

Aus der Klinik für Neurologie
der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Sven Meuth

Interaktion zwischen T-Lymphozyten und dem peripheren Nerv –

ein neues *In-vitro*-Modell

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Sandra Tessa Hattenhauer

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Bernd C. Kieseier

Zweitgutachterin: PD Dr. med. Dr. rer. nat. Kristina Spaniol

Zusammenfassung

Autoimmune Polyneuropathien des peripheren Nervensystems (PNS) sind durch zelluläre Infiltration, Demyelinisierung und axonale Schädigung des betroffenen Abschnitts des PNS charakterisiert. Der Großteil des heutigen Verständnisses über die Rolle der T-Lymphozyten in der Interaktion mit dem peripheren Nervensystem stammen von einem Tiermodell, der experimentellen autoimmunen Neuritis (EAN). Jedoch ist unklar, wie CD4⁺ und/oder CD8⁺-T-Lymphozyten am Prozess der Demyelinisierung beteiligt sind. Um die Interaktion zwischen T-Lymphozyten und Myelinscheide zu untersuchen, entwickelten wir ein *Live-imaging-in-vitro*-Modell. Myelinisierte Axone von Ratten-Dorsalstrangganglien (DRG) sind hierbei ein etabliertes Modell des peripheren Nervensystems. Hierfür wurden DRG von Embryonen (E16) von Lewis-Ratten präpariert, kultiviert, nach einer Woche die Myelinisierung angeregt und für zwei weitere Wochen fortgeführt. Die T-Lymphozyten wurden nach 10 Tagen aus Lewis-Ratten isoliert, die mit peripherem Myelinprotein P2₅₅₋₇₈ immunisiert wurden. Als Kontrollgruppe wurden T-Lymphozyten von gesunden Ratten gewonnen. Nach magnetischer Zellseparation von CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten konnte der spezifische Effekt neuritogener T-Lymphozyten getrennt betrachtet werden. Zur Untersuchung vitaler T-Lymphozyten erfolgte die Färbung mittels *orange cell tracker*. Die Myelinanalyse in der vitalen Kultur erfolgte mittels *Green-fatty-acid*-Färbung. Die Experimente erfolgten in einer entsprechend klimatisierten Mikroskopkammer, die gefärbten T-Lymphozyten wurden der DRG-Kultur zugegeben und die Interaktion von T-Lymphozyten und Myelin aufgezeichnet. Die Herausforderung war die erfolgreiche Etablierung eines Modells, in dem DRG-Kultur und T-Lymphozyten vital bleiben und durch *live imaging* ohne Signalverlust stabil überwacht werden können. Die Färbungen des Myelins und der T-Lymphozyten zeigten über den Überwachungszeitraum nur geringe Ausbleichung. Der Versuchsaufbau ermöglicht, die Interaktion zwischen T-Lymphozyten und Myelin in Co-Kultur zu studieren. Dabei zeigte sich nach dem initialen Kontakt die Anzahl der CD4⁺-T-Lymphozyten mit Myelinkontakt stabil, wohingegen die Anzahl der CD8⁺-T-Lymphozyten-Myelin-Kontakte über den Überwachungszeitraum zunahm. Ebenso ließ sich die Migration der T-Lymphozyten untersuchen. In der Gruppe neuritogener CD4⁺-T-Lymphozyten zeigte sich eine erhöhte Direktionalität, wohingegen die neuritogenen CD8⁺-T-Lymphozyten eine reduzierte Geschwindigkeit aufwiesen. Die durchgeführte Myelinfärbung mit *Sudan Black B* zeigte eine Myelinschädigung nach 3 Tagen Co-Kultur mit neuritogenen CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten. Diese Ergebnisse weisen auf eine wichtige Rolle sowohl der CD4⁺- als auch der CD8⁺-T-Lymphozyten im Pathomechanismus peripherer autoimmuner Polyneuropathien hin. Dieses neue Modell ermöglicht die detaillierte Analyse der Interaktion zwischen T-Lymphozyten, Schwann-Zellen und Myelin. Gewonnene Erkenntnisse können zur weiteren Entwicklung von Therapiestrategien für entzündliche Erkrankungen des peripheren Nervensystems führen.

