensatz zu den Lipiden, bei denen der Unterschied zwischen ZNS und PNS sehr gering ist, gibt es bei den Proteinen sowohl für Myelin insgesamt als auch für PNS-Myelin und ZNS-Myelin spezifische Proteine.



extracytoplasmatische Membranoberfläche: IDL

cytoplasmatische Membranoberfläche: MDL

Abb. 3: (siehe vorherige Seite) Schematische Darstellung von Lipiden und einigen Proteinen in der Myelinmembran des ZNS. Lipide: SPM=Sphingomyelin, GalC=Galaktocerebroside, sGalC=Sulfatide, PE=Phosphatidyl-Ethanolamin, PC=Phosphatidylcholin, PIP₂=Phosphatidyl-Inositol-4,5-bis-Phosphat. Die Acylierungen des Proteolipid Proteins sind rot, die Ig-Domänen von MAG und MOG als Halbkreise gekennzeichnet. Die Abkürzungen und die Struktur werden im Text erläutert. (Uschkureit, 2000)

1.8 Myelinproteine

(Reviews von Quarles 2002, 1997 und Lemke 1988, 1993)

Basische Myelinproteine (MBP; *myelin basic protein*)

Diese aus einem Gen durch alternatives Spleißen entstehenden Proteine machen 30-40 % der ZNS-Myelinproteine und 5-15 % der PNS-Myelinproteine aus (Lees und Brostoff, 1984). Es sind bisher beim Menschen vier und bei der Maus sechs Isoformen, die eine Molekularmasse zwischen 14 und 21,5 kDa haben, bekannt (Takahashi et al., 1985; de Ferra et al., 1985; Newmann et al., 1987). Diese Proteine haben einen außerordentlich hohen Anteil an basischen Aminosäuren, die mit sauren Lipidkopfgruppen in Wechselwirkung treten. MBP wurde immunocytochemisch in der *major dense line* lokalisiert und wird deshalb als im Cytosol befindlich angesehen (Omlin et al., 1982). MBP ist essentiell für die Bildung von ZNS-Myelin, was durch eine natürliche Mutation des Gens, bei dem die Exons drei bis sieben deletiert sind, in der Maus gezeigt werden konnte (Chernoff, 1981; Hogan und Greenfield, 1984). In dieser als *shiverer* bezeichneten Krankheit wird zwar die *intraperiod line* ausgebildet, aber die *major dense line* bleibt unkompaktiert. Da in diesen Mutanten das PNS-Myelin korrekt ausgebildet wird, scheint es im PNS ein Protein zu geben, das die Aufgaben des MBP übernimmt.

Das Proteolipid Protein (PLP)

PLP ist ein 30 kDa integrales Membranlipoprotein, das ca. 50 % des Proteinanteils des ZNS-Myelins ausmacht (Lees und Brostoff, 1984). Es wird auch in geringen Mengen in Schwann'schen Zellen gefunden, dort aber nur im Cytoplasma und nicht in der Myelinmembran. PLP ist äußerst hydrophob und nicht glykosyliert und enthält vier Transmembrandomänen (Weimbs und Stoffel, 1992). Der 26 kDa Spleißvariante DM-20 fehlen die letzten 105 Basen des Exons 3, die gerade die charakteristische hydrophile

zytosolische Domäne enthalten. Auch von PLP ist eine natürliche als *jimpy* bezeichnete Mutation bekannt, die zu den gleichen, in der Regel meist schwereren, Symptomen führt wie die *shiverer* Mutation (Sidman et al., 1964). In diesem Falle ist allerdings die *intraparalinear line* nicht korrekt kompaktiert, was auf die Funktion von PLP bei der Interaktion der extrazellulären Membranen hindeutet (Duncan et al., 1987). Auch die von Boison und Stoffel (1994) generierte PLP-defiziente Maus zeigt eine Aufweitung der *intraparalinear line*. Im Gegensatz zu der *jimpy* Mutante zeigt die PLP-defiziente Maus wesentlich schwächere Symptome. Desweiteren werden für PLP auch Funktionen als Ionenkanal (Lees und Bizzozero, 1992) sowie als Oligodendrozytendifferenzierungsfaktor (Schneider et al., 1992) für möglich gehalten.

Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG)

MAG ist ein 100 kDa Glykoprotein mit fünf extrazellulären immunglobulinähnlichen Domänen, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne, welche in Nagern in zwei verschiedenen Spleißvarianten vorkommt (Quarles et al., 1992). MAG hat nur einen Anteil von 1 % des Myelins, sowohl im ZNS als auch im PNS. Es findet sich im periaxonalen Bereich in der Myelinmembran und spielt eine wichtige Rolle bei der Glia-Axon Wechselwirkung (Poltorak et al., 1987). Es ist sehr stark glykosyliert und hat neben der großen Homologie zum Neuronalen Adhäsionsmolekül (N-CAM) ein mit HNK-1 reagierendes Epitop (Lai et al., 1987).

Oligodendrozyten-Myelin Glykoprotein (OMgP)

OMgP ist ein hoch glykosyliertes 120 kDa Protein, das charakteristisch für das ZNS ist. Analyse des Gens zeigt ein cysteinreiches Motiv am N-terminus und eine Reihe von leucinreichen Wiederholungen, ähnlich denen anderer bisher beschriebener Moleküle, die eine Rolle bei der Adhäsion spielen (Mikol et al., 1990a und 1993). Interessant ist die Lokalisation des Gens auf dem menschlichen Chromosom 17 in einem Intron des Neurofibromatose Typ 1 Gens (Mikol et al., 1990b; Viskochil et al., 1991). OMgP enthält neun potentielle Bindungsstellen für Asparagin-verknüpfte Oligosaccharide und eine Serin/Threonin reiche Domäne für eventuelle O-verknüpfte Kohlenhydrate. Ein Teil enthält auch das HNK-1 Epitop. Obwohl die genaue Funktion unbekannt ist, nimmt man aufgrund

der leucinreichen Wiederholungssequenzen und des HNK-1 Epitopes an, dass OMgP eine Rolle bei Adhäsionsvorgängen spielt.

Weitere häufigere Proteine sind die 2',3'-zyklische Nukleotid-3'-Phosphodiesterase mit 4% Anteil an Myelin (Sprinkle, 1989), Myelin-assoziiertes Oligodendrozyten basisches Protein (MOBP) mit einem Anteil von über 4% (Montague et al., 1997, Yamamoto et al., 1994), dem *tight junction* Protein Oligodendrozyten spezifisches Protein OSP (Claudin-11) mit ca. 7% Anteil (Bronstein et al., 1997, Morita et al., 1999). Es sind außerdem auch eine ganze Reihe von Enzymen bekannt, die eine besondere Rolle im ZNS spielen (z.B. UDP-Galactose: Ceramid-Galactosyltransferase (Schulte und Stoffel, 1993) und die saure Sphingomyelinase (Otterbach und Stoffel, 1995)), die hier nur erwähnt werden sollen.

2. Myelin/Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG)

MOG wurde zuerst in der Ratte mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers (8-18C5), der gegen Ratten Cerebellum Glykoproteine gerichtet war, als nur im ZNS vorkommend identifiziert (Linnington et al., 1984). Derselbe Antikörper gab auch im Menschen ein positives Signal, was auf eine Konservierung des vom Antikörper erkannten Epitops hindeutete. Es wurde bereits hier erkannt, dass MOG spezifisch nur in myelinisierenden Oligodendrozyten exprimiert wird. Die genaue Lokalisation erfolgte durch immunocytochemische Studien (Brunner et al., 1989; Lebar et al., 1986), die zeigen, dass MOG auf der extrazellulären Seite der äußersten Myelinmembran und in der Oligodendrozyten Plasmamembran lokalisiert ist und es ähnlich wie MAG weitgehend in kompaktem Myelin fehlt. Während man ursprünglich von einem 51 kDa Protein ausging, das bei der Lagerung in 20-26 kDa Fragmente zerfällt, konnten Amiguet et al., 1992 zeigen, dass man bei entsprechender Reinigung zwei Banden (26 und 28 kDa) durch unterschiedliche Glykosylierung erhält. Diese können sich zu einem Dimer zusammenlagern. Durch Deglykosylierung erhält man aus den zwei Banden eine 25 kDa Bande. Desweiteren konnten Amiguet et al. zeigen, dass MOG nur ungefähr 0,05 % des gesamten Myelinproteins ausmacht. Aufgrund der exponierten Lokalisation von MOG wurde vermutet, dass es eine wichtige Rolle bei De- und Dysmyelinisierungen spielt, was durch zahlreiche Experimente bestätigt wurde (siehe unten). MOG konnte bisher, im Gegensatz zu anderen

myelinspezifischen Proteinen, nur in Säugetieren nachgewiesen werden. Es ist also ein Protein, das erst spät in der Evolution auftritt (Birling et al., 1993).

2.1 Genstruktur

Die cDNAs von Rind, Ratte, Maus und Mensch sind mit Homologien von 89-95% stark konserviert (Gardinier et al., 1992; Pham-Dinh et al., 1993; Pham-Dinh et al., 1994; Hilton et al., 1995; Gardinier und Matthieu, 1993).

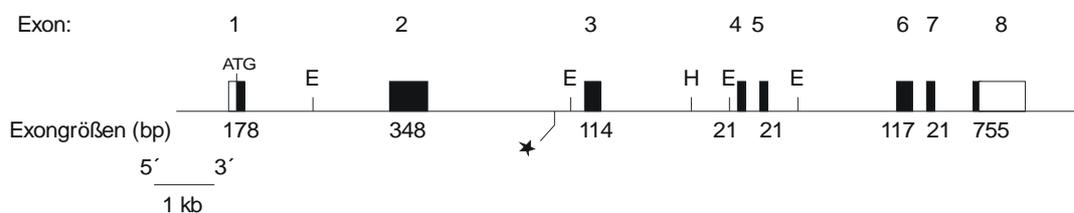


Abb. 4: Maus MOG-Genstruktur (Daubas et al., 1994). Die Exons sind nummeriert und entsprechen den vertikalen Kästen. Die Protein-kodierenden Regionen sind schwarz eingezeichnet. Die Restriktionsschnittstellen von EcoRI (E) und HindIII (H) sind eingezeichnet. Das Sternchen markiert einen Polymorphismus, dem aber bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte.

Das Gen der Maus umfaßt acht Exons und hat eine Gesamtlänge von ungefähr 12,5 kb. Der kodierende Bereich ist 744 Nucleotide lang, was einem Protein mit 248 Aminosäuren entspricht. Von diesem wird eine 30 Aminosäuren lange Signalsequenz abgespaltet, so dass das reife Protein 218 Aminosäuren enthält. Alle Exon-Intron-Übergänge beginnen nach dem ersten Nucleotid des Codons und stimmen mit der GT/AC-Regel (Mount, 1982) überein. Das Gen der Maus wurde auf dem Chromosom 17 Bande C, 25 kb telomerisch vom H2-M5 Gen in Ende zu Kopf Orientierung lokalisiert (Pham-Dinh et al., 1995). Es handelt sich hierbei um das distale Ende des *major histocompatibility complex* (MHC) Klasse Ib. MHC-Moleküle der Klasse Ia präsentieren den T-Zellen endogene und fremde Proteine. Die Funktion der MHC-Moleküle der Klasse Ib ist bisher ungrklärt (Klein und O'hUigin 1994). Obwohl eine räumliche Nachbarschaft von Genen nicht zwingend auf Verwandheiten hindeutet, kann man häufig wichtige Erkenntnisse daraus gewinnen. So hat MOG z. B. eine immunglobulinähnliche Domäne und spielt eine Rolle bei Immunprozessen.

MOG besitzt im zweiten Exon eine typische N-Glykosylierungssequenz (Asn-Ala-Thr, aa 31-33) und eine immunglobulinähnliche Sequenz. Exon drei und sechs kodieren typische Transmembrandomänen, die durch Exon vier und fünf, eine zytoplasmatische Domäne kodierend, verbunden werden. Der C-Terminus wird von Exon sieben und dem Anfang von Exon acht kodiert und enthält eine mögliche Phosphorylierungsstelle (Thr, aa 167).

Am Ende des zweiten Introns findet sich eine Wiederholungssequenz von 5'-GA-3', welche je nach Mausstamm zwischen 155 und 164 bp lang ist. Dieser konnte aber bisher keine Funktion zugeordnet werden (Roth et al., 1995). Sie findet sich auch in der Ratten DNA, aber nicht in der menschlichen.

Promoterstudien (Daubas et al., 1994, Solly et al., 1997) zeigten eine Vielzahl von möglichen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Die TATA Box bei -50 bp und die CAAT Box bei -101 bp sind hiernach erforderlich für die Oligodendrozyten-spezifische Transkription, was auf cis-Elemente in dieser Region hindeutet. Die Region zwischen -435 und -657 bp scheint positiv regulierende Elemente zu enthalten. Dieses war auch die Länge, die ausreichte, um maximale Expression zu erreichen. Desweiteren gibt es 5'-wärts drei purinreiche cis-regulatorische Elemente enthaltende Regionen, die auch bei anderen Myelinproteinen gefunden wurden (MBP, PLP, CNP, MAG und P0; Hudson et al., 1995; Nave und Lemke, 1991; Berndt et al., 1992; Janz und Stoffel, 1993; Goujet-Zalc et al., 1993). Im MOG-Gen liegen diese allerdings in Bereichen, die es fraglich erscheinen lassen, ob diese bei MOG die gleiche Bedeutung haben wie bei den anderen Proteinen.

Das Gen des Menschen ist analog aufgebaut, mit dem Unterschied, dass es in mehreren durch alternatives Spleißen entstehenden Isoformen vorkommt (Pham-Dinh, 1995b).

2.2 Expressionsmuster

Ein auffälliges Merkmal von MOG ist dessen späte Expression im Vergleich zu allen anderen bisher identifizierten Myelinproteinen. Das genaue Expressionsmuster in der Maus wurde eingehend von Solly et al. (1996) in Zellkulturen (CG4-Zelllinie) und in situ Hybridisierungen untersucht. MOG kann im Gegensatz zu anderen Myelinproteinen nicht im Embryo nachgewiesen werden. Die Expression beginnt mit dem ersten Tag nach der Geburt (P1) in der Medulla Oblongata. Das Expressionsmuster von MOG ist analog zu dem von MBP mit caudalem-rostralem Gradienten, jedoch mit dem Unterschied, dass die MOG-Expression um einige Tage verzögert stattfindet. Das Expressionsmaximum wird bei P18 erreicht.

2.3 Strukturmodell

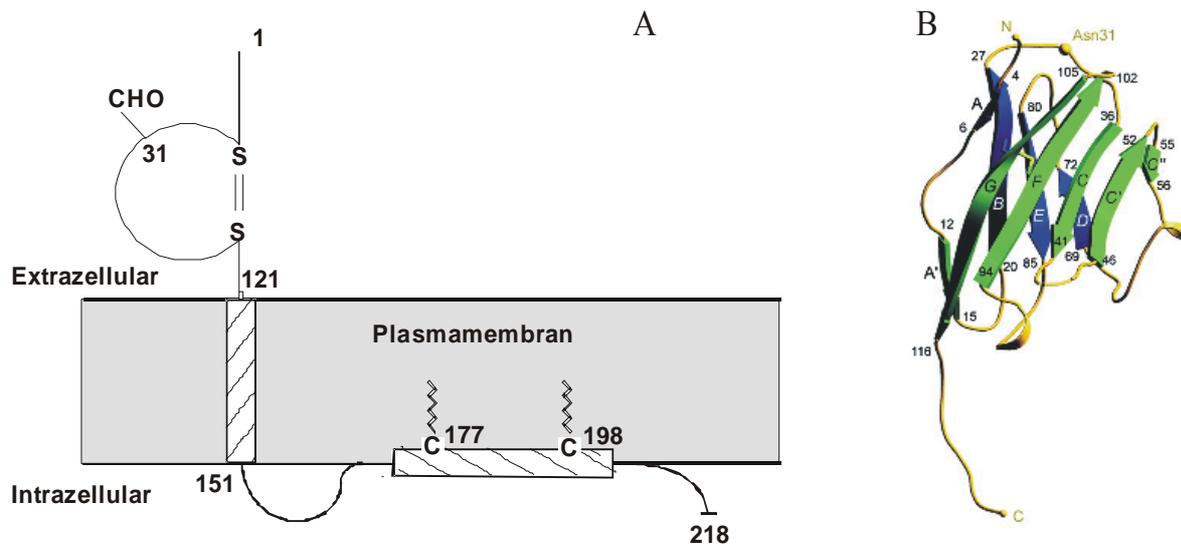


Abb. 5: A; Leicht abgewandeltes von Kroepfl et al. (1996) und Johns und Bernard (1999) vorgeschlagenes Strukturmodell von MOG. B; Bändermodell der Kristallstruktur der extrazellulären Domäne von MOG (aus Breithaupt et al., 2003).

Die Struktur wurde mit Hilfe von mit Maus MOG transfizierten HEK-Zellen und den jeweiligen Domänen entsprechenden Antisera untersucht: MOG1-125 für die extrazelluläre Transmembrandomäne, MOG154-169 für die Domäne zwischen den beiden Transmembrandomänen und MOG198-218 für den C-Terminus (Kroepfl et al., 1996). Nur MOG1-125 gab ohne Permeabilisierung der Membran ein positives Signal, während nach Permeabilisierung der Membran alle drei Antikörper ein Signal gaben. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass die zweite Transmembrandomäne nicht durch die Membran hindurchgeht, sondern eingelagert ist. Zusätzlich bilden die beiden Cysteine bei den Positionen 177 und 198 ideale Acylierungsstellen um die Domäne in der Membran zu verankern (Casey, 1995). Damit ist MOG ein ungewöhnliches Mitglied der Ig Superfamilie, denn es sind keine Ig-Moleküle mit einer zweiten in der Membran liegenden Domäne bekannt. Es sind aber integrale Membranproteine bekannt, welche eine Haarnadelstruktur auf der Oberfläche der Plasmamembran ausbilden könnten (K^+ und ionotrophe Glutamat Rezeptoren (Wood et al., 1995)). Dieses wird auch bei der zweiten Transmembrandomäne von MOG wegen drei enthaltenen Prolinen für möglich gehalten (Kroepfl et al., 1996). Mittlerweile ist es Breithaupt et al. (2003) und Clements et al., (2003) gelungen die extrazelluläre Domäne zu kristallisieren und röntgenspektroskopisch zu analysieren (Abb. 5, B). Es zeigt sich die typische Struktur einer variablen Immunglobulin Domäne (Ig-V). Die größte strukturelle Verwandtschaft zur extrazellulären Domäne haben Sialoadhesin, das PNS

Protein *myelin protein zero* (P₀) und der Cofaktor B7-2. Sialoadhesin ist ein Sialinsäure bindendes Protein, das auf Makrophagen exprimiert wird (Crocker et al., 1991) und an CD43 von T-Zellen bindet (van den Berg et al., 2001). CD43 ist ein Regulator der T-Zell Aktivierung und Adhäsion (Walker und Green, 1999). B7-2 (CD 86) bindet an CD28 und CTLA-4 und spielt eine wichtige modulatorische Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen (Review; Coyle und Gutierrez-Ramos, 2001). Interessanterweise haben diese Proteine mit der extrazellulären Sequenz von MOG nur eine Aminosäuresequenzhomologie von weniger als 30%.

2.4 Funktionen

Eine eindeutige Funktion konnte MOG bisher nicht zugeordnet werden. Die Ig-V Struktur, die strukturelle Verwandtschaft zu P₀, B7-2, Sialoadhesin, *junctional adhesion molecule* (JAM) und Adenovirus Rezeptor D1 Domäne (CAR) deuten auf eine Funktion als Adhäsions- oder Rezeptormolekül hin (Clements et al., 2003). Gestützt wird dies durch die Lokalisation von MOG auf der Oligodendrozytenoberfläche (Scolding et al., 1989) und die Ausbildung eines L2/HNK-1 Kohlenhydratepitops (Burger et al., 1993) analog zu MAG und P₀ (Burger et al., 1992). In vitro-Experimente deuten darauf hin, dass MOG anders als P₀ möglicherweise keine intermolekulare Bindung mit sich selbst sondern mit einem anderen Molekül eingeht (Hilton et al., 1995). Bis heute ist allerdings noch kein Bindungspartner für MOG identifiziert worden. Falls MOG eine Bedeutung als Adhäsionsmolekül besitzt, könnte es für den Zusammenhalt zwischen benachbarten Myelinfasern im ZNS dienen (Bernard et al., 1997; Burger et al., 1993). Die ZNS Spezifität von MOG und die sich nicht berührenden Myelinfasern im PNS und die späte Expression unterstützen diese Überlegung. Hieraus wird auch eine Rolle bei der Fertigstellung und Myelinkompaktierung abgeleitet (Johns und Bernard, 1999).

In vitro Experimente von Dyer und Matthieu (1994) zeigen eine mögliche Wirkung von MOG auf die Mikrotubuli. Anti-MOG Antikörper, die an MOG binden, bewirken eine Umverteilung von MOG in der Zellmembran und anschließende Depolymerisation von Mikrotubuli in der Zelle. Eine Verstärkung der Mikrotubuli wird hingegen durch die Zugabe von an MOSP bindende anti-MOSP Antikörper beobachtet. MBP interagiert mit den Mikrotubuli (Pirollet et al., 1992) und anti-MOG und anti-Galaktosylcerebrosid Antikörper führen in vitro zu einer Depolymerisierung der Mikrotubuli und zur Degradation von MBP (Johns et al., 1995; Menon et al., 1997; Dyer, 1993). Deshalb könnte durch Zusammenspiel

von MOG und MOSP die Mikrotubulistabilität in Oligodendrozyten reguliert werden (Johns und Bernard, 1999).

Gereinigtes MOG und die rekombinante extrazelluläre Domäne von MOG binden C1q, ein Molekül der Komplementkaskade (Johns und Bernard, 1997). Da ZNS Myelin, anders als PNS Myelin, die klassische Komplementkaskade aktivieren kann (Vanguri und Shin, 1986) und MOG auf der Oligodendrozytenmembran und der äußersten Myelinlamelle lokalisiert ist, könnte MOG im ZNS für die Komplementaktivierung verantwortlich sein (Johns und Bernard, 1999). Allerdings zeigt die Röntgenkristallstruktur von MOG, dass die Bindung von C1q unter physiologischen Bedingungen sehr unwahrscheinlich ist (Breithaupt et al., 2003). Stattdessen gibt es eine zu B7-2 strukturell homologe Bindungstasche. Die Aminosäuresequenzen sind in diesem Bereich überraschenderweise nicht konserviert, die räumliche Verteilung von hydrophoben und polaren Bereichen allerdings schon. B7-2 bindet an dieser Stelle *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4* (CTLA-4) (Schwartz et al., 2001), während ein Ligand für MOG noch nicht identifiziert ist (Breithaupt et al., 2003).

Die wohl interessanteste Eigenschaft von MOG ist aber zur Zeit dessen Rolle in den Autoimmunkrankheiten wie Multiple Sklerose (MS) und Experimentelle Autoimmun Encephalomyelitis (EAE).

3. EAE, MS und MOG

3.1 MS

Die Multiple Sklerose ist eine schubförmig oder chronisch progredient verlaufende Entmarkungskrankheit des ZNS unbekannter Ätiologie. Im Allgemeinen manifestiert sich MS mit leichten neurologischen Störungen, wie z.B. Parästhesien an den Extremitäten, die sich bei schubförmigem Verlauf wieder zurückbilden. Bei fast einem Drittel aller MS-Patienten tritt eine Optikus Neuritis zu Beginn auf. Die Krankheit schreitet immer weiter fort, entweder mit wiederkehrenden sich verschlimmernden Schüben (schubförmig-remittierend RR-MS (engl. *relapsing remitting*)) oder mit einer chronischen langsamen (in seltenen Fällen auch schnellen) Verschlechterung der Symptome (*primary progressive*). Häufige Symptome sind Sensibilitätsstörungen, Paresen, Spastiken, Sehstörungen, Sexualfunktionsstörungen und Miktionsstörungen. Häufig geht der schubförmige Verlauf in einen chronisch progredienten über (*secondary progressive*). Die Krankheitsverläufe sind insgesamt variabel, und die

Bandbreite reicht von fast symptomlosem Verlauf bis zum Versterben innerhalb weniger Monate.

Erkrankungswahrscheinlichkeit und Verlauf werden offensichtlich durch genetische Faktoren und durch Umwelteinflüsse bestimmt. Erkrankt ein eineiiger Zwilling, so hat der andere eine 25%ige Wahrscheinlichkeit ebenfalls zu erkranken (Ebers et al, 1995) und es tritt eine erhöhte familiäre Häufigkeit auf. Die Prävalenz der MS ist bei Kaukasiern im Vergleich zu Afrikanern und Asiaten erhöht (Rosati, 2001). Umfangreiche genomweite Kopplungsanalysen und Assoziationsstudien zeigen dass offensichtlich eine Vielzahl von Genen eine Rolle bei der MS spielt (Ebers et al, 1998, Chapman et al, 2001, Ferber et al, 1996, Oksenberg et al, 2001). Eindeutig mit einem erhöhten MS Risiko korrelieren nur die *Human leukocyte antigen* (HLA)-Allele DR15/DQw6 (Ebers et al, 1995).

Der Einfluß der Umwelteinflüsse spiegelt sich z.B. in der weltweiten Verteilung der MS wieder. In den gemäßigten Breiten, besonders in den Industrieländern ist der MS Anteil hoch und nimmt zum Äquator hin ab (Kurtzke, 1980) Wer vor seinem 15. Lebensjahr ein Hochrisikogebiet verlässt, verringert die Erkrankungswahrscheinlichkeit und umgekehrt, während spätere Migration kaum noch die Prävalenz verändert (Gale und Martyn, 1995).

Desweiteren ist Epidemisches Auftreten der MS bekannt, wie z.B. 1940 auf den Färöer Inseln, nach der Landung britischer Soldaten (Kurtzke, 2000).

3.1.1 Virale Ätiologie

Demyelinisierende Virusinfektionen sind seit längerem bekannt (Marsden und Hurst, 1932) und es werden immer wieder Viren mit MS in Zusammenhang gebracht, in jüngster Zeit z.B. *Chlamydia Pneumonia* (Sriram et al, 1999) was von anderen Arbeitsgruppen wiederum nicht bestätigt wird (Boman et al, 2000). Wie so oft bei Untersuchungen zur MS, ist die Anzahl an widersprüchlichen Berichten hoch. Bisher konnte kein Virus als Ursache der MS identifiziert werden. Man findet oligoklonale Banden in der zerebrospinalen Flüssigkeit von MS-Patienten und solchen mit demyelinisierenden Viruserkrankungen. Bei der viralen Infektion lassen sich krankheitsspezifische Immunglobuline nachweisen, während dieses bei der MS noch nicht gelungen ist (Vartdal et al, 1982). Als mögliche Mechanismen der Virus induzierten Demyelinisierung werden persistierende und transiente Virusinfektionen diskutiert. Neben direkter Gewebeschädigung durch Zerstörung befallener ZNS-Zellen, kann eine unspezifische Aktivierung von ursprünglich nicht enzephalitogenen Makrophagen und Lymphozyten zu einer Demyelinisierung führen (sog. *bystander effect*) (Evans et al, 1996). Außerdem ist eine

Stimulation von T-Zellen durch Superantigene, wie z.B. das bakterielle Lipopolysaccharid, möglich (Rudge, 1991). Superantigene binden direkt an MHC und TCR und führen so zu unspezifischer Aktivierung von T-Zellen. Desweiteren können durch die virusinduzierte Zerstörung von ZNS-Gewebe Autoantigene freigesetzt werden, die eine Autoimmunreaktion in Gang setzen (sog. *epitope spreading*) (Croxford et al., Vanderlugt und Miller, 2002). Durch molekulare Ähnlichkeit des infektiösen Agens zu körpereigenen Strukturen kann eine direkte Aktivierung autoreaktiver Immunzellen erfolgen (Albert et al, 1999). Dieser als *molecular mimicry* bezeichnete Mechanismus wurde z.B. für den Humanen Herpes Virus 6 (HHV-6) von Steinman und Oldstone (1997) vorgeschlagen. Weitere Hinweise für die Beteiligung von *molecular mimicry* an der Pathogenese von MS zeigen Lang et al. (2002). Ein aus einem MS-Patienten isolierter T-Zellrezeptor (Hy.2E11) erkannte sowohl MBP, von HLA-DR2b präsentiert, als auch ein Epstein-Barr Virus Peptid (EBV) von HLA-DR2a präsentiert, erkennt.

Gerade *epitope spreading* und *molecular mimicry* wären Mechanismen durch die eine Autoimmunreaktion bei einer transienten Virusinfektion ausgelöst werden könnte. Da der Virus zum Ausbruch der Krankheit bereits verschwunden ist, sind Nachweise des Verursachers äußerst schwierig (Cook, 2001).

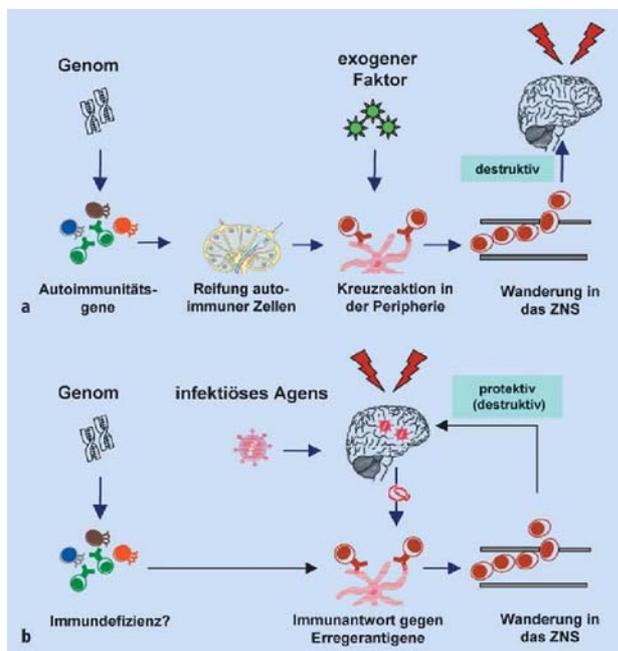


Abb. 6: Schematische Darstellung der beiden postulierten Erkrankungsmodelle für die MS. Oben (a) ist ein reiner Autoimmun Erkrankungsprozess dargestellt, wie er auch für die Experimentelle Autoimmun Enzephalitis (EAE) zu beobachten ist. Unten (b) ist die virale Ätiologie dargestellt. Wie im Text beschrieben konnte bisher aber weder das Autoimmunmodell noch das Virusmodell als für die MS zutreffend nachgewiesen werden. (Rosche et al., 2003)

3.1.2 Autoimmunität bei der MS

So wie die Suche nach einem Virus als Ursache der Autoimmunität, ist auch die Suche nach den für die Entmarkung zuständigen Autoantigenen fehlgeschlagen. Auch hier wurden zunächst Antikörper und autoreaktive T-Zellen gegen einzelne Myelinproteine, unter denen als erfolgversprechender Kandidat in neuester Zeit das MOG aufgeführt wird, nachgewiesen, aber letztendlich wurden diese selten in allen Kranken und oft sogar in gesunden Kontrollpersonen gefunden (Markovits et al, 2003, Van der Aa et al, 2003, Link, 1987, Warren, 1994). Unterstützt wird diese Hypothese z.B. durch die Demyelinisierungserkrankungen von Patienten die mit Myelin kontaminiertem Tollwutimpfstoff geimpft wurden (Remlinger, 1919). Ebenso ist eine Übertragung der Krankheit im Tiermodell durch enzephalitogene T-Zellen möglich.

Spezifische immunologische Veränderungen im Blut und der cerebrospinalen Flüssigkeit zeigen die Mitwirkung des Immunsystems bei der MS. Neben zahlreichen anderen Veränderungen ist die Zahl der CD4+ Zellen und spezifischer Adhäsionsmoleküle (*leukocyte-function associated antigen* (LFA)-1, *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1 erhöht (Traugott, 2001).

3.2 Die Blut-Hirn-Schranke

Das Gehirn ist ein „immunprivilegiertes“ Organ. Es besitzt kein lymphatisches System. Die Blut-Hirnschranke wird von den, die Blutgefäße umschließenden Endothelzellen gebildet. Durch *tight junctions* bilden sie eine Barriere für größere Moleküle, Proteine und Immunzellen. Außerdem werden fast keine MHC Moleküle exprimiert (Wekerle, 2002), sie scheinen aber durch proinflammatorische Mediatoren (z.B. IFN- γ) in bestimmten Zellen induzierbar zu sein (Neumann et al., 1995, 1996). Die Voraussetzung für eine Entzündung des Gehirns ist die Öffnung der Blut-Hirn-Schranke (BBB), wodurch sie neben Immunzellen auch für Antikörper durchlässig wird (Filippi et al, 1996, Archelos et al, 1999). Expression von Integrinen wie *intercellular adhesion molecule* (ICAM) und *vascular cell adhesion molecule* (VCAM) auf Endothelzellen kann aktivierte Lymphozyten durch Interaktion mit *lymphocyte function-associated antigen-1* (LFA-1) bzw. *very late antigen 4* (VLA-4) festhalten (*rolling*) und eine Diapedese ermöglichen (Wingerchuk et al., 2001). Die

Mechanismen die zur Öffnung der Blut-Hirn-Schranke bei MS Patienten führen, sind nicht bekannt.

3.3 Allgemeines Modell der bei MS und EAE ablaufenden Immunprozesse

Mit Abbildung 7 soll ein modellhafter Überblick über die augenblicklichen Vorstellungen über die Immunprozesse, die bei der MS und EAE ablaufen, gegeben werden. Aus ungeklärter Ursache durchbrechen autoreaktive T-Zellen die Blut-Hirn-Schranke (BBB) und wandern ins ZNS. Dort könnten lokale Faktoren, wie metabolischer Stress oder eine Virusinfektion, die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin auf Endothelzellen erhöhen und weitere Immunzellen ins ZNS dirigieren. Der Übertritt durch die BBB wird maßgeblich durch Matrix Metalloproteasen (z. B. MMP-9), die extrazelluläre Proteine abbauen, gefördert. Von aktivierten T-Zellen ausgeschüttete proinflammatorische Zytokine wie Interferon- γ (IFN- γ) und Tumor Nekrosis Faktor β (TNF- β) könnten die Ausprägung von Oberflächenmolekülen auf benachbarten Lymphozyten und Antigen präsentierenden Zellen (APC) induzieren. Die Präsentation von möglichen MS Antigenen, wie z. B. MBP, PLP, MOG, durch APC auf dem MHC II Komplex könnte zur Bindung von autoreaktiven T-Zellen, die je nach Interaktion mit costimulatorischen Molekülen (z. B. CD28, CTLA-4) und deren Liganden (z. B. B7-1, B7-2) zu einer verstärkten Immunantwort oder zur Abschwächung und Anergie führen. Bei einer Abschwächung werden antiinflammatorische Zytokine (IL-1, IL-4, IL-10, TGF- β) von CD4⁺ Zellen ausgeschüttet und führen zur Proliferation von CD4⁺ T-Helfer 2 (Th2) Zellen. Diese können durch antiinflammatorische Zytokine die Aktivitäten von APC erniedrigen und B-Zellen zur Produktion von pathologischen oder Gewebeschäden behebenden Antikörpern anregen. Bei einer verstärkten Immunantwort werden proinflammatorische Zytokine freigesetzt (IFN- γ , IL-12) die zur weiteren Proliferation von CD4⁺ T-Helfer 1 (Th1) Zellen führen, die auf unterschiedliche Weise die Autoimmunreaktion verstärken, wie direkter Zytokin vermittelter Schaden an Myelin und Oligodendrocyten; Abbau von Myelin durch Makrophagen, eventuell anti-Myelin (z. B. MOG) Antikörper vermittelt; Komplement verursachte Schädigungen und direkter Schaden durch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Einige postulierte Mechanismen sind in Abbildung 7 gezeigt.

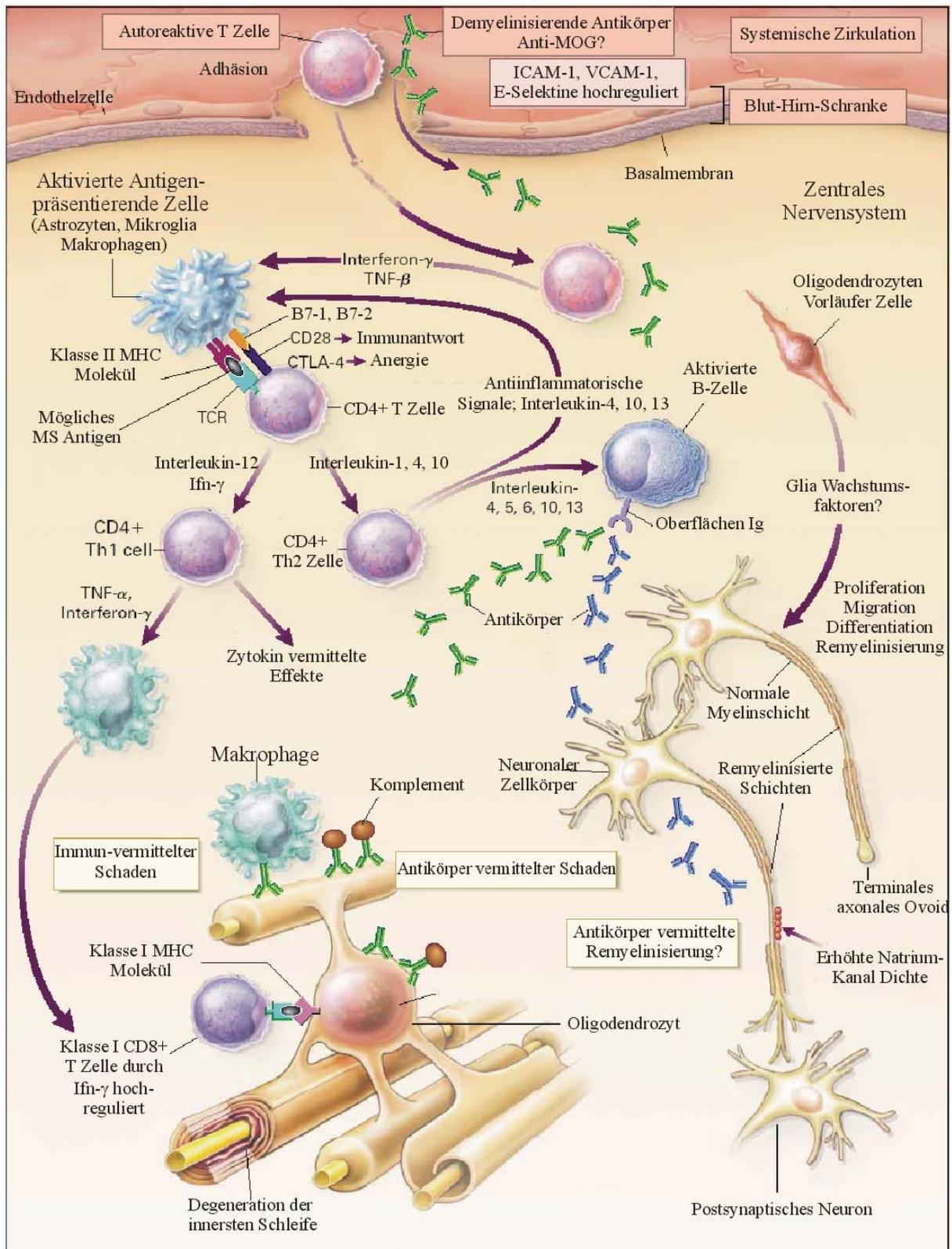


Abb. 7: Postulierte Mechanismen, die zu Gewebeschäden und Reparatur in der MS und EAE führen können. (Verändert aus Noseworthy et al., 2000).

Die Schädigung der Myelinschicht führt zur Verlangsamung oder Verhinderung der saltatorischen Erregungsleitung und äußert sich in klinischen Symptomen wie z.B. Lähmungserscheinungen. Die freigelegten Axone werden dadurch geschädigt, was sich in der Degeneration von Axonen oder der Ausbildung von terminalen Ovoiden manifestiert. Zahlreiche mögliche Mechanismen können zu einer Remyelinisierung führen, wie z.B. spontane Remyelinisierung, Remyelinisierung durch eingewanderte, proliferierende und differenzierende Oligodendrozyten Vorläuferzellen. Außerdem können sich die Natrium Kanäle über das freigelegte Axon verteilen und die Erregungsleitung wieder verbessern.

3.4 Der Entmarkungsherd (Plaque)

Spezifisch für die MS ist der Entmarkungsherd, der in Biopsien von MS-Gehirnen mit bloßem Auge zu erkennen ist.

Entmarkungsherde treten meist periventrikulär, im optischen Nerv, Hirnstamm, Kleinhirn und Rückenmark auf, seltener im übrigen ZNS. Sie sind durch Demyelinisierung der Axone gekennzeichnet, die selbst weitestgehend erhalten bleiben. Allerdings können je nach Plaqueaktivität ein großer Teil der Axone verloren gehen (Lovas et al, 2000). Plaques können als aktiv oder inaktiv bezeichnet werden (Lassmann et al, 1998). Aktive Herde sind durch myelinspezifische Abbauprodukte (MBP, PLP, MOG) in den zahlreich vorhandenen Makrophagen gekennzeichnet (Brück et al, 1995). Neben Makrophagen machen T-Zellen die zahlenmäßig stärkste Fraktion aus, wobei es sich dabei sowohl um CD4+ (Helfer) als auch um CD8+ (zytotoxische) Zellen handelt (Traugott, 2001). Es finden sich sowohl Helferzellen vom Th1 Typ, der durch Ausschüttung von sogenannten proinflammatorischen Zytokinen wie Tumor Nekrosis Faktor-alpha (TNF- α) und Gamma Interferon (IFN- γ) gekennzeichnet ist, als auch solche, Interleukine wie IL-4,-6,-10 und *transforming growth factor*-beta (TGF- β) sezernierende, vom Th2 Typ. Aktivierte Mikroglia, B-Zellen und Nukleophile sind ebenfalls in geringeren Mengen nachweisbar. Lucchinetti et al (2000) haben die aktiven demyelinisierenden Plaques in vier unterschiedliche Gruppen unterteilt:

1. Makrophagen und T-Zellen dominieren in abgegrenzten Plaques um kleine Venen herum.
2. Zusätzlich zu 1. ist das Komplementsystem aktiviert, verbunden mit Immunglobulinpräzipitation.

In beiden ist das Vorliegen von Myelinproteinen (MAG, MBP, MOG und PLP) reduziert. Oligodendrozyten gehen am Rand des Plaques verloren, während neue im Zentrum auftauchen.

3. Plaques enthalten zelluläre Infiltrate, hauptsächlich Makrophagen, T-Zellen und aktivierte Mikroglia, die nicht gefäßzentriert sind. Komplement und Immunglobulindeposition fehlt. Diese Plaques sind durch einen überproportionalen Verlust an MAG im Vergleich zu anderen Myelinproteinen gekennzeichnet und durch starken Oligodendrozytenverlust. Außerdem werden apoptotische Oligodendrozyten beobachtet.

4. Diese Plaques zeichnen sich ebenfalls durch Makrophagen und T-Zellinfiltrationen ohne Komplement und Immunglobuline aus. Zeigen aber nichtapoptotischen Untergang von Oligodendrozyten in der unauffälligen Region um den Plaque herum mit Verlust aller Myelinproteine in der aktiven Region.

In Plaques der Gruppen drei und vier ist die Remyelinisierung minimal.

Interessant bei dieser Unterteilung ist, dass sich immer der gleiche Entzündungstyp pro Patienten findet. Dies deutet auf unterschiedliche Beteiligung des Immunsystems oder sogar auf unterschiedliche Krankheitsentstehungen hin (Lucchinetti et al., 2000).

Inaktive Plaques zeichnen sich durch viel geringere Lymphozyteninfiltrate aus (Prineas und Wright, 1978). Es sind kaum Oligodendrozyten, aber teilweise Oligodendrozyten Vorläuferzellen, vorhanden (Wolswijk, 1998 a, b).

Des Weiteren gibt es sogenannte Schatten Plaques, die durch Axone mit einheitlich dünner Myelinschicht gekennzeichnet sind. Sie weisen auf die Möglichkeiten der Selbstreparatur der weißen Substanz hin (Wingerchuck, 2001).

3.5 EAE

Eine wichtige Eigenschaft von MOG ist seine Fähigkeit Experimentelle allergische (oder auch autoimmun) Encephalomyelitis (*experimental autoimmune encephalomyelitis*, EAE) in einer Reihe von Säugetieren auszulösen. EAE wird seit längerer Zeit als gutes Modell zur Untersuchung von Multipler Sklerose (MS) angesehen (Wekerle et al., 1994).

Zur Auslösung der EAE wird ZNS-Gewebe mit *complete Freund's adjuvant* (CFA) (abgetötete Mykobakterien in einer Wasser in Öl Emulsion) gemischt in Versuchstiere injiziert. Als Folge entwickeln diese Tiere Symptome, die stark der MS gleichen (Kabat et al., 1946; Morgan, 1946), die sog. Experimentelle autoimmun Enzephalitis (EAE) (Tab. 1).

EAE kann mit ZNS Homogenat, Myelin, Myelinproteinen, synthetischen Peptidfragmenten und ZNS spezifischen nicht-Myelinproteinen ausgelöst werden (Lublin, 2001). Bevorzugte Versuchstiere sind dabei Mäuse, Ratten, Meerschweinchen und nichtmenschliche Primaten

(t'Hart und Amor, 2003). Die Suszeptibilitäten und damit die Schwere und die Art der Erkrankung, akut oder chronisch, verzögert-in Schüben (*chronic, relapsing-remitting*) variieren sehr stark je nach benutztem Antigen, der Immunisierungsprozedur und dem Versuchstier (Review von Kies, 1973; Alvord et al., 1992; Bernard et al., 1997; Linington et al., 1993; Kerlero de Rosbo et al., 1995). Außerdem spielt der genetische Hintergrund, besonders der MHC Haplotyp, eine große Rolle, so dass es resistente und empfängliche Tierstämme bei gleicher Immunisierungsprozedur gibt (Weissert et al., 1998; Shaw et al., 1992). Die Entdeckung von MBP als encephalitogenen Faktor (Kies und Alvord, 1959; Laatsch et al., 1962) führte zur Entwicklung von MBP spezifischen T-Zelllinien. Die Injektion dieser Zellen führt zwar zu einer Erkrankung, aber kaum zu einer Demyelinisierung des ZNS. Wenn aber zusätzlich demyelinisierende Antikörper aktiviert werden, kann es zu massiver Demyelinisierung kommen. Bestimmte Tiere zeigen mit MS vergleichbare Demyelinisierungen, Remyelinisierung und axonale Schäden (dal Canto und Lipton, 1977; McGavern et al., 1999; Kornek et al., 2000). Interessant ist, dass transgene Mäusen, die autoreaktive T-Zell Rezeptoren überexprimieren, spontane EAE entwickeln. Mit diesen Mäusen konnte auch ein mikrobieller Einfluss für den Krankheitsausbruch gezeigt werden, da Tiere unter pathogenfreien Bedingungen nicht erkrankten (Goverman et al., 1997). Wie bei MS ist auch im EAE-Tiermodell die Krankheit durch bestimmte Agentien (Teitelbaum et al., 1971) zu beeinflussen. Die Zytokinexpressionsprofile zeigen teilweise gute Übereinstimmung mit den bei MS-Patienten gefundenen (Huang et al., 2000; Karpus und Ransohoff, 1998).

	EAE	MS
ZNS Symptome	+++	+++
Schubförmig (<i>relapsing</i>)	++	+++
ZNS perivaskuläre Infiltrate	+++	+++
ZNS Demyelinisierung	+ bis +++	+++
Antikörper-vermittelte Demyelinisierung	++	++
ZNS Remyelinisierung	++	++
Immunogen	MBP,PLP,MOG, andere	unbekannt
Genetische Veranlagung	++	++
MHC gekoppelt	++	++
Begrenzte T-Zell Heterogenität	+	+
Mikrobieller Einfluß	+	++
Zytokin Effekte	++	?+
Immunmodulatorische Beeinflußbarkeit	+++	++

Tab. 1: Vergleich zwischen EAE und MS. + = schwache Übereinstimmung; ++ = mittlere Übereinstimmung; +++ = starke Übereinstimmung; ? = Widersprüchlich. Nach Lublin, 2001.

Tabelle 1 fasst die Übereinstimmungen von Symptomen und Einflussgrößen zwischen MS und EAE zusammen.

Diese Ähnlichkeiten zu MS machen EAE zu dem zur Zeit besten Modell zur Untersuchung der MS, an dem auch schon zahlreiche Therapieansätze erfolgreich getestet wurden ('t Hart und Amor, 2003). Trotz aller Übereinstimmung sind die Verhältnisse der EAE nicht immer auf MS übertragbar. Während IFN- γ in Mäusen die Krankheitssymptome verbessert, musste die klinische Studie an MS-Patienten aufgrund der krankheitsverschlechternden Wirkung abgebrochen werden (Voorthuis et al., 1990, Panitch et al., 1987). Umgekehrt hatte IFN- β in EAE wenig positiven Effekt, wird aber bei MS-Patienten erfolgreich zur Behandlung eingesetzt (Coyle und Hartung, 2002).

3.6 MOG induzierte EAE

MBP und PLP galten lange Zeit als die hauptenzephalitgenen Proteine in der EAE. Seit der Entdeckung von MOG als starkem Antigen, das die Wirkung von MBP und PLP als Auslöser der EAE noch übertreffen kann, ist die MOG induzierte EAE immer stärker zum Untersuchungsobjekt geworden (Adelmann et al., 1995). Gereinigtes oder rekombinantes MOG löst in Mäusen, Ratten und nicht menschlichen Primaten EAE aus. Ob zur Induktion gereinigtes oder rekombinantes Protein, oder Ratten, Mäuse oder menschliches MOG benutzt wurde, hat dabei nur einen geringen Einfluss auf die beobachteten Symptome (von Büdingen et al., 2001). Die Tiere zeigen perivaskuläre Inflammationen, Demyelinisierungen und hohe Antikörper Titer. Wie für MBP und PLP wurden auch dominierende encephalitogene MOG Epitope in den unterschiedlichen Spezies untersucht. Je nach Tierart und Stamm wurden verschiedene Epitope identifiziert. In Lewis Ratten und in einigen Mauslinien ist MOG35-55 das stärkste Encephalitogen. Dies zeigt sich bei der Induktion von EAE mit kurzen Peptiden der extrazellulären Domäne von MOG. In vielen Mausstämmen reicht die Immunisierung mit MOG35-55 für die Entwicklung von EAE, wie sie auch mit komplettem MOG erreicht wird, aus (Mendel et al., 1995). Welche Peptide EAE auslösen, hängt offensichtlich von den jeweiligen MHC Haplotypen der benutzten Maustämme ab. Nicht jede Peptidsequenz, die nach Immunisierung von Autoreaktiven T-Zellen oder B-Zellen erkannt wird, ist auch encephalitogen. In der Lewis Ratte wurden nach Immunisierung mit der extrazellulären Domäne von MOG, z.B. die Sequenzen 1-20 und 35-55 von autoreaktiven T-Zellen erkannt, EAE konnte aber nur mit dem Peptid MOG35-55 ausgelöst werden (Adelmann et al., 1995).

Auch bei MS Patienten gibt es eine Dominanz gegen die Peptide 1-22, 34-56 und 64-96 (Kerlero de Rosbo, 1997).

Um den Einfluss MOG reaktiver T-Zellen zu studieren, wurden für bestimmte Peptide (z.B. MOG35-55) oder gesamt-MOG-spezifische Zelllinien auf Versuchstiere übertragen (adoptiver Transfer). In bestimmten Mäusen und Ratten konnte auf diese Weise EAE mit klinischen Symptomen und Entzündungen induziert werden (Bernard et al., 1997; Stefferl et al., 1999), Demyelinisierungen wurden aber nicht beobachtet, außer bei Marmosets, die eine schwache Demyelinisierung zeigten (Villoslada et al., 2001). Es zeigt sich also eine pathogene Funktion von MOG-reaktiven T-Zellen bei der EAE.

Anders als für die T-Zellen wird die Beteiligung von B-Zellen und demyelinisierenden Antikörpern bei der MS und EAE kontrovers diskutiert. Es gibt gerade für MOG zahlreiche Untersuchungen, die eine demyelinisierende Wirkung von Antikörpern zeigen. Anti-MOG Antikörper haben einen demyelinisierenden Effekt sowohl in vitro (Kerlero de Rosbo et al., 1990) als auch in vivo (Schleusener et al., 1987; Linnington et al., 1988 und 1992). Immunglobuline, die aus mit MOG immunisierten Ratten gewonnen wurden, stimulieren den Abbau von MBP durch Aktivierung einer myelinspezifischen Protease. Mit MBP gewonnenen Antikörpern wurde dagegen kein MBP-Abbau erreicht (Johns et al., 1995). Deshalb wird vermutet, daß MOG-spezifische Antikörper eine aktive Rolle bei der Demyelinisierung spielen (Bernard et al., 1997). MBP-Abbau im Bereich der Plaques ist ein typisches Merkmal von MS (Einstein et al., 1972; Cuzner et al., 1976). Die schwachen Symptome nach adoptiven Transfer in Lewis Ratten können durch Zusatz von anti-MOG Antikörpern deutlich verstärkt werden (Linnington et al., 1993). Im Serum von Mäusen, mit ZNS-Homogenat ausgelöster *chronic-relapsing* EAE, wurden Antikörper gegen MOG, aber nicht gegen MBP und PLP nachgewiesen, und daß obwohl MBP und PLP mehr als 100 mal häufiger sind (Lebar et al., 1987, 1986). Es wurden auch in ca. 90 % von MS Patienten in deren cerebrospinalen Flüssigkeit (CSF) oligoklonale IgG nachgewiesen, von denen zumindest einige mit myelinspezifischen Antigenen reagierten (Link et al., 1987; Bernard et al., 1983; Panitch et al., 1980; Warren et al., 1994).

Andererseits zeigten Hjelmstrom et al. (1998) und Dittel et al. (2000), dass B-Zell defiziente C57/Bl.6 Mäuse die mit MOG35-55 immunisiert wurden, dem Wildtyp vergleichbare EAE entwickeln, bei der es auch zur Demyelinisierung kommt.

3.7 Die Entstehung von autoreaktiven T-Zellen

Die T-Zellreifung erfolgt im Thymus, nach dem als negativ und positiv Selektion bezeichneten Vorgang. T-Zellen die keine Bindung mit einem Peptid/MHC Komplex eingehen, gehen durch Apoptose zu Grunde. Ebenso werden alle T-Zellen aussortiert, die eine zu starke Bindung mit dem Peptid/MHC-Komplex eingehen. Es werden nur solche T-Zellen positiv selektioniert, die eine schwache Bindung mit dem Peptid/MHC-Komplex aufbauen können (Madrenas et al., 1995; Kersh und Allen, 1996). Auf diese Weise muss jede reife T-Zelle mindestens auf ein endogenes Peptid schwach reagieren (Kuchroo et al., 2002). So ist z.B. in nicht immunisierten Sjl Mäusen eine von 20000 T-Zellen reaktiv gegen das PLP Peptid 139-151 (Anderson et al., 2000), trotzdem bekommen diese Mäuse keine spontane EAE, sind aber sehr anfällig für PLP induzierte EAE. Eine hohe Zahl von autoreaktiven T-Zellen erhöht die Möglichkeit, zur Aktivierung durch Immunisierung mit körpereigenem Gewebe oder durch das schon beschriebene *epitope spreading*. Da T-Zell Rezeptoren ein hohes Maß an Kreuzreaktivität aufweisen (Evavold et al., 1995; Jahnke et al., 1985; Madrenas, 1996; Kersh und Allen, 1996), würden hohe Konzentrationen autoreaktiver T-Zellen auch das Risiko des *molecular mimicry* erhöhen.

3.8 Gene-targeting; gezielter Austausch von Genen durch homologe Rekombination

Neben den Methoden der Mikroinjektion (Gordon und Ruddle, 1983) und der retroviralen Infektion (Putten et al., 1985), die zum unspezifischen Einschleusen von Genen in das Wirtsgenom angewendet werden, gibt es die Methode des *gene-targeting* (Capecchi, 1994). Diese Methode ermöglicht die Insertion von DNA an ihrer Sequenz entsprechenden Loci im Genom durch homologe Rekombination. Auf diese Weise können gesunde Gene durch Einfügen eines mutierten Genes spezifisch verändert oder gänzlich ausgeschaltet werden, was als *gene knock-out* bezeichnet wird.

Hierfür ist die Herstellung eines *gene-targeting*-Konstruktes erforderlich. Dazu wird ein genomisches DNA-Fragment, das die auszuschaltenden Genabschnitte trägt, in einem Plasmidvektor zum *gene-targeting*-Vektor modifiziert. Anschließend erfolgt das Einschleusen des Vektors in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Maus, die sich im pluripotenten, undifferenzierten Zustand befinden. Das *gene-targeting*-Konstrukt soll dann homolog in das Zielgenom integrieren. Da die homologe Insertion etwa 1000 mal seltener ist als die heterologe Insertion, wird das *gene-targeting*-Konstrukt mit zwei Markergenen ausgestattet, die die Selektion der homolog rekombinierten Klone erleichtern.

Der positive Marker ist das Neomycin-Resistenzgen (häufig als *neo*-Box bezeichnet), das von den Sequenzen des Zielgens flankiert wird. Die *neo*-Box führt in der Regel zum Transkriptionsabbruch und somit fast immer zu einem kompletten Abschalten des Gens.

Als negativer Marker wird das Thymidinkinase-Gen des Herpes Simplex-Virus, HSV-TK, auch als *tk*-Box bezeichnet, 5'- oder 3'-wärts von der DNA-Sequenz in das Konstrukt eingebaut. Wird nun die DNA Sequenz heterolog in das Genom integriert, so erfolgt das mit der *tk*-Box. Bei einer homologen Rekombination geht die *tk*-Box verloren.

Mit Hilfe des Neomycin-Analogons G418 (Geneticin) können solche Klone identifiziert werden, die das *neo*-Resistenzgen integriert enthalten. Alle anderen Zellen sterben ab, da G418 die Proteinbiosynthese durch Interaktion mit den 80S-Ribosomen blockiert. Auf homologe Rekombinanten wird zusätzlich mit dem synthetischen Nucleotidanalogen Gancyclovir (GanC) selektioniert. Ist die *tk*-Box aufgrund heterologer Rekombination noch vorhanden, so wird das GanC phosphoryliert, was zum Kettenabbruch der DNA Polymerase führt. Aus diesem Grund sterben die Zellen, die das *tk*-Gen tragen, ab.

Diese Methode der positiv/negativ-Selektion (Mansour et al., 1988) ermöglicht die unkomplizierte Identifizierung von potentiell positiven Klonen. Der endgültige Nachweis homologer Rekombination erfolgt in der Southern Blot Analyse. Dabei kann mit Hilfe einer außerhalb des Konstruktes liegenden, radioaktiv markierten Sonde ein Restriktionspolymorphismus nachgewiesen werden, der nur durch den Einbau des Konstruktes mit der *neo*-Box erzeugt wird. Ein weiterer möglicher Nachweis kann mittels PCR geführt werden.

