

4547-602 6

**Modulation experimenteller Autoimmunerkrankungen des
peripheren Nervensystems durch die Induktion
oralen Toleranz für Myelinproteine**

**Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen
Doktorgrades der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität
Würzburg**

**vorgelegt
von
Stefanie Gaupp
aus
Saulgau**



Würzburg 1999

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen	6
ZUSAMMENFASSUNG	7
A. EINLEITUNG	9
B. ERGEBNISSE	27
1. Die Induktion von oraler Toleranz durch Fütterung von bovinem Myelin und der Einfluß von Adjuvantien auf die Induktion und Aufrechterhaltung dieser oralen Toleranz	27
1.1. Orale Toleranz nach früher Induktion der EAN	27
1.2. Orale Toleranz nach später Induktion der EAN	36
2. Die Auswirkung der oralen Gabe von P2-Protein auf die Ausprägung der myelininduzierten EAN	38
3. Orale Toleranz bei peptidinduzierter EAN	38
3.1. Die orale Applikation von BPM/CT bewahrt vor der myelin- aber nicht vor der peptidinduzierten EAN	39
3.3. Die präventive orale Gabe des neuritogenen Peptides verhindert die Entstehung einer peptidinduzierten EAN	41
4. Adoptiver Transfer der oral induzierten Toleranz	43
5. Effekt der „Bystander Suppression“ nach oraler Applikation des Antigens	43
5.1. Die Bystander Suppression mildert die Ausprägung der P2-Peptid-induzierten EAN ..	47
5.2. Die Bystander Suppression mildert die Ausprägung der myelininduzierten EAN	50

6. Einfluß von oralen Adjuvantien	52
6.1. <i>In vivo</i> Einfluß der oralen Adjuvans CT	52
6.2. <i>In vivo</i> Einfluß des oralen Adjuvans LPS	56
7. Sowohl die präventive orale als auch nasale Gabe von P2-Peptid bewahrt vor einer peptidinduzierten EAN	58
8. Therapeutische orale Applikation von Myelin während einer ablaufenden myelininduzierten EAN	60
9. Chronisches Modell einer EAN	62
9.1. Dark agouti-Ratten entwickeln nach der Immunisierung mit BPM/CFA eine rezidivierende Form der EAN	62
9.2. Effekt der präventiven oralen Gabe von Myelin auf den klinischen Verlauf der R-EAN	67
9.3. Therapeutischer Erfolg der oralen Toleranz in der R-EAN bei DA-Ratten	73
10. <i>In vitro</i> Untersuchungen	75
10.1. Einfluß der Myelinfütterung und der Adjuvantien auf die <i>in vitro</i> Proliferation	75
10.2. Myelinsensibilisierte Lymphozyten entwickeln keine peptidspezifische primäre Proliferationsantwort	77
10.3. Hemmung der myelinspezifischen Proliferationsantwort von Lymphozyten aus immunisierten Tieren durch mesenteriale Lymphozyten oder Milzzellen aus oral tolerisierten Tieren	79
10.4. Zeitkinetik zur Aufrechterhaltung von oraler Toleranz und der modulierende Einfluß der beiden Ajuvantien CT und LPS	82
10.5. Durchflußzytologische FACS-Analysen zur Untersuchung des Einflusses von oralen Adjuvantien auf das Wachstum von nativen Milzzellen und MLNZ	86
10.6. Die Effekte der Antigenfütterung auf die antigenspezifische <i>in vitro</i> Produktion von Zytokinen	89

10.7. Die Effekte der Antigenfütterung auf die Produktion von antigenspezifischen Antikörpern in der BPM-induzierten EAN	91
C. DISKUSSION	94
D. MATERIAL UND METHODEN	118
1. Antigengewinnung	118
1.1. Myelinpräparation (BPM)	118
1.2. Präparation des Myelinproteins P2 (P2-Protein)	118
1.3. Neuritogenes P2-Peptid	119
1.4. Basisches Myelinprotein vom Meerschweinchen (GP-MBP)	119
2. Tierexperimentelle Methoden	120
2.1. Versuchstiere	120
2.2. Induktion von oraler Toleranz	121
2.3. Induktion nasaler Toleranz	121
2.4. Induktion von „aktiver“ experimenteller autoimmuner Neuritis (EAN)	121
2.5. Induktion von „aktiver“ experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE)	122
2.6. Bewertung des Krankheitsgrades	122
3. Untersuchungen zur oralen Toleranz	123
3.1. Adoptiver Transfer der Toleranz	123
3.2. Bystander Suppression	123
4. Histologie	124
4.1. Puffer und Lösungen	124
4.2. Perfusion und Präparation	125
4.3. Kunstharzeinbettung	125
4.4. Semiquantitative histopathologische Auswertung	126
4.5. Paraffineinbettung	126
4.6. Immunzytochemie an Paraffinschnitten	127

5. Zellkultur	127
5.1. Sterilisation	127
5.2. Proliferationsassay	128
5.3. Suppression der Proliferationsantwort gegen Myelin <i>in vitro</i>	128
6. Immun-Durchflußzytometrie	129
7. Enzym-gekoppelter Immunoabsorbtiions-Essay (ELISA)	130
7.1. Puffer	130
7.2. Nachweis von Zytokinen	131
7.3. Nachweis von myelinspezifischen Antikörpern im Serum	133
8. Statistische Auswertung	134
E. LITERATUR	135
LEBENS LAUF	164
PUBLIKATIONS LISTE	165