Summary

Immune-mediated inflammatory disorders of the peripheral nervous system (PNS) are characterized by cellular infiltration, demyelination and axonal loss in the affected part of the PNS. Most of our current understanding on the role of T cell immunology affecting the peripheral nerve has been gathered from studies in an animal model, experimental autoimmune neuritis (EAN). However, the precise contribution of CD4⁺ and/or CD8⁺ T lymphocytes to the destructive process of demyelination still remains elusive. To shed further light on the precise interactions between T cells, myelin sheaths and axons we established a live imaging *in vitro* model. Myelinated fibres of rat dorsal root ganglia (DRG) served as a model for the peripheral nerve. DRGs of embryonic (E16) Lewis rats were prepared and cultured, myelination was initiated after one week *in vitro* and proceeded for two additional weeks. T lymphocytes were obtained from diseased animals with EAN. Lewis rats immunized with P2₅₅₋₇₈ were sacrificed to obtain T cells of the lymph nodes ten days after immunization. Control T cells were prepared from healthy rats. After magnetic separation of the CD4⁺ and CD8⁺ T cells, we studied the specific effect of neuritogenic T lymphocytes. For vital tracking T lymphocytes were stained using orange cell tracker. Myelin detection in vital cultures was assessed by incorporation of C16 fatty acids conjugated with a fluorophore into the myelin layer. Experiments were performed in a conditioned microscope chamber, dyed T-cells were added to the DRG-culture and continuously followed-up. We were able to successfully establish a model system in which DRGs and T lymphocytes remain vital and can be followed by live imaging. The dyes for fatty acids and for T cells exhibited minor bleaching over the monitoring period. The experiments allowed to monitor T cell migration in the myelinated cultures. After initial contact the CD4⁺ T cell number in close proximity with myelin was almost not altered over the time. However, CD8⁺ T cells numbers in contact with myelin structures increased during the observation period. The neuritogenic CD4⁺ T cells show a directional migration, whereas the CD8⁺ T cells migrate slower. Additional analysis of Sudan Black B staining showed myelin loss after three days co-culture with neuritogenic CD4⁺ and CD8⁺ T cells. All these results indicate an important role of CD4⁺ as well as CD8⁺ T cells for the pathogenesis of peripheral autoimmune neuropathies. This new model system may represent a useful tool to better understand the interactions between T lymphocytes and Schwann cells forming the myelin sheath as well as axons. In addition, it may be useful in the development of new therapies for inflammatory diseases affecting the peripheral nerve.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AIDP	akute inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
AMAN	akute motorische axonale Neuropathie
APC	<i>antigen-presenting cell</i> , antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
BNB	<i>blood-nerve barrier</i> , Blut-Nerven-Schranke
C. jejuni	<i>Campylobacter jejuni</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Oberflächenmarker-Unterscheidungsgruppen
CIDP	chronisch-inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
CO₂	Kohlenstoffdioxid
DF	Dilutionsfaktor
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DRG	<i>dorsal root ganglia</i> , Dorsalstrangganglion
EAN	experimentelle autoimmune Neuritis
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
GFA	<i>green fatty acid</i> , grüne Fettsäure
h	<i>hora</i> , Stunde
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
IFN-γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MBP	<i>myelin basic protein</i> , basisches Myelinprotein
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
Mio.	Million(en)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PNS	peripheres Nervensystem
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SC	<i>Schwann cell</i> , Schwann-Zelle
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
TH-Zellen	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
Tregs	regulatorische T-Zelle