Die Häufigkeit der homologen Rekombination steigt mit der Länge der homologen Sequenzen zwischen *gene-targeting*-Vektor und Ziellocus (Hasty et al., 1991b). Die so erhaltenen positiven Klone werden vermehrt und in Mausembryonen im Blastocystenstadium injiziert. Die ES-Zellen tragen die Erbanlagen für eine braune Fellfarbe (*agouti*) und übertragen diese auf die Mäuse, die die ES-Zellen funktionell integrieren konnten. Diese als Chimären bezeichneten Mäuse weisen eine gescheckte Fellfarbe auf. Die injizierten ES-Zellen können aufgrund ihres undifferenzierten Zustands zu allen Zellen differenzieren können, integration in die Keimbahn führt durch Kreuzungen der Keimbahnchimären zur homozygoten Mauslinie.

II. Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit war die Aufklärung der bisher unbekanntes Funktion von MOG.

1. Ausgehend von einem bereits in der Diplomarbeit isolierten Genfragment, sollte ein *gene-targeting* Vektor für die homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus erstellt werden, als Ausgangspunkt für:
2. Die Generierung einer MOG-defizienten Mauslinie durch Blastozysteninjektion.
3. Diese null allelischen Mäuse sollten genotypisch und phänotypisch charakterisiert und die Auswirkungen der MOG-Defizienz untersucht werden.
4. Weiterhin sollte durch Kreuzung mit der MBP/PLP defizienten Mauslinie, der ca. 70-80% der gesamten Myelinproteine fehlen, eine homozygote Tripelmutante generiert werden, um aus zusätzlichen phänotypischen Veränderungen der bereits charakterisierten *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-} Mauslinie mit ihren Myelinisierungsdefekten Einblick in die Funktion von MOG zu erhalten.
5. Es sollte die Rolle von MOG als Autoantigen in EAE-Experimenten an wt- und *mog*^{-/-} Mäusen aufgeklärt werden.

III. Ergebnisse

1. Generierung einer MOG-defizienten Mauslinie

1.1 Klonierung des *replacement* Vektors

Ausgangspunkt bildete ein bereits in der Diplomarbeit aus einer Phagenbank isoliertes und charakterisiertes 6.2kb-Fragment, welches die Exons I-III enthielt. Als Vektor diente der pPNT-Vektor, bei dem sowohl die *Neo*- als auch die *Tk*-Box unter Kontrolle des starken und ubiquitär aktiven 3-Phosphoglyceratkinase (PGK) Promoters stehen (Okada et al., 1997).

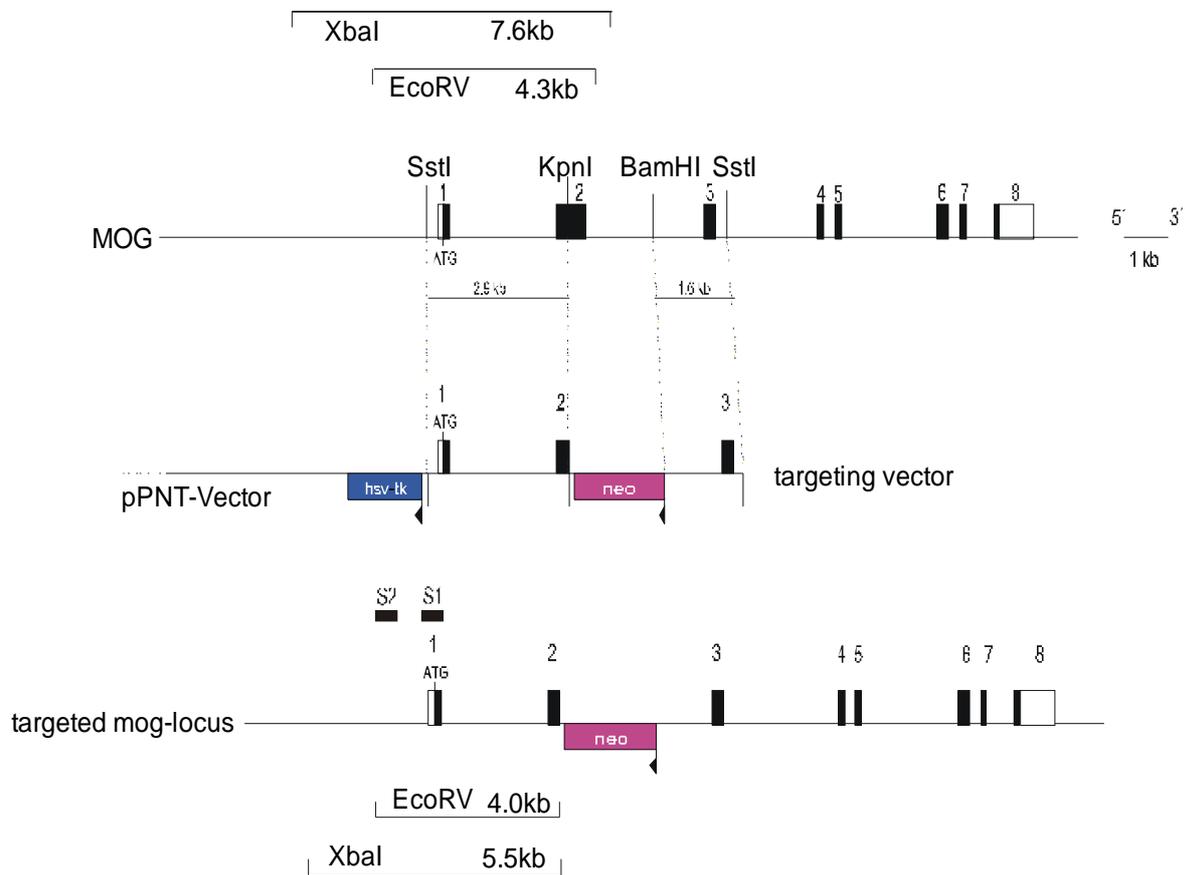


Abb. 8: Schematische Darstellung des Genlocus, *targeting*-Konstruktes, homologen Rekombinationsereignisses und Nachweismethoden von MOG. Der kodierende Bereich des MOG-Gens ist durch die schwarze Füllung symbolisiert. Die liegenden eckigen Klammern zeigen die Größe der analytischen Fragmente, darin die entsprechenden Restriktionsenzyme. Die mit S2 und S1 gekennzeichneten Balken zeigen Lage und Größe der Hybridisierungssonden.

Der Versuch das 6.2kb-Fragment an der KpnI Schnittstelle zu teilen und die so erhaltenen 2.9kb- und 3.2kb-Stücke *blunt end* um die *Neo-Box* des pPNT-Vektors einzubauen, schlug trotz zahlreicher Versuche fehl. Um dieses Problem zu umgehen, wurde das 2.9kb 5'-Fragment zunächst aus dem pBluescript Vektor in einen neuen pBluescript Vektor mit zerstörter XhoI Schnittstelle in *antisense*-Richtung inkloniert. Aus diesem wurde das 2.9kb 5'-Fragment mit KpnI/SstI ausgeschnitten und gerichtet in den pPNT Vektor inkloniert. Das 1.6kb große 3'-Fragment wurde mit BamHI/SstI ausgeschnitten und *blunt-end* in die XhoI-Schnittstelle des pPNT-Vektors inkloniert. Die verschiedenen Klonierungsschritte und das *targeting*-Konstrukt wurden durch Restriktionskartierungen überprüft. Abbildung 8 zeigt die Darstellung des Genlocus, des *targeting*-Konstruktes, des homologen Rekombinationsereignisses und die zur Identifizierung verwendeten Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen.

Der Nachweis der homologen Rekombination erfolgte sowohl mit einer externen als auch mit einer internen Sonde. Für den Nachweis mit Hilfe der internen Sonde wurde ein weiterer Restriktionsschnitt mit BamHI (4.7kb/3.1kb) durchgeführt, der sich für die Schwanzbiopsien am geeignetsten erwies.

1.2 Herstellung rekombinanter ES-Zell Klone

Die Einschleusung von fremder DNA in ES-Zellen erfolgte durch Elektroporation. Bei Verwendung dieser Technik wurden die Zellmembranen exponentiell wachsender Zellen durch kurze elektrische Pulse hoher Feldstärke für hochmolekulare Moleküle durchlässig gemacht. Da sich die embryonalen Stammzellen in einem undifferenzierten -totipotenten-Zustand befinden, können sie sich nach der Einschleusung in Blastocysten zu allen Arten von Gewebe entwickeln und damit auch zu Keimbahngewebe.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene ES-Zelllinien verwendet. R1: hervorgegangen aus einer Kreuzung von 129/Sv-cp und 129/J Mäusen und CJ7: hervorgegangen aus 129/Sv-Mäusen (Nagy et al., 1993; Swiatek und Gridley, 1993). Beide Mauslinien haben einen männlichen Genotyp.

Für eine Elektroporation wurden $1-2.5 \times 10^7$ ES-Zellen eingesetzt. Das über Nacht mit NotI linearisierte Targetingkonstrukt (20-40 μ g) wurde, in R1-Medium gelöst, mit den ES-Zellen vermischt und elektroporiert.

Nach 24 Stunden begann die positiv/negativ Selektion mit dem Neomycinanalogon G418 und Gancyclovir. Die Klone, die diese Behandlung überlebten, wurden nach 10-12 Tagen isoliert, expandiert, die eine Hälfte tiefgefroren und die andere zur DNA-Gewinnung benutzt. Die Identifizierung homolog rekombinierter Klone erfolgte durch Southern Blot Hybridisierungsanalyse. Die so ermittelten potentiell positiven Klone wurden aufgetaut und nach Expansion mittels spezifischer Southern Blot Analysen auf die einmalige und korrekte homologe Integration des *targeting* Vektors in das ES-Zellgenom untersucht.

Um die Totipotenz der ES-Zellen zu gewährleisten, wurde die Passage-Zahl und die Gesamtzeit in Kultur möglichst niedrig gehalten. Außerdem wurden die Zellen immer (außer zur DNA-Gewinnung) auf einem Rasen embryonaler Fibroblasten unter Zusatz von 1000-2000 U rekombinanten LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) pro ml Medium kultiviert. Mitotisch inaktivierte embryonale Fibroblasten schaffen Kulturbedingungen, unter denen der embryonale Zustand und damit die Totipotenz der ES-Zellen erhalten werden kann. Die Fibroblasten sezernieren LIF (Hilton und Gough, 1991), ein in der Hämatopoese und Embryogenese beteiligtes Glykoprotein, das differenzierungshemmende Eigenschaften besitzt (Smith et al., 1988).

Bei jeder durchgeführten Elektroporation wurde eine G418-Kontrollplatte mit elektroporierten (G418^r) und eine mit nicht elektroporierten Zellen (G418-Kontrolle) angelegt. Während die nicht transfizierten Zellen im Verlaufe der Selektion absterben, kann mit Hilfe der G418 resistenten Klone die Anreicherung an doppelt resistenten Klonen (G418^r + GanC^r) und damit die Effizienz der positiv/negativ Selektion kontrolliert werden.

Anzahl der Elektroporationen	Zell-Linie	Anzahl untersuchter Klone	Anreicherungs-faktor	Anzahl positiver Klone
3	R1	322	1:10-1:30	-
9	CJ7	603	1:4-1:10	3

Tab. 2: Übersicht über die Ergebnisse der durchgeführten Elektroporationen.

1.3 Nachweis der homologen Rekombination

Die homologe Rekombination wurde mittels eines charakteristischen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) im Southern Blot nachgewiesen. Hierfür wurde die DNA entweder einem XbaI oder EcoRV Restriktionsschnitt unterworfen und über

1%ige- Agarosegele aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Das homolog rekombinierte Allel konnte durch die zwischen Exon 2 und der *neo*-Box eingeführten XbaI und EcoRV Schnittstellen von dem Wildtyp-Allel unterschieden werden, da sich für das Wildtyp-Allel jeweils größere Fragmente ergeben. Mit Hilfe der radioaktiv markierten Sonden S1 und S2, die jeweils mit denselben Fragmenten hybridisiert wurde sowohl mit externer, als auch mit interner Sonde (S1 bzw. S2) die homologe Rekombination bei drei Klonen nachgewiesen.

Die drei positiven Klone wurden aufgetaut, expandiert und noch einmal den entsprechenden

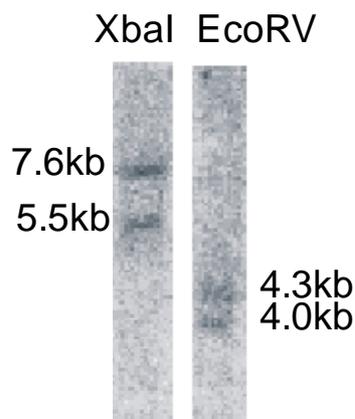


Abb. 9: Exemplarischer Verdau eines homolog rekombinierten ES-Zell Klones.

Restriktionsschnitten unterzogen (Abb. 9). Während der Expansion waren deutliche qualitative Unterschiede in Wachstum und Morphologie der drei ES-Zell-Klone zu erkennen. Nur Klon 30 wuchs mit einer nahezu kreisrunden Erscheinung ohne Anzeichen von unregelmäßiger Gestalt. Die Klone 68 und 120 hatten eine weniger runde Morphologie und zeigten eine ungleichförmige Gestalt. Um DNA von Klonen in großen Mengen zu gewinnen, wurden diese dreimal auf Gelatineplatten mit LIF freiem Medium passagiert, um sie von den *Feeder*-Zellen zu befreien. Die Klone 68 und 120 vermehrten sich allerdings nach der zweiten Passage nicht

mehr. Erst nach Zugabe von LIF war es möglich sie ein drittes mal zu passagieren. Klon 30 wuchs ohne Probleme auf Gelatineplatten und in LIF freiem Medium. Diese Beobachtungen ließen im Gegensatz zu Klon 30 einen höheren Differenzierungsgrad für Klon 68 und 120 vermuten und obwohl man aus diesen Eigenschaften nicht zwingend eine Selektion nach keimbahngängigem und nicht keimbahngängigem Klon ableiten kann, wurde zur Blastocysteninjektion hauptsächlich Klon 30 verwendet.

1.4 Karyotypisierung

Durch die Einfrier- und Auftauvorgänge, die lange Kultivierung und die Elektroporation sind die embryonalen Stammzellen erheblichen Belastungen ausgesetzt, die zu einem Verlust der Totipotenz führen können. Häufig entsteht eine Aneuploidie durch Fehlverteilung der Chromosomen in der Meiose, die sich häufig in Mono- oder Trisomien äußert (Liu et al., 1997). Hierdurch wird die Integration in die Keimbahn verhindert, während somatische

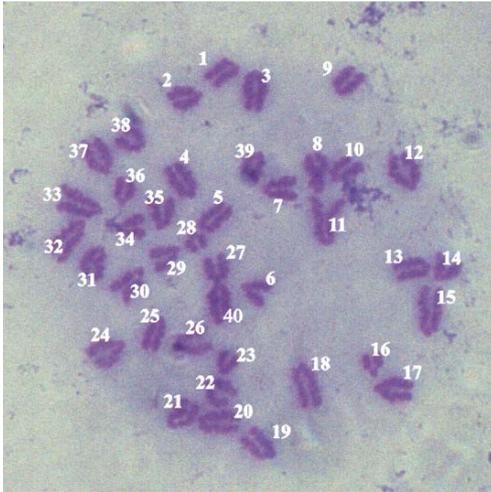


Abb. 10: Karyogramm des ES-Zellklons 30 mit willkürlich nummerierten Chromosomen. Vergrößerung: 100x.

Integrationen weiterhin möglich bleiben und dadurch eine hohe Totipotenz vortäuschen können. Um dieses zu entdecken, wurden die ES-Zellen in einer hypotonischen KCl Lösung inkubiert und auf einen Objektträger aufgetropft. Die gequollenen Zellen platzten beim Aufprall und die Chromosomen wurden unter dem Mikroskop ausgezählt (Abb. 10). Alle drei ES-Zellklone hatten die normale Chromosomenanzahl von 40.

1.5 Embryonenmanipulation

Die transgene MOG-defiziente Mauslinie wurde durch Blastocysteninjektion (Osada und Maeda, 1998) etabliert. Dafür wurden Blastocysten am Tag 3,5 p.c. aus den Uteri schwangerer Mäuse isoliert. Isolation und Aufbewahrung im Brutschrank bis zum Experiment erfolgte in DF-Medium, die Injektion in DFH-Medium. Es wurden je nach Qualität und Größe der Blastocysten zwischen 4 und 30 ES-Zellen injiziert. Die ES-Zellen wurden nach Möglichkeit auf die innere Zellmasse abgelegt. Nach erfolgreicher Injektion wurden die Blastocysten für ca. 1h in M16-Medium inkubiert und expandierten zum großen Teil wieder zu ihrer ursprünglichen Form, aber auch die nicht expandierten Blastocysten wurden in der Regel verwendet. Anschließend wurden zwischen 5 und 15 Blastocysten in ein Uterushorn pro scheinsschwangerer *Foster*-Mutter reimplantiert.

Die verwendeten ES-Zelllinien resultieren aus den Mauslinien 129/Sv. Bei Inzuchtlinien wie C57/Bl.6 und Balb/c werden damit hohe Keimbahntransmissionen (Schwartzberg et al., 1989) erreicht, während die 129/Sv ES-Zelllinien bei sogenannten *outbred*-Stämme wie CD1 aufgrund deren höherer genetischen Diversizität keinen Selektionsvorteil mehr haben. Da aber die Anzahl und die hohe Qualität der pro Versuch isolierten Blastocysten bei den CD1-Mäusen sehr konstant war und sich somit ein deutlich niedriger Bedarf an Mäusen ergab, wurden zum überwiegenden Teil CD1-Mäuse verwendet.

Im Experiment war dieses auch zu beobachten. In Tabelle 3 (unterer Teil) erkennt man das der prozentuale Anteil an Nachkommen mit 13% bei den CD1-Mäusen gegenüber 7.6% bei

den C57/Bl.6-Mäusen deutlich höher ist, wohingegen das Verhältnis von fellchimären Nachkommen zu Nachkommen insgesamt bei den CD1-Mäusen niedriger ist (47%:67%). Beeindruckend ist, dass zwei der drei generierten männlichen C57/Bl.6 Chimären transgene Nachkommen ergaben und zeigt deren höhere Effizienz als Blastocystenspender.

Wildtyp-Experiment						
Klon	Reimpl. Blast.	Nachkommen männl.	Nachkommen weibl.	Chimäre männl.	Chimäre weibl.	Keimbahnchimäre
Verschiedene	80	5	8	3	5	1: 100% (CD1, Cj7 Wt 2)
Cj7 Wt2	186	24	7	20	4	1: 100% (CD1)
MPI II Subkl.1	124	22	19	11	3	1: ~10% (CD1)
MPI II Subkl. 2	93	1	3	0	1	-----
Σ	483	52	37	34	13	3

Homolog rekombinierte ES-Zellklone						
Klon	Reimpl. Blast.	Nachkommen männl.	Nachkommen weibl.	Chimäre männl	Chimäre weibl	Keimbahnchimäre
Kl. 30 (Cj7)	160 (63)	14 (4)	4 (2)	12 (3)	2 (1)	2: je ~10% (Bl.6)
Kl. 120 (Cj7)	154 (6)	14	12	7	2	-----
Kl. 68 (Cj7)	91 (10)	6	3	1	1	-----
Σ	405 (79)	34 (4)	19 (2)	20 (3)	5 (1)	(2)

Tabelle 3: Übersicht über die Blastocysteninjektionen. Die Werte beziehen sich auf injizierte CD1-Blastocysten (C57/Bl6-Blastocysten in Klammern) Während im Wildtypexperiment nur CD1-Blastocysten benutzt wurden und Keimbahnchimäre ergaben, wurde bei den homolog rekombinierten MOG-ES-Zellklonen mit den C57/Bl.6-Blastocysten zwei Keimbahnchimäre generiert.

Die Fellchimarität variierte bei beiden Blastocystenlinien zwischen 5 und 95%.

Begleitend zu den Injektionen der homolog rekombinierten Klone wurde die Keimbahngängigkeit der zur Elektroporation verwendeten Klone kontinuierlich geprüft. Deswegen wurden auch nicht elektroporierte ES-Zellklone in Blastocysten injiziert und

reimplantiert (Wildtyp-Experiment). Alle fellchimären Nachkommen wurden entsprechend ihrer Herkunft mit CD1 bzw. C57/Bl.6 Mäusen verpaart.

Da die verwendeten ES-Zellen den dominanten agouti-Fellmarker tragen, erkennt man keimbahnchimäre Tiere an den agouti-farbenen Nachkommen. Die Keimbahnintegration der jeweiligen ES-Zellklone wurde an dem Anteil der agouti-farbenen Nachkommen erkannt (Tab.:3). Mit dem Wt-Klon Cj7 Wt2 wurden zwei keimbahnchimäre Männchen generiert, deren Keimbahn zu 100% aus diesem gebildet wurde, weshalb dieser auch bei allen folgenden Experimenten benutzt wurde und auch zur Generierung der MOG-defizienten Mauslinie führte. Außerdem wurde mit dem Wt-Klon MPI-II Subkl.1 (Voss et al., 1997) ebenfalls ein keimbahnchimäres Männchen erhalten.

1.6 Southern Blot Hybridisierungsanalyse der transgenen Mauslinie

Zwei der aus C57/Bl.6 hervorgegangenen fellchimären Männchen ergaben pro Wurf einen transgenen Nachkommen. Insgesamt ergaben die beiden Keimbahnchimären Männchen 7 transgene Nachkommen bei insgesamt 11 Würfen und 73 Nachkommen.

Da die homolog rekombinierten ES-Zellklone heterozygot für die Mutation sind, wurden die agouti-farbenen Nachkommen über ihre genomische DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien genotypisiert. Hierfür wurden sie einer zu den ES-Zell-Klonen analogen Southern Blot Hybridisierungsanalyse unterworfen. Durch Rückkreuzungen wurden homozygote Mäuse generiert.

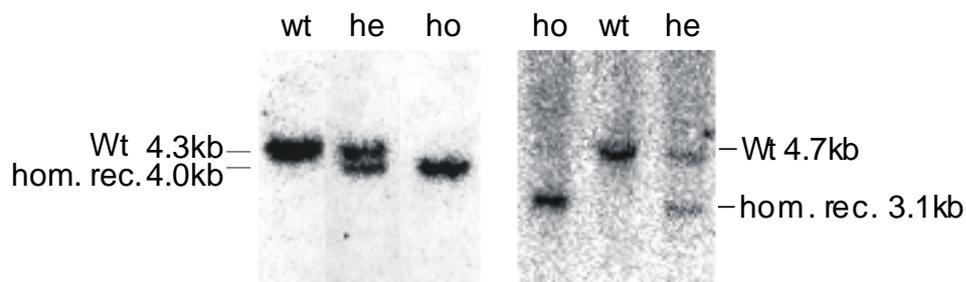


Abb. 11: Links exemplarische EcoRV Verdaue mit der externen Sonde S2 und rechts exemplarische BamHI Verdaue mit der internen Sonde S1.

1.7 Northern Blot Analyse

Zum Nachweis der MOG Defizienz auf RNA Ebene wurde Gesamt-RNA aus Hirnen 18 Tage alter Mäuse aus heterozygoter Verpaarung untersucht. Da die Hybridisierungen der Gesamt-RNA mit einem ca. 800bp cDNA-Fragment sehr schwache Signale ergaben, wurde poly-A RNA für die Northern Blot Analyse isoliert. Es ist eindeutig das Fehlen von MOG-Transkripten in der *mog*(*-/-*) aus nachgewiesen (Abb. 12).

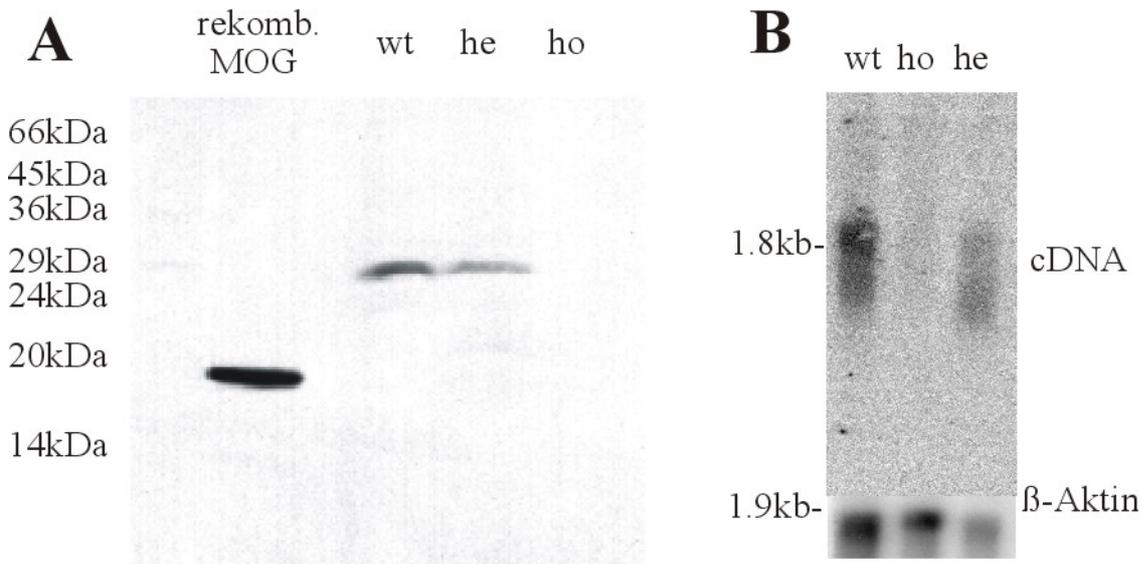


Abb. 12.: A: Western-Blot von Gesamthirnproteinen. Ganz links: rekombinantes MOG, welches zur Generierung des hier verwendeten Antikörpers benutzt wurde (siehe dort). B: Northern-Blot von Hirn-RNA mit β -Aktin-Kontrolle. In der homozygoten Maus ist weder auf RNA- noch auf Proteinebene ein Signal zu erkennen.

1.8 Western Blot Analyse

Auf Proteinebene wurde die MOG-Defizienz durch Auftrennen von Gesamthirnprotein und Myelin-Extrakten durch SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese, anschließender Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran und Hybridisierung mit selbst hergestellten polyklonalen Kaninchen-anti-Maus-MOG Antikörpern (siehe dort) nachgewiesen. Zusätzlich wurde anti-MOG Serum aus Ratten verwendet, das ebenfalls gegen die extrazelluläre Domäne von MOG gerichtet ist und von Prof. Linington (Max-Planck Inst., Martinsried) zur Verfügung gestellt wurde. Mit keinem der beiden Antiseren konnte in der *mog*(*-/-*) Maus ein spezifisches Signal erhalten werden (Abb. 12). Zur Untermauerung wurden Western Blots länger exponiert (Abb.

ho wt

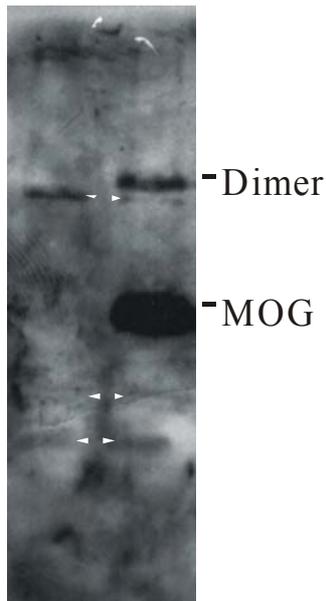


Abb. 13: Western Blot von Myelin mit langer Belichtungszeit. Weiße Pfeile zeigen unspezifische Banden (siehe Text).

13). Hier wird in der *mog*^{-/-} Maus eine Bande bei ca. 52kDa deutlich. Und insgesamt drei schwächere bei 20kDa und 16kDa (weiße Pfeile). Bei den unteren drei schwachen Banden handelt es sich um die drei Isoformen von MBP. Die obere stärkere Bande konnte nicht zugeordnet werden. Da diese Banden aber auch alle im Wildtyp zu sehen waren, kann man davon ausgehen, dass es sich nicht um MOG enthaltende Proteinfragmente handelt. Die stärkere Signalintensität der oberen Bande in der *mog*^{-/-} Maus liegt in diesem Fall an der Gesamtfärbung in diesem Bereich, was am stärkeren Hintergrund zu erkennen ist und in späteren Western Blots nicht mehr beobachtet wurde. Mit Hilfe des Western Blots und der beiden gegen die extrazelluläre Domäne gerichteten Antiseren wurde so der Nachweis für das komplette Fehlen von MOG in der *mog*^{-/-} Maus erbracht.

2. Analyse der MOG-defizienten (mog -/-) Maus

2.1 Allgemeines

Die ersten erhaltenen homozygoten Tiere wurden für den Aufbau der Zucht benutzt. Trotz intensiver Beobachtungen konnten zwischen wt- und mog-Mäusen keine Verhaltensauffälligkeiten festgestellt werden. Die Tiere sind somit unter Laborbedingungen als verhaltensunauffällig zu bezeichnen. Alle Untersuchungen wurden vergleichend mit Wildtyp Mäusen aus heterozygoter Verpaarung oder aus Verpaarungen von aus diesen Verpaarungen erhaltenen wt-Eltern durchgeführt, die im folgenden als Wildtyp (wt) bezeichnet werden.

2.2 Myelin- und Proteinanalyse

Um die Auswirkungen der MOG-Defizienz auf Proteinebene zu untersuchen wurde Myelin von 2-3 Monate alten Mäusen mittels Sucrose-Gradienten präpariert (Norton und Poduslo, 1973). Das erhaltene Myelin wurde durch 15% SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie und Silberfärbung sichtbar gemacht (Abb. 14). Die isolierten Myelinmengen der beiden Genotypen waren identisch. Ebenso war kein Unterschied im Bandenmuster zu erkennen. Gut zu sehen waren die Banden für PLP und die verschiedenen Isoformen des MBP im Coomassie gefärbten Gel. DM20 stellt sich gut im Silbergel dar. Wie zu erwarten ist bei einem Gesamtmyelinproteinanteil von 0.05% die Bande für MOG weder durch Coomassie noch Silberfärbung sichtbar zu machen. Es wurden mehrere Gele mit gleichen Proben und Proben aus unterschiedlichen Präparationen mit einander verglichen, aber es ergab sich kein sichtbarer Unterschied in der Proteinverteilung zwischen mog-/- Maus und Wildtyp.

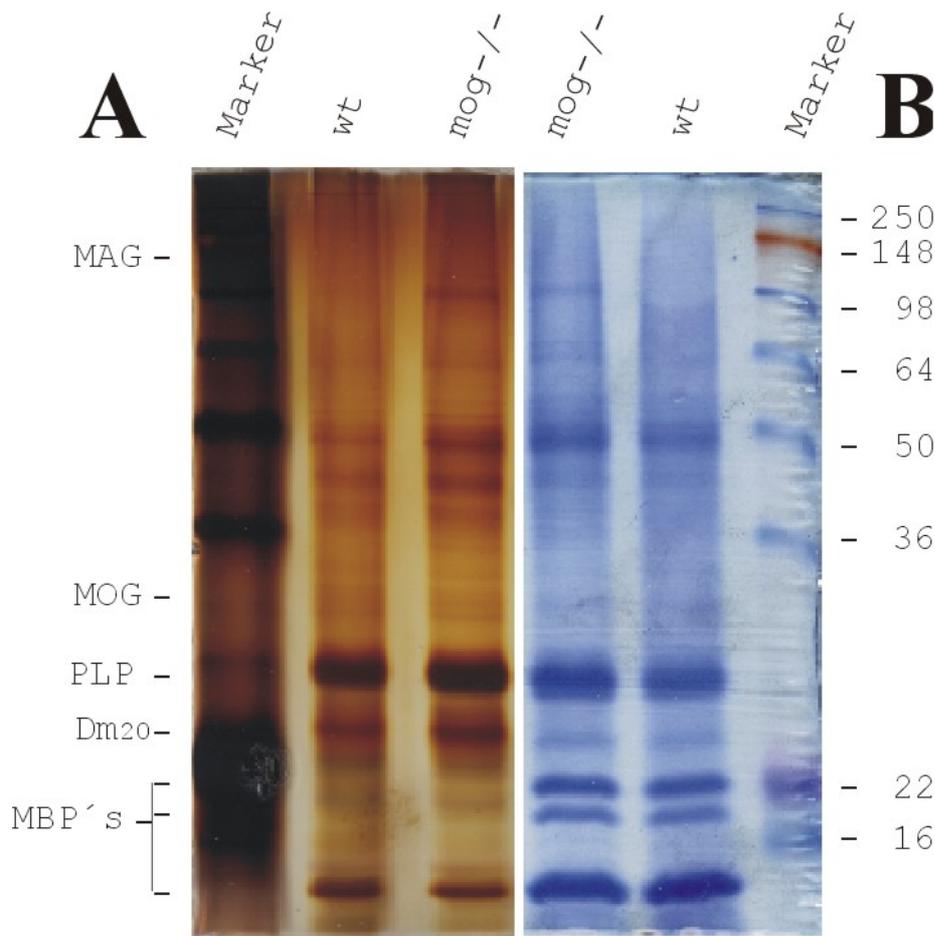


Abb. 14: A: Silbergefärbtes 15%iges SDS-Gel. B: Coomassieblau gefärbt.

2.3 Lipidanalyse

Die Analyse der Gesamtlipide erfolgte nach Chloroform/Methanol Extraktion aus Gradienten gereinigtem Myelin. Die Extrakte wurden dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und die Banden mit Schwefelsäure und Ninhydrin sichtbar gemacht (Abb. 15). Abgesehen von einer niedrigeren eingesetzten Lipidmenge im Wildtyp, konnte auch hier kein Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp festgestellt werden. Die einzelnen Lipide wurden durch Standards identifiziert.

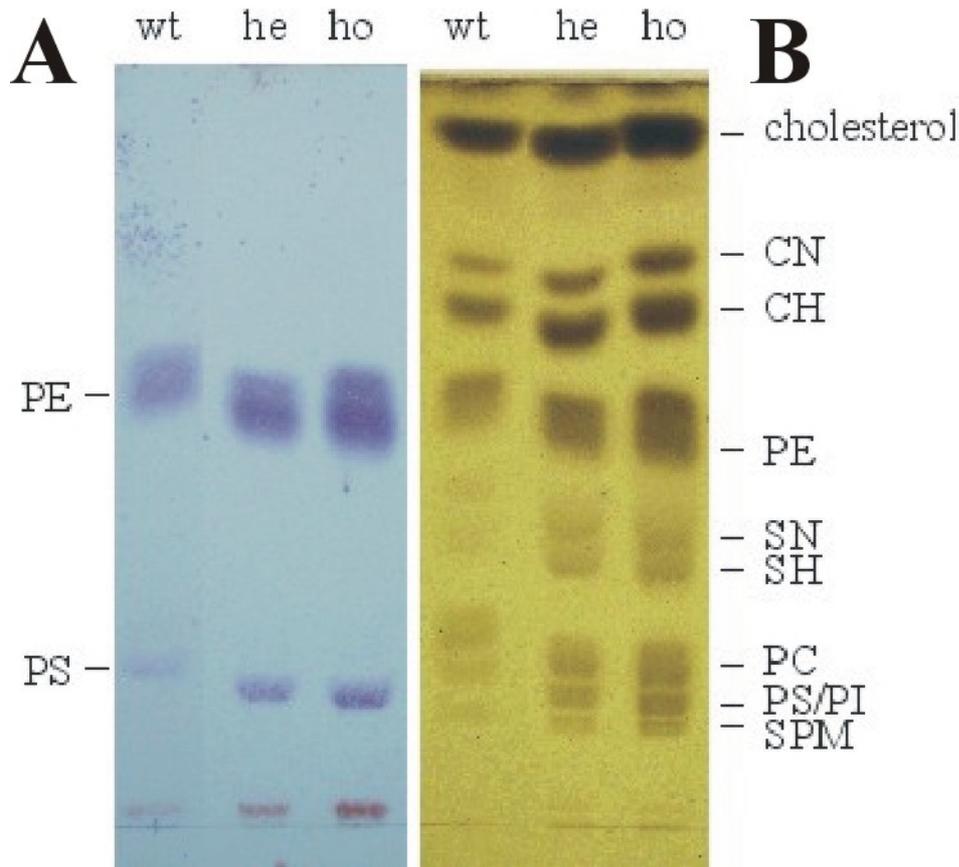


Abb.15: A: Sichtbarmachung aminhaltigen Lipide mittels Ninhydrin. B: Veraschung der Gesamtlipide mittels Schwefelsäure (Laufmittel: Chloroform/Methanol/H₂O (65:25:4)). PE: Phosphatidylethanolamin, PS: Phosphatidylserin, CN: GalC, CH: GalC mit α -Hydroxyfettsäuren verestert, SN Sphingosin, SH mit α -Hydroxyfettsäure verestertes Sphingosin, PC: Phosphatidylcholin. PS: Phosphatidylserin, PI: Phosphatidylinositol, SPM: Sphingomyelin.

2.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Um die vermutete Funktion von MOG zur Kompaktierung und/oder Erhaltung der Myelinschicht zu erhellen, wurde das Rückenmark und der optische Nerv elektronenmikroskopisch untersucht. Diese beiden Strukturen eignen sich besonders gut zur Analyse der Myelinstruktur und Kompaktierung, da beide sehr homogen in Bezug auf die myelinisierten Axone sind. Die Untersuchungen wurden von Prof. Büssow (Institut für Anatomie, Universität Bonn) durchgeführt.

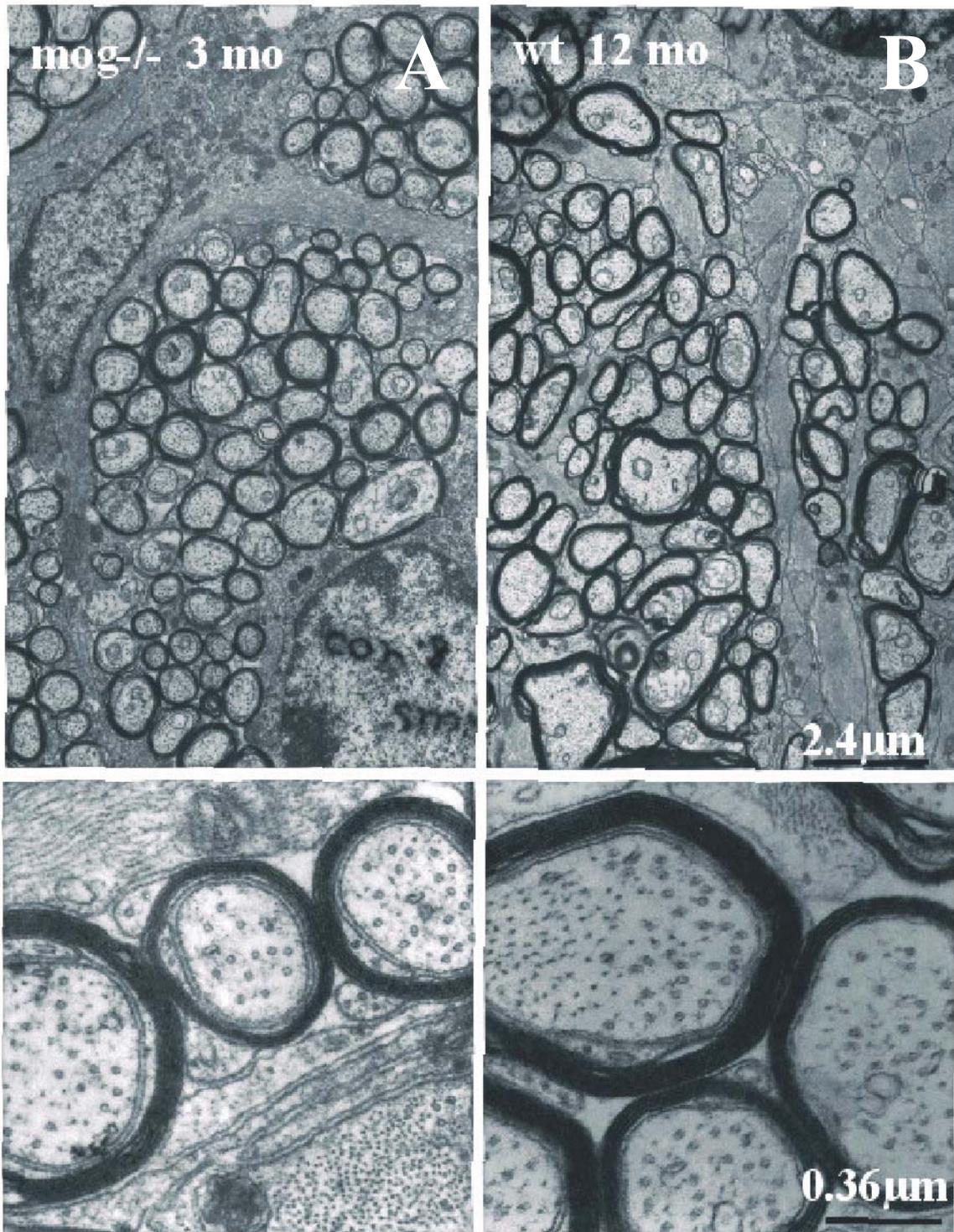


Abb. 16: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des optischen Nervs A: *mog*^{-/-} maus; B: wt-Maus. Sehr gut sind die vom wt nicht zu unterscheidende myelinisierten Axone zu erkennen. In der Vergrößerung ist die unveränderte Struktur von *main-dense line* und *intra-period line* zu erkennen.

Auch hier konnte kein Unterschied zwischen wt- und *mog*^{-/-} Maus festgestellt werden. Während bei vielen anderen in dieser Arbeitsgruppe untersuchten *knock-out* Mäusen (*plp*^{-/-};

mbp^{-/-}, plp^{-/-}; cgt (Boison und Stoffel, 1994; Stoffel et al., 1997; Bosio et al., 1996) gestörte Myelinisierung, Kompaktierung oder Axonuntergänge beobachtet werden, ist hier weder ein Unterschied in der Zahl der myelinisierten Axone noch in der Dicke selbiger zu erkennen. Ebenso besteht auch kein Unterschied in der Kompaktierung. Sowohl *intraproduct-* als auch *main dense line* sind exakt gleich, wie in Abb. 16 zu erkennen (16000x Vergrößerung).

Da MOG bevorzugt auf der äußersten Myelinschicht und auf der Plasmamembran der Oligodendrocyten sitzt, wäre auch eine Interaktion mit anderen Gliazellen wie Astrocyten denkbar. Aber weder Zahl, Morphologie und Verteilung der Astrozyten, Oligodendrocyten und Neurone waren vom Wildtyp zu unterscheiden. Ebenso konnten keine Auffälligkeiten an den Berührungspunkten zwischen zwei äußersten Myelinschichten und zwischen Oligodendrozytenmembran und Astrozyten beobachtet werden.

2.5 Immunhistochemische Lokalisation von MOG an Paraffinschnitten

Zur Verifizierung der Lokalisation von MOG im Gehirn, wurden 6-10µm dicke Paraffinschnitte von eineinhalb bis sechs Monate alten Mäusen angefertigt und mit anti-MOG-Antiserum inkubiert. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die Epitope mittels Vorbehandlung der Schnitte mit Trypsin und Mikrowellenbad demaskiert. In Übereinstimmung mit Brunner et al. (1989), wurde eine myelinspezifische Lokalisation von MOG bestätigt. Besonders starke Fluoreszenz wurde im Balken, im Ansatz zum optischen Nerv und im Kleinhirn (Cerebellum) beobachtet (Abb.: 17). Desweiteren konnte mit diesem Versuch das komplette Fehlen der IgG-Domäne in den mog^{-/-} Mäusen gezeigt werden.

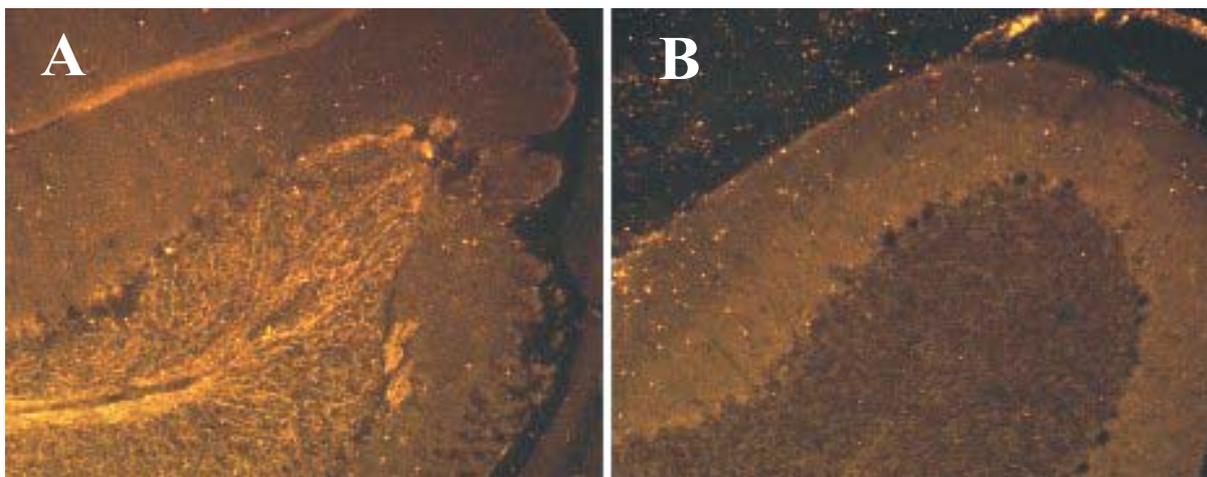


Abb. 17: Immunfluoreszenz des Kleinhirns von Paraffinschnitten mit Polyklonalen Antikörpern (Kaninchen anti-MOG Serum). A: wt, B: mog^{-/-}.

2.6 Immunhistochemische Lokalisation von MOG an Gefrierschnitten

An 8-12µm dicken Gefrierschnitten wurde die *in vivo* Verteilung von MOG im Gehirn untersucht. Hierfür wurde anti-MOG-Serum aus Ratten (erhalten von Prof. Linington) und das in dieser Arbeit hergestellte MOG-Antiserum aus Kaninchen verwendet. Zur Detektion wurde der entsprechende Cy3-gekoppelte zweite anti-rabbit IgG Antikörper verwendet. Beide Antiseren sind gegen die extrazelluläre Domäne von MOG gerichtet. In Abb. 18 sieht man an zwei unterschiedlichen Regionen des Gehirns (Kleinhirn (Cerebellum) und Balken (Corpus Callosum)) deutlich die MOG positive Färbung der weißen Substanz und myelinisierter Fasern. Da keine positive Färbung mit Kryoschnitten von *mog*^{-/-} Mäusen gelang, zeigt auch dieser Versuch noch einmal, dass von einer vollständigen Ablation des MOG-Gens in der *mog*^{-/-} Maus ausgegangen werden kann.

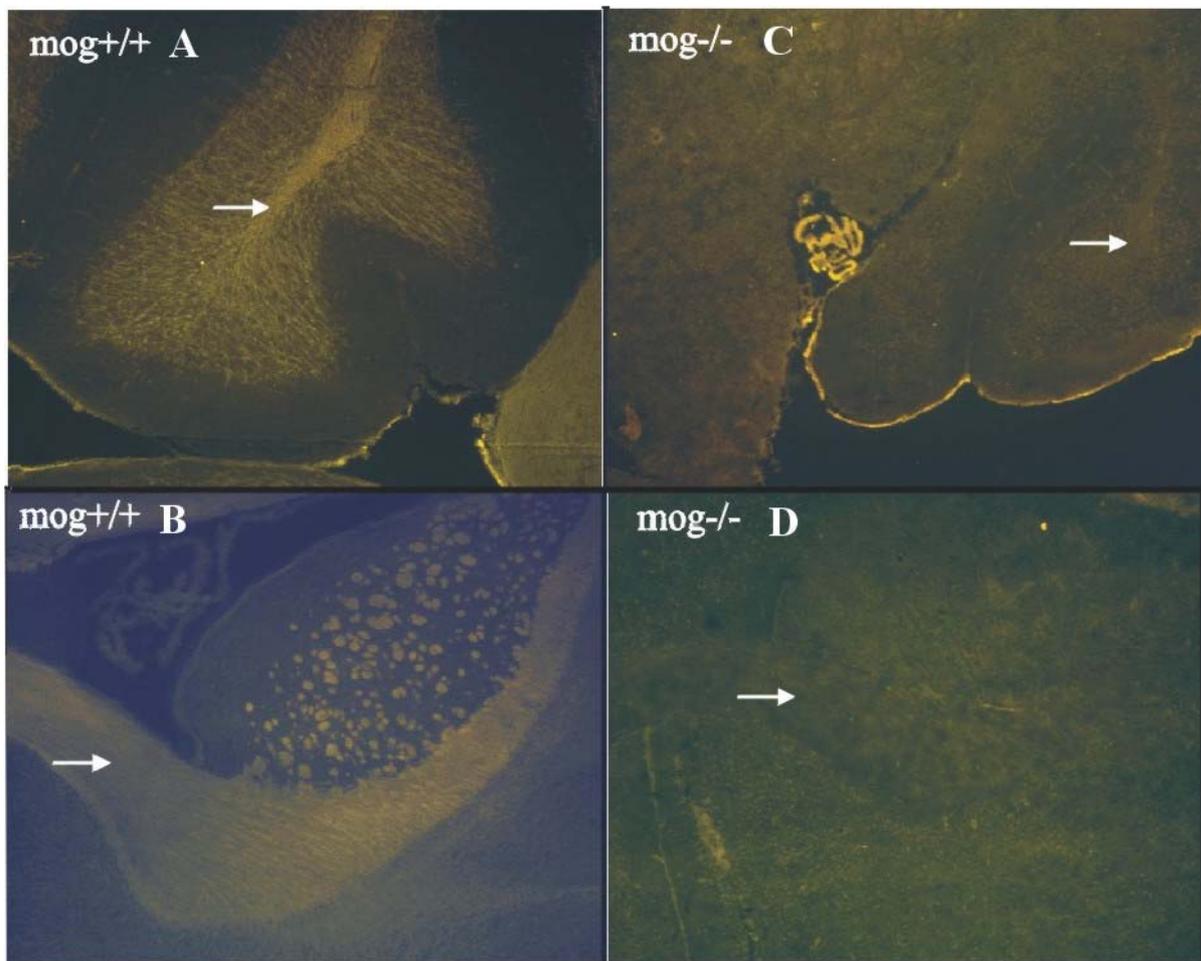


Abb. 18: Mit gegen die extrazelluläre Domäne gerichtetes Ratten anti-MOG Serum gefärbte Kryoschnitte. A und B: Eindeutig sind in der *mog*^{+/+} Maus Myelin und myelinisierte Fasern im Cerebellum und Corpus Callosum gefärbt. C und D: In identischen Regionen der *mog*^{-/-} Maus ist dagegen keine Färbung zu erkennen (Pfeile).

Weitere Hirnbereiche der wt Maus (Hippocampus und Großhirnrinde) zeigten mit dem von Linington (Max-Planck Inst., Martinsried) erhaltenen anti-MOG anti-Serum empfindliche Färbungen (Abb.: 19), die die in der Literatur beschriebene Myelinspezifität von MOG bestätigten. Zur Bestätigung der Colokalisation von MOG Färbung mit Myelin wurden Myelin gefärbte Horizontalschnitte des *mouse brain atlas* (Sidman et al., 1971) mit den MOG Färbungen verglichen (siehe auch Abb. 1). Es konnten sogar einzelne myelinisierte Fasern der Hirnrinde sichtbar gemacht werden, in denen man die Segmentstruktur der myelinisierten Axone erkennen kann (siehe Abb.: 19, Pfeile).

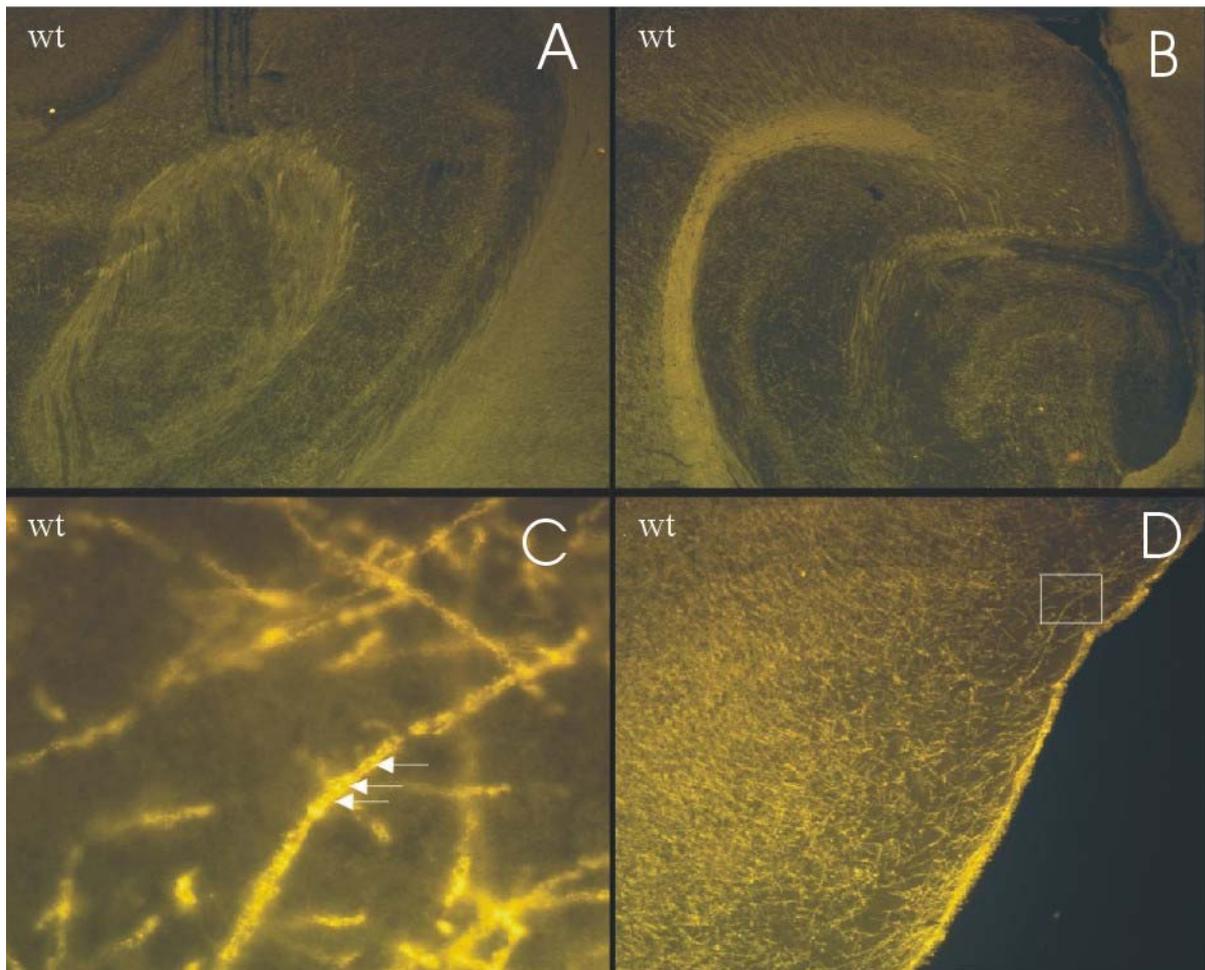


Abb. 19: A und B: jeweils Färbungen von Regionen des Hippocampus. D: Großhirnrinde; C: Vergrößerung der im weißen Rechteck befindlichen Region. Die Pfeile zeigen die alternierende Fluoreszenzstruktur, die man als Myelinsegmente interpretieren kann.

2.7 RT-PCR Analyse

Der Frage, die durch die EAE Experimente (siehe später) aufgeworfen wurde, ob nicht nachweisbare Mengen von Proteinfragmenten (Exons I und der ersten 40 Aminosäuren des

Exons II) wurde durch Polymerase Kettenamplifikation an revers transkribierter (RT-PCR) poly-A RNA nachgegangen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 20 gezeigt.

Die Primer für β -Actin amplifizierten in wt und in *mog*^{-/-} RNA des Gehirns die erwartete Bande bei 358bp. Von der *mog*^{-/-} RNA wurden mit dem Primerpaar auf Startcodon und 3'-Ende der neo-Box zwei Transkripte bei 320bp und 240bp erhalten. Zwei Transkripte von 430bp und 350bp wurden mit den Primern Preexon-*mog*-s und 3'-*neo*-sense amplifiziert. In wt-RNA wurde mit den Primern auf Startcodon und RT-MOGas das erwartete 700bp wt-Fragment erhalten. Um die MOG Spezifität zu überprüfen wurden Northern Blot Hybridisierungen mit MOG cDNA als Sonde durchgeführt. Bis auf das β -Actin Fragment gaben alle anderen Fragmente ein positives Signal. Zusätzlich wurde eine neue Bande bei 1200bp im Northern Blot mit der Primerpaarung 1 (Promsonds) und 4 (3'-*neo*-sense) sichtbar.

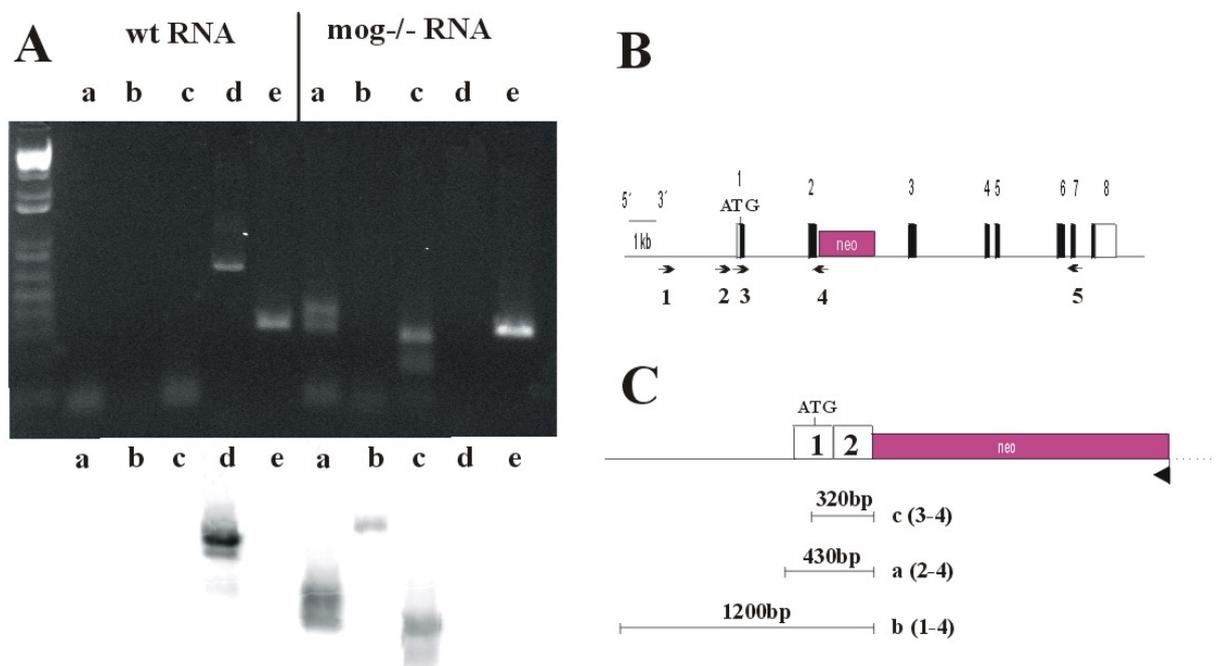


Abb. 20: Ergebnisse der RT-PCR Analyse von revers transkribierter poly-A RNA. A: 2% Agarosegel von wt- und *mog*^{-/-} RNA. Darunter der entsprechende Southern Blot mit MOG cDNA Sonde. B: Lage der verwendeten Primer im rekombinierten Allel. C: Modellhaft dargestellte cDNA. Es sind Exon 1, Exon 2 und die *neo*-Box dargestellt; Darunter: Die jeweils amplifizierten Transkripte mit den entsprechenden Primerpaaren. Primer: 1; Promsonds, 2; Preexon-*mog*-s, 3; *mog*-sense, 4; 3'-*neo*-sense, 5; RT-MOGas. Bezeichnungen der Primerpaarungen: a: 2-4; b: 1-4; c: 3-4; d: 3-5; e: β -Actin.

Da die Primer 1 (Promsonds) und 2 (Preexon-*mog*-s) vor dem Transkriptionsstart von MOG lagen sind diese zwei Transkripte (a und b) aus *antisense* RNA amplifiziert worden. Dies

kommt durch Überlesen des Polyadenylierungssignals in der *neo*-Box zustande. Die um jeweils 80bp verkürzten Transkripte der Primerpaarungen a und c gaben ebenfalls ein positives Signal mit der cDNA Hybridisierungssonde. Sie entstehen durch kryptisches Spleißen des nicht kodierenden Bereichs der *neo*-Box. Während Transkript a und b nur durch antisense RNA zustande gekommen sein konnten, wäre bei Transkript c auch eine Amplifikation aus *sense* RNA denkbar. Da aber bei diesem Transkript auch ein 80bp kürzeres Spleißprodukt wie bei Transkript a nachgewiesen wurde, kann davon ausgegangen werden das die in der *mog*^{-/-} poly-A RNA amplifizierten Fragmente aus antisense RNA entstanden sind.

3. Generierung und Analyse von Myelinmutanten

In zwei gut untersuchte Mauslinien, *mbp*^{-/-} (*shiverer*, *shi*) und die Doppelmutante *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-} (Stoffel et al., 1997), wurde der *mog*^{-/-} Genotyp eingekreuzt. Es wurden eine homozygote (*plp*^{-/-}, *mbp*^{-/-}, *mog*^{-/-})-Mauslinie und eine (*mbp*^{+/-}, *mog*^{-/-})-Mauslinie generiert. Die *mbp*^{-/-}, *mog*^{-/-} Maus war wie die *shiverer* Maus nicht fertil und musste deshalb mit für *mbp* heterozygoten Mäusen verpaart werden.

Nur wenige *mbp*^{-/-}, *mog*^{-/-} Mäuse wurden bis zum Ende dieser Arbeit erhalten, so dass bei diesen nur der Phänotyp beobachtet wurde und eine elektronenmikroskopische Untersuchung stattfand. Es wurden deshalb keine Myelinanalyse, Verhaltenstests und Lipidanalyse für die *mbp*^{-/-}, *mog*^{-/-} Maus und die *mbp*^{-/-} Maus, sondern nur mit der *mbp*^{-/-} *plp*^{-/-} und der *plp*^{-/-}, *mbp*^{-/-}, *mog*^{-/-} Maus durchgeführt.

Das Hauptinteresse bei den folgenden Untersuchungen lag darin, die Unterschiede zwischen *plp*^{-/-}, *mbp*^{-/-} und *mog*^{-/-}, *plp*^{-/-}, *mbp*^{-/-} Mäusen aufzuspüren, um Rückschlüsse auf die Funktionen von MOG zu erhalten. Die Auswirkungen der PLP- und MBP-Defizienz wurde bereits ausführlich beschrieben (Stoffel et al., 1997).

3.1 Genotypisierung

Die Bestimmung des Genotyps erfolgte durch Isolierung von genomischer DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien und wurde über die entsprechenden RFLPs mit entsprechenden DNA Sonden durch Southern Blot Hybridisierung ermittelt (Abb.: 22). Die Restriktionsschnitte wurden für das PLP-Gen mit *Nco*I und für die MBP- und MOG-Gene mit *Bam*HI durchgeführt. Abb.: 21 zeigt die Lokalisation der Hybridisierungsproben und die erwarteten Fragmente. Die Hybridisierungssonde, ein ExonIII spezifisches 700bp großes Fragment, für die *plp*-Mutation wurde durch *Bgl*II Restriktion hergestellt und lieferte Banden bei 3.2kb für das wt Allel und 2.6kb für das mutierte Allel. Die 350bp Sonde für die *mbp*-Mutation wurde durch genomische PCR aus *shiverer* DNA hergestellt. Sie ist so gelegen, dass sich ein 7kb Fragment für das mutierte Allel und ein 3.5kb Fragment für das wt Allel ergibt. Die 500bp große Sonde für das *mog*-Gen wurde wie beschrieben hergestellt und ergab für das wt Allel ein 4,7kb und für das Mutierte ein 3,1kb Fragment.

3.2 Beschreibung der Phänotypen

Die Lebenserwartung der *plp*^{-/-}, *mbp*^{-/-} Mutante ist mit über zwei Jahren normal. Die ältesten *plp*^{-/-}, *mbp*^{-/-}, *mog*^{-/-} Mutanten haben ebenfalls eine Lebensspanne von zwei Jahren erreicht und scheinen damit auch eine normale Lebenserwartung zu haben. Beide Mauslinien sind fertil, fallen aber bereits im Alter von ca. drei Wochen durch einen starken Ganzkörper-Tremor auf. Zusätzlich zum Tremor stellen sich ab einem Alter von ca. 6 Wochen Krämpfe des gesamten Körpers ein, die einige Sekunden andauern und eine komplette Immobilität der Maus während dieser Zeit zur Folge haben. Die Krämpfe können durch Belastungen der Mäuse, wie z.B. das Anheben des Käfigdeckels, ausgelöst werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen *plp*^{-/-}, *mbp*^{-/-} Maus und *plp*^{-/-}, *mbp*^{-/-}, *mog*^{-/-} Maus konnte nicht festgestellt werden. Die Lebenserwartung der *mbp*^{-/-} Mutanten beträgt nur drei bis vier Monate. *Shiverer* Mäuse sind ebenso durch einen Tremor ausgezeichnet, der besonders ausgeprägt an den Hinterläufen zu beobachten ist. Im Vergleich zur *plp*^{-/-}, *mbp*^{-/-} Mutante ist die Mobilität stärker eingeschränkt und die Symptomatik der Krämpfe gravierender.

Der Phänotyp der neu generierten *mbp*^{-/-}, *mog*^{-/-} Mäuse war unterschiedlich zu dem der *mbp*^{-/-} Maus. Die *mbp*^{-/-}, *mog*^{-/-} Mäuse zeigten ein deutlich niederfrequenteres Zittern, welches im Alter von 4 Wochen immer stärker in ein Torkeln überging. Die Krämpfe unterschieden sich nicht von denen der *mbp*^{-/-} Mäuse und die Lebenserwartung schien ebenso kurz zu sein.

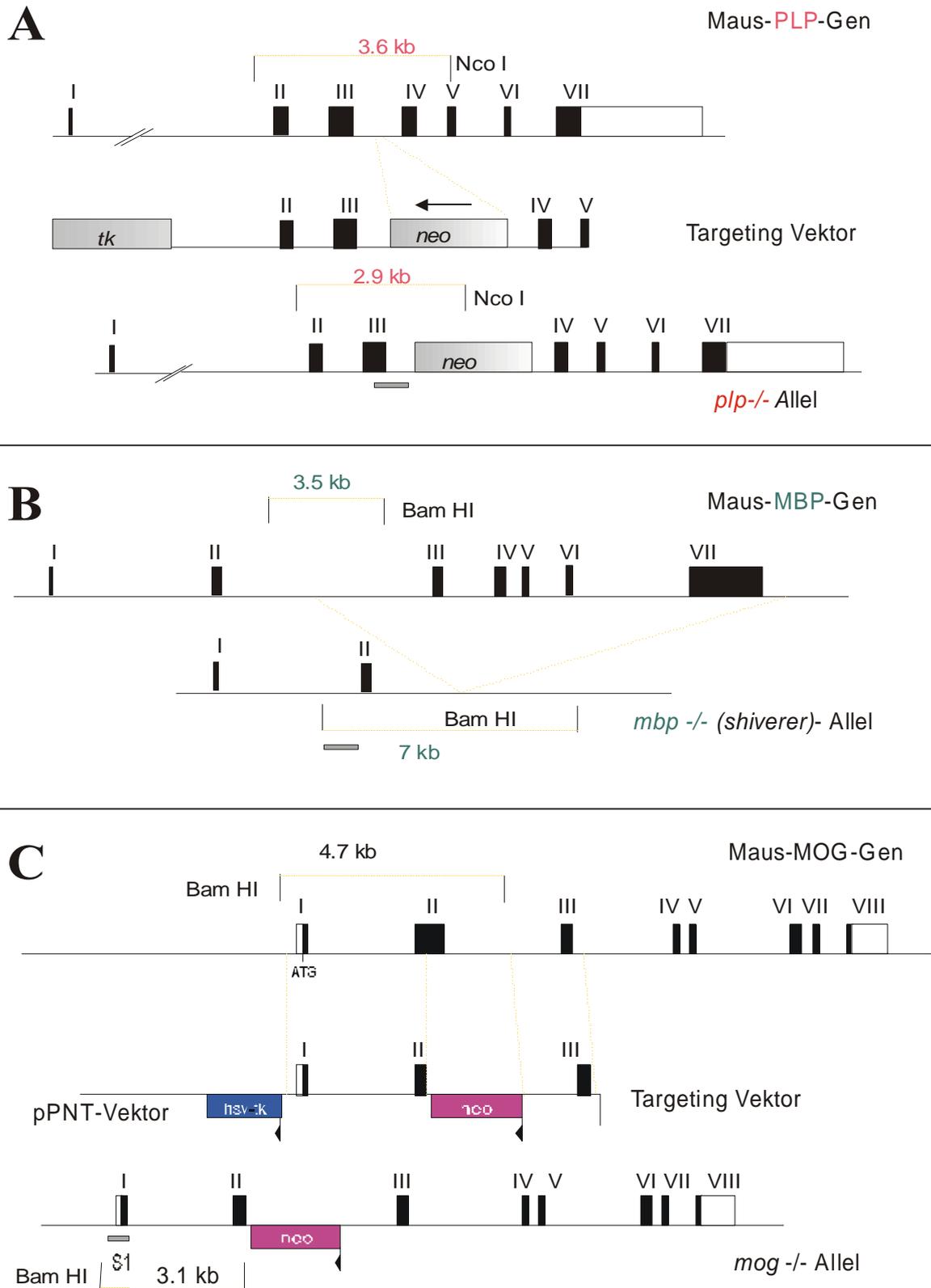


Abb. 21: Übersicht über die drei wt Allele von PLP, MBP und MOG und die mutierten Allele die zur jeweiligen Defizienz führen. A: Darstellung des *targeting* Ereignisses, das zur Generierung der *plp*^{-/-} Maus führte (Boison und Stoffel, 1994). B: Die Deletion die zur *shiverer* Mutation führt. C: Das bereits vorher beschriebene MOG-Gen und das mutierte Allel. Die Größen der jeweils erhaltenen Banden mit den entsprechenden Enzymen und die zugehörigen Sonden für die Hybridisierungsanalyse sind indiziert.

3.3 RNA Analyse mittels Northern Blot-Analyse

Die RNA aus Gehirnen 20 Tage alter Mäuse zeigte in der Northern Blot-Hybridisierungsanalyse, dass die für die Wildtypen spezifischen Transkripte in den jeweiligen Mutanten nicht mehr nachweisbar sind (Abb.: 22).

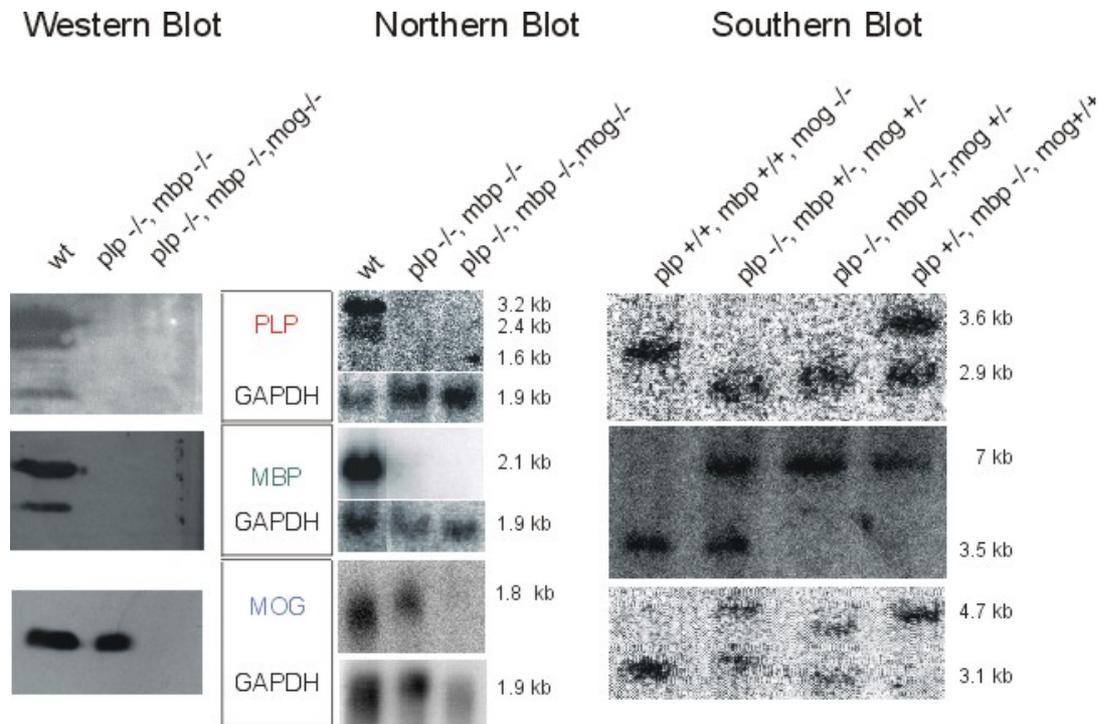


Abb. 22: Nachweise für die Defizienzen von Doppel- und Tripelmutante auf DNA-, RNA- und Proteinebene. Der Southern Blot zeigt exemplarisch die verschiedenen Signale der RFLP für die jeweiligen Gene; der Northern Blot eine Zusammenstellung der mit den jeweiligen cDNA-Sonden erhaltenen Signale für die Gen-Transkripte der entsprechenden Mauslinien. Die Hybridisierungen für den Western Blot erfolgten mit anti-PLP- und anti-MOG Kaninchenserum und für MBP mit einem monoklonalen Antikörper (Boehringer).

3.4 Myelinanalyse

Aus Gehirnen sechs bis acht Wochen alter Mäuse wurde das Myelin durch Sucrose-Gradienten-Zentrifugation gewonnen. Für beide Genotypen wurden aufgrund des geringen Myelingehalts jeweils vier Gehirne zur Präparation benutzt.

Die Auftrennung erfolgte mittels 15% SDS-PAGE und die Sichtbarmachung der Proteine mit Coomassie Blau und durch Silberfärbung. Beide Methoden zeigten keinen Unterschied zwischen den beiden Mutanten (Abb.: 23), ihnen gemeinsam ist das Fehlen der Hauptmyelinproteine PLP/DM₂₀ und MBP.

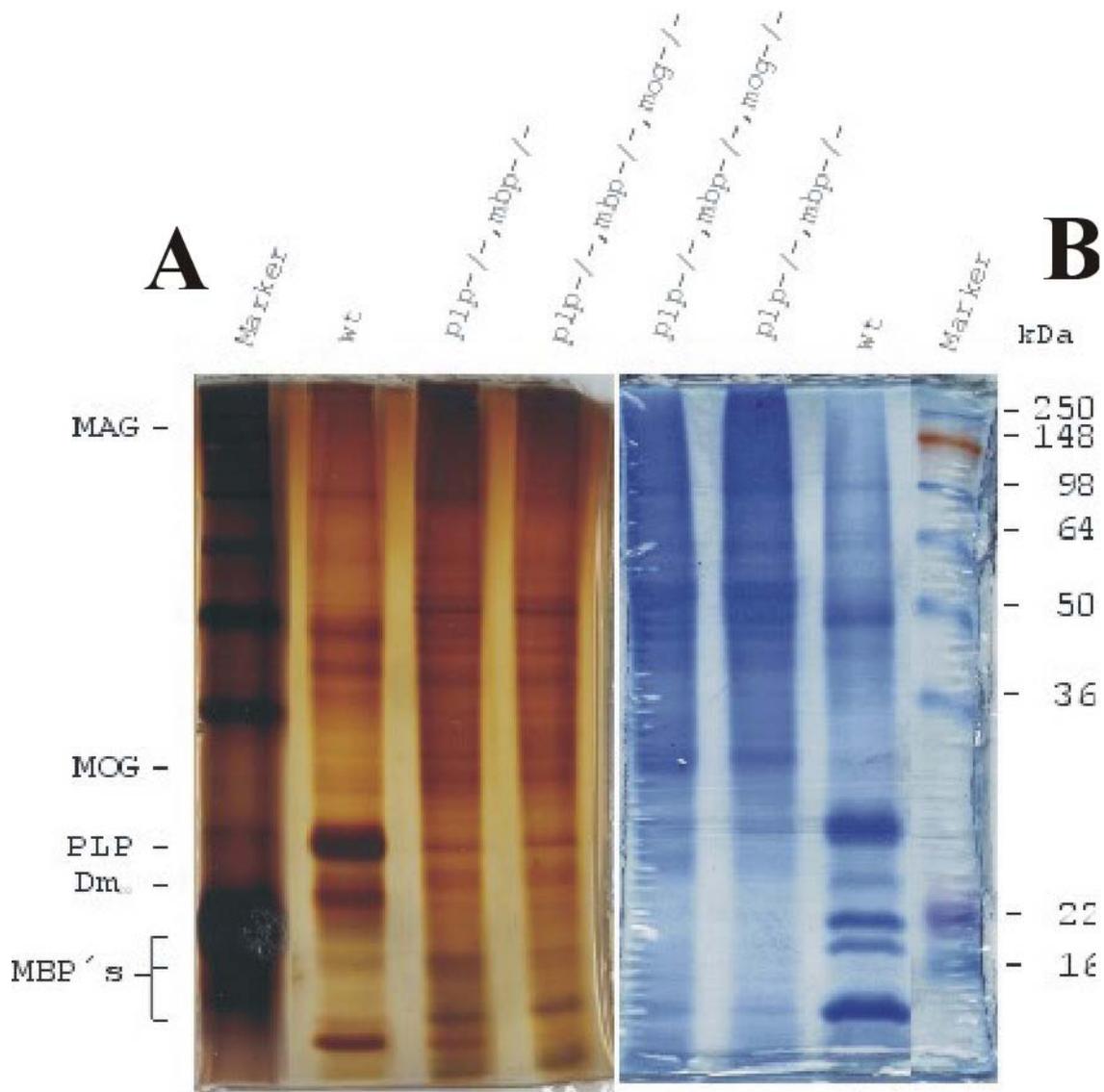


Abb. 23: Proteinauftrennung auf 15% SDS Polyacrylamidgelen. A: Silberfärbung, B: Coomassie Blau.

Durch Westen Blot mit spezifischen Antikörpern wurden die Genotypen nochmals bestätigt und auch auf Proteinebene ein gänzlich Fehlen der entsprechenden Proteine nachgewiesen (Abb. 22).

3.5 Lipidanalyse

Lipide wurden wie schon beschrieben durch Chloroform/Methanol Extraktion aus Gradienten

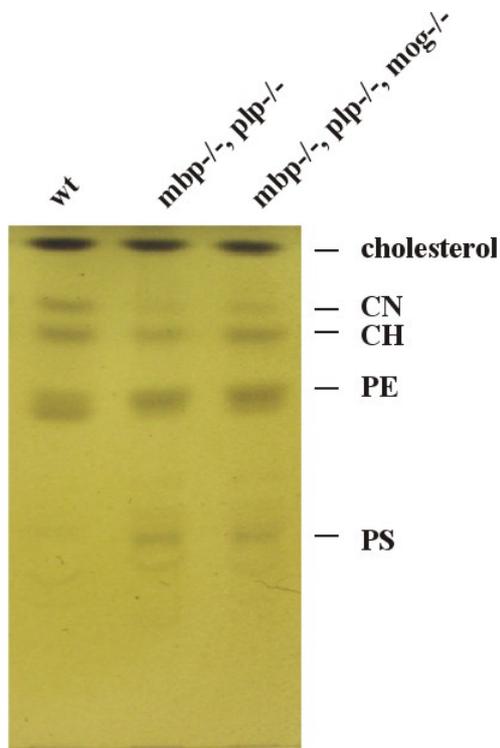


Abb. 24: Lipidanalyse aus gereinigtem Myelin. PE: Phosphatidylethanolamin; PS: Phosphatidylserin; CN: GalC; CH: GalC mit α -Hydroxyfettsäuren verestert

gereinigtem Myelin gewonnen. In Abb. 24 sind die Hauptlipidkomponenten der drei untersuchten Mauslinien gut zu erkennen. Zwischen Wildtyp und Mutanten fällt der höhere Gehalt an Galaktosylceramiden und der niedrigere an Phosphatiden mit Ausnahme von Phosphatidylethanolamin in der wt-Maus auf. Dieses Ergebnis wurde für die *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-} Maus bereits von Uschkureit et al. (2000) beschrieben. Das zusätzliche Fehlen von MOG in diesen Mäusen wirkt sich dagegen auf die Hauptlipidkomponenten nicht signifikant aus. Lediglich der Anteil an Galaktosylceramiden scheint in der *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-}, *mog*^{-/-} Maus leicht erhöht zu sein. In der *mog*^{-/-} Einzelmutanten war dieses allerdings nicht zu beobachten (Siehe 2.3).

3.6 Elektronenmikroskopie

Die ultrastrukturelle Analyse der *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-}, *mog*^{-/-} und *mbp*^{-/-}, *mog*^{-/-} Mäuse hatte zum Ziel, durch Vergleichen der jeweiligen Phänotypen ohne *mog* Defizienz, *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-} bzw. *mbp*^{-/-}, Veränderungen durch zusätzliches Fehlen von MOG aufzuspüren.

PLP defiziente Tiere zeigen Anomalien in der Myelinstruktur. Größere Axone sind von einer Schicht unkompakterter Myelinlamellen umgeben, in denen die *intraperiod line* fehlt. Axone kleineren Durchmessers bleiben unmyelinisiert. In älteren Mäusen wurden axonale Schwellungen und spätere Degeneration meist kleinerer Axone beobachtet.

Die *mbp*^{-/-} (*shiverer*) Maus zeigt mit weniger als 0,1% ein nahezu vollständiges Fehlen von Myelin. Gebildetes Myelin zeigt eine normale Kompaktierung der *intraperiod line*, aber keine *major dense line*.

Die sich in der *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-} Maus aus beiden Genotypen zusammen ergebenden Myelinisierungsdefekte sind weniger stark ausgeprägt als in der *shiverer* Einzelmutante. Vorwiegend größere Axone werden von einer locker gepackten, als Pseudomyelin bezeichneten Schicht umgeben. Die *major dense line* fehlt und die *intraperiod line* ist stärker kompaktiert als in Wildtyp-Myelin. Bei älteren Mäusen wurde auch hier das Anschwellen einiger Axone beobachtet. Insgesamt werden mehr Axone ummantelt als in der *shiverer* Maus.

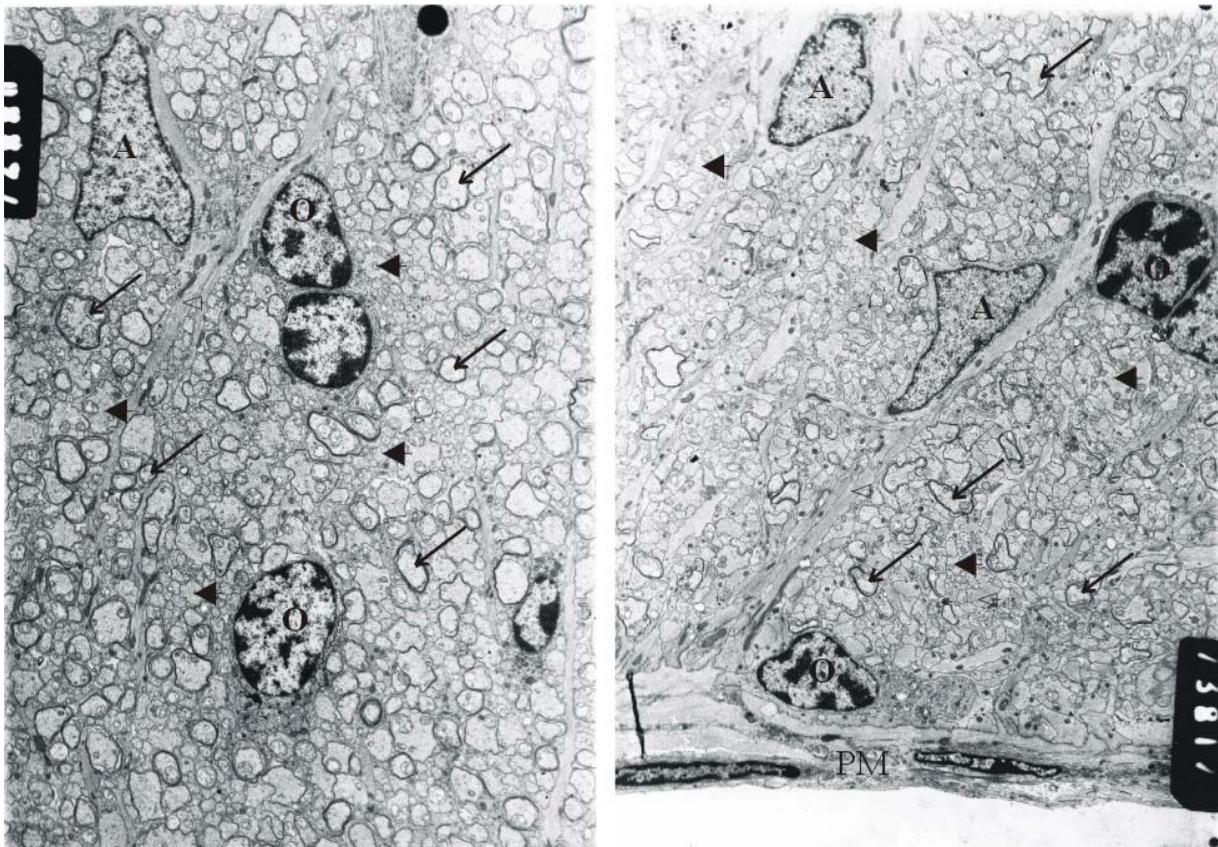


Abb. 25: Aufnahmen des Nervus opticus von *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-}, *mog*^{-/-} (links) und *mbp*^{-/-}, *mog*^{-/-} rechts. A: Astrocytenperikaryon; O: Oligodendrocytenperikaryon; Pfeile: myelinisierte Axone; Pfeilspitzen: nicht myelinisierte Axone; PM: Pia Mater; Leere Pfeilspitzen: Astrocytenfortsätze. Vergrößerung 5600x.

Die Abbildung 25 gibt eine Übersicht der Struktur in Querschnitten des Nervus Optikus von beiden neu generierten Mutanten (*mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-}, *mog*^{-/-} und *mbp*^{-/-}, *mog*^{-/-}). Die *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-}, *mog*^{-/-} Maus zeigt eine deutliche Hypomyelinisierung. Die meisten Axone sind nur mit einer dünnen Myelinschicht ummantelt und einige Axone sind gar nicht myelinisiert. Große Axone sind zu einem höheren Anteil ummantelt als kleinere Axone. Die beobachtete erhöhte Zahl von Oligodendrocyten spiegelt sich gut in dieser Abbildung wieder. Axonale Schwellungen oder degenerierte Axone wurden nicht beobachtet. Diese Beobachtungen

wurden auch bereits bei der Analyse der *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-} Maus gemacht. Es konnte keine Veränderung des Phänotyps in der *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-}, *mog*^{-/-} festgestellt werden.

Die *mbp*^{-/-}, *mog*^{-/-} Maus zeigte eine noch stärker ausgeprägte Hypomyelinisierung als die *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-}, *mog*^{-/-}. Es sind nur wenige dünn myelinisierte Axone zu erkennen und der Grossteil der Axone ist nackt. Auch in der *mbp*^{-/-}, *mog*^{-/-} wurde eine Vermehrung von Oligodendrocyten beobachtet, die sich in dieser Abbildung widerspiegelt. Eine Veränderung des *shiverer*-Phänotyps durch das zusätzliche Fehlen von MOG konnte nicht beobachtet werden.

Auch die genauere Analyse der Myelinstruktur zeigte keine durch die zusätzliche MOG Defizienz hervorgerufenen Veränderungen (Abb. 26). In der *plp*^{-/-}, *mbp*^{-/-}, *mog*^{-/-} Maus zeigen sich die für die *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-} Maus beschriebenen Symptome (Stoffel et al., 1997). Es ist nur sporadisch die Ausbildung der *intraperiod dense line* (Pfeil) zu beobachten. Es wird keine *major dense line* gebildet und die aneinanderliegenden extrazellulären Membranseiten bilden ein typisches alternierendes Muster sich annähernder und entfernter Linien.

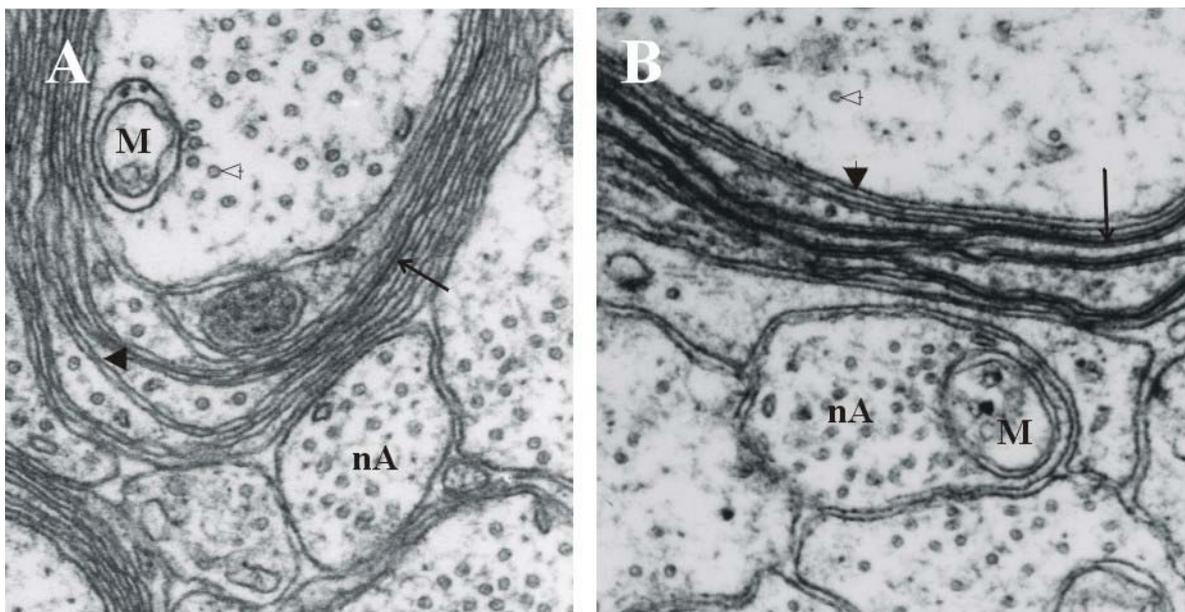


Abb. 26: Vergrößerte Ausschnitte von lose myelinisierten Axonen im Nervus Optikus von A: *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-}, *mog*^{-/-} und B: *mbp*^{-/-}, *mog*^{-/-} Maus. M: Mitochondrion; nA: nicht myelinisiertes Axon; langer Pfeil: *intraperiod dense line*; Pfeilspitze: nicht kompaktierte Membran; leere Pfeilspitze: Mikrotubuli. Vergrößerung: 56000x.

In der *mbp*^{-/-}, *mog*^{-/-} Maus ist die nahezu kontinuierliche Ausbildung der *intraperiod dense line* mit verstärkter Elektronendichte zu sehen. Die *major dense line* fehlt dagegen völlig. Die gebildeten Myelinschichten umwickeln das Axon in einer lockeren Schicht. Die in der *plp*^{-/-}, *mbp*^{-/-}, *mog*^{-/-} Maus beobachtete alternierende Linienstruktur der Membranen ist nicht zu

beobachten. Es zeigten sich auch hier nur die von der *shiverer* Maus bereits bekannten Veränderungen der Myelinstruktur.

Somit sind *plp*^{-/-}, *mbp*^{-/-}, *mog*^{-/-} Maus und *mbp*^{-/-}, *mog*^{-/-} Maus elektronenmikroskopisch nicht von *plp*^{-/-}, *mbp*^{-/-} bzw. *mbp*^{-/-} Maus zu unterscheiden.

3.7 Physiologische Untersuchungen

Jeweils acht drei Monate alte Männchen beider Genotypen (*plp*^{-/-}, *mbp*^{-/-} und *plp*^{-/-}, *mbp*^{-/-}, *mog*^{-/-}) wurden verschiedenen Verhaltenstests unterzogen, um die motorischen Fähigkeiten zu untersuchen. Die Untersuchungen wurden am Institut für Anatomie II (Universität zu Köln) von der Arbeitsgruppe kognitive Neurobiologie durchgeführt. Das Testprogramm beinhaltete eine allgemeine Analyse der motorischen Fähigkeiten an die sich die Verhaltenstests anschlossen. Aus Kapazitätsgründen konnten keine C57/Bl.6 Wt-Kontrollmäuse und auch keine *mog*^{-/-} Mäuse untersucht werden. Der Vergleich von Doppelmutanten (*plp*^{-/-}, *mbp*^{-/-}) zu wt-Mäusen in Verhaltenstests wurde bereits von (Uschkureit et al., 2000) durchgeführt. Ziel sollte es sein die möglichen Veränderungen durch das zusätzlich fehlen von MOG in der Tripelmutante zu untersuchen.

Horizontal Wire/Gimp Test

Dieser Test dient zur Untersuchung der motorischen Koordination. Zwischen zwei Plattformen befindet sich ein dünner Metallstab. Die Mäuse werden am Schwanz so gehalten, dass sie den Metallstab mit den Vorderpfoten erreichen. Dann werden sie unter Spannung um 180° gedreht und losgelassen. Es wurden pro Maus jeweils drei Versuche durchgeführt und notiert ob die Mäuse in der Lage sind mit ihren Hinterläufen den Metallstab zu greifen. Analog wurde das Experiment mit einem Kordstab anstelle des Metallstabes durchgeführt. Beide Mauslinien waren zum größten Teil nicht in der Lage den Metallstab mit den Hinterläufen zu erreichen, während der überwiegende Teil der Mäuse beim Versuch mit dem Kordstab dieses schaffte. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mauslinien war nicht zu beobachten.

Vertical Pole Test

Bei diesem Test werden motorische Koordinationsfähigkeit und Balancefähigkeit gemessen. Die Mäuse werden in die Mitte eines Stabes gesetzt, der dann so gedreht wird, dass die Tiere mit dem Kopf nach oben gerichtet sind. Nun wird die Zeit gemessen in der sich die Tiere herumdrehen um den Stab nach unten zu krabbeln. Außerdem wird festgehalten ob sich die Tiere nach oben oder unten bewegen und ob sie herabfallen oder den Stab einfach herunterrutschen.

Die Doppelmutanten brauchten signifikant länger als die Tripelmutanten zur Drehung um 180°. Interessanterweise sind aber auch mehr Tripelmutanten heruntergefallen und den Stab heruntergerutscht.

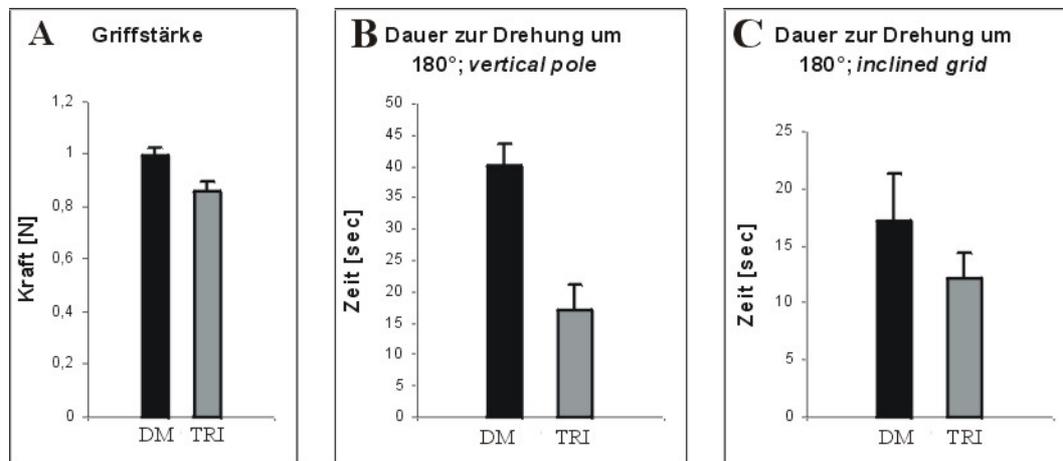


Abb. 27: A: Grafische Darstellung der Griffstärke. B: Dauer zur 180° Drehung auf dem *vertical pole*. C: Dauer zur Drehung um 180° auf dem *inclined grid*. DM = mbp^{-/-},plp^{-/-}; TRI = mbp^{-/-},plp^{-/-},mog^{-/-}.

Griffstärke Test

Mittels einer Federapparatur wird die Griffstärke der Vorderläufe der Tiere gemessen. Diese greifen an eine mit einer Feder verbundenen Triangel und werden vorsichtig weggezogen bis sie sich nicht mehr festhalten können und die Kraft zum Zeitpunkt des Loslassens gemessen. Die Griffstärke der Doppelmutanten war signifikant höher als bei den Tripelmutanten.

Upside down grid

Mit diesem Test können neuromuskuläre Unterschiede untersucht werden. Die Tiere benötigen Balance und Griffstärke für diesen Test. Hierfür werden die Mäuse auf ein Gitter gesetzt, das anschließend so gedreht wird, dass die Mäuse vom Gitter herabhängen. Nun wird

gemessen ob die Tiere sich mit allen vier Pfoten 30 sec lang festhalten können oder ob sie nur mit den Vorderpfoten am Gitter hängen oder herunterfallen. Beide Mauslinien konnten sich über die gesamte Zeit am Gitter mit allen vier Pfoten festhalten.

Inclined grid

Analog zum *upside down grid* wird bei diesem Test das Versuchstier auf ein horizontales Gitter gesetzt und dann so um 30° geneigt, dass die Maus mit dem Kopf nach unten zeigt. Nun wird die Zeit gemessen, die die Tiere zum Drehen um 180° benötigen. Wie beim *vertical pole* Test sind auch hier die Tripelmutanten schneller (Abb. 27).

Placing response

Bei diesem Test wird das Verhalten der Tiere beim Herablassen auf den Boden untersucht. Die Tiere werden am Schwanz gehalten und langsam auf eine Unterlage herabgelassen. Der Zeitpunkt an dem die Tiere aktiv den Boden erkennen wird festgehalten. Sowohl Tripel- als auch Doppelmutanten richten sich entweder aktiv aus, sobald sie Kontakt mit ihren Barthaaren zum Boden haben oder kurz vorher durch visuellen Kontakt (ca. 18mm).

Rota rod Test

Dieser Test dient zur Analyse von Balancefähigkeit und motorischen Fähigkeiten. Die Mäuse werden auf eine Walze gesetzt die sich zum einen mit konstanter Geschwindigkeit (4rpm, 8rpm, 16rpm) und zum anderen mit zunehmender Beschleunigung (4 bis 40rpm) dreht. Jede Maus wurde einmal in allen vier Disziplinen untersucht. Bei konstanter Umdrehung wurde die durchschnittliche Zeit bis zum Fallen über einen Zeitraum von zwei Minuten untersucht. Bei zunehmender Beschleunigung über einen Zeitraum von drei Minuten. Bei konstanter Geschwindigkeit von 4rpm bleiben die Tripelmutanten mit ca. 16sec fast zweieinhalb mal so lange auf der Walze wie die Doppelmutanten mit ca. 6sec. Bei höheren Geschwindigkeiten nimmt dieser Unterschied ab. Bei 16rpm ist er kaum noch signifikant, was wohl daran liegt, dass beide Mauslinien bei dieser Geschwindigkeit direkt herunterfallen. Im Beschleunigungsmodus zeigt sich, dass die Tripelmutanten im Schnitt bei einer Geschwindigkeit von 6.5rpm herunterfallen, während die Doppelmutanten bei 4.5rpm herunterfallen. Daraus ergibt sich auch eine höhere Durchschnittszeit auf der

beschleunigenden Walze für die Tripelmutanten von ca. 9.5sec zu ca. 4sec für die Doppelmutanten (Abb. 28).

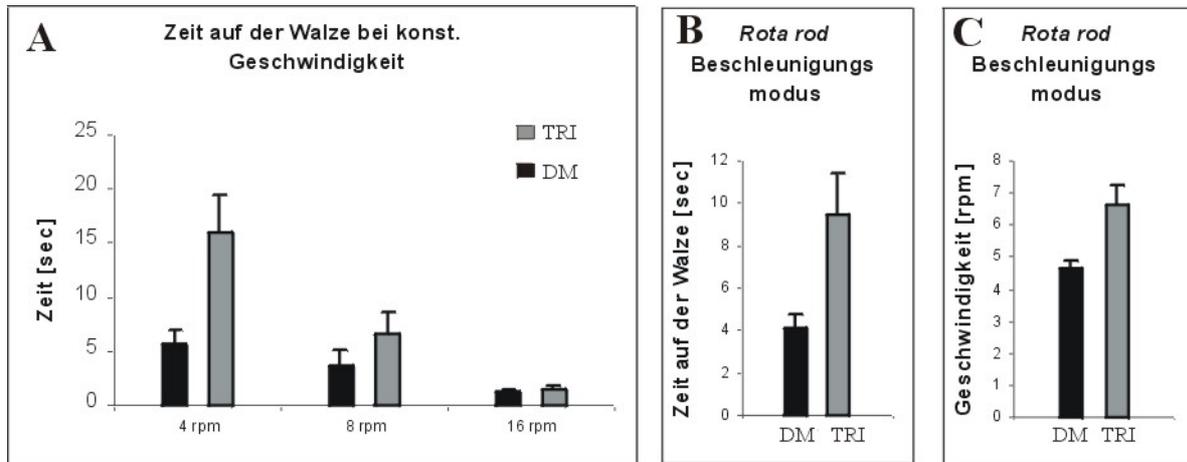


Abb. 28: Grafische Darstellung der Ergebnisse des *rota rod* Tests. A: Die durchschnittliche Zeit bis zum Fallen bei drei unterschiedlichen Geschwindigkeiten. B: Die durchschnittliche Zeit auf der Walze bei zunehmender Beschleunigung. C: Die durchschnittliche Geschwindigkeit bei der die Mäuse herabfielen.

Zusätzlich wurden noch Tests durchgeführt die über den allgemeinen Gesundheitszustand der Mäuse Auskunft geben. Da sich Doppel- und Tripelmutanten hierin aber nicht unterschieden, sind diese Tests der Vollständigkeit halber nur kurz erwähnt.

Atmungsverhalten:

Vor und nach dem *horizontal wire* Test wurden die Mäuse auf ihre Atmung untersucht, die bei allen Tieren normal war.

Fellerscheinung:

Bei allen Mäusen war das Fell in einem einwandfreiem Zustand

Genital- und Rektumanalyse:

Unsaubere Genital- oder Rektumbereiche deuten meist auf eine Krankheit oder auf einen allgemeinen schlechten Gesundheitszustand hin. Bei keiner Maus wurde jedoch etwas auffälliges beobachtet.

Nestbauverhalten:

Die Tiere bekamen Baumwollstoffmaterial (sog. *nestlets*, Plexx) mit denen Wt-Mäuse im allgemeinen gerne kleine Nester bauen. Die Nester wurden nach aussehen, Sauberkeit und Platzierung im Käfig untersucht. Weder die Doppel- noch die Tripelmutanten bauten sich

Nester. Dementsprechend war auch keine aussagekräftige Analyse der Sauberkeit, des Aussehens und der Platzierung der Nester möglich.

Lautgeben während des Hantierens mit den Mäusen:

Krankheit, Not oder Angst können die Tiere zu Lautäußerungen bringen, wenn sie vom Experimentator hochgehoben werden. Bei beiden Mauslinien lag der Anteil an Mäusen, die sich während des Hantierens beschwerten, zwischen 10-30% und damit höher als für Wt-Mäuse in unserem Tierstall beobachtet.

Ungewöhnliches Verhalten:

Alle Tiere zeigten keine unnormalen Verhaltensmuster wie Kopfschütteln, Rückwärt- oder im Kreislaufen.

Spontane Aktivitäten:

Hierbei werden plötzliche Handlungen, wie blitzartiges rennen oder kräftiges Kratzen beobachtet. Beide Mauslinien zeigen auch hier ein völlig normales Verhalten ohne auffällige spontane Handlungen.

Aufstehreflex:

Tiere, die auf den Rücken gelegt werden, drehen sich im Normalfall sofort wieder auf die Füße. Dieses Verhalten zeigten auch alle Doppel- und Tripelmutanten.

Widerstand gegen mehrfaches Hochheben:

Werden die Mäuse mehrfach hintereinander am Schwanz hochgehoben so fingen alle Mäuse an sich zu bewegen. Wurden sie am Genick hochgehoben, so zeigte die Hälfte der Tripelmutanten keine Reaktion während bei den Doppelmutanten nur eine Maus von acht passiv blieb.

4. Rekombinante Expression von MOG in E.coli

Zur Gewinnung größerer Mengen MOG für die Immunisierung von Kaninchen und Mäusen wurde das Protein in E.coli rekombinant exprimiert. Das kommerziell erhältliche Plasmid pet22b(+) diente als Vektor. Dieses enthält eine Zielsequenz für den periplasmatischen Raum (*pelB leader-sequence*) und eine Hexa-Histidin-Sequenz (*his-tag*). Durch PCR wurden bei den verwendeten MOG DNA Sequenzen jeweils Schnittstellen eingeführt, die ein Einklonieren in den pet22b(+) Vector *in frame* zwischen *leader-sequence* und *his-tag* ermöglichten. Die so erstellten Fusionskonstrukte wurde sequenziert und in BL21pLysS-Zellen exprimiert. Dieser E. coli Stamm trägt das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des durch IPTG induzierbaren *lac*-Operons und ein zusätzliches Plasmid, das für T7-Lysozym kodiert und die Zelllyse erleichtert.



Abb. 29: Grafische Darstellung des zur Expression von rMOG1-120 benutzten Konstrukts.

Eine Expression des gesamten MOG konnte trotz Variation der Expressionsbedingungen und Benutzung anderer Expressionsvektoren (ohne *leader sequence* mit dem Vektor *pet 8c*) nicht erreicht werden, weshalb schließlich nur die extrazelluläre Immunglobulindomäne (Exon 2) exprimiert wurde. Als Schnittstellen dienten NcoI 5'-wärts und XhoI 3'-wärts. Da sich diese beiden Schnittstellen jeweils am äußersten Rand der *multiple cloning site* befinden, wurde diese komplett herausgeschnitten und durch die MOG-Sequenz ersetzt. Auf diese Weise wurden fast alle überflüssigen Basen entfernt. Das rekombinante Protein enthielt nur zwei fremde Aminosäuren außer der Leadersequenz und dem Hexahistidin-Ende, ein Methionin zwischen *pelB* Sequenz und MOG1-120 Sequenz, die andere entstand durch die XhoI Schnittstelle zwischen MOG1-120 Sequenz und His-tag. Nach Überführung in BL21pLysS-Zellen wurde eine Übernachtskultur in M9ZB-Medium angesetzt und am nächsten Tag in 150ml Medium exprimiert. Bei der anschließenden Isolierung wurde sowohl rekombinantes Protein in der in Phosphatpuffer löslichen Fraktion als auch in der 8M Harnstoff löslichen gefunden. Protein aus der löslichen Fraktion war frei von *leader sequence*, während das in Harnstoff lösliche jeweils zu gleichen Teilen ohne und mit *leader sequence* vorlag.

Die Reinigung erfolgte durch Metallchelate-Chromatographie, ermöglicht durch den an den C-terminus von MOG fusionierten Hexa-Histidinrest. Die sechs terminalen Histidinreste bilden selbst unter denaturierenden Bedingungen Chelat-Komplexe mit an einer Chromatographiematrix immobilisierten Schwermetallionen (TALON).

Sowohl die ohne Harnstoff lösliche als auch die mit 8M Harnstoff lösliche Fraktion wurden an die Chromatographiesäule gebunden und mit steigenden Imidazolkonzentrationen eluiert. Die unterschiedlichen Fraktionen wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (Abb. 30) und zur Kontrolle mit einem anti-Histidin Antikörper hybridisiert. Neben der erwarteten Bande bei 16 kDa gab es auch noch höhermolekulare Banden, die ebenfalls von dem anti-Histidin Antikörper erkannt wurden. Hierbei handelt es sich um Multimere, die für natives MOG im SDS-Gel auch in der Literatur (Amiguet et al., 1992) beschrieben wurden. Die ca. 2kDa größere Bande der Doppelbanden in den 8M Harnstoff Fraktionen entstand durch nicht abgespaltene *leader sequence*. Das Ergebnis des Western Blots wurde auch durch Massenspektrometrie bestätigt (Abb. 31). Das rekombinante Protein ergibt einen Molekülionenpeak mit der vorausberechneten Masse, wenn man berücksichtigt, dass sich ein Natriumaddukt gebildet hat, was den Peak um 40m/z erhöht. Bei der Analyse des Pellets sind mehrere Peaks zu erkennen, die zum einen von nicht abgespaltener *leader sequence* stammen und um jeweils 2kDa erhöht sind und zum anderen von Multimeren, die sich zwischen den Proteinen mit und ohne *leader sequence* gebildet haben. Der Massenpeak der Größe 7269 kommt wahrscheinlich nicht durch Spaltprodukte zustande, sondern durch eine zusätzliche positive Ladung, wodurch das Verhältnis von m/z sich halbiert.

Für die Immunisierung von Mäusen zur Auslösung der EAE wurde zusätzlich eine Expression mit mock-transfizierten Zellen vorgenommen. Das Expressionskonstrukt ist der pet22b+ Vektor, der durch seine pelB *Leader* Sequenz, multiple Klonierungsstelle und den *his-tag* ein 2kDa großes Peptidfragment ergab, das ebenfalls mittels SDS-PAGE und Western-Hybridisierung mit His-tag- und MOG-Antikörpern verifiziert werden sollte. Auch bei diesem Produkt erkennt man ein ausgeprägtes Bandenmuster, das offensichtlich durch die Bildung von Multimeren zustande kommt. Der Multimerisierungsgrad hing bei beiden Proteinen stark von der Lagerungsmethode und der Probenbehandlung vor dem Auftragen auf das SDS Gel ab. Für beide rekombinanten Proteine konnte ein hoher Reinheitsgrad erreicht werden.

Zur Analyse von Paraffinschnitten wurden die MOG-Antikörper affinitätsgereinigt. Hierfür wurde das zur Immunisierung verwendete Protein kovalent an Bromcyan-aktivierte Sepharose gekoppelt und das Kaninchen Antiserum herübergeleitet. Die anti-MOG-Antikörper binden an das gekoppelte MOG, wurden gereinigt und anschließend eluiert. Die gewonnenen

Antikörper wurden lyophilisiert und zum Gebrauch in einer Konzentration von 1mg/ml in PBS gelöst.

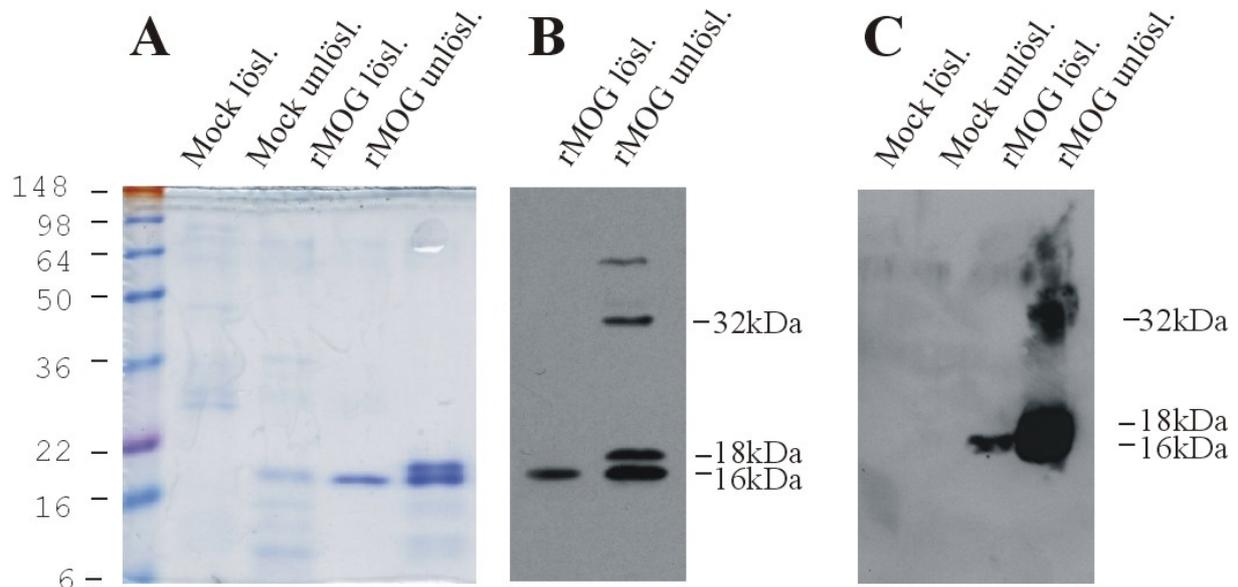


Abb. 30: Analyse der gereinigten Proteinfractionen. A: SDS Polyacrylamidgel; B: Western Blot der beiden rMOG Fractionen und Hybridisierung mit einem Antikörper gegen His-tag. C; Western Blot der gereinigten Mock- und rMOG-Fractionen mit anti-MOG Antikörper.

4.1 Gewinnung von polyklonalen Antikörpern gegen rekombinantes MOG

Bei der Immunisierung von Kaninchen zur Gewinnung von polyklonalen Antikörpern wurden zwei unterschiedliche Methoden überprüft.

Bei einem Kaninchen wurde 300µg gereinigtes rekombinantes MOG-Protein in einer Emulsion mit komplettem Freundschens Adjuvans intramuskulär in den Hinterlauf injiziert. Bei dem anderen wurde die gleiche Proteinmenge über ein SDS-PA-Gel gereinigt, direkt in komplettem Adjuvans emulgiert und injiziert. Rekombinant exprimierte Proteine können trotz Histidin-tag manchmal nicht über Affinitätschromatographie gereinigt werden. Um das rekombinante von bakteriellem Protein zu trennen, kann man die betreffende Bande aus einem SDS-PA-Gel ausschneiden und anschließend aus dem Gel auswaschen. Hier sollte überprüft werden, ob in diesem Fall eine genügend starke Immunantwort durch aus dem SDS-PA-Gel ausgeschnittenes (aber nicht ausgewaschenes) Protein erreicht werden kann.

Im Abstand von zwei Wochen erfolgten jeweils identische Injektionen mit halber Proteinmenge (150µg) und in inkomplettem Adjuvans, die dreimal wiederholt wurden. Zur Bestimmung der Antikörperproduktion wurden den Kaninchen vor allen Injektionen 1ml Blut aus der Ohrvene abgenommen und das Serum mittels *enzyme linked immunosorbent assay*

(ELISA) untersucht, wobei das vor der ersten Injektion abgenommene Blut den Referenzwert bildete (Präimmuns Serum, PIS). Nach der dritten Boosterinjektion wurden die Kaninchen ausgeblutet. Normal immunisierte Kaninchen Seren hatten einen Antikörpertiter von 1/1000000. Für das Kaninchen welches mitsamt Polyakrylamidgel immunisiert wurde war der Titer um eine Zehnerpotenz niedriger. Beide Seren waren bei Verdünnungen von 1:10000 bzw. 1:1000 spezifisch für MOG im Western Blot.

Es konnte die hohe Antigenizität der extrazellulären Domäne (Ichikawa et al., 1996 a,b) bestätigt werden. Eine Immunisierung mit Protein, direkt im Polyacrylamid mit Adjuvans verabreicht, ist ebenfalls möglich, führte in diesem Experiment aber zu niedrigeren Antikörpertitern.

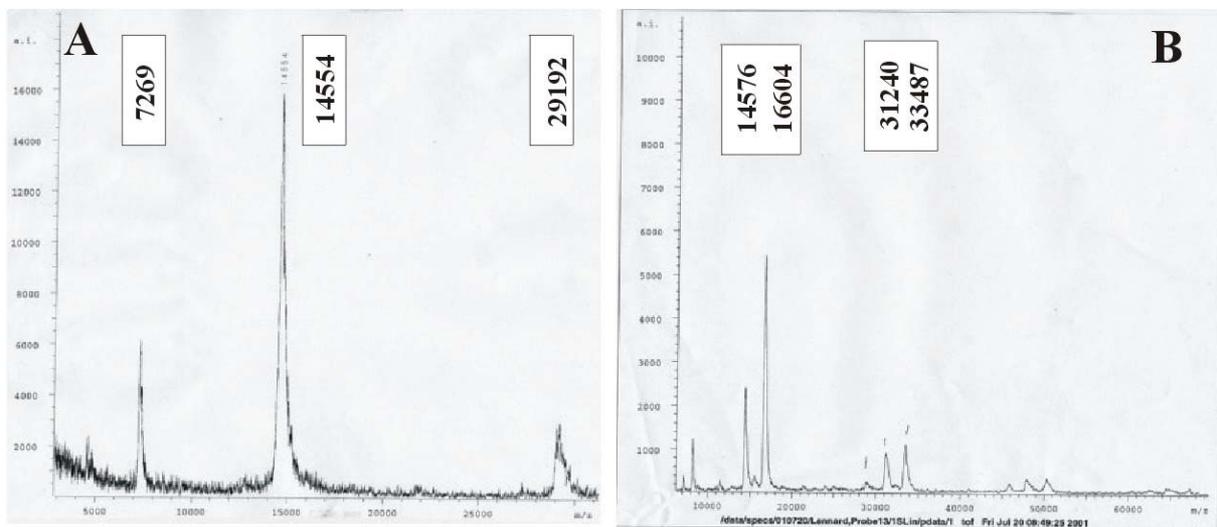


Abb. 31: Massenspektrometrische Überprüfung der beiden gereinigten rMOG Fraktionen. A: Massenpeaks der löslichen Fraktion. B: Massenpeaks der unlöslichen Fraktion. Multimerenbildung ist in beiden Fraktionen deutlich zu erkennen, ebenso die nicht abgespaltene *leadersequence*.

5. Versuche zur Experimentellen Autoimmun Enzephalitis

Als Grundlage zur Induktion von EAE dienten Arbeiten von Mendel (1995), Devaux (1997) und Leadbetter (1998), die EAE mit rekombinantem MOG oder MOG-Peptiden in C57/Bl.6 und Sjl Mausstämmen auslösten. Die Suszeptibilitäten für EAE zwischen Mausstämmen, bedingt durch ihren genetischen Hintergrund, sind sehr variabel (Bernard et al, 1997, von Budingen et al, 2001). Die mog^{-/-} Maus ist ein Hybrid aus 129er (ES-Zelllinie) und C57/Bl.6 Mauslinien, deren Empfänglichkeit für EAE nicht bekannt ist. Als Positivkontrolle dienten daher neben den wt-Nachkommen (mog^{+/+}) aus heterozygoter Verpaarung von mog^{-/+} Mäusen und zusätzlich die Mausstämme C57/Bl.6 und Sjl.

5.1 Immunisierungsprozedur ohne Pertussis Toxin

Zur Immunisierung wurde das in dieser Arbeit hergestellte rekombinante, aus der extrazellulären IgG-Domäne bestehende, MOG1-121 benutzt. 300µg MOG1-121 wurden zur Immunisierung in 100µl kompletten Freund'schem Adjuvans (CFA) emulsifiziert (Gesamtvolumen war maximal 200µl), zugesetzt wurden noch 400µg abgetötete Tuberkulose Mykobakterien. Die Injektionen erfolgten subkutan in der Nähe des Schwanzansatzes. Eine identische Injektion erfolgte eine Woche später.

Dieses Immunisierungsprotokoll wurde mit je 5 C57/Bl.6, Sjl, mog^{-/-} und mog^{+/+} Mäusen durchgeführt. Da keine Maus klinische Symptome zeigte, eignete sich dieses Protokoll nicht zum Auslösen von EAE. Die Mäuse aus diesem Experiment wurden nicht weiter untersucht.

5.2 Immunisierungsprozedur mit Pertussis Toxin

Zu dem eben beschriebenen Procedere kann die Immunantwort zusätzlich stimuliert werden, indem man Bordetella Pertussis Toxin injiziert. Pertussis Toxin ist maßgeblich an der Öffnung der Blut-Hirn Schranke beteiligt (Tuomanen et al,1993, Tonra et al, 2001), verstärkt und verlängert die allergische Wirkung von Antigen (Sewell et al, 1983 und 1987) und erhöht demzufolge die Empfänglichkeit für EAE.

Im Folgenden wurde das eben beschriebene Experiment wiederholt und zusätzlich am Tag der Immunisierung und 48h später 500ng Pertussis Toxin pro Maus in den Bauchraum (intraperitoneal, i.p.) injiziert.

Nach dem ersten Experiment wurde das Immunisierungsschema noch einmal geändert. Während vorher das Antigen jeweils komplett mit einer Injektion verabreicht wurde, wurden alle weiteren Immunisierungen, bei gleichbleibender Antigenmenge, auf zwei Einstichstellen verteilt; so dass eine Maus bei der ersten Immunisierung die Hälfte des Antigens auf die linke Seite des Schwanzansatzes injiziert bekam und die andere Hälfte knapp darüber in der Nähe der Wirbelsäule. Die Boosterinjektion erfolgte dann seitengleich. Auf diese Weise konnte bei gleichbleibender injizierter Antigenmenge eine höhere Inzidenz und ein höherer Schweregrad der Lähmungen bei den *mog*^{+/+} Mäusen erreicht werden, die das Niveau der C57/Bl.6 Mäuse erreichten. (Tab.: 4)

Neben C57/Bl.6, *Sjl*, *mog*^{-/-} und *mog*^{+/+} Mäusen wurden als weitere Kontrolle C57/Bl.6 Mäuse in einem pathogen freien Tierstall der Firma MEMOREC GmbH immunisiert. Auf diese Weise sollten Umwelteinflüsse ausgeschlossen werden, die eventuell die EAE beeinflussen könnten. Es ist bekannt, dass im Tiermodell, das spontane EAE entwickelt, die Umweltfaktoren eine Rolle spielen (Goverman et al, 1993). Außerdem konnte ein zusätzlicher Beweis für die Uniformität des genetischen Hintergrundes der C57/Bl.6 Maus geschaffen werden.

5.3 Beurteilung der klinischen Symptome

Die Mäuse wurden täglich über einen Zeitraum von bis zu sechs Wochen gewogen und der Grad der klinischen Symptome festgehalten. Die klinischen Symptome wurden nach einem System beurteilt, das je nach Autor und Verlaufsform der EAE in den Einstufungen der Schweregrade variiert. Für die hier durchgeführten Versuche erwies sich die folgende Einteilung am besten (Devaux et al, 1997): Schweregrad 0.5 schwache Spannkraft des Schwanzes, Schweregrad 1 komplette Schwanzlähmung, Schweregrad 2 Parese (Schwäche) der Hinterläufe, Schweregrad 3 komplette Hinterlaufslähmung, Schweregrad 4 Vorderlaufschwäche und Schweregrad 5 Tetraplegie oder Tod.

5.4 Etablierung des EAE Mausmodells

Die Ergebnisse des ersten mit Pertussis Toxin als zusätzlichem Adjuvans durchgeführten Immunisierungsexperimentes sind in Tab. 4 zusammengefasst. Man erkennt die hohe Inzidenz bei den Sjl- und den C57/Bl.6 Mäusen (4 von 5 bzw 8 von 10), wohingegen diese bei mog+/+ Mäusen mit 2 von 5 niedriger ist. Des weiteren erwies sich der Schweregrad der mog+/+ Mäuse im Vergleich mit den anderen wt-Mäusen deutlich geringer. Wie zu erwarten war, zeigten die mog-/- Mäuse keine klinischen Symptome.

Mauslinie	Anzahl	Inzidenz	Durchschnitt Tag des Einsetzens	Durchschnitt des maximalen Schweregrad	Inflammation
Sjl	5	4(5)	13	3,5	Ja(H/E)
C57/Bl.6	5	4(5)	15	2,25	Ja(H/E)
C57/Bl.6 (Pf)	5	4(5)	16	1,75	ja(H/E)
Mog+/+	5	2(5)	16	1	ja(LCA)
Mog-/-	5	0(5)		0	ja(LCA)

Tab. 4: Ergebnisse der ersten Immunisierung mit Pertussis Toxin.

Sjl und C57/Bl.6 Mauslinien zeigten die typischen in der Literatur (Mendel et al, 1995, Devaux et al, 1997 und Leadbetter et al, 1998) beschriebenen Symptome. Sowohl die Inzidenz, der Tag des Ausbruchs der ersten Lähmungserscheinungen und der Schweregrad der klinischen Symptome wurden übereinstimmend reproduziert. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den C57/Bl.6 Mäusen aus unserem Tierstall und denen aus dem pathogenfreien Tierstall der Firma MEMOREC GmbH. Damit können hygienische Effekte, die die EAE beeinflussen, bei der Tierhaltung unserer Mäuse ausgeschlossen werden. Von allen Mäusen wurden Paraffinschnitte des Gehirns angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin (Kernfärbung und Plasmafärbung) gefärbt. In Sjl Maus und C57/Bl6 Maus wurden perivaskuläre Infiltrate eindeutig nachgewiesen. Abb. 32 zeigt repräsentative Aufnahmen von Gehirnen immunisierter Sjl- und mog+/+-Mäuse. Die perivaskulären Infiltrate sind in der Sjl Maus deutlich zu erkennen. Außer im Mittelhirn wie in dieser Abbildung gezeigt, wurden Infiltrate auch im Kleinhirn und dem Rest des Gehirns beobachtet; analog waren die Beobachtungen in den C57/Bl.6 Mäusen. Im Gegensatz dazu konnte in keinem H/E gefärbten Schnitte von mog+/+ oder mog-/- Mäusen eine Inflammation nachgewiesen werden. Schnitte beider Mauslinien zeigten stets ein analoges zu dem in Abbildung 32 gezeigten Ergebnis. Zur Kontrolle wurden die Schnitte von Personen begutachtet, die die Proben nicht kannten.

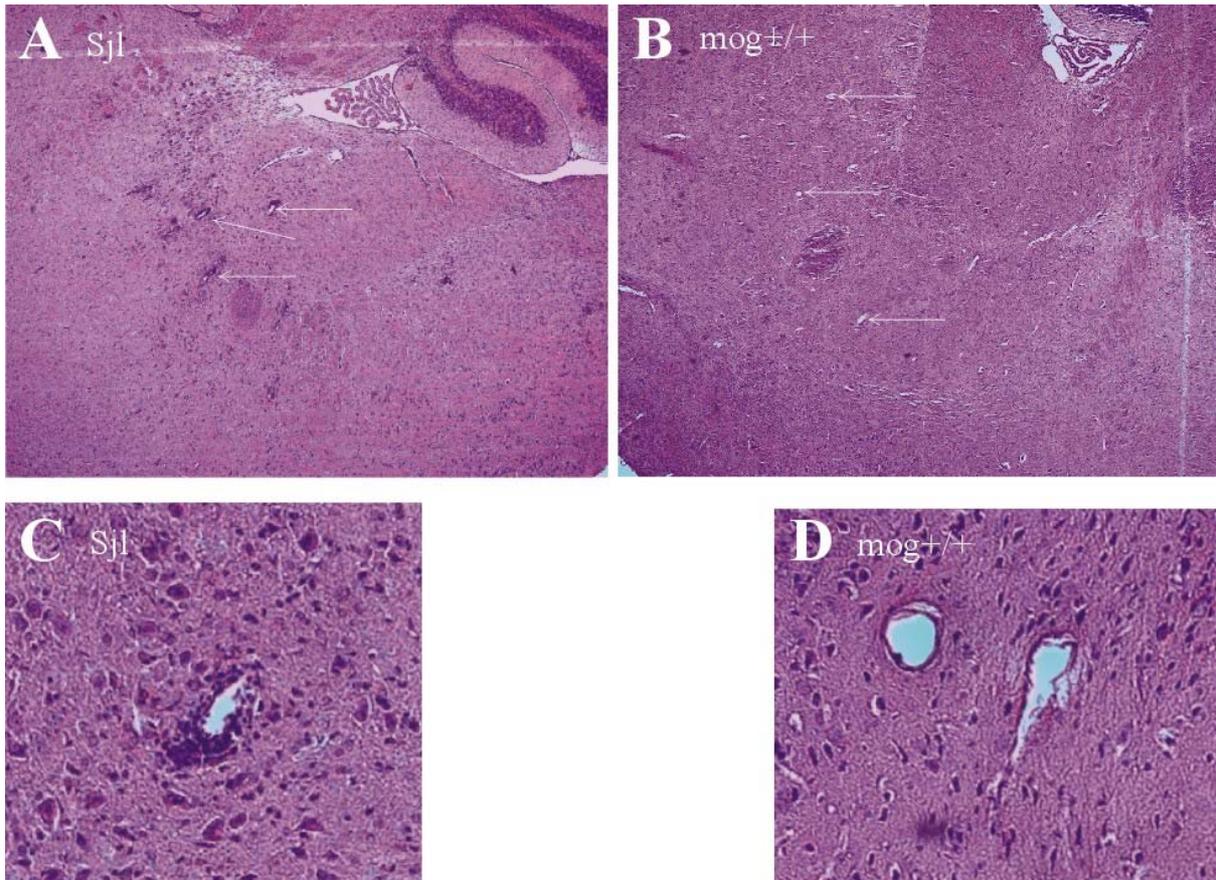


Abb. 32: Sagittale Hämatoxylin/Eosin gefärbte Paraffinschnitte des Gehirns von immunisierten Mäusen. A: Sj1 Maus mit perivaskulären Infiltrationen im Mittelhirn (Pfeile). B: $mog^{\pm/\pm}$ Maus ohne nachweisbare perivaskuläre Inflammationen (Pfeile). C: Vergrößerung eines Gefäßes mit perivaskulär eingewanderten Leukocyten (Sj1). D: Vergrößerung zweier Gefäße der $mog^{\pm/\pm}$ Maus, in denen keine Infiltrationen zu beobachten waren. (Vergrößerung: A und B 5x; C und D 20x)

5.5 Identifizierung von Leukozyteninfiltraten

Da die Paraffinschnitte mit Hämatoxylin und Eosin (H/E) Färbung keine eindeutige Identifizierung von Immunzellen, die in das ZNS Gewebe eingedrungen waren, für $mog^{-/-}$ und $mog^{\pm/\pm}$ Maus erlaubten, wurden Kryoschnitte ohne Verwendung von Fixierungsmitteln, wie Formaldehyd, Paraformaldehyd oder Glutaraldehyd, hergestellt, um eine einwandfreie Bindung der Antikörper zu gewährleisten. Gehirnschnitte von $mog^{-/-}$ und $mog^{\pm/\pm}$ Maus wurden mit einem Antikörper, der gegen aktivierte Leukozyten gerichtet ist (CD45 oder *Leukocyte common antigen*, LCA) behandelt. In beiden Gehirnen zeigten sich zahlreiche leukozytäre Infiltrate. Es waren sowohl perivaskuläre Infiltrate zu beobachten als auch Inflammationsherde, die nicht gefäßzentriert waren (Abb.: 33). Die Abbildung zeigt für die

mog^{+/+} Maus eine typische perivaskuläre Inflammation des Kleinhirns bei der allerdings keine Leukozyten in das umliegende Gewebe eingewandert sind. Für die mog^{-/-} Maus ergibt sich ein ähnliches Bild, wobei die hier gezeigte perivaskuläre Inflammation durch in das umliegende Gewebe eingewanderte Leukozyten gekennzeichnet ist. Es ist aber festzustellen, dass auch in den mog^{+/+} Mäusen gleichermaßen in das Gewebe eingewanderte Leukozyten beobachtet wurden. Es wurden je zwei Gehirne pro Genotyp in Kryoschnitten untersucht. Die LCA Färbungen zeigten eins bis sechs Inflammationsherde von der hier gezeigten Größe und Art pro Gehirnschnitt. Es war fast ausschließlich die weiße Substanz betroffen. Es wurden nur vereinzelt Leukozyten außerhalb der weißen Substanz beobachtet. Schweregrad und Verteilungsmuster der Infiltrate waren sich so ähnlich, dass anhand der Inflammationen keine Unterscheidung zwischen mog^{+/+} und mog^{-/-} Maus getroffen werden konnte.

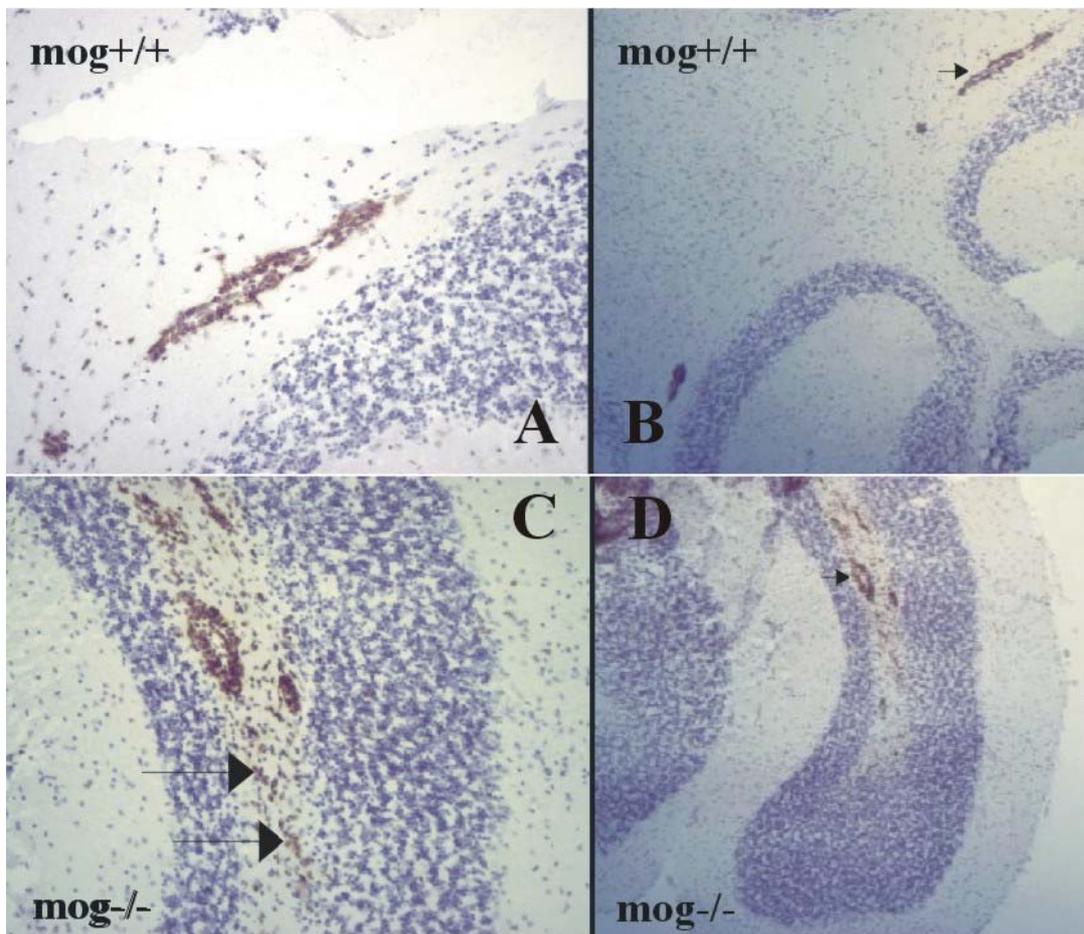


Abb. 33: Mit LCA gefärbte Kryoschnitte von immunisierten mog^{+/+} (A, C) und mog^{-/-} Mäusen (B, D). Kleine Pfeile: perivaskuläre Infiltration, große Pfeile; In das umliegende Gewebe eingewanderte Leukocyten. (Vergrößerung: A und C 20x; B und D 5x)

Da sowohl Infiltrationen von Immunzellen als auch die eben beschriebenen Schäden des ZNS-Gewebes bei der mog^{-/-} Maus sehr unerwartet waren, wurden alle (auch die folgenden)

Kryoschnitte zur nochmaligen Bestätigung des Genotyps mit anti-MOG-Serum behandelt (siehe Abb.: 18).

5.6 Einfluss von Adjuvans und Pertussis Toxin

Da es denkbar war, dass Pertussis Toxin und mit Mykobakterien versetztes Freund'sches Adjuvans ohne Antigen zu den in der mog^{-/-} Maus beobachteten Infiltraten führen kann, wurden mog^{+/+} und mog^{-/-} Mäuse wie oben beschrieben immunisiert und eine Gruppe mit Antigen und die andere mit PBS behandelt (Tab.: 5). Von diesen Mäusen wurden wieder Kryoschnitte des Gehirns angefertigt und mit LCA gefärbt (nicht gezeigt). In keinem der untersuchten Gehirne mit PBS behandelte Tiere konnten Infiltrate nachgewiesen werden im Gegensatz zu den mit Antigen immunisierten. Damit wurde gezeigt, dass das injizierte Antigen tatsächlich für die Infiltrate verantwortlich ist.

5.7 Einfluss von Substanzen aus der rekombinanten Expression von rMOG1-120

Obwohl das verwendete rekombinante Antigen (rMOG1-120) affinitätsgereinigt wurde (siehe dort) könnten trotz des hohen Reinheitsgrades eventuell bakterielle Proteine oder Substanzen aus der Säulenreinigung die Probe verunreinigen haben. In diesem Fall könnten bakterielle

Antigen	Analysierte Gehirne
rMOG1-121	6(6)
Mock	6(0)
Bakt. Lysat	4(0)
PBS	4(0)

Tab. 5: Übersicht über die Encephalitogenität verschiedener Antigene.

Verunreinigungen wie beschrieben (siehe Einleitung) als Superantigen fungieren und für die beobachteten Infiltrationen verantwortlich sein. Deshalb wurde eine Expression mit nicht transfizierten Bakterien parallel zur Expression von rMOG durchgeführt. Der in 8M Harnstoff lösliche Teil wurde mit dem im harnstofffreien Puffer löslichen vereinigt. Immunisiert wurde mit 3mg Bakterienproteinen, was der 10fachen rMOG Menge entsprach. Außerdem wurden Expressionen in einem parallelen Ansatz mit rMOG und nur mit Expressionsvektor transfizierten

Bakterien (mock-transfiziert) durchgeführt. Beide Ansätze wurden immer exakt parallel aufgearbeitet. Es wurden die gleichen Lösungen benutzt und alle Proben in gleichen Volumina gelöst. Als Proteinkonzentration ergab sich für rMOG 4µg/µl und für die Mock-Expression 0.3µg/µl. Es wurden von rMOG 75µl (300µg) und für mock 75µl (22.5µg) zum

Immunisieren verwendet. Da der Einfluss der Verunreinigungen ermittelt werden sollte, wurde mit dem gleichen Volumen und nicht mit gleicher Proteinkonzentration immunisiert.

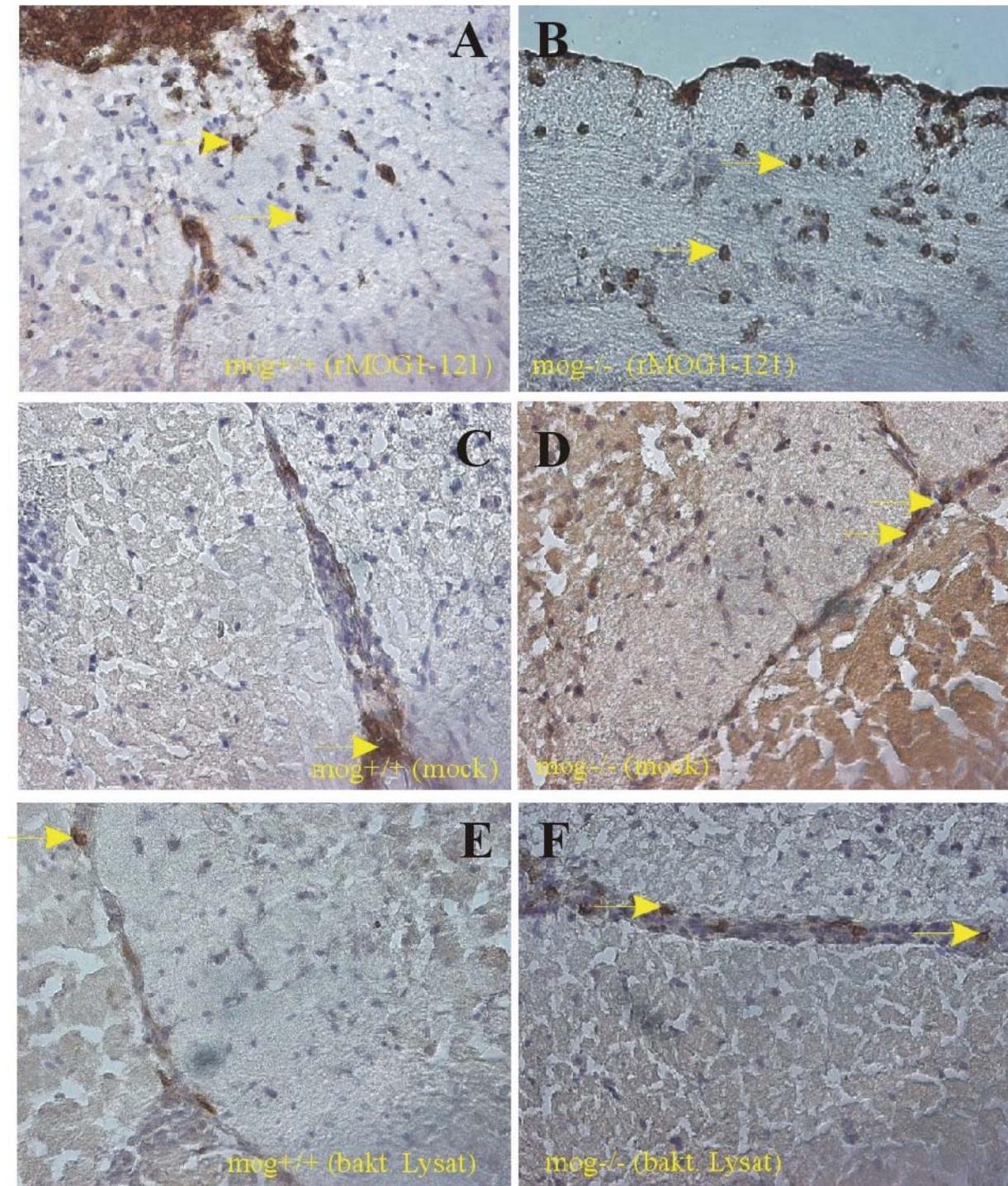


Abb. 34: LCA gefärbte Gehirnschnitte von $mog^{+/+}$ Mäusen (A, C, E) und von $mog^{-/-}$ Mäusen (B, D, F). A, B: Mit rMOG immunisierte Mäuse. C, D: Mock immunisierte Mäuse. E, F: mit bakt. Lysat immunisierte Mäuse. Die Pfeile zeigen einzelne Leukocyten. Deutlich zu sehen ist, dass nur in den mit rMOG immunisierten Mäusen (A, B) Leukocyten im Parenchym zu detektieren sind, während sich in den mit mock (C, D) und bakt. Lysat (E, F) immunisierten Mäusen Leukocyten nur in den Meningen (Hirnhäuten) finden. (Vergrößerung: 40x)

Es wurden Horizontalschnitte von kryokonservierten Gehirnen angefertigt und mit LCA gefärbt. Es wurden verschiedene Schnittebenen ausgehend von der Basis untersucht. Nur in mit rMOG immunisierten Mäusen waren Inflammationsherde zu sehen. Weder die Immunisierung mit Bakterienproteinen noch die mit mock-Protein führte zu Inflammationen (Abb. 34). Lediglich in den Hirnhäuten sind bei den mit mock- und Bakterienprotein immunisierten Mäusen mehrere Leukozyten nachzuweisen und gelegentlich waren vereinzelte Leukozyten im ZNS zu beobachten. In den rMOG immunisierten Mäusen (*mog*^{+/+} und *mog*^{-/-}) ist die Zahl der Leukozyten in den Hirnhäuten allerdings deutlich höher, wie aus Abb. 34 für die *mog*^{+/+} Maus zu erkennen ist. Damit konnte gezeigt werden, dass die bei der *mog*^{-/-} Maus beobachteten Infiltrate tatsächlich durch rMOG verursacht werden. Die Gesamtzahlen der untersuchten Gehirne ist in Tabelle 5 zusammen gefasst. In Klammern ist die Zahl der Gehirne gezeigt, die Leukozyteninfiltrate zeigten.

5.8 Klinische Symptome von *mog*^{+/+} und *mog*^{-/-} Mäusen

Alle immunisierten Mäuse wurden täglich gewogen und der Schweregrad der Lähmungserscheinungen festgehalten. Für Sjl und C57/Bl.6 Mäuse ergaben sich, wie bereits erwähnt, die in der Literatur beschriebenen Krankheitsverläufe. Interessant war der Vergleich

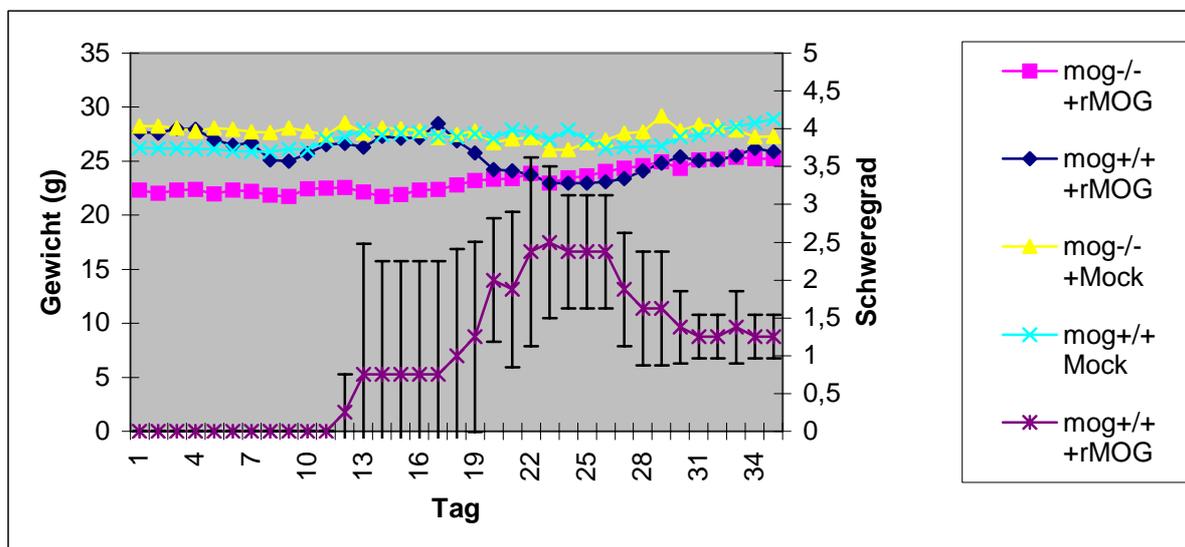


Abb. 35: Gewichtsveränderungen von immunisierten Mäusen und der Verlauf der klinischen Symptome (linke bzw. rechte Y-Achse). Nur die mit rMOG immunisierten *mog*^{+/+} Mäuse zeigen eine Gewichtsabnahme. Diese korreliert mit der Entwicklung von Lähmungen.

der Gewichte zwischen $mog^{+/+}$ und $mog^{-/-}$ Mäusen zur Überprüfung ob die nicht von Lähmungen begleiteten Inflammationen in der $mog^{-/-}$ Maus sich trotzdem in einer Gewichtsreduzierung äußern.

Für diese Analyse wurden alle Mäuse, die mindestens 34 Tage überlebten, verwendet. Die Versuchstiere, die vorher als offensichtliche Folge der Immunisierungen verstarben oder die für Experimente geopfert wurden, wurden nicht berücksichtigt. So wurden je 5-8 Mäuse aus zeitlich unterschiedlichen Immunisierungen zusammengefasst. Abbildung 35 gibt die beobachteten Gewichtsveränderungen der Unterschiedlichen Versuchsgruppen wieder. Neben den mit rMOG immunisierten Mäusen wurden mock immunisierte Mäuse mit aufgetragen. Nur die mit rMOG immunisierten $mog^{+/+}$ Mäuse zeigten eine signifikante Gewichtsabnahme, die mit der Ausprägung der Lähmungserscheinungen einhergeht. Der durchschnittliche maximale klinische Schweregrad betrug 2,5. Dieser Schweregrad ist aus den beschriebenen Gründen höher als im ersten Experiment in Tabelle 4 dargestellt und zeigt erneut den großen Einfluss der Immunisierungsweise auf den Verlauf der EAE. Die Symptome klingen nach Erreichen eines Maximalwertes langsam wieder etwas ab. Es wurde aber bei keiner erkrankten $mog^{+/+}$ Maus ein vollständiger Rückgang der Symptome beobachtet. Die klinischen Symptome blieben auf dem in der Abbildung 35 erkennbaren Plateau stehen. Außerdem wurde bei keiner Maus ein erneutes Ansteigen der Symptome beobachtet. Die mit rMOG immunisierten $mog^{-/-}$ Mäuse zeigten ebenso wie die mit mock-Protein immunisierten keine Gewichtsabnahme. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die unspezifische Aktivierung des Immunsystems mit CFA, mock-Protein und Pertussis Toxin nicht zu einer Gewichtsreduzierung führten. Außerdem erfolgte durch die Immunisierung der $mog^{-/-}$ Maus mit rMOG keine Veränderung des Gewichtes. Da die rMOG immunisierten $mog^{-/-}$ Mäuse ähnliche viele infiltrierende Leukozytenherde im ZNS aufwiesen wie die $mog^{+/+}$ Mäuse, kann man schlussfolgern, dass die Entzündungen alleine nicht zur Ausprägung von klinischen Symptomen ausreichen. Dies entspricht der allgemeinen Ansicht, dass bei MS Patienten schon lange vor dem Auftreten erster Symptome das ZNS von Immunzellen infiltriert wird (Poser, 1994; Allen, 1999).

5.9 Analyse der Infiltrate im ZNS

Die Infiltrate wurden näher immunhistochemisch an Kryoschnitten von Mäusegehirnen mit Antikörpern gegen CD4, CD8 und B220 gefärbt charakterisiert. Untersucht wurden mit

rMOG immunisierte *mog*^{+/+} und *mog*^{-/-} Mäuse. B220 färbt B-Zellen, während CD4-Antikörper die sogenannten T-Helferzellen und CD8-Antikörper die zytotoxischen T-Zellen anfärbt. Zusätzlich wurden die Schnitte mit LCA gefärbt. Es wurden direkt hintereinander folgende Schnitte benutzt, um die Inflammationen besser vergleichen zu können. Die gezeigten Ausschnitte vom Kleinhirn zeigen deutlich Infiltrate in der weißen Substanz in beiden Mauslinien (Abb.:36). B-Lymphozyten sind in *mog*^{+/+} und *mog*^{-/-} Maus im Entzündungszentrum und nur in kleinen Mengen im Parenchym zu sehen (Abb. 36, C und G). Dies korreliert mit Befunden bei MS-Patienten, bei denen B-Zellen bevorzugt direkt im perivaskulärem Bereich und im Plaque zu finden sind, während die T-Zellen auch im umliegenden Gewebe angetroffen werden (Esiri, 1980). In den Gehirnen beider Mauslinien sind sowohl CD4- als auch CD8-positive Zellen perivaskulär als auch in das umliegende Gewebe eingewandert (Abb. 36, A, D, E, H). Die Verteilung von CD4-, CD8- und B-Zellen ist zwischen beiden nicht signifikant unterschiedlich. Die bei der *mog*^{+/+} Maus in diesem

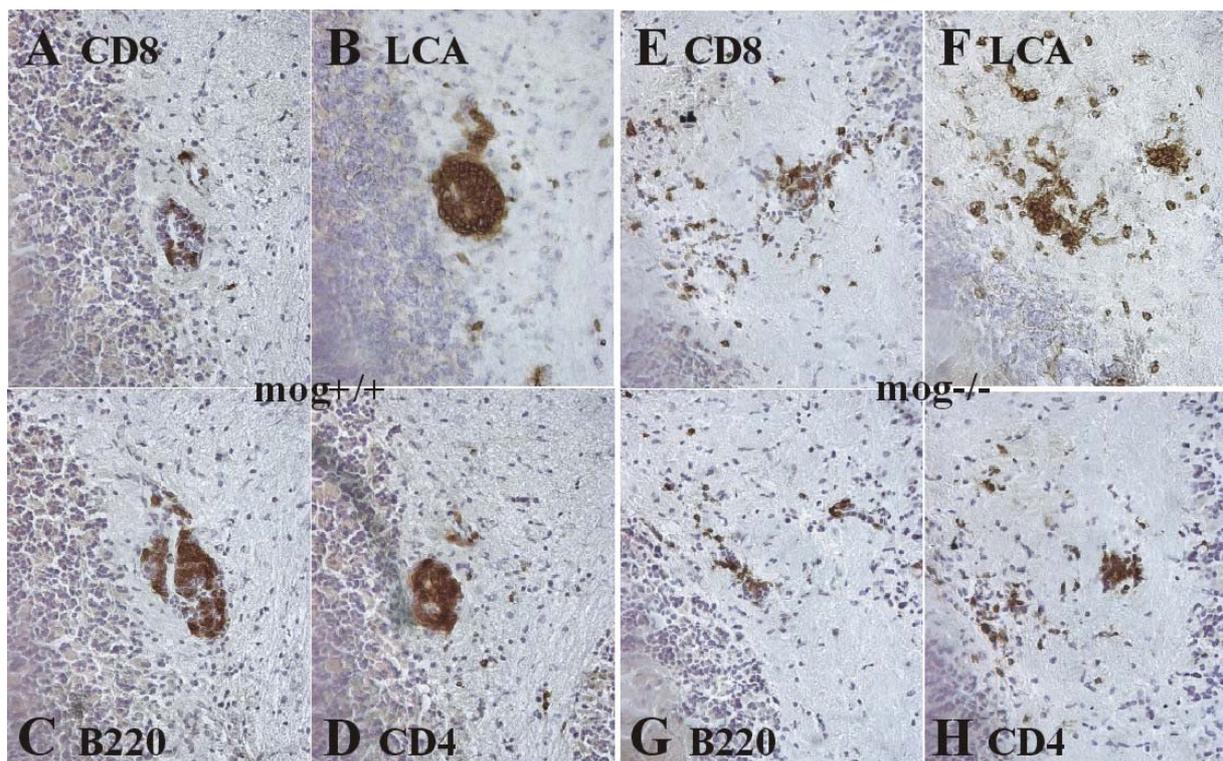


Abb. 36: Übersicht von hintereinander angefertigten Kryoschnitten des Kleinhirns von rMOG immunisierten Mäusen, die mit den angegebenen Antikörpern gefärbt wurden. A-D: *mog*^{+/+} Hirnschnitte; E-H: *mog*^{-/-} Hirnschnitte.

Schnitt zu sehende stark abgegrenzte Entzündung wurde auch bei den *mog*^{-/-} Mäusen beobachtet und ist offensichtlich durch Anschneiden eines Gefäßes entstanden. Die einzelnen

Zellen wurden gezählt. Das Verhältnis von CD4- zu CD8-Zellen war in der *mog*^{-/-} Maus höher als in der *mog*^{+/+} Maus. Dieses rein qualitative Ergebnis wurde durch eine FACS-Analyse mit aus Gehirn isolierten Immunzellen überprüft (siehe unten).

5.10 Bestimmung von MOG-Antikörpern in Mäuseserum

Zehn bis zwanzig Tage nach der Immunisierung wurde den Mäusen Blut abgenommen und das erhaltene Serum mittels *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) untersucht. Aus Abbildung 37 wird deutlich, dass MOG-spezifische Antikörper im Serum nicht immunisierter Mäuse und in mit PBS immunisierten Mäusen nicht in nachweisbarer Menge vorhanden sind. Die mit rMOG immunisierten Mäuse haben einen Titer von 1:500. Interessant ist dabei, dass das Serum der untersuchten *mog*^{+/+} und *mog*^{-/-} Mäuse den gleichen Titer besitzen. Das zeigt die geringe B-Zelltoleranz gegen körpereigenes MOG in der *mog*^{+/+} Maus. Desweiteren liefert es eine mögliche Erklärung für die hohe Antigenizität von MOG und die hohe Effektivität als Antigen bei der EAE.

5.11 Untersuchung von Kreuzreaktivität von Antikörpern

MOG Antikörpern wird eine Bedeutung bei Demyelinisierungsprozessen zugeschrieben (Piddlesden et al., 1993; Raine et al., 1999; Storch et al., 1998). In einem Experiment wurden *mog*^{-/-} Mäuse, die im Labor von Pham-Dinh (Dellarasse, 2003) generiert wurden, mit einer transgenen Mauslinie gekreuzt, die spezifisch den MOG spezifischen monoklonalen Antikörper 8.18-C5 durch B-Zellen funktionell exprimieren sollten (Litzenburger et al., 2000). In diesen Mäusen wurden interessanterweise praktisch keine funktionellen Anikörper gebildet. Eine Erklärung hierfür wäre eine Kreuzreaktion dieses MOG spezifischen Antikörpers mit einem anderen endogenen Protein, wodurch die Reifung der B-Zellen die diesen Antikörper exprimieren, verhindert würde. Da B-Zellen als Antigen präsentierende Zellen fungieren können, wäre es bei einer tatsächlichen Kreuzreaktion denkbar gewesen, dass kreuzreagierende B-Zellen T-Zellen stimulieren, die für das kreuzreagierende Protein spezifisch sind und für die Entzündungsherde in der *mog*^{-/-} Maus verantwortlich sein könnten. Um zu untersuchen, ob in der *mog*^{-/-} Maus Kreuzreaktionen mit anderen körpereigenen Proteinen des ZNS durch die Immunisierung ausgelöst wurden, wurden mit

Seren von immunisierten und nicht immunisierten Mäusen Western Blot Hybridisierungen gegen Maus-ZNS Myelin durchgeführt (Abb. 37).

Eindeutig waren die Ergebnisse für MOG. Nicht immunisierte Mäuse und mit mock immunisierte Mäuse zeigten keine Reaktivität mit MOG (Abb.37A, C, D). Nur Serum von mit rMOG immunisierten Mäusen war positiv für MOG in MOG exprimierenden Mäusen (Abb. 37B, F, E). In allen Blots waren drei Banden <21kDa zu erkennen, die von einer Hybridisierung mit den drei MBP Isoformen herrühren. Dies zeigt sich in der Spur der Doppelmutanten (*mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-}), in der diese nicht zu sehen sind. Eine weitere Bande ist etwas oberhalb von 22kDa zu erkennen. Diese Bande scheint im Vergleich im rMOG Serum Western blot stärker als mit NIS zu sein (Abb. 37A, B). Außerdem ist diese auch etwas schwächer in der *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-} Mauslinie zu erkennen, so dass es sich möglicherweise nicht um PLP oder DM20 handelt, sondern um ein anderes Protein. Um zu überprüfen, ob diese Intensitätsverstärkung tatsächlich von einer durch rMOG Immunisierung ausgelöste, spezifischen kreuzreaktiven Antikörpererhöhung herrührte, wurde mit Serum von mock immunisierten Mäusen hybridisiert. Auch in diesem Western Blot (Abb. 37D) zeigt sich diese Bande deutlich. Sie ist ebenso schwach in der PLP defizienten Maus zu erkennen wie für

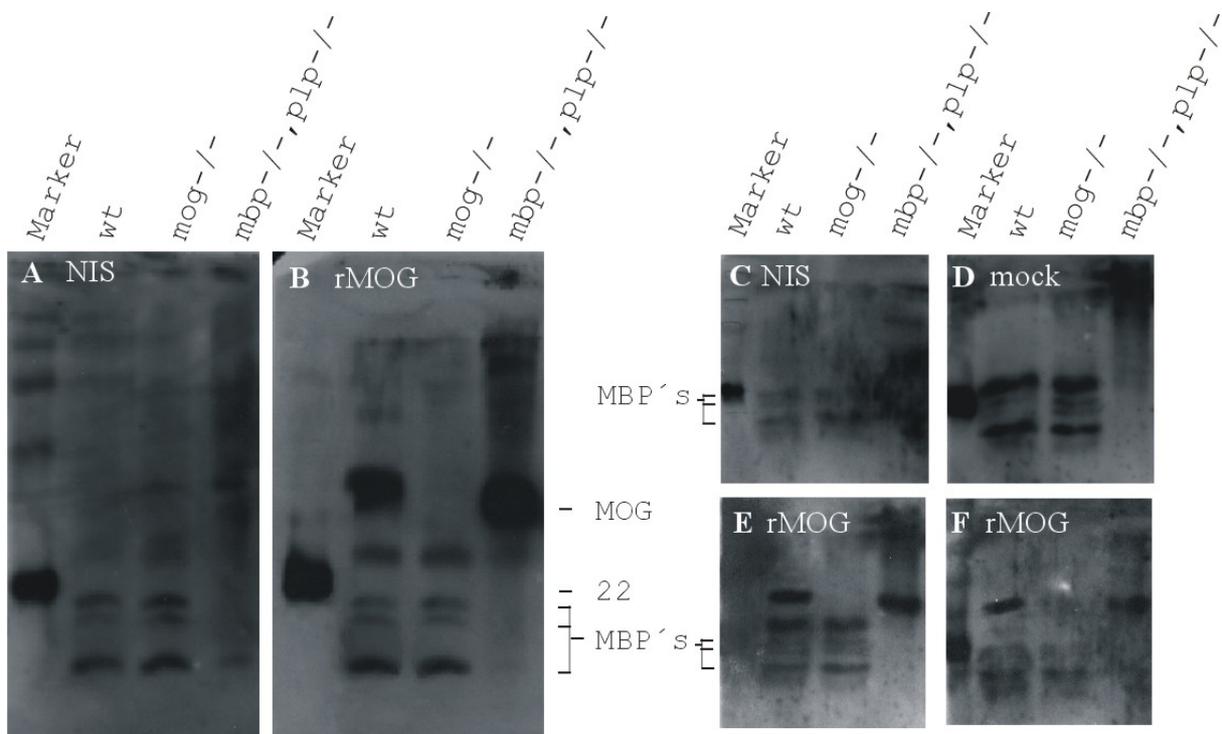


Abb. 37: Western Blots mit Myelin aus drei verschiedenen Mauslinien. Die Blots wurden mit verschiedenen Mausseren hybridisiert. NIS: *non immune serum*; rMOG: Mit Serum rMOG immunisierter Mäuse; Mock: Mit Serum mock immunisierter Mäuse. In allen Blots sind die Banden für MBP deutlich zu erkennen. Ebenso die MOG Bande in Wt- und *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-} Myelin. Die prominente Markerbande entspricht 22kDa.

rMOG Serum. Zusätzlich zeigte sich bei weiteren Western Blots mit rMOG Serum, dass die Bande manchmal sogar fast gar nicht zu beobachten war (Abb 37F). Es kann also davon ausgegangen werden, dass diese Färbung nicht spezifisch für rMOG Serum ist und dementsprechend auch nicht durch kreuzreagierende Antikörper hervorgerufen wurde. Somit kann man eine Rolle für kreuzreagierende B-Zellen, welche die T-Zellantwort gegen MOG fremde Proteine in der mog^{-/-} Maus dirigieren, ausschließen.

5.12 Quantifizierung von T- und B-Zellen in immunisierten Mäusegehirnen

Zur Quantifizierung der bei den Immunfärbungen an Kryoschnitten gemachten qualitativen Ergebnissen wurden Immunzellen aus je 3 immunisierten mog^{+/+} und mog^{-/-} Mäusen mittels Percoll Dichtegradientenzentrifugation aus homogenisiertem Gehirn isoliert. Die drei mog^{+/+} Mäuse zeigten klinische Symptome zwischen Schweregraden 1 bis 3. Die Mäuse wurden drei Wochen nach Beginn der Immunisierung analysiert. Die Zellen wurden zur Gesamtzellzahlbestimmung mit Tryphan-Blau gefärbt und die übrigen an CD4-, CD8-, LCA- und B220-fluoreszenzmarkierte Antikörper gekoppelt. Nun wurden die Zellen mittels *fluorescence aided cell sorting* (FACS) analysiert. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde das Experiment noch einmal mit je drei Gehirnen von Mäusen aus einem späteren Immunisierungsexperiment wiederholt. Die isolierten Gesamtzellzahlen variierten stark. Während im ersten Experiment aus den drei mog^{+/+} Gehirnen mehr Zellen isoliert wurden ($2,7 \cdot 10^5$ mog^{+/+} Zellen zu $1 \cdot 10^5$ mog^{-/-} Zellen/Hirn), wurden im zweiten Experiment mehr Immunzellen aus mog^{-/-} Gehirnen isoliert ($0,9 \cdot 10^5$ mog^{+/+} Zellen zu $4 \cdot 10^5$ mog^{-/-} Zellen/Hirn). Da der durchschnittliche Schweregrad der klinischen Symptome bei den Mäusen des ersten und zweiten Experimentes ungefähr gleich war, zeigte sich, dass die Inflammationen des Gehirns beider Mauslinien (mog^{+/+} und mog^{-/-}) nicht mit den klinischen Symptomen korrelieren (Lassmann, 1999).

Der prozentuale Anteil von CD4 und CD8 positiven Zellen an der Gesamtzellzahl war im zweiten Experiment um ca. eine Zehnerpotenz niedriger. Diese Varianz könnte durch große Verteilungsunterschiede der Leukozyten im Gehirn bei den beiden Experimenten oder durch die Aufarbeitung bedingt sein. Da das Percoll des Dichtegradienten toxisch für die Zellen ist, könnten diese bei der ca. 5 stündigen Aufarbeitung unterschiedlich stark geschädigt worden sein. Eine höhere Zahl an toten Zellen konnte zu der geringeren Gesamtzahl gezählter CD4⁺ und CD8⁺ Zellen geführt haben.

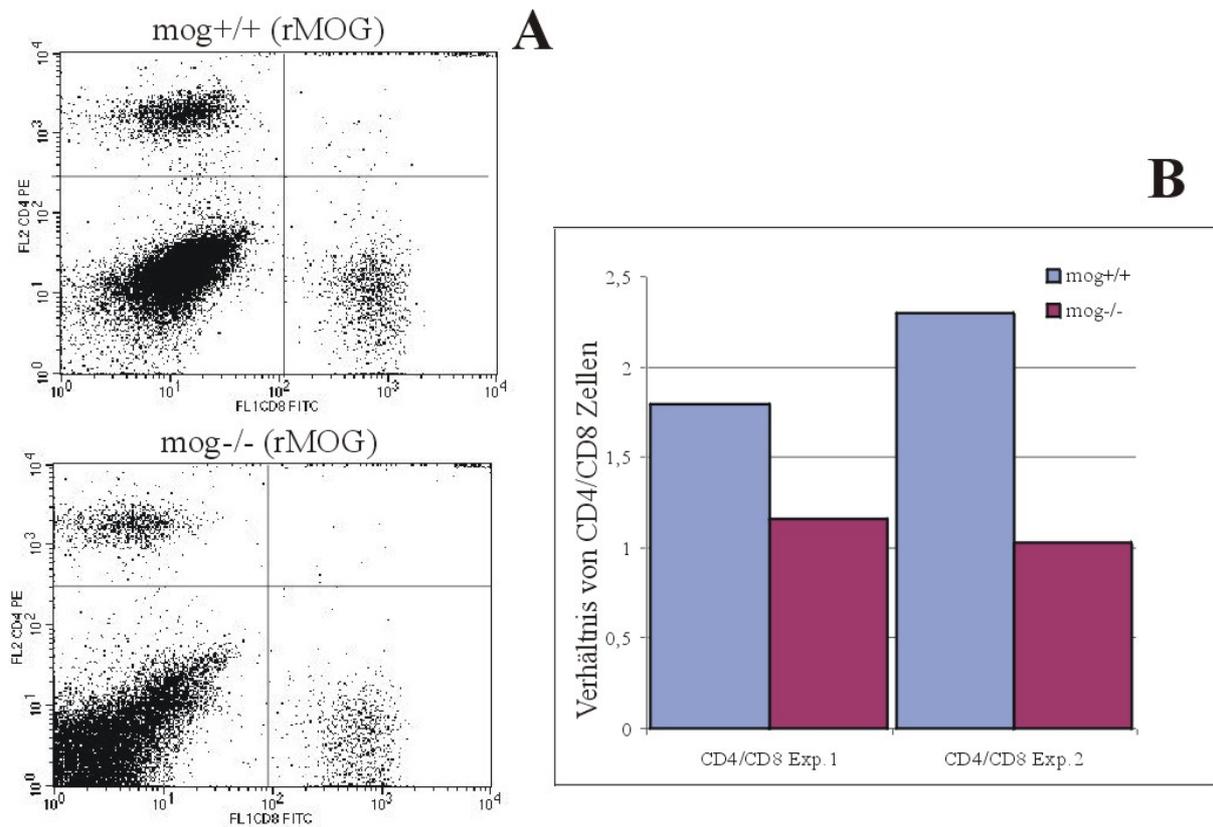


Abb. 38: A: FACS von den aus Gehirn isolierten Immunzellen des ersten Experiments. Oben links: PE markierte CD4+ Zellen, unten rechts: FITC markierte CD8+ Zellen, oben rechts: doppelt positive und unten links: doppelt negative Zellen. B: Verhältnis von CD4+ zu CD8+ Zellen aus zwei identischen Experimenten.

In beiden Versuchen gleich ist dagegen das Verhältnis von CD4 zu CD8 positiven Zellen. Dieses Verhältnis wird nicht signifikant durch die Aufarbeitung beeinflusst (im Gegensatz zu dem eben beschriebenen Anteil an Gesamtzellen), da CD4 und CD8 Zellen gleichermaßen empfindlich sein sollten und spiegelt somit die tatsächliche Verteilung im Gehirn wider. Für die *mog+/+* Mäuse ist es in beiden Versuchen nahe zwei, während es bei den *mog-/-* Mäusen ungefähr eins ist (Abb. 38). Es ist also eine signifikante Erniedrigung dieses Koeffizienten zu beobachten. Anhand der prozentualen Anteile scheint sich nur die Zahl der CD4 positiven Zellen in der *mog-/-* Maus verringert zu haben. Anhand dieses Experimentes kann man allerdings nicht sagen ob CD4 Zellzahlen erniedrigt oder CD8 Zellzahlen erhöht sind.

Neben der CD4/CD8-Analyse wurden auch Zellen mit LCA und B220 markiert (Abb. 39). Zwei LCA positive Populationen wurden eingegrenzt, die sich anhand ihrer Fluoreszenzintensität unterscheiden ließen. Die Makrophagen sind mit R4 in Abb. 39B gekennzeichnet und die Mikroglia mit R3. Der Anteil der B-Zellen ist mit weniger als 1% in beiden Experimenten sehr gering. Im Gegensatz zu den T-Zellen ist die Gesamtzahl der

gezählten B-Zellen allerdings in beiden Experimenten und in beiden Mauslinien nicht signifikant unterschiedlich.

Die dagegen klar abgrenzbaren Populationen von Makrophagen und Mikroglia zeigen in beiden Experimenten eine Erniedrigung des Mikroglia/Makrophagen Koeffizienten in den *mog*^{+/+} Mäusen (Abb. 39A). Da man bei den Mikroglia von einer annähernd konstanten Zellpopulation ausgehen kann, ist eine signifikante Vermehrung von Makrophagen in den *mog*^{+/+} Mäusen im Vergleich zu *mog*^{-/-} Mäusen zu beobachten. Diese Ergebnisse müssen noch mit spezifischen Makrophagen und Mikroglia Antikörpern mittels FACS überprüft werden, damit andere Leukozyten, die ebenfalls unter den untersuchten Populationen sein können, ausgeschlossen werden.

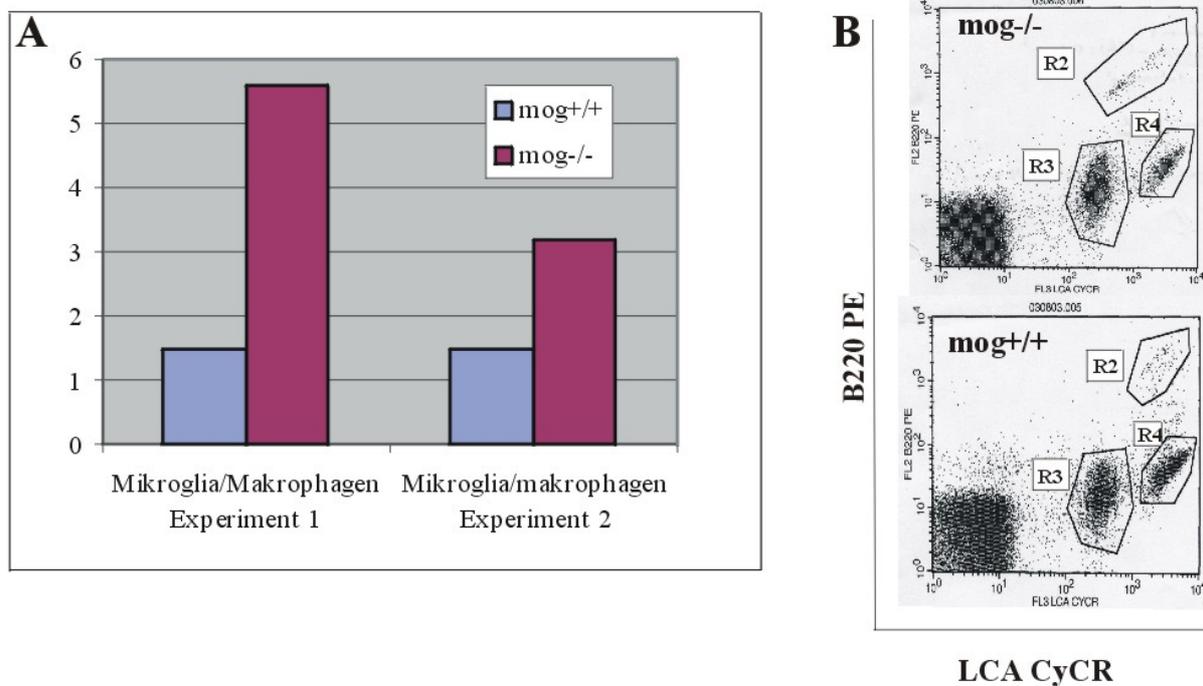


Abb. 39: A: Verhältnisse von Mikroglia zu Makrophagen in Gehirnen von *mog*^{+/+} und *mog*^{-/-} Mäusen (blauer Balken bzw. roter Balken). B: FACS Plot von LCA zu B220 markierten Zellen. R3 Mikroglia population; R4 Makrophagen population.

Da den Makrophagen bei der ZNS-Gewebeschädigung bei der EAE eine Hauptfunktion zugeschrieben wird, korreliert die erhöhte Makrophagenanzahl in den *mog*^{+/+} Mäusen gut mit den beobachteten klinischen Symptomen.

Dieses Experiment zeigt, dass sich die Immunantworten in *mog*^{+/+} und *mog*^{-/-} Maus nicht nur bei den klinischen Symptomen sondern auch auf zellulärer Ebene durch eine Erhöhung

der Makrophagen und CD4+ Zellen im Vergleich zu Mikroglia bzw CD8+ Zellen bei den mog+/+ Mäusen voneinander unterscheiden.

5.13 T-Zell Proliferationsassay

Zur Analyse der peripheren Immunantwort gegen MOG wurden Lymphozyten aus poplietalen und lingualen Lymphknoten rMOG immunisierter Mäuse 10-14 Tage nach Immunisierung isoliert. Es wurden Lymphozyten aus je vier Mäusen isoliert und wie von Mendel et al. (1995) beschrieben in 96-Loch Platten in Dreifachkultur zu je $4 \cdot 10^5$ Zellen pro Loch verteilt. Nach Zugabe von rMOG wurde zwei Tage bei 37°C inkubiert und dann für weitere 16h [³H]-Thymidine (1µCi/Loch) zugegeben. Die Lymphozyten wurden über Filter abgesaugt und im Szintillationszähler analysiert. Die Zunahme der Radioaktivität bei rMOG stimulierten Zellen ist ein direktes Maß für MOG spezifische aktivierte Lymphozyten in den untersuchten Mäusen. Abb. 40A zeigt für die aus den jeweiligen Mäusen isolierten Lymphozyten drei Messungen. Erstens die nur mit PBS stimulierten Zellen, zweitens und drittens die mit 0,5µg rMOG bzw. 2µg rMOG stimulierten Zellen. Die Stärke der Proliferation ist in der Abb. 39B in Vielfachen von den Werten für die Stimulation mit PBS angegeben.

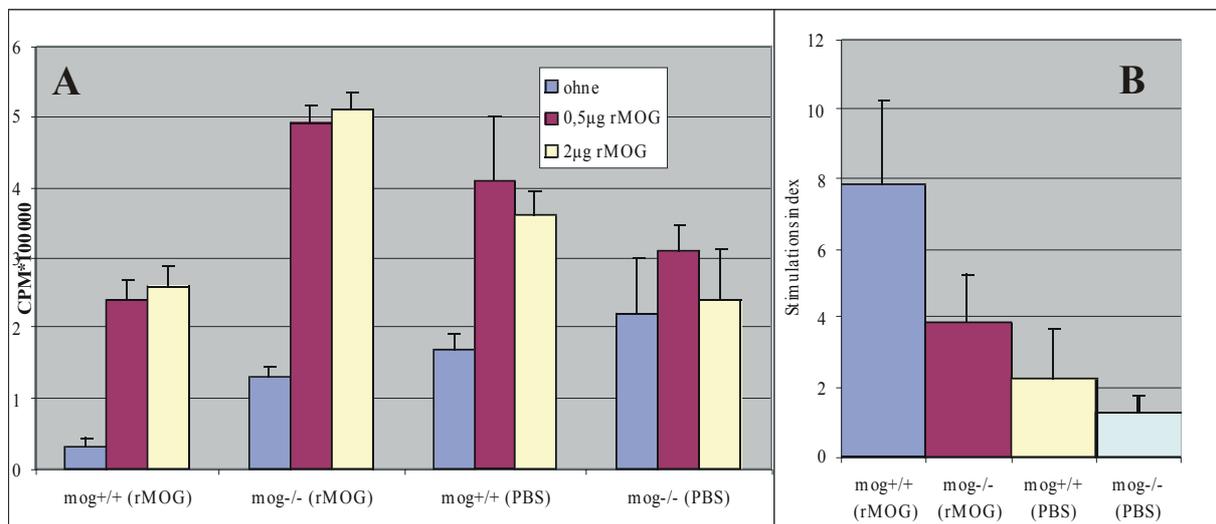


Abb. 40: T-Zell Proliferationsassay von Lymphozyten von je vier mog+/+ und mog-/- Mäusen die mit rMOG oder PBS immunisiert wurden. A: Proliferation nach in vitro Stimulation mit PBS oder rMOG. B: Stimulationsindex.

Man erkennt etwa achtfache Stimulation der T-Zellantwort in der rMOG immunisierten *mog*^{+/+} Maus, während in der rMOG immunisierten *mog*^{-/-} Maus nur eine Vervierfachung zu beobachten ist. Bei der PBS (in CFA mit Mycobakterium Tuberculosis emulgiert) und Pertussis Toxin Immunisierung konnte eine Verdoppelung in der *mog*^{+/+} und keine Erhöhung in der *mog*^{-/-} Maus nachgewiesen werden. Mit diesem Versuch wurde eine periphere T-Zell Aktivierung für die mit rMOG immunisierten Mäuse nachgewiesen werden, die für die *mog*^{-/-} Maus nur halb so stark war. Ferner wurde auch eine leicht erhöhte Aktivität bei den PBS immunisierten *mog*^{+/+} Mäusen beobachtet.

5.14 CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellverteilung nach in vitro Stimulation

EAE wird als CD4⁺ Zellen vermittelte Krankheit angesehen (Lublin, 2001; Zamvil und Steinman, 1990; Martin und McFarland, 1995; Flügel et al., 2001), auch wenn in jüngster Zeit Publikationen über den Effekt der CD8⁺ Zellen erschienen sind (Schroeter et al., 2003; Sun et al., 2001; Jiang et al., 2001). Den CD4⁺ Zellen schreibt man eine Hauptfunktion bei der ZNS Gewebeschädigung zu. Die gleichstarken Entzündungen der *mog*^{-/-} und *mog*^{+/+} Maus, aber ohne klinische Symptome in der *mog*^{-/-} Maus verlaufend, könnte durch eine Verringerung der rMOG spezifischen CD4⁺ Zellen verursacht werden.

Um dieser Frage nachzugehen, sollte die Verteilung von rMOG spezifischen CD4⁺ zu CD8⁺ Zellen in der Peripherie ermittelt werden.

Hierfür wurden analog zum T-Zell Proliferationsassay Lymphozyten aus rMOG immunisierten Mäusen und PBS immunisierten Mäusen isoliert und für drei Tage in vitro entweder mit 2µg rMOG oder PBS stimuliert. Die Zellen wurden anschließend mit CD4 und CD8 gekoppelten Fluoreszenzmarkern markiert und mittels FACS analysiert.

In Abb. 41 sind die jeweiligen Plots für die CD4 und CD8 positiven Zellen dargestellt. Die CD4⁺ (unten rechts) und CD8⁺ (oben links) Zellen konnten sehr gut separiert werden. Es wurden insgesamt pro Analyse 2000 Zellen gezählt. Die erhaltenen Ergebnisse für die Zellzahlen wurden umgerechnet in CD4/CD8- Quotienten und in Abb. 40B graphisch dargestellt. Für die in vitro nur mit PBS stimulierten Zellen ergibt sich ein Verhältnis von 2 für *mog*^{+/+} (rMOG) bis zu 4 für *mog*^{-/-} (rMOG). Bei den mit rMOG stimulierten Zellen der *mog*^{-/-} (rMOG) Maus ist der Quotient von 4 auf 1.4 deutlich reduziert, während bei den Zellen der anderen drei Mäuse kein signifikanter Unterschied festzustellen ist. Die Quotienten der mit PBS stimulierten Zellen sind im erwarteten Bereich. Bei den *mog*^{+/+} (rMOG) Zellen findet nach rMOG Stimulation eine leichte Zunahme statt, bei den beiden Kontrollgruppen

der PBS immunisierten Mäuse findet eine leichte Abnahme statt. Leider ist auch hier keine Bestimmung der absoluten Zellzahlen möglich. Deswegen kann man bei den in vitro mit rMOG stimulierten T-Zellen aus der *mog*^{-/-} (rMOG) Maus nicht ableiten worauf die Verkleinerung des CD4/CD8 Quotienten beruht. Es können die CD4⁺ Zellzahlen vermindert sein, die CD8⁺ Zellzahlen erhöht oder auch beides.

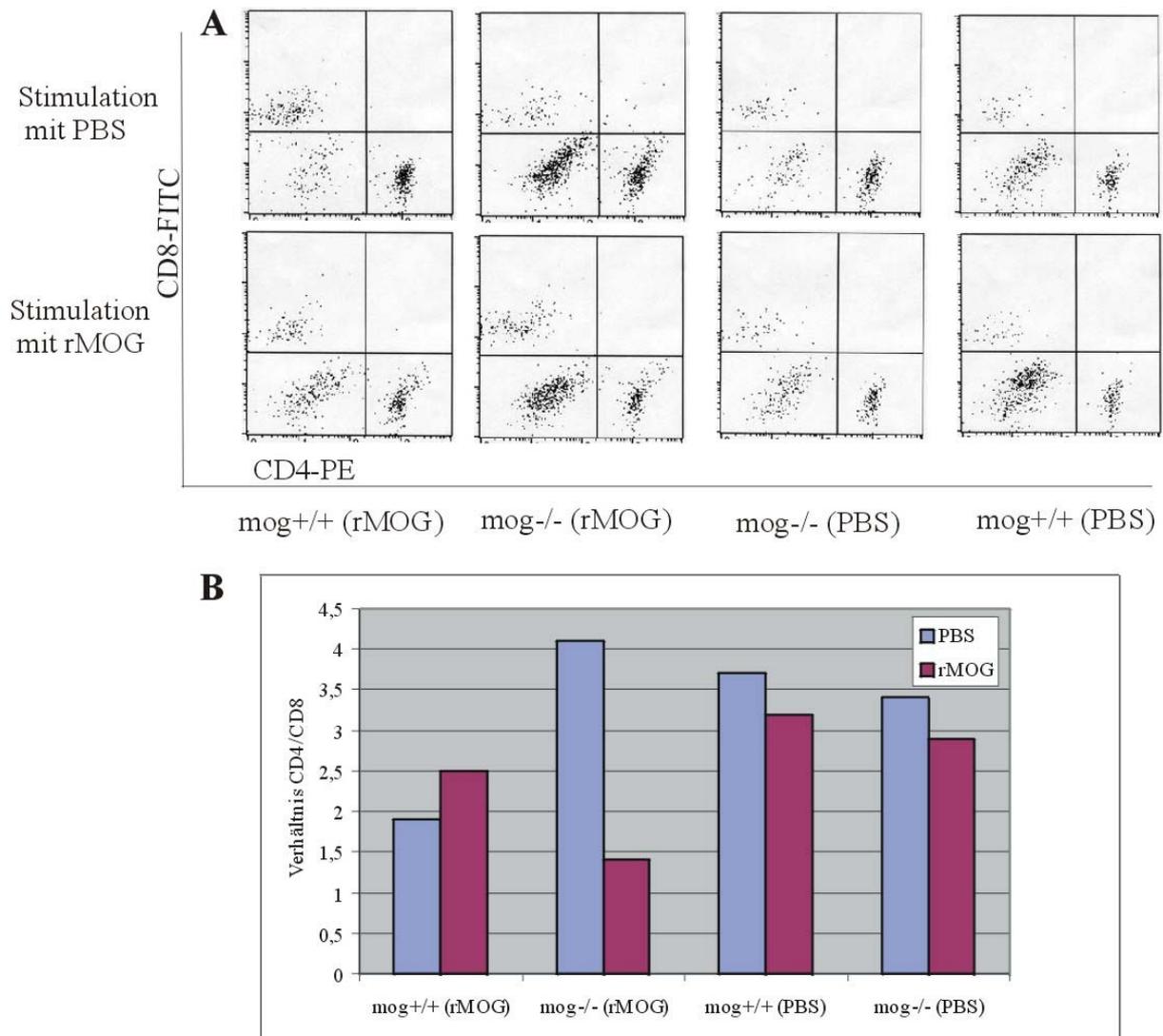


Abb. 41:A: FACS Plots der T-Zellen der mit rMOG oder PBS immunisierten Mauslinien und deren jeweilige in vitro Stimulation mit rMOG und PBS. B: Verhältnis der Signalintensitäten von CD4 zu CD8 positiven Zellen. Die blauen Balken zeigen die in vitro Stimulation mit PBS, die roten mit rMOG. Auf der X-Achse sind die mit rMOG und PBS immunisierten Mauslinien aufgeführt.

Dieses Experiment zeigt, dass sich die Immunantwort von *mog*^{+/+} und *mog*^{-/-} bei rMOG Immunisierung auch in der Peripherie unterscheidet. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied bei der in vitro Stimulierbarkeit mit rMOG von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen der beiden Mauslinien.

5.15 Analyse der IFN- γ sezernierenden Zellen in Milz, Gehirn und Rückenmark

IFN- γ gilt als proinflammatorisches Cytokin (Willenborg und Staykova, 2003; Santamaria, 2003). IFN- γ wird von zytotoxischen T-Zellen (CD8) und T-Helferzellen (CD4) des Typs 1 sezerniert (*T-helper1 cells*, Th1). Diese T-Zellen sezernieren eine ganze Reihe von proinflammatorischen Cytokinen wie TNF- α , IL-12 und unterscheiden sich dadurch von den Th2 Zellen, die nicht inflammatorische Cytokine ausschütten (TGF- β , IL-10 usw). Um die Spezifität der Immunantwort gegen MOG zu testen wurde ein *enzyme linked immunospot assay* (ELISPOT) durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird eine 96 Loch Platte mit einem Antikörper gegen ein Cytokin (hier IFN- γ) beschichtet. Anschließend werden auf dieser Platte Milzzellen von unbehandelten Mäusen der gleichen Mauslinie, die später untersucht werden sollen, für einige Stunden kultiviert. Diese Zellen dienen als Antigen präsentierende Zellen (APC). Danach werden Leukozyten aus mit rMOG immunisierten Mäusen mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. In diesem Experiment wurden T-Zellen aus je fünf Gehirnen und Rückenmarken aus immunisierten *mog*^{+/+} und *mog*^{-/-} Mäusen isoliert. Zur Untersuchung der peripheren T-Zellantwort wurden T-Zellen aus der Milz dieser Mäuse isoliert. Es wurden anders als bei Gehirn und Rückenmark nicht alle Zellen gepoolt, sondern nur T-Zellen aus je zwei Milzen. Die isolierten T-Zellen wurden in verschiedenen Verdünnungen von $1 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^4$ und $1 \cdot 10^5$ auf die 96-Loch Platte aufgetragen. Alle Zellen wurden vierfach verteilt; für Doppelbestimmungen und für die Negativkontrolle mit PBS. Nun wurde zur einen Hälfte das zur Immunisierung benutzte rMOG hinzugegeben und zur anderen die PBS-Kontrolle. rMOG spezifische CD8- und Th1- Zellen sezernierten IFN- γ , das nun direkt von den auf dem Plattenboden befindlichen Antikörpern gebunden wurde. Nach sorgfältigem Waschen wurden Biotin gekoppelte IFN- γ Antikörper an das gebundene IFN- γ gebunden und mit Streptavidin gekoppelter *horseradish peroxidase* (HPO) und Diaminobenzidin sichtbar gemacht. Die Analyse erfolgte durch Auszählen der Punkte in den einzelnen Löchern, die jeweils einer IFN- γ sezernierenden T-Zelle entsprechen und Abgleich mit den entsprechenden Negativkontrollen. Bei diesem Verfahren wird nicht zwischen unterschiedlich starken Signalen unterschieden, und damit der Anzahl der ausgeschütteten Moleküle pro Zelle, sondern es werden alle IFN- γ sezernierenden T-Zellen gezählt, deren IFN- γ Ausschüttung einen klar erkennbaren Punkt ergab.

Die in diesem Experiment gemachten Ergebnisse sind in Abb. 41 zusammengestellt. Die gezählten Spots in den untersuchten Milzen unterscheiden sich nicht signifikant zwischen *mog*^{+/+} und *mog*^{-/-} Maus. Die Milzen eins und zwei stammen von *mog*^{+/+} Mäusen mit

klinischen Symptomen des Schweregrades 1,5, während die Milzen 3 und 4 von Mäusen stammten die keine klinischen Symptome zeigten. Dies korrelierte mit der annähernden Verdreifachung der gezählten Spots in den *mog*^{+/+} Mäusen bei Milz eins und zwei. In Milz drei und vier zeigen die *mog*^{-/-} T-Zellen sogar eine etwas stärkere Reaktion gegen rMOG als die *mog*^{+/+} T-Zellen aus Mäusen ohne klinische Symptome. Dies ist ein Hinweis auf den vermuteten Zusammenhang zwischen proinflammatorischen (Th1 und CD8) T-Zellen und Gewebeschädigung (Zamvil und Steinman, 1990; Jiang et al., 2001).

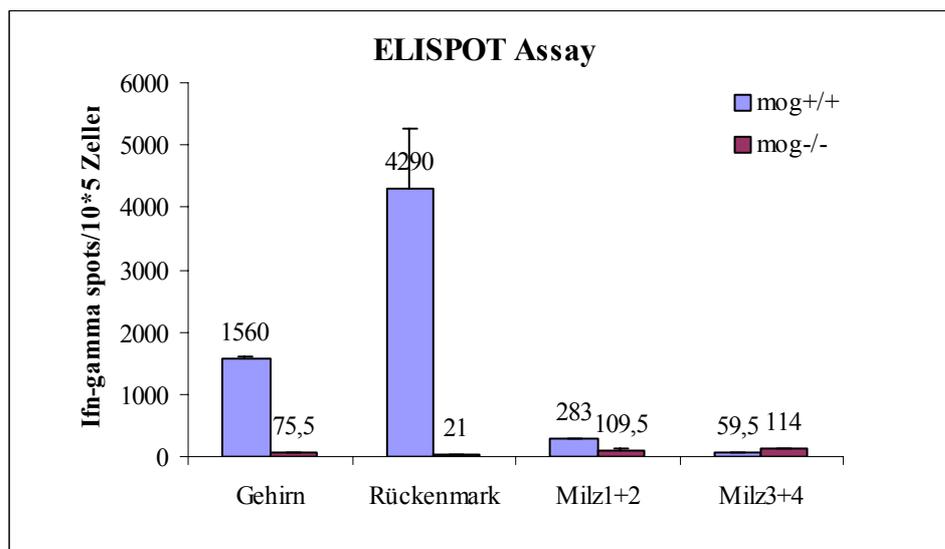


Abb. 42: Anzahl der Ifn- γ Spots pro 10^5 Leukocyten, die aus den jeweiligen Geweben isoliert wurden und in vitro mit rMOG stimuliert wurden.

Ein anderes Ergebnis lieferten die aus Gehirn und Rückenmark isolierten Zellen. Hier ist die Zahl der rMOG stimulierbaren IFN- γ sezernierenden Zellen in der *mog*^{+/+} Maus um das 20- bzw. 200-fache erhöht. Im Rückenmark der *mog*^{-/-} Maus ist nur jeder 5000ste Leukozyt eine rMOG spezifische Th1 oder CD8 Zelle, im Rückenmark der *mog*^{+/+} Maus dagegen jede 25ste.

Diese Abbildung zeigt die Spots pro 100000 Zellen und gibt die jeweiligen Anteile an den gesamten eingesetzten Leukozyten an. Die insgesamt pro Gehirn oder Rückenmark isolierten Zellen unterschieden sich in diesem und den vorangegangenen Versuchen um einen Faktor kleiner als drei. Da die rMOG spezifischen IFN- γ sezernierenden Zellen sich aber um die Faktoren 20 und 200 unterschieden, kann man von einer drastischen Reduktion dieser Zellen insgesamt in Gehirn und Rückenmark in der *mog*^{-/-} Maus ausgehen.

Tabelle 6 gibt eine Zusammenfassung über die bisher beschriebenen Ergebnisse.

	Klinik	Histologie	Serumanalyse		Lymphknotenpräparation		
	Lähmungen	Inflammation	MOG Ab-Titer	Kreuz-reaktivität von Antikörpern	rMOG in vitro T-Zellproliferation aus Lymphknoten	CD4/CD8 nach in vitro PBS Stimulation	CD4/CD8 nach in vitro rMOG Stimulation
mog+/+	20 (24)	8 (8)	1:500	nein	8x	2	2,5
mog-/-	0 (17)	8 (8)	1:500	nein	4x	4	1,5

	Leukozyteninsolation aus Gehirn				ELISPOT IFN- γ sez. T-Zellen pro 100000		
	Leukozyten pro Gehirn (x100000)	CD4/CD8 aus Gehirn	B-Zell Anteil an Leukozyten aus Gehirn	Makrophagen/Mikroglia aus Gehirn	Gehirn	Rückenmark	Milz
mog+/+	1-4	2	>1%	6/9	1560	4290	170
mog-/-	1-4	1,1	>1%	2/9	75	21	112

Tab. 6: Übersicht über die Ergebnisse der rMOG Immunisierungen von mog+/+ und mog-/- Mäusen.

Die signifikantesten Unterschiede zeigen die Lähmungserscheinungen und die Ergebnisse des ELISPOT aus Zellen des Gehirns und Rückenmarks. Alle immunhistochemisch analysierten Mäuse zeigten Entzündungen und gleiche B-Zell Antworten bei der Serumanalyse.

5.16 Nachweis von Demyelinisierungen mit Luxol Fast Blue

Da Lähmungen der Mäuse mit Demyelinisierungen korrelieren sollten, wurden Luxolfärbungen der Gehirnschnitte angefertigt, um entmarkte Regionen aufzuzeigen.

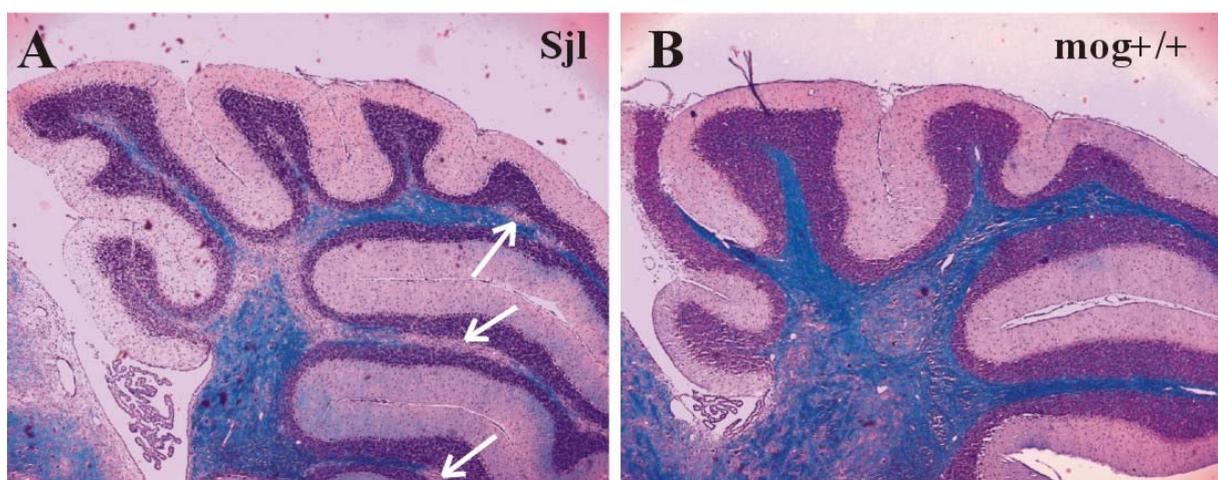


Abb. 43: Luxol gefärbte Paraffinschnitte von immunisierten Mäusen. A: Kleinhirn einer Sjl Maus mit unregelmäßiger Blaufärbung. Die Pfeile zeigen nicht gefärbte Regionen bei denen es sich um Demyelinisierungen handeln könnte. B: Kleinhirn einer mog+/+ Maus mit durchgehender Blaufärbung und keinerlei Anzeichen für eine Entmarkung. (Vergrößerung: 10x)

Demyelinisierungen lassen sich am besten im Kleinhirn nachweisen, weil hier eine starke gleichmäßige Färbung der Myelinfasern mit Luxolfärbung erhalten wird. In den restlichen Gehirnbereichen hingegen erschwert die insgesamt schwächere und weniger homogene Färbung eine genaue Beurteilung. In den Sjl Mäusen wurden Bereiche im Kleinhirn mit schwacher bzw. fehlender Blaufärbung beobachtet (Abb. 43A), die auf demyelinisierte Bereiche hindeuten. Diese Bereiche scheinen frei von Infiltraten zu sein. Diese Beobachtung wird auch bei demyelinisierten MS-Plaques häufig gemacht. Die Gebiete um die perivaskulären Inflammationen herum zeigten dagegen mit Luxolfärbung keine Demyelinisierungen (ohne Abbildung). Die Analyse der C57/Bl6, mog^{+/+} und mog^{-/-} Mäuse ergab dagegen keine Hinweise auf Demyelinisierungen. Bei den mog^{+/+} und mog^{-/-} Mäusen konnte dieses Ergebnis erwartet werden, da schon in der H/E Färbung keine Infiltrate nachweisbar waren. In der C57/Bl6 Maus waren dagegen Inflammationen mit H/E Färbung nachzuweisen. Das Fehlen der Demyelinisierungen könnte mit der geringeren Symptomatologie der Krankheit einhergehen. Wie aus Tab 4 ersichtlich liegt der klinische Schweregrad der C57/Bl6 Mäuse um über einen Punkt unter denen der Sjl Mäuse. Da in der Luxolfärbung kleine demyelinisierte Bereiche, wenn diese nicht scharf von myelinisierten Arealen abgegrenzt sind, schwierig zu erkennen sind, ist es denkbar, dass vorhandene Demyelinisierungen nicht erkannt werden.

5.17 Nachweis von Demyelinisierungen an Semidünnschnitten und durch Elektronenmikroskopie

Die Tatsache, dass die mog^{+/+} Mäuse Lähmungen zeigten nicht aber die mog^{-/-} Mäuse, sollte sich auf zellulärer Ebene widerspiegeln. Da die Luxolfärbung nicht ausreichend empfindlich war, um Unterschiede in der Stärke der Gewebsschädigungen zwischen mog^{+/+} und mog^{-/-} Maus zu identifizieren, wurden Semidünnschnitte von Rückenmark und Nervus opticus angefertigt.

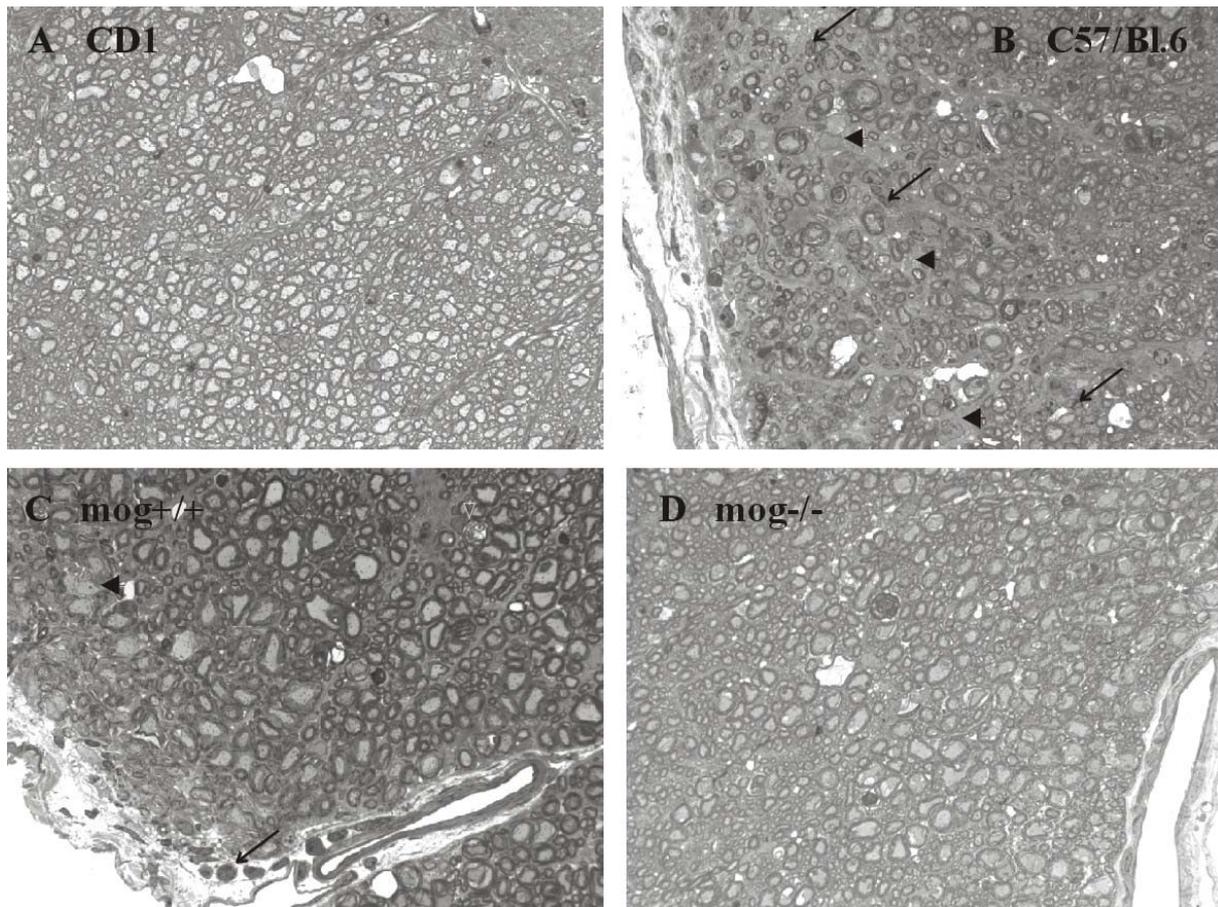


Abb. 44: Semidünnschnitte des Rückenmarks von: A: nicht immunisierter CD1 Maus (Wt); B: immunisierter C57/Bl.6 Maus; C: *mog*^{+/+} Maus; D: *mog*^{-/-} Maus. (Vergrößerung: 700x)

Es wurden nicht immunisierte CD1 Mäuse (Wt) mit immunisierten C57/Bl.6, *mog*^{+/+} und *mog*^{-/-} Mäusen verglichen. Hierfür wurden die Mäuse mit Paraformaldehyd perfundiert. Nervus opticus und Rückenmark präpariert und in Epoxy Harz eingebettet.

Das Rückenmark der C57/Bl.6 Maus zeigt starke Gewebeschäden. Es finden sich zahlreiche Bereiche mit demyelinisierten Axonen oder einem Fehlen intakter Zellstrukturen (Abb 44, Pfeilspitzen). Desweiteren ist eine Vielzahl von Zellkernen zu erkennen. Bei einer großen Zahl von diesen handelte es sich wahrscheinlich um eingewanderte Leukozyten (lange Pfeile). Im Vergleich zur CD1 Maus ist das Ausmaß der Gewebeschädigung und die verringerte Axondichte eindeutig zu erkennen. Die beobachteten Lähmungserscheinungen der C57/Bl.6 Mäuse lassen sich anhand dieser Bilder erklären. Zusätzlich lieferten die Semidünnschnitte der C57/Bl.6 Maus eine Erklärung für die in der Luxolfärbung nicht erkennbare Demyelinisierung. Vergleicht man CD1 und C57/Bl.6 Maus, so sind in letzterer immer noch zahlreiche myelinisierte Axone zu erkennen, die möglicherweise für eine Luxol Blaufärbung dieses beschädigten Bereiches ausreichen würden.

Für $\text{mog}^{+/+}$ und $\text{mog}^{-/-}$ waren die Semidünnschnitte weniger eindeutig. In der gezeigten Abbildung 44 ist für die $\text{mog}^{+/+}$ Maus eine geringere Axondichte als bei der CD1 Maus zu beobachten, außerdem sind vereinzelt demyelinisierte Axone zu beobachten (Pfeilspitze). Die hohle Pfeilspitze zeigt ein zerstörtes Axon, an dem offensichtlich ein Leukozyt anliegt. Bei dieser Vergrößerung lassen sich Leukozyten nur schwer von Oligodendrozyten unterscheiden. Die zum äußeren Rand hin zunehmende Gewebszerstörung wurde zur Beurteilung nicht herangezogen, da diese auch durch mechanische Beschädigungen bei der schwierigen Rückenmarkspräparation entstanden sein könnten. Der Vergleich von zahlreichen Regionen des Rückenmarks und des Nervus opticus zeigte aber, dass die in dieser Abbildung zu sehenden Schädigungen signifikant waren. Interessant ist die Kolonne von Leukozyten, die offensichtlich in den Arachnoidalraum eingewandert ist. Diese Beobachtung bestätigt die bereits bei der Färbung von Kryoschnitten mit LCA gemachten Ergebnisse (siehe Abb. 34), die hohe Konzentrationen von Leukozyten in den Meningen von $\text{mog}^{+/+}$ und $\text{mog}^{-/-}$ Mäusen zeigten.

In der $\text{mog}^{-/-}$ Maus zeigte sich für das Rückenmark ein der CD1 Maus ähnliches Bild. Es waren keine Infiltrate oder demyelinisierte Axone nachzuweisen. Nur die Anzahl an Axonuntergängen schien erhöht. (Im Nervus opticus wurden dagegen dieselben Beobachtungen gemacht wie für die $\text{mog}^{+/+}$ Maus im Rückenmark, weshalb der Nervus opticus von später immunisierten Mäusen auch noch untersucht wurde (siehe S. 92).

Im Anschluss an die Lichtmikroskopische Analyse wurden Ultradünnschnitte angefertigt und elektronenmikroskopisch untersucht. Wie in Abbildung 45 zu sehen, ist die Fixation des Gewebes nicht optimal gelungen, da die Myelinscheide dekomprimiert war, und wurde in Präparaten aller vier untersuchten Mäuse beobachtet. Da das Hauptaugenmerk auf Demyelinisierungen gerichtet war, konnten die Schnitte trotzdem zur Analyse benutzt werden.

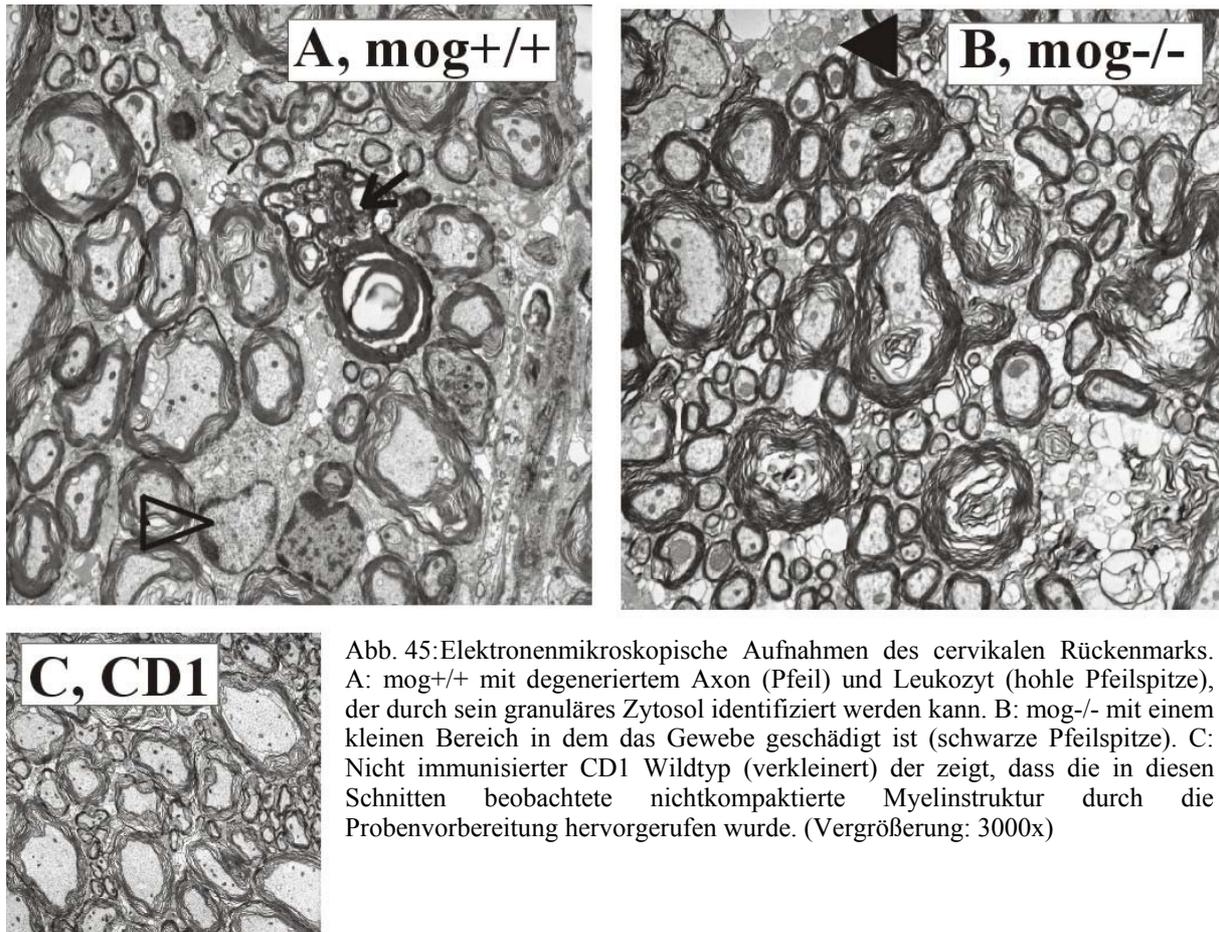


Abb. 45: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des cervikalen Rückenmarks. A: mog^{+/+} mit degeneriertem Axon (Pfeil) und Leukozyt (hohle Pfeilspitze), der durch sein granuläres Zytosol identifiziert werden kann. B: mog^{-/-} mit einem kleinen Bereich in dem das Gewebe geschädigt ist (schwarze Pfeilspitze). C: Nicht immunisierter CD1 Wildtyp (verkleinert) der zeigt, dass die in diesen Schnitten beobachtete nichtkompaktierte Myelinstruktur durch die Probenvorbereitung hervorgerufen wurde. (Vergrößerung: 3000x)

Mit den elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten die im Semidünnschnitt gemachten Beobachtungen bestätigt werden. Es zeigte sich eine im Vergleich zur nicht immunisierten Maus erhöhte Zahl von degenerierten Axons in der mog^{+/+} und mog^{-/-} Maus. Es wurden infiltrierende Zellen (höchst wahrscheinlich Leukozyten) und Bereiche mit Gewebsschädigungen nachgewiesen. Während in der C57/Bl.6 Maus die Demyelinisierungen bestätigt werden konnten, wurden weder bei der mog^{+/+} noch der mog^{-/-} Maus größere zusammenhängende demyelinisierte Bereiche entdeckt. Für die mog^{+/+} Maus fehlten also die typischerweise bei der EAE zu beobachtenden Entmarkungsherde, während diese für die mog^{-/-} Maus wegen der fehlenden Symptome auch nicht erwartet wurde. Die Abbildung 45 zeigt beim Rückenmark der mog^{+/+} Maus ein degeneriertes Axon (schwarzer Pfeil) und offensichtlich einen Leukozyten (hohler Pfeil). Bei genauem Hinsehen erkennt man dessen mit zahlreichen Partikeln gefülltes Zytoplasma, das in engem Kontakt zum Myelin des großen Axons links oben steht.

Die Abbildung des Rückenmarks der mog^{-/-} Maus zeigt keine degenerierten Axone und scheint eine höhere Axondichte aufzuweisen als die mog^{+/+} Maus. Der mit der Pfeilspitze markierte Bereich könnte eine Gewebeschädigung (Demyelinisierung) darstellen.

5.18 Unterschiede zwischen $mog^{+/+}$ und $mog^{-/-}$ in Semidünnschnitten und elektronenmikroskopischer Analyse

Beide Mäuse zeigen Infiltrate, degenerierte Axone, demyelinisierte Axone und Bereiche zerstörten Gewebes. Die Anzahl im ZNS beobachteter Immunzellen ist an den hier verwendeten ungefärbten Schnitten schwer zu beurteilen und ist bereits durch die Immunhistochemie untersucht worden (Abb. 33).

Es wurden mehrere Schnittebenen aus Rückenmark und Nervus opticus analysiert und qualitativ miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass in der $mog^{+/+}$ Maus deutlich häufiger degenerierte und demyelinisierte Axone zu finden waren als in der $mog^{-/-}$ Maus. Diese Beobachtung wird auch gut durch Abbildung 33 dokumentiert. Ob dieser Unterschied ausreicht, die Lähmungen der $mog^{+/+}$ Maus zu erklären, während die $mog^{-/-}$ keine Lähmungen zeigt, konnte nicht zuverlässig gezeigt werden. Das Problem besteht darin, dass man immer nur einen kleinen Teil des Rückenmarks oder Nervus opticus mittels Semidünnschnitt und Elektronenmikroskopie untersuchen kann. Deshalb ist es durchaus möglich, dass die Entmarkungsherde in der $mog^{+/+}$ Maus nicht in den geschnittenen Bereichen lagen.

5.19 Elektronenmikroskopie des Nervus opticus von $mog^{-/-}$ Mäusen

Da die $mog^{-/-}$ Maus im Nervus opticus anders als im Rückenmark eine der $mog^{+/+}$ Maus vergleichbare Demyelinisierung zeigte, sollte dieses Ergebnis mit weiteren optischen Nerven näher untersucht werden. Hierfür wurde eine weitere Maus aus derselben immunisierten Gruppe wie bei dem vorangegangenen Experiment benutzt. Diesmal wurden die Mäuse mit einer Mischung aus Glutaraldehyd und Formaldehyd perfundiert und elektronenmikroskopisch untersucht.

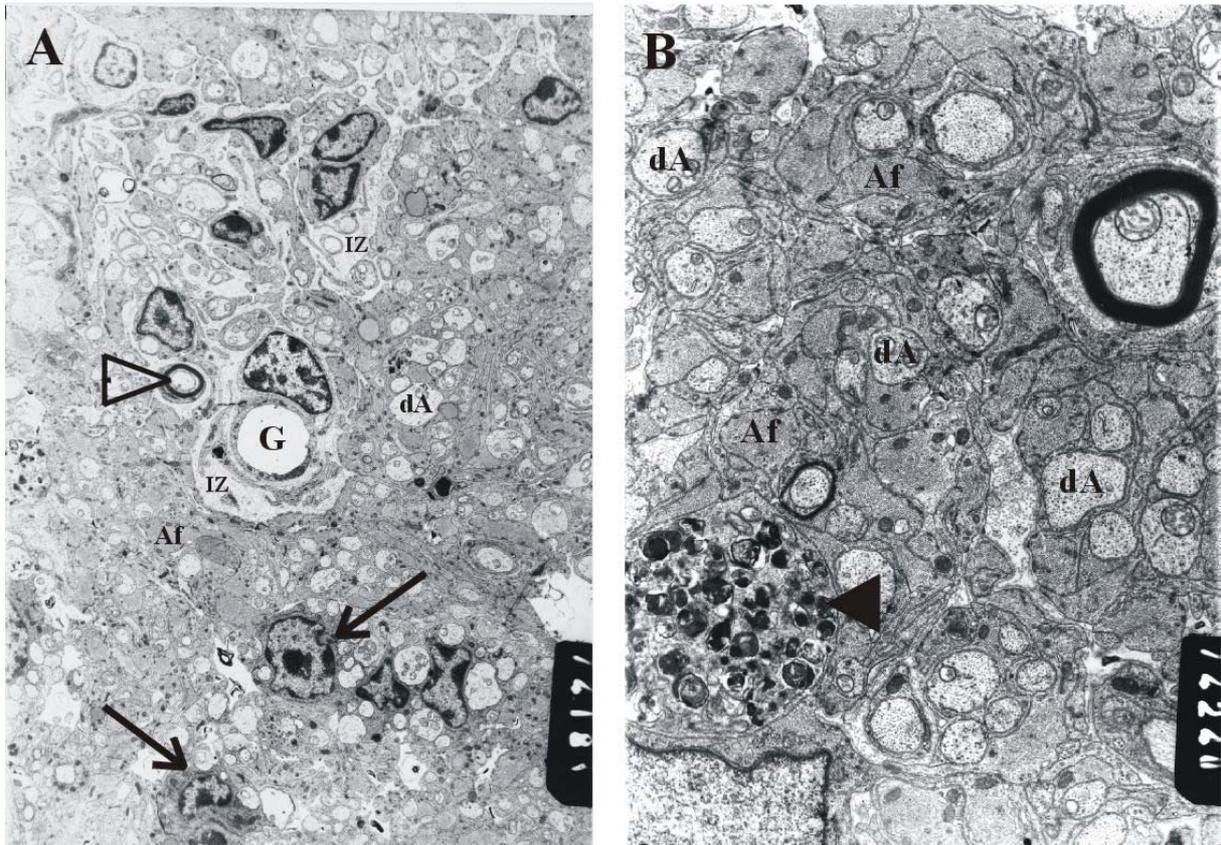


Abb. 46: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Nervus Optikus einer immunisierten *mog*^{-/-} Maus. A: Komplette Demyelinisierung um ein Blutgefäß, mit einem von einer Schwann Zelle remyelinisierten Axon. Es sind zahlreiche Leukozyten zu erkennen und ein vergrößerter Interzellularraum. B: Ein offensichtlich ruhender Herd, ohne Infiltrate, mit demyelinisierten Axonen und zwei myelinisierten Axonen und einem Axonuntergang. Hohler Pfeil: Von Schwann Zelle remyelinisiertes Axon; Pfeile: Offensichtlich Makrophagen, die mit ihren Zellausläufern einige Axone umschlingen; Pfeilspitze: Axonuntergang; dA: demyelinisierte Axone; Af: Astrozytenfortsätze; IZ: Interzellularraum; G: Blutgefäß. (Vergrößerung: A: 5600x; B: 16800x)

Bei der Maus aus der Immunisierungsgruppe, aus der bereits eine *mog*^{-/-} Maus die zuvor beschriebenen Demyelinisierungen im Nervus opticus zeigte, wurden die in Abbildung 44 gezeigten Beobachtungen gemacht.

Interessanterweise war der gesamte optische Nerv nahezu vollständig demyelinisiert. Abb. 46A zeigt einen Querschnitt durch einen offensichtlich aktiven Entmarkungsherd. Es sind zahlreiche eingewanderte Zellen zu erkennen. Die beiden mit Pfeilen gekennzeichneten sind sehr wahrscheinlich Makrophagen, was an deren granulärem Zytoplasma zu erkennen ist. Man erkennt, dass diese mit ihrem Zytoplasma in engem Kontakt zu Axonen stehen und einige Axone gänzlich umschlossen haben. Es sind keine myelinisierten Axone mehr vorhanden. Interessanterweise ist aber ein remyelinisiertes Axon zu sehen (hohler Pfeil) welches von einer in das ZNS eingewanderten Schwann Zelle –wie von Büssow (1978)

beschrieben- ummantelt wurde. Deutlich zu erkennen ist der vergrößerte Interzellularraum, ein weiteres Indiz für eine Entzündungsreaktion, die typischerweise mit einem Einstrom von Gewebsflüssigkeit verbunden ist.

In Abbildung 46B sind keine Infiltrate zu erkennen, der Interzellularraum ist nicht vergrößert. Die akute Entzündungsreaktion ist offensichtlich abgeklungen und die Zwischenräume zwischen den übriggebliebenen nicht myelinisierten Axonen sind durch Astrozytenfortsätze aufgefüllt, was bei MS die typische Vernarbung darstellt (*gliotic scar*) (Fawcett und Asher, 1999). Außerdem ist noch ein degeneriertes Axon zu sehen.

Diese Abbildungen zeigen die charakteristischen Merkmale eines akuten demyelinisierenden Plaques (Abb. 46A) und eines chronischen Plaques (Abb. 46B). Diese Untersuchungen legten den Verdacht nahe, dass die mog-/- Mäuse offensichtlich nur im Nervus opticus demyelinisiert wurden und deshalb keine Lähmungen zeigten. Deshalb wurden drei weitere mog-/- Mäuse aus drei weiteren separaten Immunisierungen untersucht. Die drei untersuchten optischen Nerven zeigten keinerlei Anzeichen einer durch die Immunisierung hervorgerufenen Veränderung und waren von denen nicht immunisierter Mäuse nicht zu unterscheiden. Damit zeigten nur die Mäuse aus einer bestimmten Immunisierung (der ersten mit Pertussis Toxin) dieses Phänomen, während zu einem späteren Zeitpunkt immunisierte keine Demyelinisierungen des Nervus opticus zeigten.

5.20 Immunisierung neun Monate alter Mäuse mit rMOG

Bei MS Patienten besteht eine Korrelation zwischen Ausbruch und Schwere der Krankheit, je später die Krankheit ausbricht, desto schwerer ist allgemein der Krankheitsverlauf (Leibowitz et al., 1964). Im Mausmodell EAE gibt es nur wenige Untersuchungen zur altersabhängigen Ausprägung der Krankheit (Smith et al., 1999). Um zu überprüfen, welche Rolle das Alter der Mäuse zum Zeitpunkt der Immunisierung spielt, wurden je fünf 9 Monate alte mog+/+ und mog-/- Mäuse mit rMOG immunisiert. Normalerweise werden alle EAE Experimente an Mäusen im Alter zwischen 6 und 14 Wochen ausgeführt. Dieses Experiment könnte Erklärungshinweise für die teilweise sehr inhomogenen Ergebnisse geben, die in der Literatur beschrieben sind und auch in dieser Arbeit gemacht wurden (siehe Demyelinisierungen des Nervus opticus). Bei einem deutlich schwereren Krankheitsverlauf der EAE entsprechend der MS bei älteren Mäusen, könnte man herausfinden, ob der elektronenmikroskopisch gezeigte

leichte Gewebeschaden (Demyelinisierung, Axondegeneration) in den *mog*^{-/-} Mäusen sich so weit verstärkt, dass es auch bei den *mog*^{-/-}-Mäusen zu Lähmungen kommt.

Tatsächlich zeigten diese Mäuse überraschend große Unterschiede im Krankheitsverlauf zu den bisher beobachteten maximal 14 Wochen alten Mäusen. Die fünf *mog*^{+/+} Mäuse zeigten eine kontinuierliche Gewichtsabnahme und extrem schwere Lähmungen, die auch um einige Tage früher einsetzten. Der durchschnittliche maximale Schweregrad betrug ca. 3,5 und war damit deutlich höher als bei den Experimenten zuvor. Zwei Mäuse starben bereits nach Tag 18 bzw. Tag 24. An Tag 28 nach der Immunisierung wurde eine Maus zur Analyse geopfert, die beiden verbliebenen Mäuse starben an Tag 28 und 36. Alle wiesen eine komplette Lähmung der vier Gliedmaßen auf (Tetraplegie) und waren nicht mehr in der Lage sich im Käfig fortzubewegen. Tetraplegie wurde bei den max. 14 Wochen alten Mäusen nie beobachtet. Die Mäuse verloren ca. 50% ihres Gewichts und damit doppelt so viel wie bei den Experimenten zuvor beobachtet. Überraschenderweise zeigten auch die *mog*^{-/-} Mäuse eine kontinuierliche wenn auch geringere Gewichtsabnahme, als die *mog*^{+/+} Mäuse. Anders als die *mog*^{+/+} Mäuse erreichten diese ein Plateau, das in Abbildung 47 für die letzten zwei Tage zu erkennen ist und nicht mehr in die Grafik aufgenommen wurde. Zusätzlich zeigten sie als einzige in dieser Arbeit untersuchten Mäuse leichte klinische Symptome vom Schweregrad 1. Auch die klinischen Symptome klangen leicht ab und erreichten ein Plateau bei ca. 0,5. Interessant ist der um ca. 7 Tage verzögerte Ausbruch von Lähmungserscheinungen der *mog*^{-/-} Mäuse.

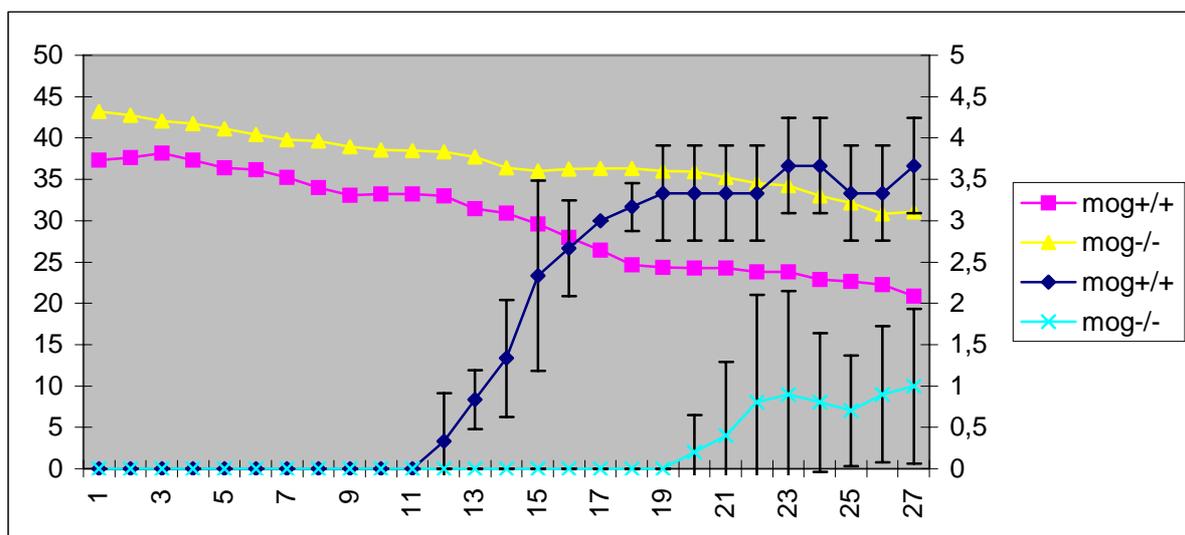


Abb. 47: Kontinuierliche Gewichtsabnahme von immunisierten Mäusen und der Verlauf der klinischen Symptome (linke bzw. rechte Y-Achse). Auch die *mog*^{-/-} Mäuse zeigten leichte klinische Symptome, die um ca. eine Woche verzögert auftraten.

5.21 Immunhistochemische Untersuchungen der neun Monate alten Mäuse

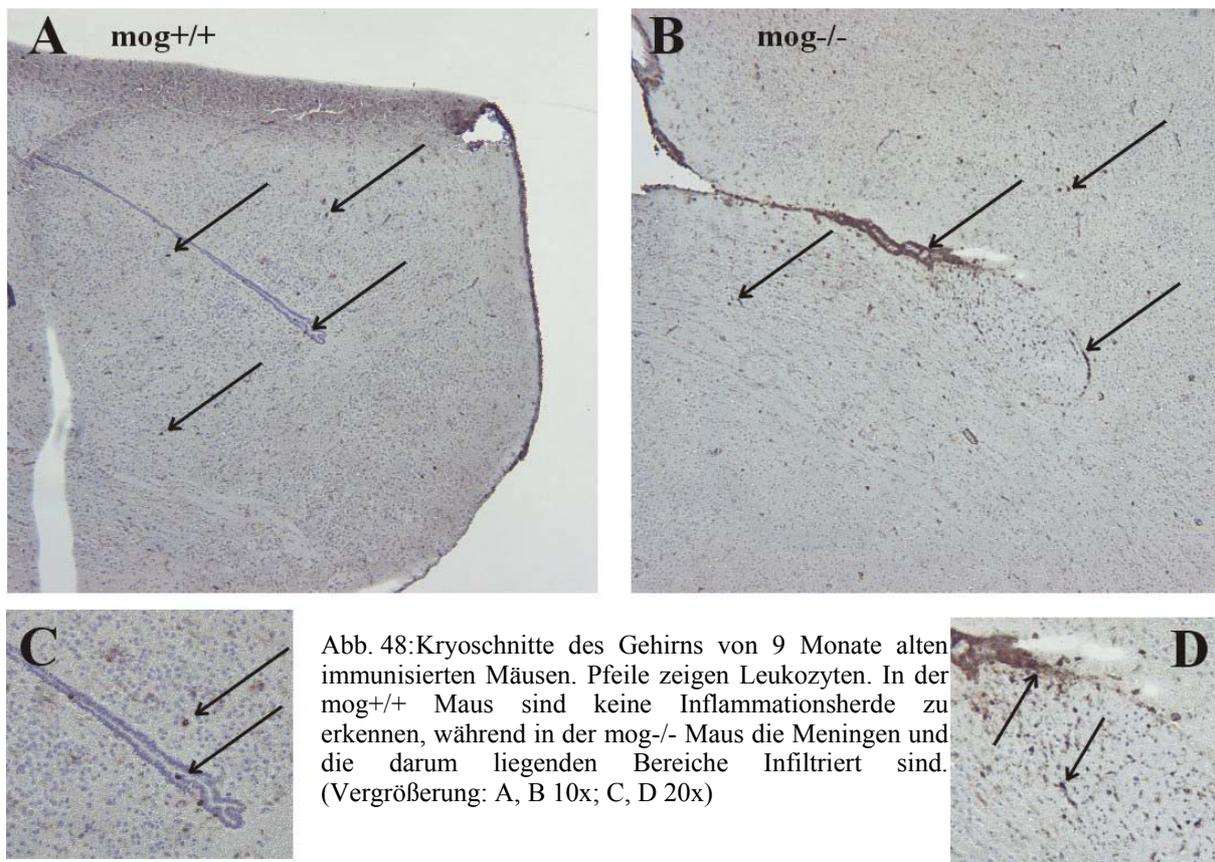
Es wurden Kryoschnitte des Nervus opticus, des Rückenmarks und des Gehirns angefertigt. Die Untersuchung des Gehirns ergab mittels LCA Färbung eine geringe Anzahl von Infiltraten in mog^{+/+} und mog^{-/-} Maus. Es wurden maximal zwei Infiltrationsherde pro Schnitt beobachtet, von denen entsprechende Bereiche in Abb. 48 dargestellt sind. Im Gehirn der mog^{+/+} Maus sind, fast gleichmäßig im Gewebe verteilt, Leukozyten zu erkennen. In der mog^{-/-} Maus ist eine deutliche Ansammlung von Leukozyten in der Hirnhaut zu beobachten, von der aus zahlreiche Leukozyten in das umliegende Gewebe eingewandert sind. Im Vergleich zu den bisher gemachten Untersuchungen der Gehirne bei jüngeren Mäusen unterscheiden sich die Infiltrationen im Gehirn dieser 9 Monate alten Mäuse nicht. Damit scheint die bisher gemachte Beobachtung, dass sich im Gehirn nur milde Infiltrationen zeigen, die unabhängig vom Schweregrad der Lähmungen in mog^{+/+} und mog^{-/-} Mäusen waren, auch für die 9 Monate alten Mäuse zu bestätigen.

Ebenso wurden in den optischen Nerven dieser Mäuse keine Leukozyten nachgewiesen (nicht dargestellt).

Im Gegensatz zu diesen geringen Infiltrationen war das gesamte analysierte Rückenmark in mog^{+/+} und mog^{-/-} Mäusen von Leukozyten bevölkert (Abb. 49). Die untersuchten Längsschnitte zeigten in der mog^{+/+} Maus eine nahezu gleichmäßige Infiltration des gesamten Gewebes ohne die normalerweise beobachteten perivaskulären Entzündungsherde. Große Ansammlungen von Leukozyten wurden dagegen im gesamten Zentralkanal und in den äußeren Randbereichen beobachtet (Pfeilspitzen Abb. 49).

In der mog^{-/-} Maus ist eine noch massivere Infiltration als in den mog^{+/+} Mäusen zu erkennen. In dem hier gezeigten Ausschnitt (Abb. 49) sind auch perivaskuläre Herde zu erkennen. Der hier dargestellte Bereich wies die stärksten Entzündungen auf. Andere Bereiche desselben Rückenmarks zeigten ein der mog^{+/+} Maus gleiches Bild. Es ist erstaunlich, dass die hier untersuchte mog^{-/-} Maus nur einen Schweregrad der Lähmungen der Stufe 1 aufwies, während die mog^{+/+} Maus den Schweregrad 4 zeigte, wenn man die Zahl der Leukozyten im ZNS des Rückenmarks beider Mäuse miteinander vergleicht. Eine Erklärung hierfür könnte in der unterschiedlichen Rekrutierung proinflammatorischer (z.B. CD8- und Th1-Zellen) und regulatorischer (z.B. Th2-Zellen) Zellen liegen. Diese Möglichkeit ist durchaus wahrscheinlich, da bereits durch den ELISPOT Assay gezeigt wurde, dass in der mog^{-/-} Maus deutlich weniger IFN- γ (ein proinflammatorisches Zytokin) sezernierende rMOG spezifische Zellen im Rückenmark vorhanden sind. Um einen qualitativen Überblick

über die verschiedenen Zellen im Rückenmark zu erhalten, wurden die Schnitte mit CD4, CD8 und F4/80 zur Detektion von T-Helferzellen, Zytotoxischen Zellen und Makrophagen immungefärbt. Wie erwartet waren die meisten Zellen Makrophagen, während die Zahl der CD4 positiven T-Helferzellen deutlich geringer waren und sich hauptsächlich im perivaskulären Raum, um den Zentralkanal und in den Meningen fanden. Noch geringer war die Zahl der CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen, die ein ähnliches Verteilungsmuster hatten wie die CD4 Zellen.



Warum in der *mog*^{+/+} Maus keine perivaskulären Inflammationsherde nachgewiesen werden konnten, ist möglicherweise durch eine ungünstige Schnittebene erklärbar. Wie bereits erwähnt, handelt es sich um Kryoschnitte von Mäusen die nur mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9%) ohne Fixierungsmittel wie Formaldehyd oder Glutaraldehyd erhalten wurden. Das Freilegen des Rückenmarks ohne Beschädigung ist äußerst schwierig. Dadurch kam es bei der Präparation teilweise zu Verdrehungen des Marks oder zu beschädigten Bereichen. Ein weiteres großes Problem stellte die starke Adhäsion und Weichheit des unfixierten Marks selbst dar. Dies erschwerte die Orientierung der Objekte und könnte die histologische Auswertung erschweren (Zahl der Infiltrate, Entzündungsherde).

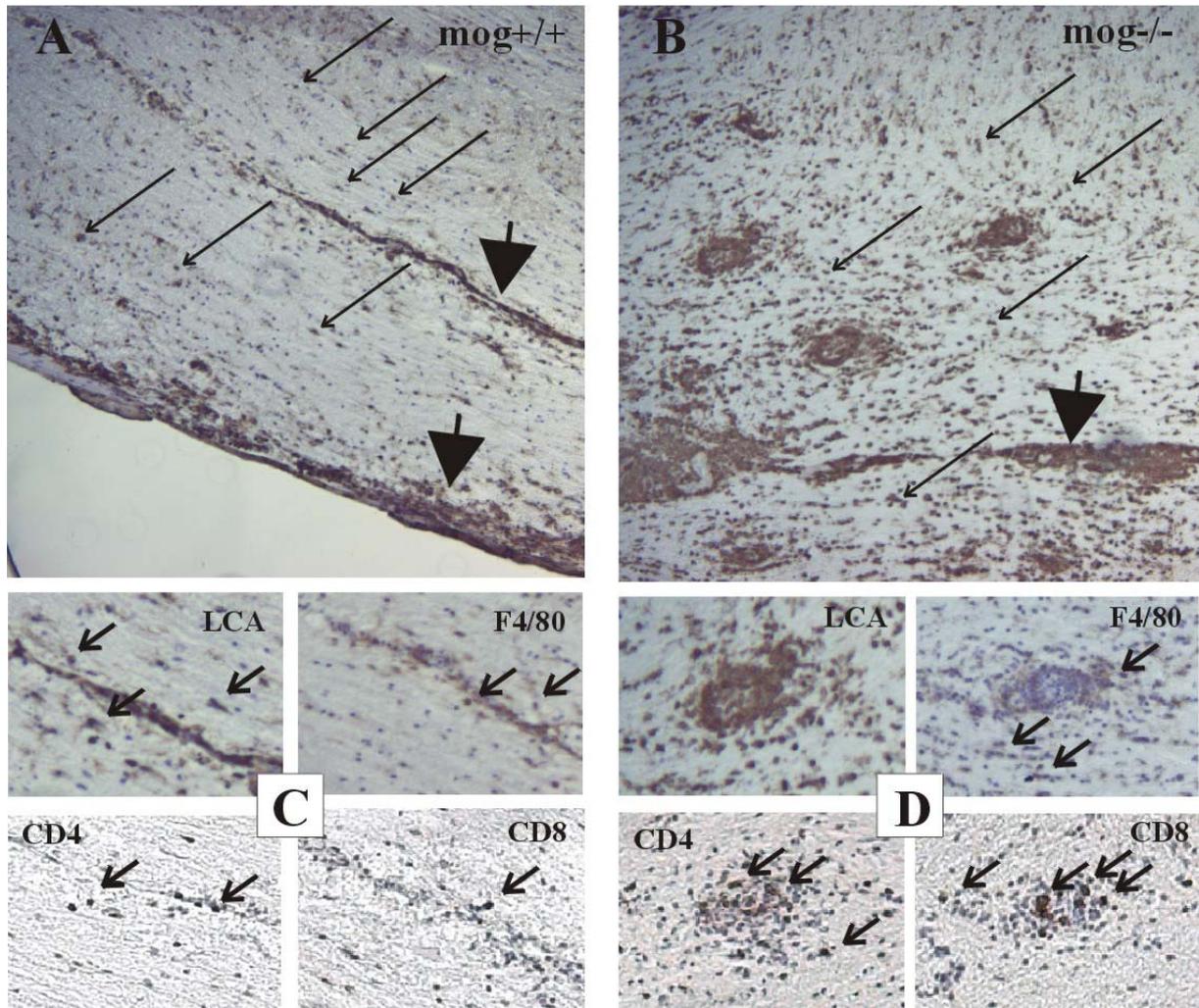


Abb. 49: Kryoschnitte des Rückenmarks 9 Monate alter immunisierter Mäuse. A und B: Übersicht mit LCA gefärbt. In beiden Mäusen sind Leukozyten über das gesamte Gewebe verteilt (Pfeile zeigen einige davon). Inflammationsherde zeigen sich im Zentralkanal und in der Peripherie (Pfeilspitzen). Perivaskuläre Herde sind nur in der *mog*^{-/-} Maus zu beobachten. Ausschnitte C und D: Färbungen mit den jeweiligen Antikörpern. Einige angefärbte Zellen sind gekennzeichnet (kurze Pfeile). (Vergrößerung: A und B: 10x; C und D: 20x)

Dieses Experiment zeigte, dass ältere Mäuse offensichtlich wesentlich schwerere EAE Symptome entwickeln als die üblicherweise verwendeten 8-14 Wochen alten. Außerdem bekamen diese Mäuse im Gegensatz zu allen hier bisher immunisierten 8-14 Wochen alten *mog*^{-/-} Mäusen leichte klinische Symptome. Es ist davon auszugehen, dass es bei diesen Mäusen zu Demyelinisierungen gekommen ist. Dieses erhärtet die bereits beschriebenen Ergebnisse an Semidünn- und Ultradünnschnitten von *mog*^{-/-} Mausgehirnen mit Demyelinisierungen und vereinzelt Axonuntergängen.

5.22 Immunisierung von mog^{+/+}; mog^{-/-}; mbp^{-/-}, plp^{-/-} und mbp^{-/-}, plp^{-/-}, mog^{-/-} Mäusen mit Myelin

Um die Bedeutung von MOG als Ziel der Autoimmunreaktion zu überprüfen, wurden mog^{+/+}; mog^{-/-}; mbp^{-/-}, plp^{-/-} und mbp^{-/-}, plp^{-/-}, mog^{-/-} Mäuse mit Myelin immunisiert. Es wurde bereits berichtet, dass sich die Symptome von mog^{-/-} Mäusen, die mit Rückenmarkhomogenaten immunisiert wurden, nicht von immunisierten wt-Mäusen unterscheiden. Im Gegensatz dazu wurde von Delarasse (2003) beschrieben, dass mit Myelin immunisierte Mäuse deutlich reduzierte EAE Symptome gegenüber immunisierten Wt-Mäusen zeigen. Durch die zusätzlich Immunisierung von mbp^{-/-}, plp^{-/-} und mbp^{-/-}, plp^{-/-}, mog^{-/-} Mäusen könnte neben MOG auch die Bedeutung von MBP und PLP untersucht werden. Zur Zeit sind diese drei Proteine die „klassischen“ EAE Proteine der Wahl. Die meisten EAE Modelle bauen auf Immunisierungen mit diesen drei Proteinen auf. Um die unterschiedlichen zu erwartenden Abstufungen in der Schwere der EAE in den verschiedenen Mutanten zu analysieren, wurden je fünf Mäuse der einzelnen Genotypen wie bei Delarasse (2003) mit 1,3mg frisch präpariertem Myelin immunisiert und das Gewicht und der Beginn der Krankheitssymptome zeitlich verfolgt.

Nur zwei mog^{+/+} Mäuse zeigten Lähmungserscheinungen vom maximalen Schweregrad 1, eine mog^{-/-} Maus den Schweregrad 0,5 nur drei Tage lang. Alle anderen Mäuse zeigten keine Lähmungserscheinungen. Damit unterschied sich dieses Experiment deutlich von dem von Delarasse beschriebenen. Diese Autoren fanden eine deutlich höhere Inzidenz und einen höheren Schweregrad der Lähmungserscheinungen. Das hier beobachtete Ergebnis von zwei mog^{+/+} Mäusen mit Schweregrad 1 und einer mog^{-/-} Maus mit Schweregrad 0,5 ist nicht als signifikant einzustufen um daraus einen schwereren Lähmungsgrad von mog^{+/+} gegenüber mog^{-/-} Mäusen abzuleiten. Die deutlich geringere Ausprägung der Lähmungserscheinungen in diesem Experiment im Gegensatz zu dem beschriebenen, liegt offensichtlich an dem schon Eingangs erörterten unterschiedlichen genetischen Hintergrund. Delarasse et al. (2003) benutzten für ihre Experimente bereits auf den C57/Bl.6 Hintergrund zurückgekreuzte Mäuse, die Mäuse in dieser Arbeit wiesen den Mischgenotyp C57/Bl.6;129Sv auf. Damit schien sich ein weiteres mal die niedrigere Suszeptibilität dieses Mischgenotyps gegenüber des C57/Bl.6 Genotyps zu bestätigen. Wie bereits in Tabelle 4 gezeigt, waren die rMOG immunisierten mog^{+/+} Mäuse weniger schwer von der EAE betroffen als reine C57/Bl.6 Mäuse.

5.23 Immunisierung von mbp^{-/-}, plp^{-/-} und mbp^{-/-}, plp^{-/-}, mog^{-/-} Mäusen mit rMOG

Für die unerwarteten Entzündungen in den mit rMOG immunisierten mog^{-/-} Mäusen boten sich zwei unterschiedliche Erklärungen an. Zum einen könnten Reste von MOG noch exprimiert werden, zum anderen wäre eine Kreuzreaktion mit anderen ZNS Proteinen (bzw. deren von MHC Komplexen präsentierten Peptiden) möglich. Mit Hilfe des ELISPOT wurde aber gezeigt, dass das Rückenmark und Gehirn der mog^{-/-} Mäuse nur von sehr wenigen rMOG reaktiven Th1- und CD8-Zellen infiltriert wurden. Da diesen Zellen die entscheidende Rolle bei der Demyelinisierung zugeschrieben wird und es in den mog^{-/-} nachweislich zu Demyelinisierungen kam, wäre es denkbar, dass der beobachtete Gewebeschaden durch T-Zellen ausgelöst wurde, die für andere ZNS Proteine spezifisch sind. Diese könnten durch Kreuzreaktionen oder durch *epitope spreading* hervorgerufen worden sein. *Epitope spreading* zwischen MOG, PLP und MBP wurde bereits beschrieben (Yu et al., 1996). Durch Immunisierung von mbp^{-/-}, plp^{-/-} und mbp^{-/-}, plp^{-/-}, mog^{-/-} Mäusen mit rMOG sollte nun die Rolle von MBP und PLP als Ziel kreuzreagierender oder durch *epitope spreading* entstandener T-Zellen untersucht werden.

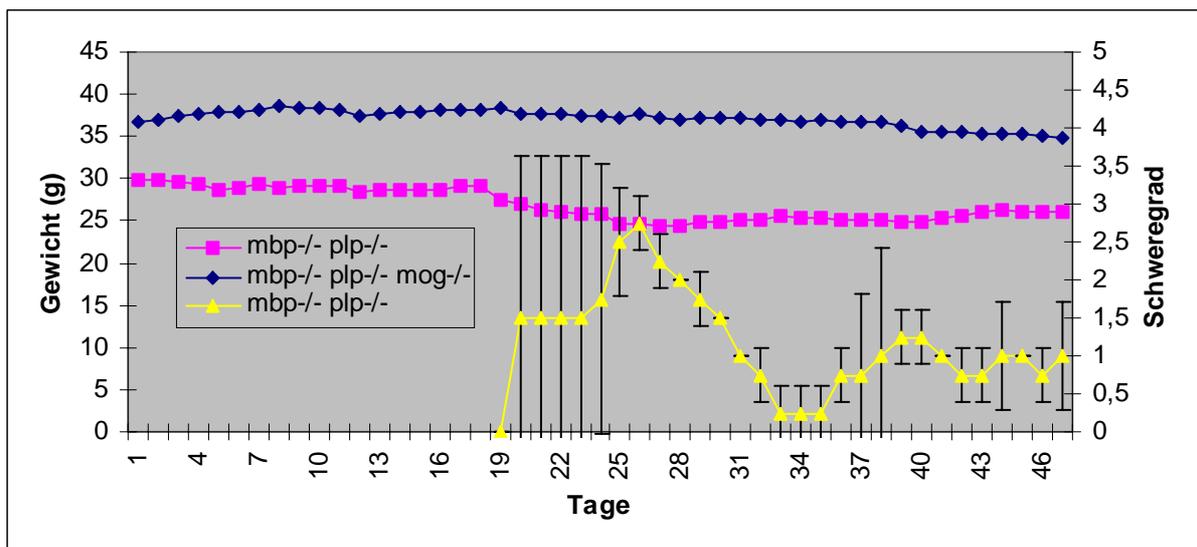


Abb. 50: Gewichtsveränderungen der rMOG immunisierten mbp^{-/-}, plp^{-/-} und mbp^{-/-}, plp^{-/-}, mog^{-/-} Mäuse (linke Y-Achse) und klinische Symptome (rechte Y-Achse, Dreiecke). Der Schubförmige Verlauf zeigt sich deutlich im klinischen Schweregrad; weniger deutlich in der Gewichtsveränderung. Die mbp^{-/-}, plp^{-/-}, mog^{-/-} Mäuse zeigen keine Gewichtsveränderungen.

Es zeigten sich für die mbp^{-/-}, plp^{-/-}, mog^{-/-} Mäuse weder eine signifikante Gewichtsabnahme noch Lähmungserscheinungen (Abb.50). Dagegen zeigten die mbp^{-/-}, plp^{-/-} Mäuse Gewichtsabnahmen und drei von fünf Mäusen entwickelten Symptome vom

Schweregrad 3 (komplette Hinterlaufslähmung). Interessanterweise gingen die Lähmungserscheinung innerhalb von 10 Tagen wieder komplett zurück. Damit zeigen sie eine stärkere Remission die *mog*^{+/+} Mäuse.

Bei beiden überlebenden erkrankten Mäusen zeigten sich nach ca. 4 Tagen wieder stärkere Lähmungserscheinungen, was in den bisher untersuchten Mäusen nicht beobachtet wurde.

Zur immunhistochemischen Analyse wurden Gehirn, Nervus opticus und Rückenmark je einer Maus präpariert und mit LCA gefärbt. Im Gehirn der *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-} Maus zeigten sich die typischen Infiltrate, die vergleichbar mit denen der *mog*^{+/+} Mäuse waren. Es wurden also nur zwei bis drei kleine Inflammationsherde entdeckt, von denen einer in Abbildung 51 zu erkennen ist. Das Gehirn der *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-}, *mog*^{-/-} Maus war völlig frei von Leukozyten.

Zur Präparation der optischen Nerven wurden diese zwischen Chiasma und Augapfel durchtrennt und blieben somit am Gehirn. Zur Einbettung in OCT-Medium wurden die Gehirne mit der Basis nach oben weisend, die optischen Nerven vorsichtig nach vorne ausgerichtet, gelagert.

Wie im Gehirn zeigte die *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-} Maus auch im Nervus opticus deutliche Infiltrate, während in der *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-}, *mog*^{-/-} Maus keine Leukozyten zu finden waren (Abb. 49, Mitte).

Auch das Rückenmark der *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-} Maus war komplett von infiltrierenden Leukozyten durchsetzt (Abb. 51C). Das Rückenmark der *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-}, *mog*^{-/-} Mäuse ist dagegen frei von Entzündungsherden.

Der Verlauf der EAE in *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-} Mäusen ist ähnlich dem der *mog*^{+/+} Mäuse. Bemerkenswert ist die niedrigere Inzidenz aber der höhere Schweregrad der Lähmungen bei den *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-} Mäusen und der komplette Rückgang der Lähmungen, sowie der remittierende Verlauf der EAE.

Das Fehlen der Infiltrate im ZNS der *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-}, *mog*^{-/-} Maus könnte ein Hinweis darauf sein, dass es bei der Immunisierung mit rMOG tatsächlich zu einer Kreuzreaktion von MOG autoreaktiven T-Zellen mit MBP oder PLP kommt.

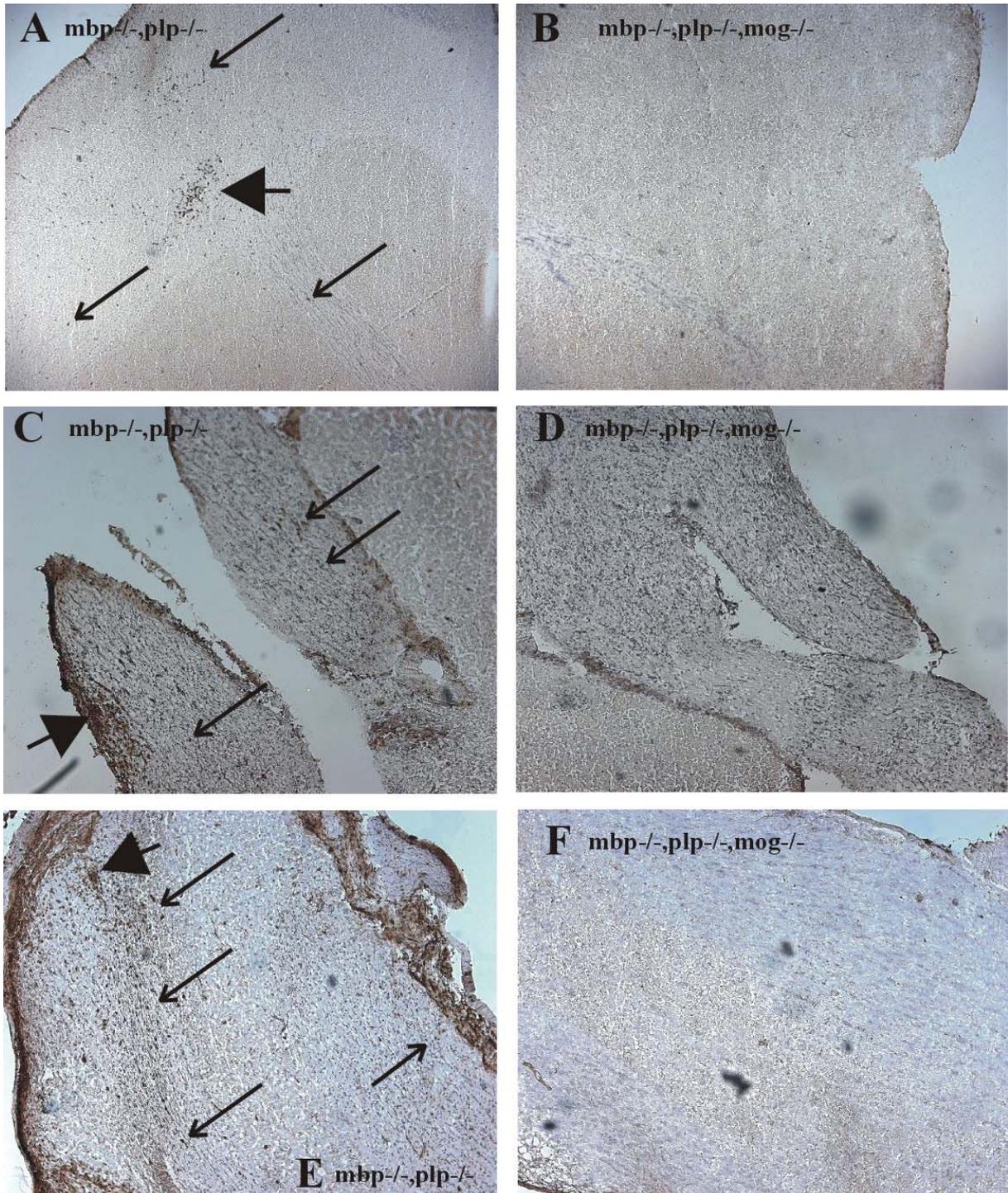


Abb. 51: Kryoschnitte von rMOG immunisierten *mbp^{-/-}, plp^{-/-}* (A, C, E) und *mbp^{-/-}, plp^{-/-}, mog^{-/-}* Mäusen (B, D, F) die mit LCA gefärbt wurden. In Gehirn, Nervus opticus und Rückenmark sind zahlreiche Leukozyteninfiltrate zu erkennen (Pfeile). Inflammationsherde (Pfeilspitzen); in der *mbp^{-/-}, plp^{-/-}, mog^{-/-}* Maus sind auch in den Meningen Ansammlungen von Leukozyten nicht zu beobachten. (Vergrößerung 10x)

IV. Zusammenfassung

Ausgehend von einem Genfragment, das Exon I-III enthielt, wurde ein auf dem pPNT-Vektor basierendes *targeting*-Konstrukt hergestellt. Es wurden embryonale Stammzellen der Linien Cj7 und R1 mit diesem Konstrukt transfiziert. Durch positiv/negativ Selektion wurden drei homolog rekombinierte ES-Zellklone isoliert und durch Southern Blot Hybridisierung mittels externer und interner Sonden charakterisiert. Durch Blastocysteninjektion wurden zwei keimbahnchimäre C57/Bl.6 Männchen erhalten. Die Nachkommen wurden zur Homozygotie gekreuzt und die Genablation durch Northern und Western Blot Hybridisierungsanalyse bestätigt. Immunhistochemische Studien bestätigten die myelinspezifische Lokalisation von MOG und das Fehlen der extrazellulären Domäne von MOG in *mog*^{-/-} Mäusen. Die *mog*^{-/-} Mäuse waren phänotypisch nicht von wt-Mäusen zu unterscheiden.

Lipid und proteinchemische Charakterisierung der *mog*^{-/-} Mäuse ergaben keine Veränderungen zu wt-Mäusen in der Zusammensetzung des Myelins.

Der Anteil von MOG an Myelinproteinen war im SDS-Gel selbst mit Silberfärbung nicht sichtbar.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Nervus opticus der *mog*^{-/-} Mutante waren vom Wildtyp nicht zu unterscheiden. *intraproduct line* und *major dense line* waren korrekt ausgebildet und das Myelin wies eine normale Schichtung auf. Morphologisch zeigten die Oligodendrozyten, deren Plasmamembran und die Kontaktstellen zu umliegendem Gewebe keine Abnormalitäten.

Es konnten keine Auswirkungen der MOG Defizienz in den untersuchten *mog*^{-/-} Mäusen gefunden werden.

Anti-MOG Antiserum wurde durch rekombinante Expression der extrazellulären Domäne von MOG (komplettes Exon II) in *E.coli* mittels pet22b+ Vektor als C-terminales hexa-Histidin-Fusionsprotein exprimiert. Die Reinigung erfolgte über Ni-Chelat-Chromatographie durch Bindung des His-tag. Das gereinigte Protein wurde zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt, aus denen das Antiserum gewonnen wurde. Die Spezifität wurde im Western Blot und immunhistochemisch überprüft.

Durch Kreuzungen von *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-} und *mog*^{-/-} Mäusen wurden *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-}, *mog*^{-/-} und *mbp*^{-/-}, *mog*^{-/-} Mauslinien generiert, die durch Northern-, Western- und Southern Blot Hybridisierungen charakterisiert wurden.

Die mbp^{-/-}, plp^{-/-}, mog^{-/-} Mauslinie zeigte einen der mbp^{-/-}, plp^{-/-} Maus ähnlichen Phänotyp mit starkem Tremor und sporadischen Krämpfen. Die Lebensdauer der mbp^{-/-}, plp^{-/-}, mog^{-/-} Maus ist normal. Lipid-, Protein- und elektronenmikroskopische Analyse zeigten die gleichen Resultate, die bereits für die mbp^{-/-}, plp^{-/-} Mäuse beschrieben wurden.

Das zusätzliche Fehlen von MOG in den MBP, PLP defizienten Mäusen führt abgesehen vom Fehlen von MOG zu keiner erkennbaren Veränderung auf molekularer und morphologischer Ebene.

Versuche zum Verhalten und den motorischen Fähigkeiten der mbp^{-/-}, plp^{-/-}, mog^{-/-} Mäuse zeigten leicht reduzierte Griffstärken aber etwas bessere motorische und Balancefähigkeiten im Gegensatz zu den mbp^{-/-}, plp^{-/-} Mäusen.

Die mbp^{-/-}, mog^{-/-} Maus zeigte mit zunehmendem Alter eine deutliche Reduzierung der für die mbp^{-/-} Maus typischen Tremorfrequenz, die stetig in ein Torkeln überging, wobei die Neigung zu schweren Krämpfen sich nicht unterschied. Die Lebenserwartung schien nicht erhöht. Ein Weibchen war sogar fertil.

Elektronenmikroskopie des Nervus opticus zeigte keine signifikanten Unterschiede zur mbp^{-/-} Maus.

Immunisierung von 8-14 Wochen alten mog^{+/+} und mog^{-/-} Mäusen mit rMOG(1-120) ergab folgende Ergebnisse:

Während fast alle mog^{+/+} Mäuse Lähmungserscheinungen bis zum maximalen Schweregrad 3 aufwiesen, zeigten keine mog^{-/-} Mäuse klinische Symptome.

Die Gehirne von mog^{+/+} und mog^{-/-} Mäusen zeigten nicht von einander unterscheidbare Leukozyteninfiltrationen (LCA-Färbung) in der immunhistochemischen Analyse.

Die durch ELISA erhaltenen Antikörpertiter der Seren waren mit 1:500 für beide Mauslinien gleich. Es wurde keine Kreuzreaktivität mit anderen Myelinproteinen im Serum durch Western Blot Hybridisierungen nachgewiesen.

In vitro Stimulation von Lymphozyten mit rMOG gab eine Verachtfachung bzw. Vervierfachung für die mog^{+/+} und die mog^{-/-} Maus. Das durch FACS Analyse bestimmte Verhältnis von CD4/CD8 Zellen nach in vitro PBS Stimulation war zwei für mog^{+/+} und vier für die mog^{-/-} Maus. In vitro Stimulation mit rMOG veränderte das Verhältnis zu 2,5 und 1,5. Aufgrund der hohen Variabilität der einzelnen Analysen wurde den in vitro Stimulationen peripherer Lymphozyten nur eine geringe Aussagekraft beigemessen.

Die aus Gehirn isolierten Leukozytenzahlen schwankten pro Gehirn zwischen 100000 und 400000 für beide Mauslinien. Das Verhältnis von CD4/CD8 Zellen betrug 2 und 1,1 und von Makrophagen/Mikroglia 6/9 für mog^{+/+} und 2/9 für mog^{-/-} Mäuse. Der Anteil der B-Zellen lag in beiden Mauslinien unter 1%.

Die ELISPOT Analyse von Leukozyten des Gehirns und Rückenmarks ergab eine drastische Reduktion von rMOG reaktiven IFN- γ sezernierenden Zellen in den mog^{-/-} Mäusen, während sich für die Splenozyten praktisch kein Unterschied zeigte.

Es wurde gezeigt, dass sich die Leukozyteninfiltrate im Gehirn und Rückenmark zwar nicht in ihrer Anzahl, aber in ihrer Zusammensetzung und Substratspezifität deutlich zwischen mog^{+/+} und mog^{-/-} Maus unterscheiden.

Kontrollimmunisierungen mit PBS in CFA, Mycobacterium tuberculosis und Pertussis Toxin; Bakterien Lysat und „Mock“-Protein führten zu keiner Entzündung. Die Entzündungen wurden also spezifisch durch rMOG1-120 ausgelöst.

Die Immunisierung von neun Monate alten Mäusen zeigte eine Korrelation zwischen höherem Alter und Schwere der Krankheit. Nur in diesem Experiment wurden mog^{-/-} Mäuse mit Lähmungserscheinungen beobachtet.

Immunisierung von mbp^{-/-}, plp^{-/-}, mog^{-/-} Mäusen führte im Unterschied zu mbp^{-/-}, plp^{-/-} Mäusen zu keinen immunhistochemisch sichtbaren Entzündungen in Gehirn, Nervus opticus und Rückenmark.

Die Frage, warum es in den mog^{-/-} Mäusen zu Entzündungen kommt, wurde auf die Möglichkeiten Kreuzreaktion oder minimale Expression von MOG-Fragmenten eingegrenzt und die Vorgehensweise zur endgültigen Klärung dieser Frage erarbeitet.

V. Diskussion und Ausblick

1. Generierung und Analyse einer MOG defizienten Mauslinie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das MOG Gen der Maus durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen gezielt mutiert und das manipulierte Gen in die Keimbahn eingebracht.

Die Klonierung des *targeting* Vektors erfolgte unter Berücksichtigung möglichst isogener DNA (Deng und Capecchi, 1992; te Riele et al., 1992) und der notwendigen Mindestlänge für die homologe Rekombination (Hasty et al., 1991a). Die PGK-*neo*-Box ersetzte die letzten 228bp des insgesamt 348bp umfassenden zweiten Exons und lag in *antisense* Richtung vor. Eine mögliche Translation hätte ein 73 Aminosäuren langes *missense* Protein zur Folge.

Die erhaltenen *mog*^{-/-} Mäuse zeigten keinen auffallenden Phänotyp. Sie bildeten Myelin, das sich von der Lipid- und Proteinzusammensetzung her nicht vom *wt* unterschied. Ebenso zeigten sich auch keine morphologischen Abnormalitäten. Kurz nach Züchtung der ersten homozygoten Mäuse wurde bekannt, dass zwei andere Arbeitsgruppen unabhängig voneinander ebenfalls MOG defiziente Mäuse generiert hatten (Waisman, 2001; Pham-Dinh et al. in Iglesias et al., 2001), die diese Ergebnisse bestätigten.

Es können folgende Ursachen für das Ausbleiben eines Phänotyps diskutiert werden:

Durch Northern- und Western Blot Analysen wurde ausgeschlossen, dass es sich um einen unvollständigen *gene knock out* handelt. Ebenso wurde mit immunohistochemischen Untersuchungen das Fehlen von MOG bestätigt. Von Exon II (348bp Gesamtlänge) waren 228bp deletiert. Aus der Kristallstruktur abgeleitet wird dadurch zu die räumliche Struktur der IgG Domäne zerstört und die Bildung eines funktionellen Proteins verhindert.

Da sich MOG erst spät in der Evolution entwickelt hat, es wurde bisher nur in Säugetieren nachgewiesen, und mit über 90% Sequenzhomologie zwischen Maus und Mensch sehr stark konserviert ist, kann man für MOG eine wichtige Rolle im ZNS annehmen. Zunächst könnten kompensatorische Mechanismen die Ausprägung eines Phänotyps verhindert haben. Da Proteine in vielen Domänen redundant sind, könnte ein anderes Protein die fehlende Funktion von MOG übernommen haben. Die größte Schwierigkeit, kompensatorische Mechanismen in der *mog*^{-/-} Maus aufzudecken, liegt in der geringen Expression im Myelin (0,05%). Da MOG selbst in Silber gefärbten SDS Polyacrylamidgelen nicht zu identifizieren war, wäre auch ein in gleichem Maße hochreguliertes Protein nicht detektierbar. Es sei denn man würde mit entsprechenden Antikörpern für mögliche Interaktionspartner von MOG Western Blot Hybridisierungsanalysen durchführen. Da aber über die Funktion und möglicherweise mit

MOG wechselwirkende Moleküle nichts bekannt ist, ist dieser Ansatz zum jetzigen Zeitpunkt nicht praktikabel. Gleiches trifft auch auf die Analyse mittels quantitativer RT-PCR zu. Genomische Datenbankanalysen ergaben Homologien von 46% für Butyrophilin (einem Milchdrüsenprotein) und 27% für B7.2 (CD86) für die extrazelluläre Domäne. Die von Breithaupt et al. (2003) und Clements et al. (2003) durchgeführte kristallographische Analyse der extrazellulären Domäne von MOG zeigte strukturelle Homologien zu B7.2, Sialoadhesin und dem PNS spezifischen Protein P₀. Keines dieser Proteine wird im ZNS auf Oligodendrozyten exprimiert, womit sie als Kandidaten für eine Kompensation ausscheiden. Durch die Kombination der IgG Domäne, einer Transmembrandomäne und einer offensichtlich membranassoziierten Domäne steht MOG allein unter den Mitgliedern der IgG Superfamilie und erschwert dessen Funktionsaufklärung und Möglichkeiten in der *mog*^{-/-} Maus gezielt nach Folgen der MOG Defizienz zu suchen, da es keine Anhaltspunkte über Funktionen von ähnlichen Proteinen gibt.

Gleiches gilt für mögliche Auswirkungen auf die Lipidverteilung. MOG wurde mit Lipid *rafts* in Verbindung gebracht (Simons et al., 2000; Marta et al., 2003) und könnte in der *mog*^{-/-} Maus eine veränderte Lipidzusammensetzung oder Verteilung hervorrufen, die aber wie auf Proteinebene auch mit den hier gewählten Untersuchungsmethoden nicht nachweisbar war.

Interessant scheint der Vergleich zu PLP, das im Gegensatz zu MOG 50% des Gesamtproteinanteils von Myelin ausmacht. PLP ist noch stärker konserviert und führt in PLP defizienten Mäusen zu morphologischer Veränderung der Myelinstruktur, aber nicht zu nachweisbaren Kompensationen auf Protein und Lipidebene (Boison und Stoffel 1994, Uschkureit, 2000, Poggel 2000).

Es wäre denkbar, dass das Fehlen von MOG in Analogie zu PLP und den oben genannten Gründen ebenfalls nicht kompensiert wird. Da MOG aber ca. 1000-fach niedriger exprimiert ist, könnten auch die Auswirkungen der MOG Defizienz deutlich geringer sein und nur unter Belastungssituationen zu Tage treten, die bei normaler Tierstallhaltung der Mäuse nicht bemerkbar sind. So könnten sich die vermuteten Funktionen von MOG als Adhäsions-, Rezeptormolekül oder als Stabilisator der Mikrotubuli in der Flexibilität der Oligodendrozyten erst in hohem Alter, bei Remyelinisierungen nach Gewebeschädigung oder im Lernverhalten zeigen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen und Verhaltenstests von alten *mog*^{-/-} Mäusen könnten hierüber Auskunft geben.

2. Generierung von mbp^{-/-}, plp^{-/-}, mog^{-/-} Tripelmutanten

Die Generierung von mbp^{-/-}, plp^{-/-}, mog^{-/-} Mäusen schien ein geeigneter Weg zu sein um die Funktionsaufklärung von MOG zu erleichtern. Als Basis diente die eingehend charakterisierte mbp^{-/-}, plp^{-/-} Doppelmutante (Stoffel et al., 1997a; Poggel, 2000; Uschkureit et al., 2000). MBP und PLP machen 80-90% der gesamten Myelinproteine aus, die in den Doppelmutanten fehlen und zu Hypomyelinisierungen, durch sogenanntes Pseudomyelin, führt. Das Fehlen dieser beiden Hauptstrukturproteine führt in höherem Alter zu Axondegenerationen. Das zusätzliche Fehlen von MAG verschlechterte den Phänotyp deutlich, obwohl die mag^{-/-} Einzelmutante ein unauffälliges Käfigverhalten zeigt (Uschkureit et al., 2000). Dementsprechend sollte sich ein zusätzliches Fehlen von MOG in den mbp^{-/-}, plp^{-/-} Mäusen stärker auswirken als in den mog^{-/-} Einzelmutanten. Die Reduktion der Proteinmenge durch MBP und PLP um 80-90% hatte den zusätzlichen Effekt, dass im SDS-Polyacrylamidgel eine höhere Empfindlichkeit erreicht werden kann. Die generierten mbp^{-/-}, plp^{-/-}, mog^{-/-} Tripelmutanten unterschieden sich jedoch nicht von den mbp^{-/-}, plp^{-/-} Doppelmutanten im Hinblick auf die Zusammensetzung des Myelins auf Protein- und Lipidebene und in der ultrastrukturellen Morphologie des ZNS. Nur die Verhaltenstests zeigten für die mbp^{-/-}, plp^{-/-}, mog^{-/-} Mäuse niedrigere Griffstärken aber verbesserte Balance- und neuromotorische Fähigkeiten. Da die beiden Mauslinien durch die eingekreuzten Mutationen einen heterogenen genetischen Hintergrund hatten, müsste eine Wiederholung dieses Experimentes mit Doppel- und Tripelmutanten aus gleichen Würfen (Nachkommen aus mbp^{-/-}, plp^{-/-}, mog^{-/+} Verpaarungen) erfolgen.

3. Generierung einer mbp^{-/-}, mog^{-/-} Mauslinie

Während der Kreuzungen für die Tripelmutanten fiel eine Maus phänotypisch durch ein für die *shiverer* (mbp^{-/-}) Maus typisches Zittern auf, das mit zunehmendem Alter stetig in ein Torkeln überging und sich im Alter von 6-8 Wochen deutlich vom mbp^{-/-} Phänotyp unterschied. Von dieser mbp^{-/-}, mog^{-/-} Maus wurden bis zum Ende der Arbeit nur wenige Mäuse erhalten. Es konnte lediglich eine elektronenmikroskopische Analyse durchgeführt werden. Diese Untersuchung zeigte die typische Morphologie der MBP-Defizienz. Warum sich dennoch eine leichte Verbesserung des Phänotyps bis zur Fertilität zeigte, muss durch weitere Experimente untersucht werden. In einigen elektronenmikroskopischen Aufnahmen

schiene mehr Axone in der mbp^{-/-}, mog^{-/-} Maus von Oligodendrozyten ummantelt zu sein als in der mbp^{-/-} Maus beobachtet. Ob sich diese Beobachtung generalisieren lässt, kann eine quantitative elektronenmikroskopische Untersuchung klären.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Generierung der Mausmutanten (mog^{-/-}), (mbp^{-/-}, mog^{-/-}) und (mbp^{-/-}, plp^{-/-}, mog^{-/-}) im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Funktionsaufklärung von MOG geführt hat. Der betriebene experimentelle Aufwand zur Generierung der Doppel- und Tripelmutanten scheint aber gerechtfertigt, denn während das alleinige Fehlen von MOG zu keinem Phänotyp führt, ist der Phänotyp in den Tripelmutanten in Hinblick auf die motorischen Fähigkeiten offensichtlich verbessert und in der Doppelmutante eine deutliche Veränderung des Phänotyps zu der mbp^{-/-} Einzelmutante zu beobachten. Eine eingehende Untersuchung der mbp^{-/-}, mog^{-/-} Maus sollte daher wertvolle Informationen zur Funktion von MOG geben. Die Aufklärung der Funktion von MOG ist, gerade in Hinblick auf dessen, in den letzten 4-5 Jahren verstärkt ins Interesse gerückte, pathologische Rolle in der Multiplen Sklerose und der Experimentellen Autoimmun Enzephalitis und mögliche Therapieansätze, von großer Bedeutung.

Eine Spekulation soll an dieser Stelle erlaubt sein: MOG wird erst am Ende der Myelinisierungsphase gebildet, dient als Marker reifer Oligodendrocyten und ist hauptsächlich auf der Plasmamembran des Oligodendrozyten und der äußersten Myelinschicht lokalisiert. Es spielt möglicherweise weniger bei der Kompaktierung der Myelinschicht eine Rolle als bei der Plastizität und Interaktion der Oligodendrozyten mit der Umgebung. Die späte Expression lässt vermuten, dass MOG eher wachstumshemmende oder stabilisierende Funktionen ausübt. Sein Fehlen könnte die Oligodendrozyten zu einer höheren Flexibilität bei der Ausbildung von Fortsätzen befähigen und damit die qualitative Beobachtung in den mbp^{-/-}, mog^{-/-} Mäusen erklären, dass in diesen scheinbar mehr Axone ummantelt sind als in mbp^{-/-} Mäusen.

Es ist deshalb sinnvoll, die weiteren Untersuchungen vom Myelin weg in Richtung Oligodendrozyten zu fokussieren. Hierfür würden sich in vitro Experimente mit aus mog^{-/-} Mäusen isolierten Oligodendrozyten und Astrozyten zur morphologischen und biochemischen Analyse anbieten. Ebenso könnte die Morphologie der Oligodendrozyten elektronenmikroskopisch an adulten, älteren Mäusen und an Mäusen am MOG Expressionsmaximum (P18) noch genauer studiert werden. Mit diesem aufwändigen Verfahren könnte man unter anderem erkennen, ob die Oligodendrozyten möglicherweise mehr oder längere Fortsätze bilden. Auf Lipidebene könnten empfindlichere Verfahren als die

TLC z. B. wie die HPLC eventuell feine Unterschiede aufdecken. Bei einer Auswirkung von MOG auf Lipid *rafts* könnte es bei gleichbleibender Lipidzusammensetzung zu einer Umverteilung in unterschiedliche Mikrodomänen kommen, was mit Hilfe entsprechender Extraktionsanalysen möglich wäre (Marta et al., 2003). Als besonders kostspielige Methode käme die serielle Analyse der Genexpression (SAGE) in Frage, die bereits für die *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-} Maus wertvolle Ergebnisse geliefert hat (Poggel, 2000). Die SAGE Methode hat den Vorteil, dass sie die Expression des gesamten Genpools abdeckt, d. h. von bisher unbekanntem Genen und damit von möglichen Interaktionspartnern von MOG. Die Mikroarray Technik, die schon für die *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-} Mäuse wenig aussagekräftige Resultate lieferte (Poggel, 2000), wird auch hier nicht weiterführen. Besonders für die *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-}, *mog*^{-/-} Mäuse wäre die zweidimensionale SDS-PAGE erfolgversprechend, da das stark basische MBP und das schwer in wässrigen Lösungen lösliche PLP fehlen, damit zwei der problematischsten Proteine.

4. rMOG induzierte EAE

In Hinblick auf Immuntoleranzstudien, wie sie bereits für andere Myelinproteine wie z. B. MBP durchgeführt worden sind (Zamvil et al., 1986) und kurz vor Beendigung dieser Arbeit für MOG publiziert worden sind (Delarasse et al., 2003), wurden *mog*^{+/+} und *mog*^{-/-} Mäuse mit rekombinantem Protein, bestehend aus den gesamten 120 Aminosäuren der extrazellulären IgG Domäne, immunisiert. Wider Erwarten wurden zwar vergleichbare Leukozytenzahlen im ZNS beider Mauslinien gefunden, Lähmungen entwickelten sich nur in der *mog*^{+/+} Maus. Diese unerwarteten Ergebnisse warfen die Frage auf, wie es in den *mog*^{-/-} Mäusen zu Entzündungen kommen konnte, obwohl das zur Immunisierung benutzte Antigen in diesen Mäusen nicht mehr vorhanden ist, noch jemals war.

Handelt es sich um eine unspezifische Reaktion auf die zur Immunisierung verwendeten Substanzen?

Das MOG-Antigen wurde mit komplettem Freund'schen Adjuvans, Mycobacterium tuberculosis und Pertussis Toxin verabreicht. Diese Substanzen alleine reichten nicht zum Auslösen von Entzündungen des ZNS aus. Ebenso konnten bakterielle Verunreinigungen, ein

Einfluss des Vektors und Substanzen aus der Proteinreinigung, durch Immunisierung mit E.coli Lysat und der Mock-Präparation, ausgeschlossen werden. Die Entzündungen wurden also spezifisch von rMOG hervorgerufen.

Entstehen die Entzündungen durch nicht nachweisbare Mengen von MOG?

Es ist bekannt, dass bestimmte Peptide in äußerst geringen Konzentrationen (femtomolar) immunmodulatorische Eigenschaften besitzen (Liu et al., 2001). Auf DNA Ebene sind in der *mog*^{-/-} Maus noch die ersten 120bp (40AA) des Exon II vorhanden, an die sich direkt die PGK-*neo*-Box in *antisense* Richtung anschließt. Diese 40AA überlappen mit dem ersten Drittel des zur Immunisierung benutzten rMOG1-120. Eine Translation des 73 Aminosäuren langen *missense* Proteins in nicht detektierbaren Mengen könnte demnach vielleicht für Antigen präsentierende Zellen ausreichen, um die in der Peripherie aktivierten MOG spezifischen T-Zellen im ZNS zu stimulieren. Mit Northern- und Western Blot Hybridisierungen konnte keine MOG Translation bzw. Transkription nachgewiesen werden. Mit Hilfe der RT-PCR wurden Transkripte nachgewiesen, die durch Überlesen des Polyadenylierungssignals der *neo*-Box zustande kamen. Diese Beobachtung ist bereits ausführlich in anderen Mausmodellen unseres Labors beschrieben worden (Zumbansen, 2001; Uschkureit, 2000). In keinem Fall wurden diese Transkripte auf Translationsebene nachgewiesen. Durch den im Vergleich zum MOG Promotor stärkeren PGK Promotor der *neo*-Box werden mehr *antisense*-Transkripte die Exon I und Exon II enthalten entstehen, als vom MOG Promotor initiierte *sense*-Transkripte. Durch Bildung doppelsträngiger RNA wird einer möglichen Translation der *sense*-Transkripte entgegen gewirkt (Murray et al., 1992; Boison und Stoffel 1994). Die Expression nicht nachweisbarer Mengen von MOG-Fragmenten scheint demnach sehr unwahrscheinlich, kann aber nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Computergestützte Vorhersagen (Programm: SYFPEITHI (Rammensee et al., 1999)) über Affinitäten von MOG Epitopen zu MHC II Komplexen, ergaben für die ersten 40 Aminosäuren, die theoretisch noch hätten exprimiert werden können, Peptide mit ähnlichen Werten wie für das bekannte encephalitogene Peptid 35-55. Die Präsentation dieser Peptide auf dem MHC Komplex und Interaktion mit entsprechenden TCR ist demnach möglich. Durch in vitro Stimulation von Lymphozyten, die aus rMOG immunisierten Mäusen isoliert wurden, wurden Immunogene Regionen identifiziert (von Budingen et al., 2001). Für den Bereich 1-40AA ergibt sich für den Haplotyp MHC-2^b nur eine schwache Immunogenität

(Delarasse et al., 2003). Die Encephalitogenität dieser Region ist bisher nur für das Peptid 1-20 für den MHC-2^b Haplotyp durchgeführt worden. Das Peptid 1-20 führt bei Immunisierung nicht zu EAE und Entzündungen (Mendel et al., 1995). Da der Bereich von 21-40AA weniger immunogen ist als der Bereich 1-20 AA, sollte dieser Bereich auch weniger encephalitogen sein. Eine Beteiligung von Peptiden der Region 1-40 an Entzündungen sowohl in wt- als auch in mog-/- Mäusen ist daher unwahrscheinlich. Selbst wenn noch minimale Restmengen dieser Region exprimiert werden, sollten diese nicht für die Entzündungen verantwortlich sein.

Kommt es zu Kreuzreaktionen mit anderen Myelinprotein spezifischen Zellen?

Es ist schon seit längerem bekannt, dass ein TCR auf verschiedene Peptide reagieren kann. Diese Beobachtung wird allerdings erst in jüngster Zeit immer mehr als allgemeiner Mechanismus der T-Zell Erkennung angesehen (Kuchroo et al., 2002). Dies wurde sogar für Peptide beobachtet, die nur wenig bis gar keine Sequenzhomologie aufweisen (Evavold et al., 1995). Ebenso können unterschiedliche Peptide denselben TCR verschieden stark aktivieren, so dass es zur Stimulation oder Anergie kommen kann (Nicholson et al., 1998; Hedrick et al., 1982). Auf diesen Ergebnissen basiert auch die *molecular mimicry*, die auf molekularer Ebene von Lang et al. (2002) zwischen MBP und einem Epstein Barr Viruspeptid gezeigt wurde. Wenn eine Kreuzreaktion mit einem exogenen Peptid beobachtet wird, sollte dies auch für endogene Peptide möglich sein. Damit bei der Immunisierung mit rMOG eine Kreuzreaktion zu Entzündungen des ZNS führt, müssen autoreaktive T-Zellen gegen ZNS Proteine in der Peripherie vorhanden sein. Die Kreuzreaktion muss stark genug sein, um die Kontrollmechanismen der Selbsttoleranz zu durchbrechen. Vermutlich wird es sich um T-Zellen handeln, die zum einen in hohen Konzentrationen in der Peripherie vorliegen und zum anderen bei Immunisierung mit dem von diesen primär erkannten Peptid zur EAE führen. Autoreaktive T-Zellen gegen MBP, PLP und andere Selbstantigene können aus gesunden Individuen problemlos expandiert werden. In Sjl Mäusen ist sogar jede 1/20000 T-Zelle reaktiv gegen PLP 139-151 (Zhang et al., 1994; Anderson et al., 2000). Die Zahl dieser Zellen nimmt mit dem Alter zu. Eine Rolle von kreuzreagierenden MBP, PLP oder anderen Myelinproteinen spezifischen T-Zellen wäre also durchaus denkbar.

5. Kreuzreaktion und Restexpression im Kontext mit den experimentellen Beobachtungen

Abbildung 52 zeigt schematisch die vier möglichen Reaktionswege: A; der klassische EAE Verlauf in *mog*^{+/+} Mäusen, wie er auch anhand der hier gemachten Ergebnisse bestätigt wurde. Durch Immunisierung mit rMOG werden in der Peripherie MOG reaktive T-Zellen aktiviert. Diese überwinden die Blut-Hirn-Schranke (BBB) und treffen im ZNS auf Antigen Präsentierende Zellen (APC), werden durch die präsentierten MOG Peptide stimuliert und differenzieren zu proinflammatorischen Th1 Zellen, die durch die bereits beschriebenen Mechanismen zu Entzündungen und Demyelinisierungen führen.

Für den Fall, dass in der *mog*^{-/-} Maus noch minimale Mengen an MOG Protein exprimiert werden, ergibt sich der in Abb. 52, B dargestellte Reaktionsweg. Die T-Zellen werden gleichermaßen in der Peripherie aktiviert wie in der *mog*^{+/+} Maus und überqueren die BBB. Durch die geringe Expression von MOG ist die Konzentration von Peptiden auf den APC sehr gering. Zusätzlich ist der Bereich der ersten 40 Aminosäuren nicht sehr immunogen. Das führt zu einer schwächeren Bindung zwischen MHC, MOG Peptid und TCR und zur Differenzierung zu Th2 Zellen, die primär nicht für Gewebeschäden verantwortlich sind, sondern nur zu Entzündungen ohne Demyelinisierungen.

Geht man von einer Kreuzreaktion aus, so ergibt sich der in Abb. 52, C dargestellte Reaktionsweg. Neben den MOG spezifischen T-Zellen werden auch kreuzreagierende T-Zellen (z. B. MBP, PLP) aktiviert, die ebenfalls die BBB überwinden. Im ZNS treffen die MOG spezifischen Zellen auf kein spezifisches Antigen und akkumulieren nicht weiter im Gehirn, während die kreuzreaktiven T-Zellen nun auf ihr mit höherer Affinität gebundenes Peptid treffen und stimuliert werden. Ob die Differenzierung zu Th1- oder Th2 Zellen überwiegt kann anhand der bisher gesammelten Daten nicht ausgesagt werden. Die Differenzierung richtet sich hauptsächlich danach, welche T-Zellen in der Peripherie aktiviert wurden.

Abb. 52, D zeigt den in der *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-}, *mog*^{-/-} Maus möglichen Fall. Es werden MOG reaktive T-Zellen und MBP und PLP kreuzreagierende T-Zellen in der Peripherie aktiviert und wandern in das ZNS. Da in der Tripelmutanten keine der drei Proteine exprimiert werden, kommt es nicht zur Stimulation und Entzündung.

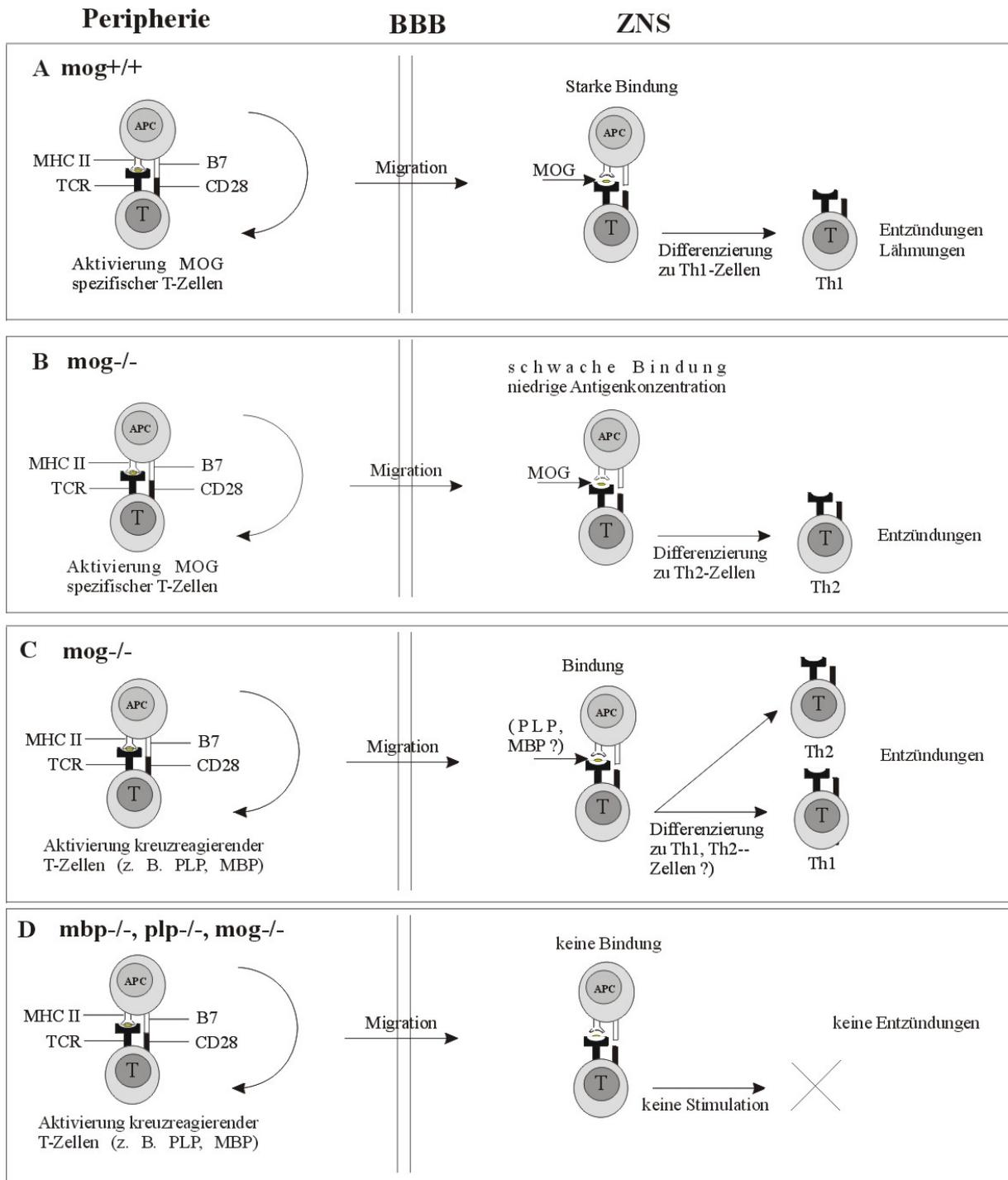


Abb. 52: Schematische Darstellung der postulierten Reaktionswege in den unterschiedlichen Mäusen.

Kreuzreaktion oder minimal translatiertes MOG Antigen?

Die bisher durchgeführten Versuche lassen keine Aussagen zu, welcher Mechanismus (B oder C) im vorliegenden Fall zum Tragen kommt. Für den Fall von Restmengen von MOG spricht,

dass Delarasse et al. (2003) ein gleiches Immunisierungsexperiment durchgeführt haben, wobei diese keine Entzündungen beobachten. In deren *targeting* Konstrukt liegt die *neo*-Box in *sense* Richtung im ersten Exon und sollte durch einen *Frameshift* selbst im Falle eines Überlesen des Polyadenylierungssignals, nicht zu einem Proteinprodukt führen in dem das zweite Exon enthalten ist, sofern es nicht durch artifizielles Spleißen zu einem Exon II enthaltenden Proteinprodukt kommt. Andererseits wurden die Entzündungen der mit rMOG immunisierten *mog*^{-/-} Mäuse nur durch H/E- und CD3 Antikörperfärbungen charakterisiert. Bei den in dieser Arbeit untersuchten *mog*^{-/-} Mäusen konnte durch H/E Färbung ebenfalls keine Entzündung nachgewiesen werden. CD3 Antikörper färben nur T-Zellen. Die Anzahl der T-Zellen in einigen der hier untersuchten Hirn- und Rückenmarksschnitte war aber so gering, dass über die T-Zellenzahl wahrscheinlich keine Entzündungen detektiert worden wären. Es besteht somit die Möglichkeit, dass mit diesen beiden Färbemethoden in den Mäusen von Delarasse et al. keine Entzündungen nachgewiesen wurden, obwohl dies durch LCA Färbung vielleicht möglich gewesen wäre. Möglicherweise ist aber auch der genetische Hintergrund für diese Diskrepanz verantwortlich. Obwohl beide Mauslinien den selben Haplotyp (MHC-2^b) aufweisen, ist die Maus von Delarasse et al. bereits auf den C57/Bl.6 Hintergrund zurückgekreuzt, während die in dieser Arbeit verwendete Mauslinie noch den Mischhintergrund C57/Bl.6;129Sv besitzt. Neben dem MHC Haplotyp spielt auch der genetische Hintergrund bei der Suszeptibilität der EAE eine Rolle (Maron et al., 1999; Encinas et al., 1999). Ein weiterer Befund der eine Restexpression fraglich erscheinen lässt, ist der Vergleich zwischen ELISPOT Assay und CD4/CD8 Verhältnis im Gehirn. Im ELISPOT werden neben den Th1-Zellen auch die MOG spezifischen CD8 Zellen erfasst. Im Gehirn der *mog*^{-/-} Maus ist die Zahl der MOG spezifischen Th1- und CD8 Zellen um das 50-fache verringert. Wie ist dann die annähernd gleiche Anzahl an CD8 Zellen in *mog*^{+/+} und *mog*^{-/-} Mauslinie zu erklären? Da praktisch keine rMOG spezifischen Th1-Zellen nachgewiesen wurden, sondern eine Th2-Differenzierung stattgefunden haben muss, die eine CD8 Proliferation hemmt, sollte die Zahl der CD8 Zellen ebenfalls deutlich verringert sein. Dass diese CD8 Zellen unspezifisch eingewandert sind scheint unwahrscheinlich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit, sprechen für das Modell der Kreuzreaktion (Abb. 52, C). Bei kreuzreagierenden T-Zellen wäre es klar, warum im ELISPOT nur wenige rMOG reaktive IFN- γ sezernierende Zellen nachgewiesen werden. Warum es bei einer Kreuzreaktion nicht zu Lähmungen kommt, kann ebenfalls erklärt werden. Untersuchungen zu TCR-Spezifitäten zeigen, dass unterschiedliche T-Zellen gleiche Peptide mit unterschiedlichen Affinitäten erkennen (Nicholson et al., 1998). T-Zellen mit einer niedrigeren Kreuzreaktivität

differenzierten bei Stimulation mit dem entsprechenden Peptid (PLP139-151) überwiegend zu Th1 Zellen, während T-Zellen mit höherer Kreuzreaktivität überwiegend zu Th2 Zellen differenzierten (Das et al., 1997). Für transgene Mäuse, die den Rezeptor für die sich zu Th2 Zellen entwickelnden T-Zellen überexprimieren, ergaben sich nach Immunisierung mit PLP139-151 keine Lähmungen, aber Entzündungen im Gehirn. Das selbe Resultat wird auch bei immunisierten Mäusen beobachtet, die mit alternativen Peptid-Liganden (*altered peptide ligands*; APL) behandelt werden (Santambrogio et al., 1998). Das würde erklären warum es gerade bei der hier postulierten Kreuzreaktion nur zu Entzündungen und nicht zu Lähmungen kommt. Die stärker kreuzreagierenden T-Zellen werden in der Peripherie aktiviert und wandern in das ZNS. Dort treffen sie auf ihr eigentlich spezifisches Antigen und entwickeln sich überwiegend zu Th2 Zellen, die nicht zu Gewebsschädigungen führen. Die weniger kreuzreaktiven, aber stärker zur Th1-Differenzierung befähigten T-Zellen, werden nicht aktiviert und verbleiben in der Peripherie.

Die Frage, warum in der *mog*^{-/-} Maus genauso viele T-Zellen im ZNS nachgewiesen werden, obwohl auch in der *mog*^{+/+} Maus die kreuzreagierenden Zellen vorhanden sind und sich zusätzlich finden lassen sollten, kann leicht erklärt werden und hat für beide Reaktionswege (Abb. 52; B und C) Gültigkeit. Die Reduktion von rMOG spezifischen IFN- γ sezernierenden Zellen in der *mog*^{-/-} Maus wurde mit ELISPOT nachgewiesen. Die Zahl der Makrophagen ist laut FACS leicht verringert, was auf eine Th2 Antwort in den *mog*^{-/-} Mäusen hindeutet. Th1 und Th2 Zellen hemmen sich gegenseitig durch die Ausschüttung verschiedener Cytokine (IFN- γ bzw IL-10) (Janeway et al., 2002). In der *mog*^{+/+} Maus überwiegen die MOG reaktiven T-Zellen, die sich aufgrund ihrer hohen Affinität zu MOG zu Th1 Zellen differenzieren. Die kreuzreaktiven T-Zellen werden zwar in der Peripherie aktiviert, wandern ins ZNS und differenzieren wie beschrieben zu Th2 Zellen, werden aber durch die Th1 Zellen an der Proliferation gehindert. Dieser Mechanismus ist die Grundlage für die Experimente zur Immundeavation, bei der die proinflammatorischen Th1 Zellen durch Stimulation von Th2 T-Zellantworten z. B. mittels APL gehemmt werden sollen.

Ein weiterer Hinweis für eine Kreuzreaktion und gegen eine Expression von MOG Resten ist die fehlende Entzündung von rMOG immunisierten *mbp*^{-/-}, *plp*^{-/-}, *mog*^{-/-} Mäusen. Bei einer Restexpression hätte das zusätzliche Fehlen von MBP und PLP keine Auswirkung auf die Krankheitsentwicklung haben dürfen. Diese Mäuse besitzen allerdings keinen definierten MHC Haplotyp und einen aus mehreren Mauslinien zusammengesetzten genetischen Hintergrund, was auch ein Grund für das Ausbleiben von Entzündungen sein könnte.

Das Immunisierungsexperiment mit 9 Monate alten Mäusen konnte zu dieser Fragestellung keinen Beitrag leisten, denn die Ergebnisse lassen sich mit beiden Möglichkeiten in Einklang bringen. Es zeigte aber, dass die zuvor sporadisch beobachteten Demyelinisierungen in den *mog*^{-/-} Mäusen keine Artefakte waren. Desweiteren zeigt es den großen Einfluss des Alters der Mäuse auf die Ausprägung der EAE. Möglicherweise sind viele uneinheitliche Ergebnisse, wie z. B. die sporadischen Demyelinisierungen oder unterschiedliche Tage des Krankheitsausbruchs, durch die große Altersspanne (8-14 Wochen) der normalerweise zur Immunisierung benutzten Mäuse zu erklären. Über die Gründe, die zur deutlich stärkeren Entzündungen, aber geringeren klinischen Symptomen in der *mog*^{-/-} Maus führen, kann, obwohl die Frage nach Kreuzreaktion oder Restexpression nicht endgültig geklärt ist, spekuliert werden.

Entzündungen in *knock-out* Mäusen, die mit dem ausgeschalteten Protein immunisiert wurden, sind in der Literatur bisher nicht bekannt. So wurden die vielfältigen denkbaren Gründe für die ausgelöste Symptomatologie sukzessive im Laufe der Arbeit eingegrenzt. Zunächst wurde sichergestellt, dass das rekombinante zur Immunisierung verwendete Protein spezifisch die beobachteten Symptome auslöst. Die Möglichkeit kreuzreaktiver Antikörper wurde ausgeschlossen. Durch Analyse peripherer und im ZNS befindlicher T-Zellen mit verschiedenen Verfahren, wurde gezeigt, dass sich die Zusammensetzung der T-Zellen im ZNS extrem von denen in der Peripherie unterscheidet. Es zeigte sich auch ein signifikanter Unterschied zwischen T-Zellen des ZNS in *mog*^{+/+} und *mog*^{-/-} Mäusen, während in der Peripherie praktisch keiner zu erkennen war.

Diese Versuche führten zur Eingrenzung auf zwei mögliche Reaktionswege.

Die Entscheidung, ob es sich um eine Kreuzreaktion oder Restproteinmengen handelt, wird durch die Immunisierung mit dem MOG Peptid41-60 fallen. Es wären auch Immunisierungen mit den jeweiligen Bruchstücken von rMOG1-120 sinnvoll. Durch Immunisierung mit rMOG1-40 und rMOG41-120 kann eindeutig eine Restexpression, die zur Entzündung führt, ausgeschlossen werden. Zusätzlich könnte ein ELISPOT Assay für rMOG spezifische Th2 Zellen (IL-4, IL-10) durchgeführt werden.

Wenn es sich um eine Kreuzreaktion handeln sollte, wäre es wichtig, die Proteine bzw. deren Peptide zu identifizieren gegen die die kreuzreaktiven T-Zellen gerichtet sind. Wie erwähnt wären PLP und MBP hierfür mögliche Kandidaten, zumal von Amor et al. (1996) gezeigt wurde, dass MBP, PLP und MOG ein Aminosäuremotiv teilen, was sie zu Kreuzreaktionen mit entsprechenden TCR befähigen könnte. Nach Identifikation der kreuzreagierenden

Proteine kann der Nachweis, welcher TCR mit welchem Peptid auf welchem MHC Komplex kreuzreagiert auf molekularer Ebene erfolgen. Bestätigte sich diese Vermutung könnte dieses Mausmodell einen wichtigen Beitrag zur Erforschung kreuzreaktiver T-Zellen und deren Rolle in der Regulation oder Auslösung von Autoimmunkrankheiten leisten. Im Hinblick auf die bereits durchgeführten Experimente zur Immundeviation mittels APL, würde dieses Mausmodell interessante Möglichkeiten bieten, die Rolle von kreuzreaktiven T-Zellen, die Mechanismen zur Differenzierung in Th1 und Th2 Zellen und deren Regulation von nicht kreuzreagierenden Th1 Zellantworten zu studieren.

VI. Material und Methoden

Alle Methoden, die nicht näher erläutert werden, sowie nicht definierte Medien, Lösungen und Puffer sind in Sambrook *et al.* (1989), Robertson (1987), Cooper (1982), Hogan *et al.* (1986) oder den jeweils angegebenen Referenzen beschrieben. Die Präparation von *kompetenten Zellen* (DH5 α) und die *Transformationen* erfolgten nach der Methode von Hanahan (1983).

1. Molekularbiologische Methoden

1.1 Plasmid-DNA-Präparation

Plasmid-DNA wurde aus 5 ml Übernachtskulturen nach der Methode von Birnboim (1983) gewonnen. Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmids erfolgte die Präparation mit Hilfe von *Qiagen tip-500* (Qiagen) oder *Nucleobond-500* Säulen (Machery-Nagel) nach den Angaben des Herstellers.

1.2 Isolierung genomischer DNA

Präparation aus Zellkulturen:

Die Isolierung von genomischer DNA aus ES-Zellen erfolgte nach Mansouri (1989) aus 24-Lochplatten. Nach Entfernen des Kulturmediums und Waschen mit 1ml PBS wurden die Zellen mit 500 μ l Lysis-Puffer (100mM Tris-HCl pH 8,5; 5mM EDTA; 0,2 %SDS; 200mM NaCl; 100 μ g/ml Proteinase K) versetzt und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert (humide Atmosphäre). Die DNA wurde anschließend aus dem Zellysat in Eppendorf-Reaktiongefäßen durch Zugabe von 500 μ l Isopropanol gefällt, 5min bei RT zentrifugiert, mit 500 μ l 70% Ethanol gewaschen, bei RT 10min luftgetrocknet und in 200 μ l TE (pH 8) aufgenommen. Die gewonnene DNA wurde innerhalb über Nacht bei 55°C gelöst.

Für die Isolierung größerer Mengen DNA aus Zellkulturen (ES- oder HEK-Zellen) wurden 1ml bzw. 3ml Lysispuffer für die entsprechenden 60mm bzw. 90mm Kulturschalen eingesetzt. Die Aufarbeitung erfolgte analog zu der Präparation aus 24-Lochplatten. Die so aufgearbeitete DNA wurde in 1ml bzw. 3ml TE (10mM Tris-Cl pH 8, 1mM EDTA) gelöst.

Präparation aus Schwanzspitzen-Biopsien:

0,5-1cm der Schwanzspitze von 5-10 Tage alten Mäusen wurde in 700µl Lysis-Puffer (50mM Tris-HCl pH 8; 100mM EDTA; 100mM NaCl; 1% SDS) und 30µl Proteinase K (10mg/ml) bei 55° C im Schüttelbad lysiert. Nach einer Zentrifugation (10min, RT) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß dekantiert und die DNA durch Zugabe von 0.7ml Isopropanol bei RT gefällt. Die fadenförmige DNA wurde in 1ml 70% Ethanol gewaschen und 10min luftgetrocknet. Die erhaltene DNA war nach 3h bei 55°C im Schüttelbad in 500µl TE (pH 8) gelöst.

75-120µl der präparierten genomischen DNA wurden in 400µl Volumen einer entsprechenden Restriktionsanalyse unterworfen, anschließend mit Ethanol gefällt, in 50µl TE (pH 8) gelöst und auf ein Agarosegel aufgetragen.

1.3 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzanalyse erfolgte im Servicelabor des Zentrums für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) mit Hilfe eines ALF-Express (Pharmacia) oder eines ABI-377 (Applied Biosystems).

1.4 Synthese von Oligonukleotiden

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG synthetisiert.

1.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe von Qiaex^R-Glasmilch (*Qiaex Agarose-Gel-Extraction-Kit*, Qiagen), *NucleoSpinExtract* Säulen (Machery-Nagel) nach Angaben des Herstellers oder durch elektrophoretische Elution mit anschließender NaAc/Ethanol-Fällung .

1.6 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die Markierung von doppelsträngigen DNA-Hybridisierungssonden erfolgte durch den Einbau von α -[^{32}P]-dATP (30 μCi pro Ansatz; Amersham) mit den *random primed DNA labeling Kit* (Boehringer-Mannheim) nach den Angaben des Herstellers. Die markierten Fragmente wurden entweder über eine Entsalzungssäule (Biogel P30), *ProbeQuant G-50 micro column* (Amersham) oder gar nicht von nicht eingebauten Nukleotiden getrennt.

Die Markierung von Oligonukleotiden erfolgte durch enzymatische Phosphorylierung am 5'-Ende mit Hilfe von T4-Polynukleotidkinase (30 μCi γ -[^{32}P]-dATP pro Ansatz; Amersham). Nach Zugabe von NH_4Ac und t-RNA (Endkonzentrationen: 2 M bzw. 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) konnten die nicht eingebauten Nukleotide durch Ethanol-Fällung (10-facher Überschuß) abgetrennt werden.

1.7 Southern-Blot Hybridisierungsanalyse

Nach Restriktion und elektrophoretischer Trennung über ein Agarosegel wurde DNA mittels Kapillar-Blot nach den Angaben des Herstellers auf eine *GeneScreenPlus*-Membran (NEN) transferiert. Die Prähybridisierung erfolgte 1-2h bei 42°C in Gegenwart von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Heringssperma-DNA (P-L Biochemicals) in einer Lösung mit 50% Formamid, 1% SDS, 1M NaCl, die Hybridisierung über Nacht bei 42°C in der selben, frisch angesetzten Lösung mit 5% Dextransulfat und in Gegenwart von $1-6 \times 10^5$ cpm des ^{32}P -markierten Fragments. Für die Hybridisierung von Oligonukleotiden wurde 15-20% Formamid verwendet.

Die Blotmembranen wurden zweimal bei RT mit 2xSSC (5 min) und ein- bis zweimal bei 50-65°C mit 2xSSC, 1% SDS (20-30 min) gewaschen.

Zur Autoradiographie wurden Kodak XAR-Filme bei -70°C 1-7 Tage exponiert oder eine Analyse mit dem *PhosporImager SI 445* und der *ImageQuant Software (Molecular Dynamics)* durchgeführt.

1.8 RNA-Präparation

Die Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen und Gewebe erfolgte nach Chomczynski (1987) oder der TRIZOL Methode (Life Technologies). Ausgehend von dieser RNA wurde polyA+

RNA mit Hilfe des *Oligotex mRNA Mini Kits* (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers gewonnen. Isolierte RNA wurde in DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen und bei -70°C gelagert.

1.9 Northern-Blot Hybridisierungsanalyse

Die zu untersuchenden RNA-Proben wurden auf 50% Formamid, 6% Formaldehyd, 1x MOPS-Puffer (200mM MOPS, 50mM NaAc, 10mM EDTA, pH 7) eingestellt, 2min auf 65°C erhitzt, abgekühlt und auf einem denaturierenden Agarose-Gel (6% Formaldehyd, 1x MOPS-Puffer) bei 30-50mA größenfraktioniert. Das Gel wurde anschließend 5 min gewässert und die RNA mittels *Kapillar-blot* nach den Angaben des Herstellers auf eine *GeneScreenPlus*-Membran (NEN) transferiert.

1.10 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Standardbedingungen in Endvolumina von 100µl (bei Verwendung des *DNA Thermal Cyclers* von Perkin Elmer) bzw. 50µl (bei Verwendung des *Peltier Thermal Cyclers* von Biozym) durchgeführt:

dNTP-Konzentration: 100µM, *Primer*-Konzentration: 200µM, Taq-Polymerase: 1U/100µl,

Reaktionspuffer: 100mM Tris-Cl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.01% Gelatine.

Template-Konzentration: Plasmid-DNA: 100ng, cDNA: 1-5µg, genomische DNA: 300ng.

Die Reaktionsbedingungen wurden der jeweiligen Reaktion angepaßt:

Denaturierung: 94°C, 1-3 min

Amplifikation: 94°C, 1-3 min (Denaturierung), 50-70°C, 1-3 min

(*Annealing*), 72°C, 1 min/kb (Elongation)

Elongation: 72°C, 10 min

Die *Annealing*-Temperatur wurde so gewählt, daß sie ca. 3-5°C unterhalb der geschätzten Schmelztemperatur der Primer lag.

1.11 RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR)

Für die Amplifikation von mRNA wurden 1-2µg Gesamt-RNA (100ng polyA⁺-RNA) in einem Gesamtvolumen von 20µl umgeschrieben. Dazu wurde zunächst die RNA in einem Volumen von 4.5µl 5min bei 70°C inkubiert, 2min auf Eis abgekühlt, anschließend mit

2µl 5 x RT-Puffer (Gibco/BRL),	0.5µl Superscript II (Gibco/BRL),
1µl DTT (0.1M),	0.5µl dNTP-Mix (10mM),
0.5µl RNase-Inhibitor (Boehringer),	1µl p(dN6) (50µM,

Boehringer)

versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Dieser Ansatz wurde entsprechend der eingesetzten Menge an RNA für 2-4 PCR-Reaktionen verwendet.

2. Biochemische Methoden

2.1 Proteinexpression in E.coli

Die Expression mit Hilfe des pET-Expressionsvektors wurde nach Studier et al. (1990) durchgeführt. E.coli (BL21(DE3)pLysS) Bakterien wurden nach der Transformation mit dem Plasmid über Nacht in 150ml M9ZB Medium [6g Na₂HPO₄, 3g KH₂PO₄, 1g NH₄Cl, 10g Caseinhydrolysat, 5g NaCl, 1ml MgSO₄ (1M), 20ml Glukose (20%), 250µl Ampicillin (200mg/ml), 1ml Chloramphenicol (34mg/ml Ethanol), Wasser ad 1Liter] bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine 100 ml Kultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.8 weiter inkubiert. Die Induktion erfolgte dann mit 1mM IPTG. Nach weiteren 3 h wurden die Bakterien abzentrifugiert (10min, 4000g). Nach zweimaligen Waschen mit jeweils 30ml PBS und erneuter Zentrifugation erfolgte das Resuspendieren der Bakterien in 15ml 20mM Tris-Cl (pH 8), 100mM NaCl, 50mM Na_xH_xPO₄. Die Suspension wurde nach dreimaligem Tauen/Frieren 30 min bei 37°C mit 50µl Lysozym (50mg/ml), 50µl DNase (10mg/ml) und

50µl RNase (10mg/ml) inkubiert und zentrifugiert (15min, 12000g). Da das exprimierte Protein sowohl in der unlöslichen als auch in der löslichen Fraktion vorlag, erfolgte die Reinigung über die Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (*TALON Metal Affinity Resin*, Clontech (Porath, 1992) unter denaturierenden bzw. nativen Bedingungen. Das Präzipitat wurde in 15ml Tris/Phosphat-Puffer (20mM Tris-Cl pH 8, 100mM NaCl, 50mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 8, 8M Harnstoff) resuspendiert (Präzipitat 1), abzentrifugiert und der unlösliche Rest erneut in 15 ml Tris/Phosphat-Puffer resuspendiert (Präzipitat 2). Die Chromatographie der vereinten Lösungen (Säulenvolumen: 1.5ml) und die anschließende Elution erfolgte mit dem selben Puffer und steigenden Konzentrationen Imidazol (1mM, 10mM und 100mM). Die Chromatographie der löslichen Fraktion verlief analog, allerdings ohne Harnstoff.

2.2 Affinitätsreinigung des MOG-Antiserums

0.75 g BrCN-aktivierte Sepharose FF (Pharmacia) wurden mit 300ml kalter 1mM HCl gewaschen und in 2ml Kopplungspuffer (0.1M NaHCO₃ pH 8.3, 0.5M NaCl, 0.05% SDS) resuspendiert.

Das gereinigte MOG-Protein wurde für die Bindung an das Säulenmaterial mit Hilfe des Kopplungspuffers umgepuffert. Dieser Schritt der Gelfiltration erfolgte über PD-10 Säulen (Pharmacia), indem 2.5ml Proteinlösung (500 µg) auf die mit dem Kopplungspuffer äquilibrierte Säule aufgetragen wurden. 2 der 3.5ml (300 µg Protein), die nach der Elution des Proteins von der Säule vorlagen, wurden mit der aktivierten Sepharose über Nacht bei 4°C geschüttelt. Zur Blockierung freier Bindungsstellen wurde das Material anschließend 3h bei RT mit 0.2M Glycin pH 8 inkubiert. Vor der Äquilibration des Säulenmaterials mit 10ml PBS wurde viermal abwechselnd mit Kopplungspuffer und 0.1M NaAc pH 4, 0.5M NaCl gewaschen.

5ml Antiserum wurden mit 5ml PBS verdünnt und über Nacht bei 4°C über die Affinitätssäule rezirkuliert. Unspezifisch an die Säule gebundene Proteine wurden durch Waschstreps entfernt (10ml PBS, 10ml PBS+ 1M NaCl, 10ml PBS). Die Elution der spezifischen Antikörper erfolgte mit 0.2M Glycin, pH 2.8, in 0.5ml Fraktionen. Die Fraktionen wurden in NaHCO₃-Lösung sofort neutralisiert. Die Proteinbestimmung in den Fraktionen erfolgte nach Bradford (1976). Protein-haltige Fraktionen wurden vereinigt,

lyophilisiert, und in einer Konzentration von 1mg/ml mit PBS gelöst (5ml Antiserum enthielt 1mg spez. Antikörper).

2.3. Myelinpräparationen

Myelin aus Gehirnen 2-7 Monate alter Mäuse wurde nach Norton und Podulso präpariert (1973). Dazu wurden ein Gehirn myelinisierender (wt, mog^{-/-}, mog^{+/-}, usw.) bzw. 4 Gehirne Myelin-defizienter Mäuse (*shiverer* und *shiverer*-ähnliche) in 12 ml 0.32 M Sucrose homogenisiert (Elvekjem-Potter). Hiermit wurden 18ml 0.85M Sucrose überschichtet. Nach Zentrifugation (10000g, 4°C, 20min) wurde die Interphase abgezogen. Nun wurde drei mal mit dem dreifachen Volumen dest. Wasser gefällt und zentrifugiert (10000g, 4°C, 20min). Abschließend wurde der erhaltene Niederschlag in 500µl SDS-Probenpuffer (nicht reduzierend) aufgenommen und Aliquots von 10-50µl für ein SDS-PAGE Gel verwendet. Alternativ wurde das Myelin in 2 % SDS gelöst und für eine Proteinbestimmung nach Smith et al. (1985) mit dem BCA (*bicinchoninic acid*) Assay Kit (Pierce) oder als Suspension in Wasser eingefroren (-20°C).

2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Eine Größenauftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichtes erfolgte nach Laemmli et al. (1970). Gele mit einer Acrylamid-Konzentration von 10-15% wurden nach erfolgter Elektrophorese mit Coomassie R-250 (0.3% in 10% Essigsäure, 40% Methanol) oder durch Silber (Blum et al., 1987) angefärbt. Myelinproben wurden üblicherweise unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt (Probenpuffer: 10% Glyzerin, 125mM Tris-Cl pH 6.8, 4% SDS, 0.02% Bromphenol-Blau). Für eine entsprechende reduzierende Probenvorbereitung wurden diesem Puffer 4% β-Merkaptoethanol zugesetzt. Teilweise wurden die Proben vor dem Auftragen 3min aufgeköcht.

Die Gele wurden abschließend in 5% Glycerin 50% Methanol gewässert und zwischen Cellophan getrocknet.

2.5 Proteinquantifizierung

Die Proteinbestimmungen erfolgten photometrisch nach Bradford (1976) (Coomassie G-250 Protein Komplex) oder mit Hilfe des BCA Systems (Pierce, Protein-Cu⁺-BCA Komplex, Smith et al., 1985). Die Auswertung erfolgte auf einem ELISA-Reader (EAR 400AT, SLT Labinstruments).

2.6 Lipidanalyse

Lipide wurden mit Hilfe der von Bligh und Dyer (1959) beschriebenen Methode aus gereinigtem Myelin extrahiert. Dazu wurde das Material in 1ml PBS homogenisiert und mit 3ml Methanol/CHCl₃ (2:1) sowie mit 0.8ml 1M NaCl versetzt. Nach der Extraktion (vortexen 30sec) und einer 10minütigen Inkubation (RT) wurden 1ml CHCl₃ sowie 1ml 1M NaCl zugegeben und gründlich vermischt (30sec vortexen). Der Phasentrennung durch Zentrifugation (10min, 700g) folgte das Abpipettieren der lipidhaltigen Unterphase (Pasteurpipette). Die Lipide wurden dann im Wasserbad bei 40°C unter N₂ vom Lösungsmittel befreit, im Vakuum getrocknet und mit CHCl₃/Methanol (2:1) gelöst.

Für die dünnschichtchromatographischen Analysen wurden HPTLC Kieselgel 60 Platten (Merck) benutzt. Lipidproben wurden aufgetragen und entsprechend der durchgeführten Analysen mit verschiedenen Laufmitteln aufgetrennt.

Zur Entwicklung der Gesamtlipide wurde ein Gemisch aus CHCl₃/Methanol/H₂O (65:25:4) verwendet. Die Auftrennung der Ganglioside erfolgte im Laufmittelsystem CHCl₃/Methanol/NH₄OH_[2N] (60:35:4). Zur Analyse wurden die aufgetrennten Lipide in unterschiedlicher Weise angefärbt: Veraschen mit 50 % H₂SO₄ bei 120°C für Gesamtlipide, Zinzadze-Färbung (Dittmer und Lester, 1964) für Phospholipide, Anthron-Färbung (Ledeen und Yu, 1982) für Glykolipide, Orcin-Färbung (Ledeen, 1966) für Sialinsäure-haltige Lipide und Ninhydrin-Färbung für Amin-haltige Lipide.

3. Immunologische Methoden

3.1 Immunisierung von Kaninchen

5001g des rekombinanten MOG-Proteins wurden im Verhältnis 1:1 mit 0.5ml kompletten Freund'schem Adjuvans emulgiert und einem 10 Wochen alten Kaninchen intramuskulär in die Hinterläufe injiziert. Gleichzeitig wurde aus der Ohrvene eine Blutprobe (*pre-immun-serum*: PIS) entnommen. Drei *Booster*-Injektionen mit je 1001g des entsprechenden Proteins erfolgten im Abstand von je zwei Wochen mit Hilfe einer 1:1 Emulsion aus Proteinlösung und inkompletten Freund'schem Adjuvans. Der Titer konnte mittels ELISA verfolgt werden und ca. zwei Wochen nach der letzten *Booster*-Injektion wurden die Tiere mit Nembutal betäubt und durch Herzpunktion ausgeblutet. Nach 5h Inkubation bei RT wurde das Serum durch Zentrifugation erhalten.

3.2 Immunisierungen von Mäusen

Die Immunisierung von Mäusen zur Auslösung von Experimenteller Autoimmun Enzephalitis erfolgte mit je 200-300µg (100µl) des rekombinanten MOG-Proteins emulgiert in 100µl CFA (1:1), supplementiert mit 400µg Mycobacterium Tuberculosis (abgetötet). Von dieser Mischung wurden je 100µl subkutan links von der Schwanzwurzel und ca. 1cm weiter kopfwärts links der Wirbelsäule injiziert. Eine identische *Booster*-Injektion erfolgte eine Woche später mit gleicher Zusammensetzung auf der rechten Seite. Zusätzlich wurde noch intraperitoneal 500ng Bordetella Pertussis (PTX) in 50-100µl PBS injiziert. Eine identische Injektion erfolgte 48h später.

3.3 Enzyme Linked Immunosorbent Assay ELISA (Engvall und Perlmann, 1972)

Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei 4°C mit dem Antigen (101g/ml PBS) beschichtet und unspezifische Bindungsstellen mit 3% BSA in PBS blockiert (2h, 37°C). Nach zweimaligem Waschen mit 0.1% NP-40 in PBS wurde das zu testende Antiserum (Maus oder Kaninchen) in einer Verdünnungsreihe zugefügt (2h, 37°C). Erneutem Waschen folgte eine

Inkubation mit Anti-Kaninchen- oder Anti-Maus-IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat in 50mM Tris-Cl pH 8, 1mM MgCl₂, 3% BSA (2h, 37°C). Der oben genannte Waschschrift wurde wiederholt und nach Zugabe des Substrats (25mM p-Nitrophenylphosphat in 1M Diethanolamin pH 9.8, 0.5mM MgCl₂) innerhalb von 30min die Extinktion bei 405nm bestimmt (ELISA-Reader, EAR 400AT, SLT Labinstruments). Zur Bestimmung des Titers wurden die Verdünnungen zum NIS extrapoliert.

3.4 Western Blot Analyse

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine durch *semi-dry-electroblotting* (Harlow und Lane, 1988) auf Nitrocellulose (Schleicher & Schüll) transferiert (3h, 1mA/cm², Sartoblot II S, Sartorius).

Der Blot wurde wie folgt aufgebaut:

Kathode;

zwei Whatman-Filterpapiere durchfeuchtet mit 25mM Tris pH 9.8, , 20% Methanol, (40mM ε-Aminocaprinsäure , optional);

Gel Nitrocellulose-Membran;

2 Whatman Filterpapiere getränkt in 25mM Tris pH 10.4, , 20% Methanol;

2 Whatman Filterpapiere getränkt in 0.3M Tris pH 10.4, 20% Methanol.

Nach dem Transfer wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt. Zur Blockierung freier Bindungsstellen erfolgte eine Inkubation mit 3% BSA in TBS (über Nacht, 4°C). Die Membran wurde mit dem in 1% BSA/TBS verdünnten Antiserum 1-3h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert (Verdünnungen: anti-PLP-Serum: 1:400; anti-MBP Antikörper (monoklonaler anti-Maus-MBP, Boehringer): 1:5000; poly-Histidin-Antikörper (Sigma), 1:1000, Maus NIS 1:1000, anti-MOG-Serum Maus 1:1000, anti-MOG-Serum Kaninchen 1:10000). Nach fünfmaligem Waschen (je 5min) mit 0.1% NP-40/TBS folgte eine Inkubation mit einem anti-Kaninchen- bzw. anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat (Sigma) für 1h bei RT in 1% BSA/TBS. Die Signale konnten nach fünf abschließenden Waschschriften in 0.1% NP-40/TBS mit Hilfe des *Lumi-Light^{plus}* western-Blot Substrat (Roche) sichtbar gemacht werden.

3.5 Kryofixierung von Mausgewebe mit Formaldehyd

Drei Monate alte Mäuse wurden mit Nembutal anästhetisiert und über den linken Herzventrikel mit 4% Paraformaldehyd/2% Glutaraldehyd in PBS perfundiert. Das Gehirn wurde präpariert, drei Stunden in der Perfusionslösung nachfixiert und in 10ml 0.5M Sucrose über Nacht bei 4°C gelagert. Die Einbettung des Gewebes in OCT (Tissue Tek, Miles Scientific, Naperville) und die Anfertigung von 8-10µm Schnitten erfolgte mit Hilfe eines Cryotoms (Vogel, AS650) bei -20°C. Die Objektträger (SuperFrost Plus) wurden 10min in 4% Paraformaldehyd/PBS inkubiert, mit PBS gewaschen und getrocknet. Zur Lagerung bei -20°C wurden die Schnitte durch fünfminütige Inkubationen in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydratisiert (20% Ethanol, 40% Ethanol, 60% Ethanol, 80% Ethanol, 100% Isopropanol). Für immunzytochemische Untersuchungen wurden die Schnitte in der analogen absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert, fünfmal mit PBS gewaschen und mit 5% BSA/PBS blockiert. Die Antikörper-Inkubationen erfolgten in 1% BSA/PBS für jeweils 1h bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Objektträger mit Glyceringelatine (Merck) eingedeckelt.

3.6 Kryofixierung von Mausgewebe ohne Formaldehyd (Gehirn und Rückenmark)

Zu untersuchende Mäuse wurden mit Nembutal anästhetisiert und über den linken Herzventrikel mit 0.9% NaCl perfundiert. Das Gehirn wurde präpariert, mit einer dünnen Schicht OCT (Tissue Tek, Miles Scientific, Naperville) umgeben und 45-60sec in ein in flüssigem Stickstoff befindliches Glas mit Isopentan gehalten. Danach wurde das Gehirn zur späteren Einbettung bei -80°C gelagert.

Die Präparation des Rückenmark erfolgte nach Perfusion ohne Fixationsmittel. Nach Entnahme und Kryokonservierung des Gehirns wurde die komplette Wirbelsäule präpariert und das Mark vorsichtig von den Wirbeln abgelöst. Das präparierte Rückenmark wurde wie oben beschrieben kryokonserviert und bei -80°C gelagert.

3.7 Anfertigung von Kryoschnitten

Die Einbettung des Gewebes in OCT und die Anfertigung von 8-14µm Schnitten erfolgte mit Hilfe eines Cryotoms (Vogel, AS650) bei -20°C. Zur Einbettung wurde das Rückenmark quaderförmig aus dem OCT herausgeschnitten und Querschnitte angefertigt.

Die Objektträger (SuperFrost Plus) wurden bei -80°C gelagert.

3.8 Immunhistochemische Untersuchungen an Kryoschnitten

Für immunhistochemische Untersuchungen wurden die Schnitte 20min bei RT, 10min in Aceton, 7min in Chloroform inkubiert und dann nach dem Trocknen mit einem Fettstift umrandet.

Standardprotokoll für die Färbung von aktivierten Leukocyten mit der Meerrettich Peroxidase (*horseradish peroxidase; HPO*): Es wurde nun 20min mit 5 % BSA/PBS blockiert, der erste Antikörper (LCA 1:500, anti-MOG 1:500) in 1-5%BSA/PBS für 1h zugegeben, 10min mit 0.05M Tris gewaschen, mit dem jeweils zweiten Antikörper (Streptavidin gekoppelte Meerrettich Peroxidase 1:500, anti-rat IgG 1:500), in 1-5%BSA/PBS für 1h und mit. Die Antikörper-Inkubationen erfolgten in 1 % BSA/PBS für jeweils 1 h bei RT. Es wurde dreimal PBS gewaschen, 2-8sec mit Hämatoxylin gegengefärbt und die Objektträger nach durchlaufener aufsteigender Alkoholreihe, Isopropanol und drei mal Xylol mit Merckoglas (Merck) eingedeckelt. Bei Fluoreszenzfärbungen mit Cy3-markierten Antikörpern wurde direkt mit Glycerin-Gelatine (Merck) eingedeckelt.

3.9 Immunhistochemische Untersuchungen an Paraffinschnitten

Mäuse wurden mit Nembutal betäubt und über den linken Herzventrikel mit 4% Paraformaldehyd/2% Glutaraldehyd in PBS perfundiert. Die Gehirne wurden präpariert und über Nacht in 4% Paraformaldehyd/2% Glutaraldehyd bei 4°C nachfixiert. Anschließend wurden die Gehirne durch einen Einbettungsautomaten nach folgendem Programm in Paraffin eingebettet:

1h 70% Ethanol

2h 70% Ethanol

2h 96% Ethanol
2h 96% Ethanol
3h 100% Ethanol
3h Isopropanol
3h Xylol
3h Xylol
3h Xylol
3h Paraffin
3h Paraffin (mit Vakuum)

Danach wurden die Präparate in Paraffin Blöcke gegossen und an einem Mikrotom geschnitten.

3.10 Färbungen von Paraffin und Kryoschnitten mit Hämatoxylin, Eosin und Luxol Fast Blue

Paraffinschnitte wurden vor den Färbungen in einer absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert. Kryoschnitte wurden wie beschrieben vorbehandelt. Zur Hämatoxylin/Eosinfärbung wurden die Schnitte 5min in Eosin gestellt und anschließend in destilliertem Wasser gespült. Danach wurden sie 5min in Hämatoxylinlösung behandelt, mit destilliertem Wasser gespült und für 5min in Leitungswasser gestellt. Danach wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydratisiert und in Merckoglas (Merck) eingedeckelt.

Die Luxolfärbung erfolgte über Nacht bei 60°C in Luxol Fast Blue Lösung (0,1% Luxol; 0,5% (V/V) 10% Essigsäure; in 96% Ethanol). Anschließend wurde mit 96% Ethanol und destilliertem Wasser gewaschen. Dann wurden die Schnitte für 5sec in 0,05% Lithiumcarbonatlösung und zweimal für je 10sec in 70% Ethanol gestellt. Anschließend wurde mit destilliertem Wasser gewaschen und diese vier Schritte so oft wiederholt, bis ein scharfer Kontrast zwischen blaugefärbter weißen Substanz und nicht gefärbter grauen Substanz zu beobachten war. Abschließend wurden die Präparate in 70% Ethanol gewaschen und wie beschrieben mit H/E gegengefärbt und eingedeckelt.

3.11 Isolierung von peripheren Lymphozyten

Lymphknoten oder Milz wurden präpariert und durch ein Eisensieb oder wahlweise durch einen 60µm Nylon Filter (*Cell Strainer*, Becton Dickinson) gerieben, zentrifugiert, gewaschen und anschließend in einer vom Pellet abhängigen Menge RPMI-Medium 1640 (komplementiert durch Penicillin, Streptomycin, Glutamin, 10% FCS und $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ 2-Merkaptoethanol) aufgenommen. Nach Zellzahlbestimmung durch Tryphan Blau wurde die Konzentration der Zellen durch Zugabe von Medium wie für die weiteren Versuche gewünscht eingestellt.

3.12 Isolierung von Immunzellen aus dem Gehirn und Rückenmark

Unmittelbar vor dem Versuch wurden Lösungen der Dichte 1,03/1,05/1,072/1,098/1,122g/ml hergestellt. Diese wurden durch Mischen berechneter Mengen Percoll Lösung (10,5ml 1,5M NaCl; 94,5ml Percoll) und HBSS Medium (inkl. 3% FCS) erhalten.

Nach Perfusion der Mäuse mit NaCl wurden die Gehirne entnommen und durch ein 60µm Nylon Filter gerieben. Es wurden drei bis fünf Gehirne (Rückenmarke) pro Versuchsgruppe zusammen aufgearbeitet. Der Nylonfilter steckte auf einem 50ml Falconröhrchen, welches bis zum unteren Siebrand mit HBSS Medium gefüllt war (HBSS inkl. 3% FCS). Nachdem jeweils alle drei Gehirne durch das Sieb gerieben worden waren, wurde das 50ml Falconröhrchen 6min bei 1200U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment mit einer blauen Pipettenspitze (1ml) mit dem verbliebenen Medium resuspendiert und mit 10ml Lösung der Dichte 1,098g/ml versetzt. Nun wurde mit 5ml Lösung der Dichte 1,122g/ml vorsichtig unterschichtet. Danach wurde mit Lösungen der Dichten 1,072/1,05/1,03g/ml überschichtet. Zum Schluss wurde mit 9ml HBSS (inkl. 3% FCS) überschichtet und 30min bei 2700U/min zentrifugiert. Die Banden 3, 4 und 5 (von oben gezählt) wurden getrennt abgenommen, mit HBSS (inkl. 3% FCS) aufgefüllt auf 50ml und 6min bei 2700U/min zentrifugiert. Nun wurde das Medium abgekippt, die Zellen vereint und gezählt. Gezählt wurde durch Vermischen von 10µl Lösung mit 10µl Tryphan Blau und anschließender Zellzahlbestimmung der gefärbten Zellen. Nun wurden die Ansätze auf die gewünschte Konzentration eingestellt und je nach Bedarf aufgearbeitet.

3.13 Fluorescence Aided Cell Sorting (FACS) von Leukozyten

Die Analyse der aus Gehirn, Rückenmark, Milz und Lymphknoten isolierten Lymphozytenpopulationen erfolgte durch 20min 4°C Inkubation mit den entsprechenden Antikörperkonjugaten (anti-CD4-PE, anti-CD8-FITC, anti-B220-FITC und LCA-CyCr; Miltenyi). Die eingesetzten Verdünnungen waren 1/25 für anti-CD4 und 1/10 für die anderen Antikörper. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen am Zellsortierer der Neuropathologie Köln untersucht.

3.14 T-Zell Proliferations-assay

Es wurden $4 \cdot 10^5$ aus Lymphknoten isolierte Leukozyten in 96-Loch Platten mit flachem Boden in Dreifachkultur ausgesät (RPMI-Medium 1640 (komplementiert durch Penicillin, Streptomycin, Glutamin, 10% FCS und $5 \cdot 10^{-5}$ M 2-Merkaptoethanol)). Die Zellen wurden mit PBS, 0,5µg rMOG und 2µg rMOG pro Loch für 4 Tage inkubiert. Dann wurde 1µCi [3 H]-Thymidin für 16h hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen auf Nitrocellulose-Filter (Schleicher und Schüll) abgesaugt und je dreimal mit 10% Trichloressigsäure, 5% Tichloressigsäure, 95% Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Filter wurden mit 5ml Szintillationslösung (Firma) versetzt und in einem Szintillationszähler (Wallac 1409, Turku) ausgewertet.

3.15 Enzyme linked immuno spot assay (ELISPOT)

Der ELISPOT Assay wurde in Anlehnung an Deckert et al. (2001) durchgeführt.

An Tag 1 wurde der 1. Antikörper (anti-IFN- γ , Biosource) mit frisch hergestelltem Beschichtungspuffer auf 10µg/ml verdünnt und 65µl pro Loch auspipettiert. Die Inkubation der vor Verdunstung geschützten Platte erfolgte über Nacht bei 4°C.

An Tag 2 wurde die Platte 4 mal mit 200µl dest. Wasser pro Loch mit jeweils 15min Inkubationszeit gewaschen und die Platte danach gut ausgeschlagen. Nun wurde 200µl MEM alpha Medium (inkl. 10% FCS) pro Loch pipettiert und 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend

wurde die Platte gut ausgeschlagen und um ein Austrocknen zu verhindern mit 50µl Medium pro Loch befüllt.

Während dieser Zeit wurden die präparierten Antigen präsentierenden Zellen (APC), hier Milzzellen von nicht immunisierten mog^{+/+} Mäusen, für 4h bei 37°C mit dem Peptid (rMOG, 10⁻⁶ molar) oder nur mit Medium inkubiert. Anschließend wurden 1*10³, 1*10⁴ und 1*10⁵ der zu untersuchenden T-Zellen in je vier Löcher zusammen mit den APC (4*10⁵ Zellen pro Loch) pipettiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

An Tag 3 wurde das Medium auf der Platte ausgeschlagen und 10 mal mit je 200µl Waschpuffer behandelt. Es wurden je 50µl pro Loch des 2. Antikörpers (Biotin gekoppelter anti-Ifn-γ), mit Verdünnungspuffer auf eine Konzentration von 1µg/ml eingestellt, hinzugegeben und für 2h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Platte ausgeschlagen und 5 mal mit je 200µl dest. Wasser gewaschen. Es wurden 50µl *horseradish peroxidase*-Streptavidinkonjugat pro Loch (Verdünnung auf 1:250 durch Waschpuffer (inkl. 5%FCS)) und für 2h bei RT inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit dest. Wasser wurde gut ausgeschlagen und mit 50µl frisch angesetzter AEC-DMF Lösung für 5-30min unter Beobachtung der Farbreaktion inkubiert. Um die Färbereaktion zu stoppen wurde drei mal mit dest. Wasser gewaschen und die Platte nach Ausschlagen getrocknet.

Das Auszählen der Spots erfolgte unter einem Auflichtmikroskop mit 10-facher Vergrößerung. Die positiven Spots besitzen einen Farbsaum und werden durch Vergleich mit den ohne rMOG stimulierten Zellen ausgewertet.

Verwendete Puffer:

Beschichtungspuffer: Stammlösung A: 1,59g NaHCO₃ in 100ml destilliertem Wasser.

Stammlösung B: 2,93g Na₂CO₃ in 100ml destilliertem Wasser.

Einstellen auf pH 9,6 durch Mischen von 1,75ml Lösung A mit 0,25ml Lösung B und Zugabe von 8ml dest. Wasser.

Verdünnungspuffer: PBS (1% FCS)

Waschpuffer: PBS (0,25% Tween20)

AEC-DMF: 1 AEC-Tablette (Sigma) in 2,5ml DMF gelöst.

47,5ml 50mM Na-Acetat Puffer pH 5,0.

Lösung filtrieren.

4. Zellbiologische Methoden

4.1 Kultur von embryonalen Stammzellen:

Embryonale Stammzellen wurden unter den bei Robertson (1989) beschriebenen Bedingungen kultiviert. Die für die Blastozysteninjektion vorgesehenen Zellen wurden auf embryonalen Fibroblasten, Zellen, aus denen DNA präpariert werden sollte, auf gelatinisierten Kulturschalen kultiviert. Dem ES-Zellmedium für R1 und CJ7-Zellen (DMEM, 20% FCS, 0,1mM 2-Mercaptoethanol) wurden zusätzlich 2000U/ml LIF (ESGRO, Gibco/BRL), 1% von 100x MEM-non essential amino acids (Gibco/BRL), 1mM Natriumpyruvat (Gibco/BRL) und 10µg/ml Penicillin/Streptomycin (Seromed) zugesetzt.

Die ES-Zellen wurden jeden zweiten Tag passagiert:

Nach Entfernung des ES-Zellmediums wurden die Zellen zweimal mit PBS (Ca^{2+} - und Mg^{2+} -frei) gewaschen.

Jede Kulturschale wurde mit 3 ml Trypsin/ EDTA (0.05 %) bedeckt.

Nach ca. 3-5 min Inkubation bei 37°C beginnen sich die Zellen vom Substrat zu lösen.

Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Zellen in 7 ml ES-Zellmedium aufgenommen. Bis zum Erreichen einer Einzelzellsuspension wurden die Zellen mit einer Pasteurpipette resuspendiert und 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert.

Die Zellen wurden in 5-8 ml ES-Zellmedium resuspendiert, entsprechend ihrer ursprünglichen Dichte auf 1:5 bis 1:8 verdünnt und auf frischen Fibroblasten-*Feeder*-Platten neu ausgesät.

In einer Dichte von 10^6 Zellen/ ml Einfriermedium (80 % ES-Medium, 10 % FCS, 10 % DMSO) wurden die ES-Zellen eingefroren.

4.2 Elektroporation von ES-Zellen:

Zur Optimierung der Elektroporationsbedingungen war es wichtig, daß sich die für die Elektroporation vorgesehenen ES-Zellen in einer aktiven Wachstumsphase befanden und zwei Tage nach der letzten Passage verwendet wurden. Vier Stunden vor Beginn der Elektroporation wurde das Medium gewechselt. Anschließend wurden 201g des linearisierten *targeting*-Vektors durch das nachfolgend skizzierte Verfahren in die ES-Zellen transfiziert:

Nachdem die für die Elektroporation vorgesehenen Zellen (ca. 2×10^7 Zellen) zweimal mit PBS (Ca^{2+} - und Mg^{2+} -frei) gewaschen wurden, wurden sie mit 3 ml Trypsin/EDTA (0.05 %) nach einer Inkubationszeit von 3-5 min bei 37°C vom Substrat abgelöst.

Durch Zugabe von 7 ml ES-Medium wurde die Reaktion abgestoppt. Nachfolgend wurden die Zellen gründlich mit einer Pasteurpipette bis zum Erreichen einer Einzelzellsuspension resuspendiert.

Nach Zentrifugation (5 min) bei 1000 rpm wurden $1.2-1.5 \times 10^7$ Zellen in 0.96 ml PBS resuspendiert. 800 μl davon wurden zusammen mit 20 μg linearisierter DNA suspendiert und der Rest als nicht elektroporierte Kontrolle ausgesät.

Die Zellen wurden 5 min bei RT inkubiert und anschließend blasenfrei in eine 0.4 cm Elektroporationsküvette (BIORAD) überführt.

Die Durchführung der Elektroporation erfolgte mit einem Puls von 500 1F und 230 V bei RT. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT oder auf Eis wurden die elektroporierten Zellen in 10 ml ES-Medium überführt, resuspendiert und jeweils 2 ml auf die verbleibenden fünf Fibroblasten-*Feeder*-Platten ausgesät (2×10^6 Zellen/ Platte).

4.3. Selektion und Isolierung von ES-Zellklonen

24 Stunden nach der Elektroporation wurde das ES-Zellmedium durch das Selektionsmedium ersetzt. Eine elektroporierte und die nicht-elektroporierte G418-Kontrollplatte wurden mit Selektionsmedium 1 (ES-Medium + 4001g/ml G418), die übrigen vier Kulturschalen mit Selektionsmedium 2 (ES-Medium + 4001g/ ml G418 + 21M GanC) versetzt. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Nach dem sechsten Tag wurden alle Platten aufgrund der mutagenen Wirkung des GanC mit Selektionsmedium 1 weiterbehandelt.

Nachdem auf der G418-Kontrollplatte die nicht-elektroporierten Zellen abgestorben waren (8.-10. Tag), wurden G418- und GanC-resistente Klone von den nicht für die Kontrolle vorgesehenen Platten isoliert (Kontrolle unter dem Mikroskop).

Das für die so isolierten Klone verwendete ES-Zellmedium enthielt 3001g/ml G418.

Die Klone wurden nach weiteren fünf Tagen 1:1 gesplittet, wobei eine Hälfte mit reinem ES-Medium auf neuen Fibroblasten-*Feeder*-Platten ausgesät wurde. Die andere Hälfte wurde auf gelatinisierten 24-Loch-Platten zur Gewinnung genomischer DNA ausgesät. Im allgemeinen

waren die Zellen nach zwei Tagen konfluent und konnten direkt auf der Platte eingefroren bzw. lysiert werden.

Die drei Kontrollplatten wurden mit 3% Methylenblau gefärbt. Die angefärbten Klone wurden auf der G418-Kontrollplatte (elektroporierte Zellen) und der G418/GanC-Kontrollschale ausgezählt, um den Anreicherungsfaktor der Selektion bestimmen zu können.

4.4 Karyotypisierung der ES-Zellen

Die Bestimmung des Karyotyps erfolgte mit ES-Zellen, die auf gelatinisierten 90mm Kulturschalen gewachsen waren, nach folgendem Protokoll:

1. Blockierung des Zellzyklus mit Colchicin

- a. Medium absaugen
- b. 5ml Medium mit 33 μ l Colchicinlösung (*Demecolcine solution*, Sigma) vermischen und zugeben
- c. 50 min bei 37°C inkubieren

2. Trypsinisieren (s. Elektroporation von ES-Zellen)

3. Osmolyse mit hypotonischer KCl-Lösung (0.56 %)

- a. Zellen 8 min bei 500g zentrifugieren und Überstand dekantieren
- b. Präzipitat vorsichtig lösen und dann 1 ml KCl vorsichtig tropfenweise zugeben
- c. resuspendieren, 3 ml KCl zugeben und ohne zu pipettieren gut vermischen
- d. 8-10 min. bei RT stehen lassen, 5 min bei 500g zentrifugieren und Überstand abdekantieren

4. Fixierung

- a. Zellen in restlicher Flüssigkeit vorsichtig resuspendieren
- b. 2 ml eiskalte, frische Fixierlösung [Methanol/Eisessig (3:1)] tropfenweise zugeben
- c. 5 min bei RT stehenlassen, 5min bei 500g zentrifugieren, Überstand absaugen
- d. Schritt a. bis c. noch 1 bis 2 mal wiederholen, dann Präzipitat in 0,5 - 1ml Fixierlösung aufnehmen
- e. Zellen mittels Pasteurpipette aus mind. 10cm Höhe auf den sauberen Objektträger auftropfen (3 Tropfen/ Objektträger) und trocknen lassen

5. Färbung

- a. Objektträger ca. 1min in Giemsa-Färbelösung (*Giemsa stain*, GS-500, Sigma) tauchen
 - b. 2 mal mit dd-Wasser waschen, lufttrocknen und eindeckeln (Entellan NEU, Merck).
- Von jedem untersuchten Klon wurden 15-20 Chromosomensätze untersucht.

5. Elektronenmikroskopie

Die Mäuse wurden wie beschrieben über den linken Herzventrikel mit 6 % Glutaraldehyd in PBS perfundiert. Gehirn, Nervus opticus und Rückenmark wurden nach der Präparation in OsO₄ in 0.1 M Sucrose 30 min nachfixiert und in Epon 812 eingebettet. Ultradünnschnitte der Präparate wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert und - wie beschrieben (Büssow, 1978) - elektronenmikroskopisch von Prof. Büssow (Institut für Anatomie, Bonn) untersucht. Alternativ wurden die Proben zusammen mit Bogdan Beirowski am Institut für Anatomie, Köln aufgearbeitet und elektronenmikroskopisch untersucht.

6. Methoden zur Etablierung transgener Mauslinien (Hogan et al., 1986)

6.1. Mäusehaltung und Zucht

Für die Durchführung der beschriebenen Experimente wurden CD1 (outbred) und C57/Bl6 (inbred) Mäuse gezüchtet. Die Tiere wurden in einem künstlichen Tag-Nacht Rhythmus gehalten (Beleuchtung: 5:00 bis 19:00 Uhr, Dunkelheit: 19:00 bis 5:00 Uhr).

6.2 Blastozystenisolation

5-7 Wochen alte CD1- bzw. C57Bl/6-Weibchen (*Charles River*), die zwei Tage vor der Verpaarung mit 5U Gonadotropin (GT, *Sigma*), und exakt 47-48h später mit 5U humanem Chorion-Gonadotropin (hCG, *Sigma*) intraperitoneal zur Induktion einer Superovulation injiziert wurden, konnten als Spendermäuse verwendet werden. Alternativ wurden die Weibchen am Tag der Verpaarung durch visuelle Überprüfung des Östrus auf Empfängnisbereitschaft ausgewählt. 12 bis 18h nach Verpaarung wurden die Weibchen nach Vaginalplugs selektioniert.

Nachdem die Mäuse durch cervikale Dislokation getötet worden waren, wurden die Blastozysten durch Ausblasen des Uterus von 3.5 Tage schwangeren Weibchen isoliert. Vor der Injektion wurden diese 1h in DMEM-Medium mit 10% FCS (DF-Medium) bei 37°C und 4,9 % CO₂ inkubiert.

6.3. Injektion und Reimplantation von Blastozysten

Die verwendete Injektionsapparatur besteht aus einem Mikromanipulator (Leitz) zur Steuerung von Halte- und Injektionskapillaren und einem Lichtmikroskop (Zeiss Axiovert 10). Injektionskapillaren (Mikrokapillaren, Clark) für die Blastozysteninjektion wurden mit einem automatischen *Pipette-Puller* (*Vertical Pipette Puller, model 720*; Kopff) gezogen oder käuflich erworben (Transfer Tips (ES), Eppendorf). Die Haltekapillaren wurden an der Stelle des benötigten Durchmessers mittels eines mit einer Glasperle beschichteten Glühdrahtes angeschmolzen. Die durch Erkalten entstehende glatte Bruchstelle wurde anschließend gesintert. Selbst gezogene Injektionskapillaren wurden unter einem Mikroskop mit einem Skalpell scharf abgebrochen. Die Mikrokapillaren wurden an den Enden durch Anschmelzen um 30-40° gebogen und im Mikromanipulator so fixiert, daß sie in eine Kammer ragten, die neben DFH-Medium mit einer frisch präparierten Einzelzellsuspension sowie bereits inkubierten Blastozysten gefüllt war.

Die Injektion erfolgte mit Hilfe eines luftgefüllten Haltesystems (Cell Tram Air, Eppendorf) zur Fixierung der Embryonen und eines ölgefüllten Systems (Cell Tram Oil, Eppendorf) zur Injektion der ES-Zellen. Zur Injektion von Blastozysten wurden 5 bis 35 ES-Zellen (je nach Größe der Blastozysten) mit der Injektionskapillare auf der inneren Zellmasse abgelegt. Erfolgreich injizierte Blastozysten wurden mindestens 1h in M16-Medium in 37°C, 5% CO₂ inkubiert, bevor sie in scheinchwangere CD1-Weibchen (*foster-Mütter*) reimplantiert wurden. Die *foster-Mütter* resultierten aus einer Verpaarung mit vasktomierten Männchen. Für die Vasektomie wurden zwei Monate alte CD1-Männchen eingesetzt.

Der Transfer der Blastozysten erfolgte in scheinchwangere Weibchen am Tage 2.5 p.c. in eine Seite des Uterushorns. Es wurden je nach Größe der Weibchen 4-15 Blastozysten reimplantiert.

7. Methoden zur Verhaltensphysiologie

Es wurden je 8 Männchen der mbp^{-/-}, plp^{-/-}, mog^{-/-} und mbp^{-/-}, plp^{-/-} Mauslinien im Alter von drei Monaten im Institut für Anatomie II an der Universität zu Köln von der Arbeitsgruppe kognitive Neurobiologie nach den Methoden von Irwin (1968), Bulman-Fleming (1997), Rogers et al. (1997) und Klapdor und van der Staay (1996) durchgeführt.

VII. Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis:

aa	Aminosäuren (<i>aminoacids</i>)
APC	Antigen präsentierende Zelle(n)
BBB	Blut-Hirn-Schranke
BCA	<i>Bicinchonic acid</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinder Serum Albumin
CFA	Komplettes Freund'sches Adjuvans
CSF	Cerebrospinale Flüssigkeit
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte-associated receptor-4
DM20	Isoform des PLP
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle Autoimmun Enzephalitis
E.coli	Escherichia coli
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ELISPOT	<i>enzyme linked immunospot assay</i>
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FACS	<i>fluorescence aided cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GanC	Gancyclovir
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HSV	Herpes Simplex Virus
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
Kb	Kilobasen
KDa	Kilodalton
LCA (CD45)	<i>leukocyte common antigen</i>
LFA	<i>leukocyte-function associated antigen</i>
MACS	<i>magnetic bead-activated cell sorting</i>
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MALDI	matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry
MBP	Myelin Basisches Protein
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MMP	Matrix Metalloprotease
MOBP	Myelin assoziiertes Oligodendrozyten basisches Protein
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
neo	Neomycin
NP-40	Nonidet P-40
OD	Optische Dichte
OMgP	Oligodendrozyten-Myelin Glykoprotein

PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PGK	Phosphoglyceratkinase
PLP	Proteolipid Protein
PNS	Peripheres Nervensystem
rpm	Umdrehungen/min
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Tris Borat EDTA
TBS	tris buffered saline
TCR	T-Zell Rezeptor
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Th1	T-Helfer-1 Zellen
Th2	T-Helfer-2 Zellen
tk	Thymidinkinase
TNF	Tumor Nekrosis Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (Einheiten der Enzymaktivität)
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VLA	<i>very late antigen</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

2. Oligonukleotide

MOGex2-5'-s	GAC AAT TCA GAG TGA TAG GAC CAG GGT ATC
MOGex2-3'-as	CTT CCA CTT TCA ACT CCA TTG CTG CCT CTT
MOGex3-5'-as	GCA CAC CGG GGT TGA CCC AAT AGA AGG GAT
mogxpr-s	CCA TGG GAC AAT TCA GAG TGA TAG GAC CAG
mogxpr-as	CTC GAG ATC TTC CAC TTT CAA CTC CAT TGC
Promsonds	TGC TTC TCT GGG CAC AAA TGA CGG TCA GCT
Preexon-mog-s	CTT ACA TGG AGG TGG GGC TTG GGC
3'-neo sense	AGT GTA GCG CCT TCT ATC GTT TTC TTG ACG
RT-MOGas	GTT GTA GCA GAT GAT CAA GG

VIII. Literaturverzeichnis

- Adelmann, M., J. Wood, I. Benzel, P. Fiori, H. Lassmann, J. M. Matthieu, M. V. Gardinier, K. Dornmair and C. Linington (1995). The N-terminal domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) induces acute demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Neuroimmunol* **63**: 17-27.
- Albert, L. J. and R. D. Inman (1999). Molecular mimicry and autoimmunity. *N Engl J Med* **341**: 2068-74.
- Allen, I. V., Ed. (1999). Frontiers in multiple sclerosis. Asymptomatic multiple sclerosis: what does it mean? London, Martin Dunitz.
- Alvord, E. C. J., L. M. Rose and T. L. Richards, Eds. (1992). Chronic experimental allergic encephalomyelitis as a model of multiple sclerosis. Myelin: Biology and Chemistry. Boca Raton, CRC Press.
- Amiguet, P., M. V. Gardinier, J. P. Zanetta and J. M. Matthieu (1992). Purification and partial structural and functional characterization of mouse myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *J Neurochem* **58**: 1676-82.
- Anderson, A. C., L. B. Nicholson, K. L. Legge, V. Turchin, H. Zaghoulani, V. K. Kuchroo, J. (2000). High frequency of autoreactive myelin proteolipid protein-specific T cells in the periphery of naive mice: mechanisms of selection of the self-reactive repertoire. *J Exp Med* **191**: 761-70.
- Archelos, J. J., S. C. Previtali and H. P. Hartung (1999). The role of integrins in immune-mediated diseases of the nervous system. *Trends Neurosci* **22**: 30-8.
- Banker, G. A. (1980). Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture. *Science* **209**: 809-10.
- Baumann, N. and D. Pham-Dinh (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* **81**: 871-927.
- Bernard, C. C., T. G. Johns, A. Slavin, M. Ichikawa, C. Ewing, J. Liu and J. Bettadapura (1997). Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Mol Med* **75**: 77-88.
- Bernard, C. C., E. Townsend, V. B. Randell and H. G. Williamson (1983). Do antibodies to myelin basic protein isolated from multiple sclerosis cross-react with measles and other common virus antigens? *Clin Exp Immunol* **52**: 98-106.
- Berndt, J. A., J. G. Kim and L. D. Hudson (1992). Identification of cis-regulatory elements in the myelin proteolipid protein (PLP) gene. *J Biol Chem* **267**: 14730-7.
- Birling, M. C., G. Rousset, F. Nussbaum and J. L. Nussbaum (1993). Biochemical and immunohistochemical studies with specific polyclonal antibodies directed against bovine myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Neurochem Res* **18**: 937-45.
- Birnboim, H. C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* **100**: 243-55.
- Bligh, E. G. and W. J. Dyer (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Med Sci* **37**: 911-7.
- Blum, M., H. Beier and H. J. Gross (1987). Improved silverstaining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- Boison, D. and W. Stoffel (1994). Disruption of the compacted myelin sheath of axons of the central nervous system in proteolipid protein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 11709-13.
- Boman, J., P. M. Roblin, P. Sundstrom, M. Sandstrom and M. R. Hammerschlag (2000). Failure to detect Chlamydia pneumoniae in the central nervous system of patients with MS. *Neurology* **54**: 265.
- Bosio, A., E. Binczek and W. Stoffel (1996). Functional breakdown of the lipid bilayer of the myelin membrane in central and peripheral nervous system by disrupted galactocerebroside synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13280-5.
- Bradford, L. W. (1976). Problems of ethics and behavior in the forensic sciences. *J Forensic Sci* **21**: 763-8.
- Breithaupt, C., A. Schubart, H. Zander, A. Skerra, R. Huber, C. Linington and U. Jacob (2003). Structural insights into the antigenicity of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 9446-51.
- Bronstein, J. M., P. E. Micevych and K. Chen (1997). Oligodendrocyte-specific protein (OSP) is a major component of CNS myelin. *J Neurosci Res* **50**: 713-20.
- Bruck, W., P. Porada, S. Poser, P. Rieckmann, F. Hanefeld, H. A. Kretzschmar and H. Lassmann (1995). Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* **38**: 788-96.
- Brunner, C., H. Lassmann, T. V. Waehnelde, J. M. Matthieu and C. Linington (1989). Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendroglial glycoprotein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats. *J Neurochem* **52**: 296-304.
- Bulman-Fleming, M. B., M. P. Bryden and T. T. Rogers (1997). Mouse paw preference: effects of variations in testing protocol. *Behav Brain Res* **86**: 79-87.
- Burger, D., G. Perruisseau, M. Simon and A. J. Steck (1992). Comparison of the N-linked oligosaccharide structures of the two major human myelin glycoproteins MAG and P0: assessment of the structures

- bearing the epitope for HNK-1 and human monoclonal immunoglobulin M found in demyelinating neuropathy. *J Neurochem* **58**: 854-61.
- Burger, D., A. J. Steck, C. C. Bernard and N. Kerlero de Rosbo (1993). Human myelin/oligodendrocyte glycoprotein: a new member of the L2/HNK-1 family. *J Neurochem* **61**: 1822-7.
- Büssow, H. (1978). Schwann cell myelin ensheathing C.N.S. axons in the nerve fibre layer of the cat retina. *J Neurocytol* **7**: 207-14.
- Byravan, S., L. M. Foster, T. Phan, A. N. Verity and A. T. Campagnoni (1994). Murine oligodendroglial cells express nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8812-6.
- Capecchi, M. R. (1994). Targeted gene replacement. *Sci Am* **270**: 52-9.
- Chapman, J., S. Vinokurov, A. Achiron, D. M. Karussis, K. Mitosek-Szewczyk, M. Birnbaum, D. M. Michaelson and A. D. Korczyn (2001). APOE genotype is a major predictor of long-term progression of disability in MS. *Neurology* **56**: 312-6.
- Chernoff, G. F. (1981). Shiverer: an autosomal recessive mutant mouse with myelin deficiency. *J Hered* **72**: 128.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-9.
- Clements, C. S., H. H. Reid, T. Beddoe, F. E. Tynan, M. A. Perugini, T. G. Johns, C. C. Bernard and J. Rossjohn (2003). The crystal structure of myelin oligodendrocyte glycoprotein, a key autoantigen in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 11059-64.
- Cook, S. D., Ed. (2001). Evidence for a viral etiology of multiple sclerosis. Handbook of multiple sclerosis. New York, Basel, Marcel Dekker, Inc.
- Cooper, T. G. (1982). Biochemische Arbeitsmethoden. Berlin, New York, D. Gruyter.
- Coyle, A. J. and J. C. Gutierrez-Ramos (2001). The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol* **2**: 203-9.
- Coyle, P. K. and H. P. Hartung (2002). Use of interferon beta in multiple sclerosis: rationale for early treatment and evidence for dose- and frequency-dependent effects on clinical response. *Mult Scler* **8**: 2-9.
- Crocker, P. R., S. Kelm, C. Dubois, B. Martin, A. S. McWilliam, D. M. Shotton, J. C. Paulson and S. Gordon (1991). Purification and properties of sialoadhesin, a sialic acid-binding receptor of murine tissue macrophages. *Embo J* **10**: 1661-9.
- Croxford, J. L., J. K. Olson and S. D. Miller (2002). Epitope spreading and molecular mimicry as triggers of autoimmunity in the Theiler's virus-induced demyelinating disease model of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* **1**: 251-60.
- dal Canto, M. C. and H. L. Lipton (1977). A new model of persistent viral infection with primary demyelination. *Neurol Neurocir Psiquiatr* **18**: 455-67.
- Das, M. P., L. B. Nicholson, J. M. Greer, V. K. Kuchroo, L. Santambrogio, M. B. Lees and R. A. Sobel (1997). Autopathogenic T helper cell type 1 (Th1) and protective Th2 clones differ in their recognition of the autoantigenic peptide of myelin proteolipid protein. *J Exp Med* **186**: 867-76.
- Daubas, P., D. Pham-Dinh and A. Dautigny (1994). Structure and polymorphism of the mouse myelin/oligodendrocyte glycoprotein gene. *Genomics* **23**: 36-41.
- de Ferra, F., H. Engh, L. Hudson, J. Kamholz, C. Puckett, S. Molineaux and R. A. Lazzarini (1985). Alternative splicing accounts for the four forms of myelin basic protein. *Cell* **43**: 721-7.
- Deckert, M., S. Soltek, G. Geginat, S. Lutjen, M. Montesinos-Rongen, H. Hof and D. Schluter (2001). Endogenous interleukin-10 is required for prevention of a hyperinflammatory intracerebral immune response in *Listeria monocytogenes* meningoencephalitis. *Infect Immun* **69**: 4561-71.
- Deitmer, J. W. (2001). Strategies for metabolic exchange between glial cells and neurons. *Respir Physiol* **129**: 71-81.
- Delarasse, C., P. Daubas, L. T. Mars, C. Vizler, T. Litzenburger, A. Iglesias, J. Bauer, B. Della Gaspera, A. Schubart, L. Decker, D. Dimitri, G. Roussel, A. Dierich, S. Amor, A. Dautigny, R. Liblau and D. Pham-Dinh (2003). Myelin/oligodendrocyte glycoprotein-deficient (MOG-deficient) mice reveal lack of immune tolerance to MOG in wild-type mice. *J Clin Invest* **112**: 544-53.
- Deng, C., M. R. Capecchi (1992). Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol Cell Biol* **12**: 3365-71.
- Devaux, B., F. Enderlin, B. Wallner and D. E. Smilek (1997). Induction of EAE in mice with recombinant human MOG, and treatment of EAE with a MOG peptide. *J Neuroimmunol* **75**: 169-73.
- Dittel, B. N., T. H. Urbania and C. A. Janeway, Jr. (2000). Relapsing and remitting experimental autoimmune encephalomyelitis in B cell deficient mice. *J Autoimmun* **14**: 311-8.
- Dittmer, J. C. and R. L. Lester (1964). A Simple, Specific Spray for the Detection of Phospholipids on Thin-Layer Chromatograms. *J Lipid Res* **15**: 126-7.
- Duncan, I. D., J. P. Hammang and B. D. Trapp (1987). Abnormal compact myelin in the myelin-deficient rat: absence of proteolipid protein correlates with a defect in the intraperiod line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 6287-91.
- Dyer, C. A. (1993). Novel oligodendrocyte transmembrane signaling systems. Investigations utilizing antibodies as ligands. *Mol Neurobiol* **7**: 1-22.

- Dyer, C. A. and J. M. Matthieu (1994). Antibodies to myelin/oligodendrocyte-specific protein and myelin/oligodendrocyte glycoprotein signal distinct changes in the organization of cultured oligodendroglial membrane sheets. *J Neurochem* **62**: 777-87.
- Ebers, G. and A. D. Sadovnik, Eds. (1998). Epidemiology. Multiple Sclerosis. Philadelphia, Davis.
- Ebers, G. C., A. D. Sadovnick and N. J. Risch (1995). A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature* **377**: 150-1.
- Encinas, J. A., L. S. Wicker, L. B. Peterson, A. Mukasa, C. Teuscher, R. Sobel, H. L. Weiner, C. E. Seidman, J. G. Seidman, V. K. Kuchroo (1999). QTL influencing autoimmune diabetes and encephalomyelitis map to a 0.15-cM region containing Il2. *Nat Genet* **21**: 158-60.
- Engvall, E. and P. Perlmann (1972). Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* **109**: 129-35.
- Esiri, M. M. (1980). Multiple sclerosis: a quantitative and qualitative study of immunoglobulin-containing cells in the central nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol* **6**: 9-21.
- Evans, C. F., M. S. Horwitz, M. V. Hobbs and M. B. Oldstone (1996). Viral infection of transgenic mice expressing a viral protein in oligodendrocytes leads to chronic central nervous system autoimmune disease. *J Exp Med* **184**: 2371-84.
- Evavold, B. D., J. Sloan-Lancaster, K. J. Wilson, J. B. Rothbard and P. M. Allen (1995). Specific T cell recognition of minimally homologous peptides: evidence for multiple endogenous ligands. *Immunity* **2**: 655-63.
- Fawcett, J. W. and R. A. Asher (1999). The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* **49**: 377-91.
- Ferber, I. A., S. Brocke, C. Taylor-Edwards, W. Ridgway, C. Dinisco, L. Steinman, D. Dalton and C. G. Fathman (1996). Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol* **156**: 5-7.
- Filippi, M., T. Yousry, A. Campi, C. Kandziora, B. Colombo, R. Voltz, V. Martinelli, S. Spuler, S. Bressi, G. Scotti and G. Comi (1996). Comparison of triple dose versus standard dose gadolinium-DTPA for detection of MRI enhancing lesions in patients with MS. *Neurology* **46**: 379-84.
- Flugel, A., T. Berkowicz, T. Ritter, M. Labeur, D. E. Jenne, Z. Li, J. W. Ellwart, M. Willem, H. Lassmann and H. Wekerle (2001). Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* **14**: 547-60.
- Gale, C. R. and C. N. Martyn (1995). Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol* **47**: 425-48.
- Gardinier, M. V., P. Amiguet, C. Linington and J. M. Matthieu (1992). Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a unique member of the immunoglobulin superfamily. *J Neurosci Res* **33**: 177-87.
- Gardinier, M. V. and J. M. Matthieu (1993). Cloning and cDNA sequence analysis of myelin/oligodendrocyte glycoprotein: a novel member of the immunoglobulin gene superfamily. *Schweiz Arch Neurol Psychiatr* **144**: 201-7.
- Giaume, C. and L. Venance (1995). Gap junctions in brain glial cells and development. *Perspect Dev Neurobiol* **2**: 335-45.
- Gordon, J. W. and F. H. Ruddle (1983). Gene transfer into mouse embryos: production of transgenic mice by pronuclear injection. *Methods Enzymol* **101**: 411-33.
- Goujet-Zalc, C., C. Babinet, M. Monge, S. Timsit, F. Cabon, A. Gansmuller, M. Miura, M. Sanchez, S. Pournin, K. Mikoshiba and et al. (1993). The proximal region of the MBP gene promoter is sufficient to induce oligodendroglial-specific expression in transgenic mice. *Eur J Neurosci* **5**: 624-32.
- Goverman, J., T. Brabb, A. Paez, C. Harrington and P. von Dassow (1997). Initiation and regulation of CNS autoimmunity. *Crit Rev Immunol* **17**: 469-80.
- Goverman, J., A. Woods, L. Larson, L. P. Weiner, L. Hood and D. M. Zaller (1993). Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell* **72**: 551-60.
- Haas, N. S. and G. G. Shipley (1995). Structure and properties of N-palmitoleoylgalactosylsphingosine (cerebroside). *Biochim Biophys Acta* **1240**: 133-41.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-80.
- Harlow, E. and D. Lane (1988). Antibodies, a laboratory manual, C.S.H. Press.
- Hasty, P., J. Rivera-Perez and A. Bradley (1991,a). The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* **11**: 5586-91.
- Hasty, P., J. Rivera-Perez, C. Chang and A. Bradley (1991). Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* **11**: 4509-17.
- Hausser, M., N. Spruston and G. J. Stuart (2000). Diversity and dynamics of dendritic signaling. *Science* **290**: 739-44.
- Hedrick, S. M., L. A. Matis, T. T. Hecht, L. E. Samelson, D. L. Longo, E. Heber-Katz, R. H. Schwartz (1982). The fine specificity of antigen and Ia determinant recognition by T cell hybridoma clones specific for pigeon cytochrome c. *Cell* **30**: 141-52.

- Hilton, A. A., A. J. Slavin, D. J. Hilton and C. C. Bernard (1995). Characterization of cDNA and genomic clones encoding human myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Neurochem* **65**: 309-18.
- Hilton, D. J. and N. M. Gough (1991). Leukemia inhibitory factor: a biological perspective. *J Cell Biochem* **46**: 21-6.
- Hjelmstrom, P., A. E. Juedes, J. Fjell and N. H. Ruddle (1998). B-cell-deficient mice develop experimental allergic encephalomyelitis with demyelination after myelin oligodendrocyte glycoprotein sensitization. *J Immunol* **161**: 4480-3.
- Hogan, E. L., F. Constantini and E. Lacy (1986). Manipulating the mouse embryo. New York, Cold Spring Harbour Laboratory.
- Hogan, E. L. and S. Greenfield, Eds. (1984). Animal Models of genetic disorders of myelin. Myelin. New York, London, Plenum Press.
- Huang, D., Y. Han, M. R. Rani, A. Glabinski, C. Trebst, T. Sorensen, M. Tani, J. Wang, P. Chien, S. O'Bryan, B. Bielecki, Z. L. Zhou, S. Majumder and R. M. Ransohoff (2000). Chemokines and chemokine receptors in inflammation of the nervous system: manifold roles and exquisite regulation. *Immunol Rev* **177**: 52-67.
- Hudson, L. D., N. Ko and J. G. Kim, Eds. (1985). Control of myelin gene expression. Glial Cell Development: Basic Principles of Clinical Relevance. London, Bios Scientific Publishers.
- Huxley, A. F. and R. Stämpfli (1949). Evidence of saltatory conduction in peripheral myelinated nerve fibers. *J Physiol London* **108**: 315-339.
- Ichikawa, M., T. G. Johns, M. Adelman and C. C. Bernard (1996). Antibody response in Lewis rats injected with myelin oligodendrocyte glycoprotein derived peptides. *Int Immunol* **8**: 1667-74.
- Ichikawa, M., T. G. Johns, J. Liu and C. C. Bernard (1996). Analysis of the fine B cell specificity during the chronic/relapsing course of a multiple sclerosis-like disease in Lewis rats injected with the encephalitogenic myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide 35-55. *J Immunol* **157**: 919-26.
- Iglesias, A., J. Bauer, T. Litzenburger, A. Schubart, C. Linington (2001). T- and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Glia* **36**: 220-34.
- Inouye, H. and D. A. Kirschner (1988a). Membrane interactions in nerve myelin. I. Determination of surface charge from effects of pH and ionic strength on period. *Biophys J* **53**: 235-45.
- Inouye, H. and D. A. Kirschner (1988b). Membrane interactions in nerve myelin: II. Determination of surface charge from biochemical data. *Biophys J* **53**: 247-60.
- Irwin, S. (1968). Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia* **13**: 222-57.
- Jahnke, U., E. H. Fischer and E. C. Alvord, Jr. (1985). Sequence homology between certain viral proteins and proteins related to encephalomyelitis and neuritis. *Science* **229**: 282-4.
- Janz, R. and W. Stoffel (1993). Characterization of a brain-specific Sp1-like activity interacting with an unusual binding site within the myelin proteolipid protein promoter. *Biol Chem Hoppe Seyler* **374**: 507-17.
- Jiang, H., N. S. Braunstein, B. Yu, R. Winchester and L. Chess (2001). CD8+ T cells control the TH phenotype of MBP-reactive CD4+ T cells in EAE mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6301-6.
- Johns, T. G. and C. C. Bernard (1997). Binding of complement component C1q to myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel mechanism for regulating CNS inflammation. *Mol Immunol* **34**: 33-8.
- Johns, T. G. and C. C. Bernard (1999). The structure and function of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Neurochem* **72**: 1-9.
- Johns, T. G., N. Kerlero de Rosbo, K. K. Menon, S. Abo, M. F. Gonzales and C. C. Bernard (1995). Myelin oligodendrocyte glycoprotein induces a demyelinating encephalomyelitis resembling multiple sclerosis. *J Immunol* **154**: 5536-41.
- Kabat, E. A., A. Wolf and A. E. Bezer (1946). Rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of brain tissue with adjuvants. *science* **104**: 362.
- Kaplan, M. R., A. Meyer-Franke, S. Lambert, V. Bennett, I. D. Duncan, S. R. Levinson and B. A. Barres (1997). Induction of sodium channel clustering by oligodendrocytes. *Nature* **386**: 724-8.
- Karpus, W. J. and R. M. Ransohoff (1998). Chemokine regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: temporal and spatial expression patterns govern disease pathogenesis. *J Immunol* **161**: 2667-71.
- Karthigasan, J., J. S. Garvey, G. V. Ramamurthy and D. A. Kirschner (1996). Immunolocalization of 17 and 21.5 kDa MBP isoforms in compact myelin and radial component. *J Neurocytol* **25**: 1-7.
- Kerlero de Rosbo, N., M. Hoffman, I. Mendel, I. Yust, J. Kaye, R. Bakimer, S. Flechter, O. Abramsky, R. Milo, A. Karni and A. Ben-Nun (1997). Predominance of the autoimmune response to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in multiple sclerosis: reactivity to the extracellular domain of MOG is directed against three main regions. *Eur J Immunol* **27**: 3059-69.
- Kerlero de Rosbo, N., I. Mendel and A. Ben-Nun (1995). Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with a delayed onset and an atypical clinical course, induced in PL/J mice by myelin

- oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-derived peptide: preliminary analysis of MOG T cell epitopes. *Eur J Immunol* **25**: 985-93.
- Kersh, G. J. and P. M. Allen (1996). Essential flexibility in the T-cell recognition of antigen. *Nature* **380**: 495-8.
- Kersh, G. J. and P. M. Allen (1996). Structural basis for T cell recognition of altered peptide ligands: a single T cell receptor can productively recognize a large continuum of related ligands. *J Exp Med* **184**: 1259-68.
- Kies, M. W., Ed. (1973). Experimental allergic encephalomyelitis. Biology of brain dysfunction. New York, Plenum Press.
- Kies, M. W. and E. C. J. Alvord, Eds. (1959). Encephalitogenic activity in guinea pigs of water-soluble protein fraction of nervous tissue. "Allergic" Encephalomyelitis. New York, Charles C. Thomas.
- Killestein, J., M. J. Eikelenboom, T. Izeboud, N. F. Kalkers, H. J. Ader, F. Barkhof, R. A. Van Lier, B. M. Uitdehaag and C. H. Polman (2003). Cytokine producing CD8+ T cells are correlated to MRI features of tissue destruction in MS. *J Neuroimmunol* **142**: 141-8.
- Kirschner, D. A. and A. E. Blaurock, Eds. (1992). Myelin: biology and chemistry. Boca Raton, CRC Press.
- Klapdor, K. and F. J. van der staay (1996). The Morris water-escape task in mice: strain differences and effects of intra-maze contrast and brightness. *Physiol Behav* **60**: 1247-54.
- Klein, J. and C. O'HUigin (1994). The conundrum of nonclassical major histocompatibility complex genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 6251-2.
- Kornek, B., M. K. Storch, R. Weissert, E. Wallstroem, A. Stefferl, T. Olsson, C. Linington, M. Schmidbauer and H. Lassmann (2000). Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am J Pathol* **157**: 267-76.
- Kosaras, B. and D. A. Kirschner (1990). Radial component of CNS myelin: junctional subunit structure and supramolecular assembly. *J Neurocytol* **19**: 187-99.
- Kroepfl, J. F., L. R. Viise, A. J. Charron, C. Linington and M. V. Gardinier (1996). Investigation of myelin/oligodendrocyte glycoprotein membrane topology. *J Neurochem* **67**: 2219-22.
- Kuchroo, V. K., A. C. Anderson, H. Waldner, M. Munder, E. Bettelli and L. B. Nicholson (2002). T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* **20**: 101-23.
- Kurtzke, J. F. (1980). Epidemiologic contributions to multiple sclerosis: an overview. *Neurology* **30**: 61-79.
- Kurtzke, J. F. (2000). Epidemiology of multiple sclerosis. Does this really point toward an etiology? *Lectio Doctoralis. Neurol Sci* **21**: 383-403.
- Laatsch, R. H., M. W. Kies, S. Gordon and E. C. Alvord, Jr. (1962). The encephalomyelitic activity of myelin isolated by ultracentrifugation. *J Exp Med* **115**: 77-88.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.
- Lai, C., J. B. Watson, F. E. Bloom, J. G. Sutcliffe and R. J. Milner (1987). Neural protein 1B236/myelin-associated glycoprotein (MAG) defines a subgroup of the immunoglobulin superfamily. *Immunol Rev* **100**: 129-51.
- Lang, H. L., H. Jacobsen, S. Ikemizu, C. Andersson, K. Harlos, L. Madsen, P. Hjorth, L. Sondergaard, A. Svejgaard, K. Wucherpfennig, D. I. Stuart, J. I. Bell, E. Y. Jones and L. Fugger (2002). A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat Immunol* **3**: 940-3.
- Lanterman, A. J. (1877). Über den feineren Bau der Markhaltigen Nervenfasern. *Arch Mikrosk Anat* **13**.
- Lassmann, H. (1999). The pathology of multiple sclerosis and its evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**: 1635-40.
- Lassmann, H., C. S. Raine, J. Antel and J. W. Prineas (1998). Immunopathology of multiple sclerosis: report on an international meeting held at the Institute of Neurology of the University of Vienna. *J Neuroimmunol* **86**: 213-7.
- Leadbetter, E. A., C. R. Bourque, B. Devaux, C. D. Olson, G. H. Sunshine, S. Hirani, B. P. Wallner, D. E. Smilek and M. P. Happ (1998). Experimental autoimmune encephalomyelitis induced with a combination of myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein is ameliorated by administration of a single myelin basic protein peptide. *J Immunol* **161**: 504-12.
- Lebar, R. (1987). [Demyelination and autoimmunity]. *Pathol Biol (Paris)* **35**: 275-83.
- Lebar, R., C. Lubetzki, C. Vincent, P. Lombrail and J. M. Boutry (1986). The M2 autoantigen of central nervous system myelin, a glycoprotein present in oligodendrocyte membrane. *Clin Exp Immunol* **66**: 423-34.
- Ledeen, R. (1966). The chemistry of gangliosides: a review. *J Am Oil Chem Soc* **43**: 57-66.
- Ledeen, R. W. and R. K. Yu (1982). Gangliosides: structure, isolation, and analysis. *Methods Enzymol* **83**: 139-91.
- Lees, M. B. and S. W. Brostoff (1984). Proteins of myelin. New York, London, Plenum Press.
- Lees, M. V. and O. A. Bizzozero, Eds. (1992). Structure and acylation of proteolipid protein. Myelin: Biology and Chemistry. Boca Raton, CRC Press.
- Leibowitz, U., M. Alter and L. Halpern (1964). Clinical Studies of Multiple Sclerosis in Israel. 3. Clinical Course and Prognosis Related to Age at Onset. *Neurology* **14**: 926-32.

- Lemke, G. (1988). Unwrapping the genes of myelin. *Neuron* **1**: 535-43.
- Lemke, G. (1993). The molecular genetics of myelination: an update. *Glia* **7**: 263-71.
- Linington, C., T. Berger, L. Perry, S. Weerth, D. Hinze-Selch, Y. Zhang, H. C. Lu, H. Lassmann and H. Wekerle (1993). T cells specific for the myelin oligodendrocyte glycoprotein mediate an unusual autoimmune inflammatory response in the central nervous system. *Eur J Immunol* **23**: 1364-72.
- Link, H., Ed. (1987). Cerebrospinal fluid in immunological CNS diseases. Clinical neuroimmunology. London, Blackwell Scientific.
- Linnington, C., M. Webb and P. L. Woodhams (1984). A novel myelin-associated glycoprotein defined by a mouse monoclonal antibody. *J Neuroimmunol* **6**: 387-96.
- Liu, B., L. Qin, S. N. Yang, B. C. Wilson, Y. Liu, J. S. Hong (2001). Femtomolar concentrations of dynorphins protect rat mesencephalic dopaminergic neurons against inflammatory damage. *J Pharmacol Exp Ther* **298**: 1133-41.
- Liu, X., H. Wu, J. Loring, S. Hormuzdi, C. M. Disteché, P. Bornstein and R. Jaenisch (1997). Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission. *Dev Dyn* **209**: 85-91.
- Lovas, G., N. Szilagyi, K. Majtenyi, M. Palkovits and S. Komoly (2000). Axonal changes in chronic demyelinated cervical spinal cord plaques. *Brain* **123**: 308-17.
- Lublin, F. D., Ed. (2001). Experimental models of autoimmune demyelination. Handbook of multiple sclerosis. New York, Basel, Marcel Dekker, Inc.
- Lucchinetti, C., W. Bruck, J. Parisi, B. Scheithauer, M. Rodriguez and H. Lassmann (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* **47**: 707-17.
- Madrenas, J. and R. N. Germain (1996). Variant TCR ligands: new insights into the molecular basis of antigen-dependent signal transduction and T-cell activation. *Semin Immunol* **8**: 83-101.
- Madrenas, J., R. L. Wange, J. L. Wang, N. Isakov, L. E. Samelson and R. N. Germain (1995). Zeta phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists. *Science* **267**: 515-8.
- Mansour, S. L., K. R. Thomas and M. R. Capecchi (1988). Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* **336**: 348-52.
- Mansouri, A. (1989). Homologous recombination in embryonic stem cells. Dept. of Molecular Cell Biology. Göttingen, MPI for Biophysical Chemistry.
- Mansouri, A. (2001). Determination of gene function by homologous recombination using embryonic stem cells and knockout mice. *Methods Mol Biol* **175**: 397-413.
- Markovic, M., V. Trajkovic, J. Drulovic, S. Mesaros, N. Stojisavljevic, I. Dujmovic and M. Mostarica Stojkovic (2003). Antibodies against myelin oligodendrocyte glycoprotein in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci* **211**: 67-73.
- Maron, R., W. W. Hancock, A. Slavin, M. Hattori, V. Kuchroo, H. L. Weiner (1999). Genetic susceptibility or resistance to autoimmune encephalomyelitis in MHC congenic mice is associated with differential production of pro- and anti-inflammatory cytokines. *Int Immunol* **11**: 1573-80.
- Marsden, J. P. and E. W. Hurst (1932). Acute perivascular myelinoclasia ("Acute dissemination encephalomyelitis") in smallpox. *Brain* **55**: 181.
- Marta, C. B., C. M. Taylor, T. Coetzee, T. Kim, S. Winkler, R. Bansal, S. E. Pfeiffer (2003). Antibody cross-linking of myelin oligodendrocyte glycoprotein leads to its rapid repartitioning into detergent-insoluble fractions, and altered protein phosphorylation and cell morphology. *J Neurosci* **23**: 5461-71.
- Martin, R. and H. F. McFarland (1995). Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* **32**: 121-82.
- McGavern, D. B., P. D. Murray and M. Rodriguez (1999). Quantitation of spinal cord demyelination, remyelination, atrophy, and axonal loss in a model of progressive neurologic injury. *J Neurosci Res* **58**: 492-504.
- Mendel, I., N. Kerlero de Rosbo and A. Ben-Nun (1995). A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol* **25**: 1951-9.
- Menon, K. K., S. J. Piddlesden and C. C. Bernard (1997). Demyelinating antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein and galactocerebroside induce degradation of myelin basic protein in isolated human myelin. *J Neurochem* **69**: 214-22.
- Mikol, D. D., M. J. Alexakos, C. A. Bayley, R. S. Lemons, M. M. Le Beau and K. Stefansson (1990a). Structure and chromosomal localization of the gene for the oligodendrocyte-myelin glycoprotein. *J Cell Biol* **111**: 2673-9.
- Mikol, D. D., J. R. Gulcher and K. Stefansson (1990b). The oligodendrocyte-myelin glycoprotein belongs to a distinct family of proteins and contains the HNK-1 carbohydrate. *J Cell Biol* **110**: 471-9.
- Mikol, D. D., P. Rongneparut, B. A. Allwardt, L. S. Marton and K. Stefansson (1993). The oligodendrocyte-myelin glycoprotein of mouse: primary structure and gene structure. *Genomics* **17**: 604-10.

- Montague, P., P. J. Dickinson, A. S. McCallion, G. J. Stewart, A. Savioz, R. W. Davies, P. G. Kennedy and I. R. Griffiths (1997). Developmental expression of the murine Mobp gene. *J Neurosci Res* **49**: 133-43.
- Morell, P. (1984). Myelin. New York, Plenum Press.
- Morest, D. K., Ed. (1986). Bloom and Fawcett: A Textbook of Histology. Philadelphia 335, W. B. Saunders.
- Morgan, I. M. (1946). Allergic encephalomyelitis in monkeys in response to infection of normal monkey cord. *J. Bacteriol* **51**: 614.
- Morita, K., H. Sasaki, K. Fujimoto, M. Furuse and S. Tsukita (1999). Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis. *J Cell Biol* **145**: 579-88.
- Mount, S. M. (1982). A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res* **10**: 459-72.
- Mugnaini, E., Ed. (1986). Cell junctions of astrocytes, ependyma, and related cells in the mammalian central nervous system, with emphasis on the hypothesis of a generalized functional syncytium of supporting cells. Astrocytes. New York, Academic.
- Murray, J. A. H. (1992). Antisense RNA and DNA. New York, Wiley-Liss.
- Mutschler, E. (1991). Arzneimittelwirkung. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Nagy, A., J. Rossant, R. Nagy, W. Abramow-Newerly and J. C. Roder (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 8424-8.
- Napolitano, L. M. and T. J. Scallen (1969). Observations on the fine structure of peripheral nerve myelin. *Anat Rec* **163**: 1-6.
- Nave, K. A. (1994). Neurological mouse mutants and the genes of myelin. *J Neurosci Res* **38**: 607-12.
- Nave, K. A. and G. Lemke (1991). Induction of the myelin proteolipid protein (PLP) gene in C6 glioblastoma cells: functional analysis of the PLP promoter. *J Neurosci* **11**: 3060-9.
- Neumann, H., J. Boucraut, C. Hahnel, T. Misgeld and H. Wekerle (1996). Neuronal control of MHC class II inducibility in rat astrocytes and microglia. *Eur J Neurosci* **8**: 2582-90.
- Neumann, H., A. Cavalie, D. E. Jenne and H. Wekerle (1995). Induction of MHC class I genes in neurons. *Science* **269**: 549-52.
- Newman, S., K. Kitamura and A. T. Campagnoni (1987). Identification of a cDNA coding for a fifth form of myelin basic protein in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 886-90.
- Nicholson, L. B., H. Waldner, A. M. Carrizosa, A. Sette, M. Collins, V. K. Kuchroo (1998). Heteroclitic proliferative responses and changes in cytokine profile induced by altered peptides: implications for autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 264-9.
- Norton, W. T. and W. Cammer, Eds. (1984). Isolation and characterization of myelin. Myelin. New York, Plenum Press.
- Norton, W. T. and S. E. Poduslo (1973). Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J Neurochem* **21**: 749-57.
- Noseworthy, J. H., C. Lucchinetti, M. Rodriguez and B. G. Weinshenker (2000). Multiple sclerosis. *N Engl J Med* **343**: 938-52.
- Oksenberg, J. R., S. E. Baranzini, L. F. Barcellos and S. L. Hauser (2001). Multiple sclerosis: genomic rewards. *J Neuroimmunol* **113**: 171-84.
- Omlin, F. X., H. D. Webster, C. G. Palkovits and S. R. Cohen (1982). Immunocytochemical localization of basic protein in major dense line regions of central and peripheral myelin. *J Cell Biol* **95**: 242-8.
- Osada, J. and N. Maeda (1998). Preparation of knockout mice. *Methods Mol Biol* **110**: 79-92.
- Otterbach, B. and W. Stoffel (1995). Acid sphingomyelinase-deficient mice mimic the neurovisceral form of human lysosomal storage disease (Niemann-Pick disease). *Cell* **81**: 1053-61.
- Panitch, H. S., R. L. Hirsch, J. Schindler and K. P. Johnson (1987). Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology* **37**: 1097-102.
- Panitch, H. S., C. J. Hooper and K. P. Johnson (1980). CSF antibody to myelin basic protein. Measurement in patients with multiple sclerosis and subacute sclerosing panencephalitis. *Arch Neurol* **37**: 206-9.
- Pfriefer, F. W. and B. A. Barres (1995). What the fly's glia tell the fly's brain. *Cell* **83**: 671-4.
- Pham-Dinh, D., B. Allinquant, M. Ruberg, B. Della Gaspera, J. L. Nussbaum and A. Dautigny (1994). Characterization and expression of the cDNA coding for the human myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *J Neurochem* **63**: 2353-6.
- Pham-Dinh, D., B. Della Gaspera, N. Kerlero de Rosbo and A. Dautigny (1995). Structure of the human myelin/oligodendrocyte glycoprotein gene and multiple alternative spliced isoforms. *Genomics* **29**: 345-52.
- Pham-Dinh, D., E. P. Jones, G. Pitiot, B. Della Gaspera, P. Daubas, J. Mallet, D. Le Paslier, K. Fischer Lindahl and A. Dautigny (1995). Physical mapping of the human and mouse MOG gene at the distal end of the MHC class Ib region. *Immunogenetics* **42**: 386-91.
- Pham-Dinh, D., M. G. Mattei, J. L. Nussbaum, G. Roussel, P. Pontarotti, N. Roedel, I. H. Mather, K. Artzt, K. F. Lindahl and A. Dautigny (1993). Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a member of a subset of the immunoglobulin superfamily encoded within the major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 7990-4.

- Piddlesden, S. J., H. Lassmann, F. Zimprich, B. P. Morgan and C. Linington (1993). The demyelinating potential of antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein is related to their ability to fix complement. *Am J Pathol* **143**: 555-64.
- Poggel, C. (2000). Genexpressions-Profil einer dysmyelinisierenden Doppel knock out-Mausmutante (mbp-/- plp-/-) und Rescue-Versuch des normalen Phänotyps. *Inst. f. Biochemie*. Köln, Universität zu Köln.
- Poltorak, M., R. Sadoul, G. Keilhauer, C. Landa, T. Fahrig and M. Schachner (1987). Myelin-associated glycoprotein, a member of the L2/HNK-1 family of neural cell adhesion molecules, is involved in neuron-oligodendrocyte and oligodendrocyte-oligodendrocyte interaction. *J Cell Biol* **105**: 1893-9.
- Porath, J. (1992). Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr Purif* **3**: 263-81.
- Poser, C. M. (1994). The epidemiology of multiple sclerosis: a general overview. *Ann Neurol* **36**: S180-93.
- Prineas, J. W. and R. G. Wright (1978). Macrophages, lymphocytes, and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis. *Lab Invest* **38**: 409-21.
- Quarles, R. H., Ed. (1992). Myelin-associated glycoprotein: structure-function relationships and involvement in neurological diseases. Myelin: Biology and Chemistry. Boca Raton, CRC Press.
- Quarles, R. H. (1997). Glycoproteins of myelin sheaths. *J Mol Neurosci* **8**: 1-12.
- Quarles, R. H. (2002). Myelin sheaths: glycoproteins involved in their formation, maintenance and degeneration. *Cell Mol Life Sci* **59**: 1851-71.
- Raine, C. S., B. Cannella, S. L. Hauser and C. P. Genain (1999). Demyelination in primate autoimmune encephalomyelitis and acute multiple sclerosis lesions: a case for antigen-specific antibody mediation. *Ann Neurol* **46**: 144-60.
- Rammensee, H., J. Bachmann, N. P. Emmerich, O. A. Bachor, S. Stevanovic (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50**: 213-9.
- Ranvier, L. (1871). Contributions à l'histologie et à physiologie des nerfs périphériques. *C R Acad Sci* **73**: 1168-1171.
- Rash, J. E., H. S. Duffy, F. E. Dudek, B. L. Bilhartz, L. R. Whalen and T. Yasumura (1997). Grid-mapped freeze-fracture analysis of gap junctions in gray and white matter of adult rat central nervous system, with evidence for a "panglial syncytium" that is not coupled to neurons. *J Comp Neurol* **388**: 265-92.
- Remlinger, J. (1919). Accidents paralytiques au cours du traitement anti-rabique. *Ann Inst Pasteur* **19**: 625-646.
- Rietveld, A. and K. Simons (1998). The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochim Biophys Acta* **1376**: 467-79.
- Robertson, E. J. (1989). Teratocarcinomas and embryonic stem cells; a practical approach. Oxford, Washington D.C., I. Press.
- Rogers, D. C., E. M. Fisher, S. D. Brown, J. Peters, A. J. Hunter and J. E. Martin (1997). Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm Genome* **8**: 711-3.
- Rosati, G. (2001). The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci* **22**: 117-39.
- Rosche, B., B. Kieseier, H. P. Hartung and B. Hemmer (2003). [In Process Citation]. *Nervenarzt* **74**: 654-63.
- Roth, M. P., L. Dolbois, N. Borot, P. Pontarotti, M. Clanet and H. Coppin (1995). Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) gene polymorphisms and multiple sclerosis: no evidence of disease association with MOG. *J Neuroimmunol* **61**: 117-22.
- Rudge, P. (1991). Does a retrovirally encoded superantigen cause multiple sclerosis? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **54**: 853-5.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Santambrogio, L., M. B. Lees and R. A. Sobel (1998). Altered peptide ligand modulation of experimental allergic encephalomyelitis: immune responses within the CNS. *J Neuroimmunol* **81**: 1-13.
- Scherer, S. S., S. M. Deschenes, Y. T. Xu, J. B. Grinspan, K. H. Fischbeck and D. L. Paul (1995). Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *J Neurosci* **15**: 8281-94.
- Schmidt, H. D. (1874). On the construction of the dark or double-bonded nerve fiber. *Mon Microsc J* **11**: 200.
- Schmitt, F. O., R. S. Bear and K. J. Palmer (1941). X-ray diffraction studies on the structure of the nerve myelin sheath. *J Cell Comp Physiol* **18**: 31.
- Schneider, A., P. Montague, I. Griffiths, M. Fanarraga, P. Kennedy, P. Brophy and K. A. Nave (1992). Uncoupling of hypomyelination and glial cell death by a mutation in the proteolipid protein gene. *Nature* **358**: 758-61.
- Schroeter, M., G. Stoll, R. Weissert, H. P. Hartung, H. Lassmann and S. Jander (2003). CD8+ phagocyte recruitment in rat experimental autoimmune encephalomyelitis: association with inflammatory tissue destruction. *Am J Pathol* **163**: 1517-24.
- Schulte, S. and W. Stoffel (1993). Ceramide UDPgalactosyltransferase from myelinating rat brain: purification, cloning, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 10265-9.
- Schwartz, J. C., X. Zhang, A. A. Fedorov, S. G. Nathenson and S. C. Almo (2001). Structural basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex. *Nature* **410**: 604-8.

- Schwartzberg, P. L., S. P. Goff and E. J. Robertson (1989). Germ-line transmission of a c-abl mutation produced by targeted gene disruption in ES cells. *Science* **246**: 799-803.
- Scolding, N. J., S. Frith, C. Lington, B. P. Morgan, A. K. Campbell and D. A. Compston (1989). Myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG) is a surface marker of oligodendrocyte maturation. *J Neuroimmunol* **22**: 169-76.
- Sewell, W. A., P. A. de Moerloose, J. A. Hamilton, J. W. Schrader, I. R. Mackay and M. A. Vadas (1987). Potentiation of delayed-type hypersensitivity by pertussigen or cyclophosphamide with release of different lymphokines. *Immunology* **61**: 483-8.
- Sewell, W. A., J. J. Munoz and M. A. Vadas (1983). Enhancement of the intensity, persistence, and passive transfer of delayed-type hypersensitivity lesions by pertussigen in mice. *J Exp Med* **157**: 2087-96.
- Shaw, M. K., C. Kim, K. L. Ho, R. P. Lisak and H. Y. Tse (1992). A combination of adoptive transfer and antigenic challenge induces consistent murine experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice and other reputed resistant strains. *J Neuroimmunol* **39**: 139-49.
- Sidman, M. D., J. B. Angevine and E. Taber Pierce (1971). Atlas of the mouse brain and spinal cord. London, Oxford university press.
- Sidman, R. L., M. M. Dickie and S. H. Appel (1964). Mutant Mice (Quaking and Jimpy) with Deficient Myelination in the Central Nervous System. *Science* **144**: 309-11.
- Simons, M., E. M. Kramer, C. Thiele, W. Stoffel and J. Trotter (2000). Assembly of myelin by association of proteolipid protein with cholesterol- and galactosylceramide-rich membrane domains. *J Cell Biol* **151**: 143-54.
- Smith, A. G., J. K. Heath, D. D. Donaldson, G. G. Wong, J. Moreau, M. Stahl and D. Rogers (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336**: 688-90.
- Smith, M. E., N. L. Eller, H. F. McFarland, M. K. Racke and C. S. Raine (1999). Age dependence of clinical and pathological manifestations of autoimmune demyelination. Implications for multiple sclerosis. *Am J Pathol* **155**: 1147-61.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson and D. C. Klenk (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**: 76-85.
- Solly, S. K., P. Daubas, M. Monge, A. Dautigny and B. Zalc (1997). Functional analysis of the mouse myelin/oligodendrocyte glycoprotein gene promoter in the oligodendroglial CG4 cell line. *J Neurochem* **68**: 1705-11.
- Solly, S. K., J. L. Thomas, M. Monge, C. Demerens, C. Lubetzki, M. V. Gardinier, J. M. Matthieu and B. Zalc (1996). Myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG) expression is associated with myelin deposition. *Glia* **18**: 39-48.
- Sprinkle, T. J. (1989). 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase, an oligodendrocyte-Schwann cell and myelin-associated enzyme of the nervous system. *Crit Rev Neurobiol* **4**: 235-301.
- Sriram, S., C. W. Stratton, S. Yao, A. Tharp, L. Ding, J. D. Bannan and W. M. Mitchell (1999). Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis. *Ann Neurol* **46**: 6-14.
- Steffler, A., U. Brehm, M. Storch, D. Lambrecht-Washington, C. Bourquin, K. Wonigeit, H. Lassmann and C. Lington (1999). Myelin oligodendrocyte glycoprotein induces experimental autoimmune encephalomyelitis in the "resistant" Brown Norway rat: disease susceptibility is determined by MHC and MHC-linked effects on the B cell response. *J Immunol* **163**: 40-9.
- Steinman, L. and M. B. Oldstone (1997). More mayhem from molecular mimics. *Nat Med* **3**: 1321-2.
- Stoffel, W., D. Boison and H. Bussow (1997). Functional analysis in vivo of the double mutant mouse deficient in both proteolipid protein (PLP) and myelin basic protein (MBP) in the central nervous system. *Cell Tissue Res* **289**: 195-206.
- Stoffel, W. and A. Bosio (1997). Myelin glycolipids and their functions. *Curr Opin Neurobiol* **7**: 654-61.
- Storch, M. K., S. Piddlesden, M. Haltia, M. Iivanainen, P. Morgan and H. Lassmann (1998). Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Ann Neurol* **43**: 465-71.
- Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn and J. W. Dubendorff (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**: 60-89.
- Sun, D., J. N. Whitaker, Z. Huang, D. Liu, C. Coleclough, H. Wekerle and C. S. Raine (2001). Myelin antigen-specific CD8⁺ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J Immunol* **166**: 7579-87.
- Swiatek, P. J. and T. Gridley (1993). Perinatal lethality and defects in hindbrain development in mice homozygous for a targeted mutation of the zinc finger gene Krox20. *Genes Dev* **7**: 2071-84.
- t Hart, B. A. and S. Amor (2003). The use of animal models to investigate the pathogenesis of neuroinflammatory disorders of the central nervous system. *Curr Opin Neurol* **16**: 375-83.
- Takahashi, N., A. Roach, D. B. Teplow, S. B. Prusiner and L. Hood (1985). Cloning and characterization of the myelin basic protein gene from mouse: one gene can encode both 14 kd and 18.5 kd MBPs by alternate use of exons. *Cell* **42**: 139-48.

- te Riele, H., E. R. Maandag, A. Berns (1992). Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5128-32.
- Teitelbaum, D., A. Meshorer, T. Hirshfeld, R. Arnon and M. Sela (1971). Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide. *Eur J Immunol* **1**: 242-8.
- Tonra, J. R., B. S. Reiseter, R. Kolbeck, K. Nagashima, R. Robertson, B. Keyt and R. M. Lindsay (2001). Comparison of the timing of acute blood-brain barrier breakdown to rabbit immunoglobulin G in the cerebellum and spinal cord of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Comp Neurol* **430**: 131-44.
- Traugott, U., Ed. (2001). Evidence of immunopathogenesis. Handbook of multiple sclerosis. New York, Basel, Marcel Dekker, Inc.
- Tuomanen, E. I., S. M. Prasad, J. S. George, A. I. Hoepelman, P. Ibsen, I. Heron and R. M. Starzyk (1993). Reversible opening of the blood-brain barrier by anti-bacterial antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 7824-8.
- Uschkureit, T. (2000). Struktur-Funktionsanalyse der Myelinmembran von Axonen des zentralen Nervensystems durch Gen-Ablation mittels homologer Rekombination. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. Köln, Universität zu Köln.
- Uschkureit, T., O. Sporkel, J. Stracke, H. Bussow and W. Stoffel (2000). Early onset of axonal degeneration in double (plp-/-mag-/-) and hypomyelinoses in triple (plp-/-mbp-/-mag-/-) mutant mice. *J Neurosci* **20**: 5225-33.
- van den Berg, T. K., D. Nath, H. J. Ziltener, D. Vestweber, M. Fukuda, I. van Die and P. R. Crocker (2001). Cutting edge: CD43 functions as a T cell counterreceptor for the macrophage adhesion receptor sialoadhesin (Siglec-1). *J Immunol* **166**: 3637-40.
- Van der Aa, A., N. Hellings, C. C. Bernard, J. Raus and P. Stinissen (2003). Functional properties of myelin oligodendrocyte glycoprotein-reactive T cells in multiple sclerosis patients and controls. *J Neuroimmunol* **137**: 164-76.
- van der Putten, H., F. M. Botteri, A. D. Miller, M. G. Rosenfeld, H. Fan, R. M. Evans and I. M. Verma (1985). Efficient insertion of genes into the mouse germ line via retroviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 6148-52.
- Vanderlugt, C. L. and S. D. Miller (2002). Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **2**: 85-95.
- Vandvik, B., F. Vartdal and E. Norrby (1982). Herpes simplex virus encephalitis: intrathecal synthesis of oligoclonal virus-specific IgG, IgA and IgM antibodies. *J Neurol* **228**: 25-38.
- Vanguri, P. and M. L. Shin (1986). Activation of complement by myelin: identification of C1-binding proteins of human myelin from central nervous tissue. *J Neurochem* **46**: 1535-41.
- Vartdal, F. and B. Vandvik (1982). Multiple sclerosis. Electrofocused "bands" of oligoclonal CSF IgG do not carry antibody activity against measles, varicella-zoster or rotaviruses. *J Neurol Sci* **54**: 99-107.
- Villoslada, P., K. Abel, N. Heald, R. Goertsches, S. L. Hauser and C. P. Genain (2001). Frequency, heterogeneity and encephalitogenicity of T cells specific for myelin oligodendrocyte glycoprotein in naive outbred primates. *Eur J Immunol* **31**: 2942-50.
- Virchow, R. (1854). Über das ausgebreitete Vorkommeneiner dem Nervenmark analogen Substanz in den tierischen Geweben. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol* **6**: 562-572.
- Viskochil, D., R. Cawthon, P. O'Connell, G. F. Xu, J. Stevens, M. Culver, J. Carey and R. White (1991). The gene encoding the oligodendrocyte-myelin glycoprotein is embedded within the neurofibromatosis type 1 gene. *Mol Cell Biol* **11**: 906-12.
- von Budingen, H. C., N. Tanuma, P. Villoslada, J. C. Ouallet, S. L. Hauser and C. P. Genain (2001). Immune responses against the myelin/oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune demyelination. *J Clin Immunol* **21**: 155-70.
- Voorthuis, J. A., B. M. Uitdehaag, C. J. De Groot, P. H. Goede, P. H. van der Meide and C. D. Dijkstra (1990). Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by intraventricular administration of interferon-gamma in Lewis rats. *Clin Exp Immunol* **81**: 183-8.
- Voss, A. K., T. Thomas and P. Gruss (1997). Germ line chimeras from female ES cells. *Exp Cell Res* **230**: 45-9.
- Waisman, A. (2001). Persönliches Gespräch.
- Walker, J. and J. M. Green (1999). Structural requirements for CD43 function. *J Immunol* **162**: 4109-14.
- Warren, K. G., I. Catz, E. Johnson and B. Mielke (1994). Anti-myelin basic protein and anti-proteolipid protein specific forms of multiple sclerosis. *Ann Neurol* **35**: 280-9.
- Weimbs, T. and W. Stoffel (1992). Proteolipid protein (PLP) of CNS myelin: positions of free, disulfide-bonded, and fatty acid thioester-linked cysteine residues and implications for the membrane topology of PLP. *Biochemistry* **31**: 12289-96.
- Weimbs, T. and W. Stoffel (1994). Topology of CNS myelin proteolipid protein: evidence for the nonenzymatic glycosylation of extracytoplasmic domains in normal and diabetic animals. *Biochemistry* **33**: 10408-15.

- Weinshenker, B. G., B. Bass, G. P. Rice, J. Noseworthy, W. Carriere, J. Baskerville and G. C. Ebers (1989). The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 2. Predictive value of the early clinical course. *Brain* **112**: 1419-28.
- Weissert, R., E. Wallstrom, M. K. Storch, A. Stefferl, J. Lorentzen, H. Lassmann, C. Linington and T. Olsson (1998). MHC haplotype-dependent regulation of MOG-induced EAE in rats. *J Clin Invest* **102**: 1265-73.
- Wekerle, H. (2002). Immune protection of the brain--efficient and delicate. *J Infect Dis* **186**: S140-4.
- Wekerle, H., K. Kojima, J. Lannes-Vieira, H. Lassmann and C. Linington (1994). Animal models. *Ann Neurol* **36**: S47-53.
- Willenborg, D. O. and M. A. Staykova (2003). Cytokines in the pathogenesis and therapy of autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Adv Exp Med Biol* **520**: 96-119.
- Wingerchuk, D. M., C. F. Lucchinetti and J. H. Noseworthy (2001). Multiple sclerosis: current pathophysiological concepts. *Lab Invest* **81**: 263-81.
- Wolswijk, G. (1998). Chronic stage multiple sclerosis lesions contain a relatively quiescent population of oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci* **18**: 601-9.
- Wolswijk, G. (1998). Oligodendrocyte regeneration in the adult rodent CNS and the failure of this process in multiple sclerosis. *Prog Brain Res* **117**: 233-47.
- Wood, M. W., H. M. VanDongen and A. M. VanDongen (1995). Structural conservation of ion conduction pathways in K channels and glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 4882-6.
- Yamamoto, Y., R. Mizuno, T. Nishimura, Y. Ogawa, H. Yoshikawa, H. Fujimura, E. Adachi, T. Kishimoto, T. Yanagihara and S. Sakoda (1994). Cloning and expression of myelin-associated oligodendrocytic basic protein. A novel basic protein constituting the central nervous system myelin. *J Biol Chem* **269**: 31725-30.
- Yamamoto, Y., H. Yoshikawa, S. Nagano, G. Kondoh, S. Sadahiro, T. Gotow, T. Yanagihara and S. Sakoda (1999). Myelin-associated oligodendrocytic basic protein is essential for normal arrangement of the radial component in central nervous system myelin. *Eur J Neurosci* **11**: 847-55.
- Yu, M., J. M. Johnson and V. K. Tuohy (1996). A predictable sequential determinant spreading cascade invariably accompanies progression of experimental autoimmune encephalomyelitis: a basis for peptide-specific therapy after onset of clinical disease. *J Exp Med* **183**: 1777-88.
- Zamvil, S. S., D. J. Mitchell, A. C. Moore, K. Kitamura, L. Steinman, J. B. Rothbard (1986). T-cell epitope of the autoantigen myelin basic protein that induces encephalomyelitis. *Nature* **324**: 258-60.
- Zamvil, S. S. and L. Steinman (1990). The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* **8**: 579-621.
- Zhang, J., S. Markovic-Plese, B. Lacet, J. Raus, H. L. Weiner, D. A. Hafler (1994). Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* **179**: 973-84.
- Zumbansen, M. (2001). Biochemische und molekularbiologische Studien zur Charakterisierung der murinen neutralen Sphingomyelinase in vitro und in vivo. Math.-Nat. Fakultät. Köln, Universität zu Köln.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Dr. W. Stoffel betreut worden.

Keine Teilpublikationen.

Lennart von Hoch

IX. Kurzzusammenfassung

Das Myelin Oligodendrozyten Protein (MOG) macht nur einen Anteil von 0,05% der gesamten Myelinproteine aus. Die Funktion, dieses nur im Zentralen Nervensystem (ZNS) exprimierten, Oligodendrozyten spezifischen Proteins, ist bis heute ungeklärt. Es spielt bei der Experimentellen Autoimmun Enzephalitis (EAE) und möglicherweise auch bei der Multiplen Sklerose eine pathogene Rolle als Ziel autoreaktiver T- und B-Zellen und ist in den letzten Jahren immer stärker Gegenstand der Forschung geworden.

Zur Aufklärung der Funktion von MOG wurde im Rahmen dieser Arbeit ein nullallelisches Mausmodell durch *gene-targeting* in embryonalen Stammzellen erstellt. Die Genablation wurde auf DNA, RNA und Proteinebene nachgewiesen. Die MOG defizienten Tiere sind fertil und verhalten sich phänotypisch unauffällig. Die Zusammensetzung des Myelins auf Protein- und Lipidebene war nicht von wildtyp-Mäusen zu unterscheiden.

Zur weiteren Analyse wurden die nullallelischen Tiere mit Doppelmutanten gekreuzt, die für das Proteolipid Protein (PLP) und das Myelin basische Protein (MBP) defizient waren, um homozygote Tripelmutanten zu generieren. Das zusätzliche Fehlen von MOG in diesen Mäusen führte zu keinen detektierbaren Veränderungen der Zusammensetzung des Myelins in Bezug auf die Doppelmutanten. Die Tripelmutanten waren phänotypisch nicht von den Doppelmutanten zu unterscheiden.

Um die pathogene Funktion von MOG als Autoantigen zu untersuchen, wurden MOG defiziente und wildtyp-Mäuse mit der rekombinant hergestellten extrazellulären Domäne von MOG (rMOG) immunisiert. Die wildtyp-Mäuse entwickelten die klassischen Symptome der EAE mit Lähmungserscheinungen und Entzündungen des ZNS. Die MOG defizienten Mäuse zeigten keine Lähmungserscheinungen, wider erwarten aber mit den wildtyp-Mäusen vergleichbare Entzündungen. Durch *fluorescence aided cell sorting* (FACS) und Analyse rMOG spezifischer Interferon- γ sezernierender T-Zellen des ZNS wurden Unterschiede in der Zusammensetzung und der Spezifitäten der ins ZNS eingewanderten Leukozyten entdeckt, die auf eine Beteiligung von kreuzreaktiven T-Zellen bei der Entzündung der MOG defizienten Mäuse hindeuten. Das nicht detektierbare Mengen von MOG in den defizienten Mäusen für die Entzündungen verantwortlich sind ist auf Grund der nachgewiesenen *anti-sense* Transkripte unwahrscheinlich, kann aber nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Immunisierungen mit entsprechenden MOG Fragmenten werden diese Frage klären.

X. Abstract

Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) makes up only 0,05% of total myelin protein. The function of this central nervous system (CNS) and oligodendrocyte specific protein is still unknown. Only its pathogenic role in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and possibly multiple sclerosis as a target of selfreactive T- and B-Cells is subject to growing interest.

To investigate the function of MOG a null allelic mouse line has been generated by gene-targeting of embryonic stem cells. Ablation of the gene has been confirmed on RNA, DNA and protein level. The MOG-deficient animals are fertile and show no obvious phenotype. The composition of myelin on protein and lipid level is undistinguishable from wildtype mice. For further investigation the MOG-deficient mice were crossed into double mutants deficient in proteolipid protein (PLP) and myelin basic protein (MBP) to generate homozygous triplemutants. The additionally deleted mog gene did not lead to detectable variations of myelin in regard to the double mutant. The triple mutants were fertile and showed the same phenotype as the double mutants.

For further investigating the function of MOG as an autoantigen, MOG-deficient- and wildtype-mice were immunised with the recombinantly expressed extracellular domain of MOG (rMOG). Wildtype mice developed classical signs of EAE with paralysis and inflammation of the CNS. MOG-deficient mice did not show paralysis but similar inflammation like the wildtype mice. Fluorescence aided cell sorting and analysis of rMOG specific interferon- γ secreting T-cells of the CNS showed differences in the specificity and composition of these T-cells in the CNS, but not in the periphery. This points to a involvement of crossreactive T-cells in the inflammatory process of mog-deficient mice. Undetectable amounts of MOG in the deficient mice as a cause for the inflammation seems unlikely, especially with regard to the proven anti-sense transcripts, but cannot be excluded. Immunisation with respective MOG fragments will solve this question.

Lebenslauf

Name: Lennart von Hoch
Geburtsdatum: 15.07.1969
Geburtsort: München
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung:

1975.1980 Klaus-Rixen-Grundschule, Altenholz
1980.1989 Gymnasium Altenholz

Wehrdienst:

Juli 1989- September 1990 Grundwehrdienst bei der Luftwaffe

Hochschulausbildung:

September 1990-März 1994 Beginn des Chemiestudiums an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Juni 1993 Diplom-Chemiker Vorprüfung

April 1994 Fortsetzung des Chemiestudiums an der Albertus-Magnus-Universität zu Köln

April 1997 Diplom-Chemiker Hauptprüfung

April 1997-Januar 1998 Diplomarbeit am Institut für Biochemie (Medizinische Fakultät) der Universität zu Köln unter Anleitung von Prof. Dr. rer. Nat. Dr. med. Dr. h.c. W. Stoffel.
Thema: Targeting des Myelin Oligodendrozyten Protein-Gens der Maus.

Februar 1998-Februar 2004 Dissertation am Institut für Biochemie (Medizinische Fakultät) der Universität zu Köln unter Anleitung von Prof. Dr. rer. Nat. Dr. med. Dr. h.c. W. Stoffel.
Thema: Struktur-Funktionsanalyse des Myelin Oligodendrozyten Glykoproteins durch Gen-Ablation mittels homologer Rekombination.