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Das periphere Nervensystem.....	1
1.2.	Der periphere Nerv.....	1
1.2.1.	Die Schwann-Zelle.....	1
1.2.2.	Reizweiterleitung.....	2
1.2.3.	Myelin.....	3
1.2.4.	Blut-Nerven-Schranke.....	3
1.3.	Autoimmunerkrankungen des peripheren Nervensystems.....	3
1.3.1.	Autoimmune inflammatorische Polyneuropathien.....	4
1.3.2.	Guillain-Barré-Syndrom.....	5
1.3.3.	Molekulare Mimikry.....	5
1.4.	Pathomechanismus – bisherige Kenntnisse.....	6
1.4.1.	Tiermodelle des GBS.....	8
1.4.2.	Zusammenbruch der Blut-Nerven-Schranke.....	8
1.4.3.	Zelluläre Komponente.....	9
1.4.3.1.	T-Lymphozyten.....	9
1.4.3.2.	B-Lymphozyten.....	12
1.4.3.3.	Makrophagen und dendritische Zellen.....	12
1.4.3.4.	Schwann-Zellen als antigenpräsentierende Zellen.....	13
1.5.	Zielsetzung der Arbeit.....	13
2.	Methoden.....	15
2.1.	DGR-Kultur.....	15
2.1.1.	Plattenbeschichtung.....	15
2.1.2.	DRG-Modell.....	15
2.1.3.	Anlagen der DRG-Kultur.....	15
2.2.	Myelinisierung der DRG-Kultur.....	16
2.2.1.	Myelinfärbung mit <i>Green-fatty acid</i> -Färbung.....	16
2.2.2.	Stimulation der MHC-Präsentation mit Interferon gamma.....	17
2.3.	T-Lymphozyten.....	17
2.3.1.	Immunisierung mit P2.....	17
2.3.2.	Präparation von Milz und Lymphknoten zur T-Lymphozyten-Gewinnung.....	18
2.3.3.	Zellzählung.....	19
2.3.4.	Magnetische Zellseparation.....	19
2.3.5.	Färbung der T-Lymphozyten mit <i>orange cell tracker</i>	20
2.3.6.	Färbung der T-Lymphozyten mit CFSE-Färbung.....	20

2.3.7.	Durchflusszytometrie der T-Lymphozyten	21
2.3.8.	Videoaufnahme der Lymphozyten-DRG-Co-Kultur.....	21
2.4.	Myelinquantifizierung.....	22
2.4.1.	Plattenfixierung nach DRG-T-Lymphozyten-Co-Kultur	22
2.4.2.	Myelinfärbung mit <i>Sudan-Black-B</i> -Färbung.....	22
2.5.	Migrationsauswertung.....	22
2.6.	Zellkontaktauswertung.....	23
2.7.	Datenanalyse	23
3.	Materialien	24
3.1.	Geräte	24
3.2.	Chemikalien	24
3.3.	Material	26
4.	Ergebnisse	28
4.1.	Etablierung eines neuen In-vitro-Modells.....	28
4.2.	Myelin	29
4.3.	T-Lymphozyten.....	32
4.3.1.	Immunisierung	32
4.3.2.	T-Zell-Gewinnung.....	33
4.3.3.	Färbung T-Lymphozyten.....	33
4.3.3.1.	CFSE-Färbung.....	33
4.3.3.2.	<i>Orange-cell-tracker</i> -Färbung	34
4.3.4.	T-Lymphozyten in Co-Kultur	35
4.3.5.	Trennung der CD4 ⁺ /CD8 ⁺ -T-Lymphozyten.....	35
4.3.6.	T-Zell-Kontakte.....	38
4.3.6.1.	CD4 ⁺ -T-Lymphozyten.....	39
4.3.6.2.	CD8 ⁺ -T-Lymphozyten.....	39
4.3.7.	Direktionalität und Geschwindigkeit.....	40
4.3.7.1.	CD4 ⁺ -T-Lymphozyten.....	40
4.3.7.2.	CD8 ⁺ -T-Lymphozyten.....	41
4.3.8.	Demyelinisierung	42
4.3.8.1.	CD4 ⁺ -T-Lymphozyten.....	43
4.3.8.2.	CD8 ⁺ -T-Lymphozyten.....	44
5.	Diskussion.....	45
5.1.	Die Rolle der T-Lymphozyten in autoimmunen peripheren Polyneuropathien	45
5.1.1.	Die Rolle der CD8 ⁺ -T-Lymphozyten in der DRG-Co-Kultur.....	46
5.1.2.	Die Rolle der CD4 ⁺ -Lymphozyten in der DRG-Co-Kultur.....	48

5.1.3.	T _H 17-Lymphozyten als mögliche Effektorzellen	49
5.1.4.	Schwann-Zellen als Angriffsstruktur und Moderator der Entzündung	50
5.2.	Myelinschädigung bei autoimmunen peripheren Polyneuropathien	52
5.3.	Limitationen im verwendeten Modell	52
5.3.1.	DRG-Modell.....	52
5.3.2.	P2 als Zielstruktur	52
5.3.3.	Der Myelin-T-Zell-Kontakt.....	53
5.3.4.	Aktivierte T-Lymphozyten.....	53
5.3.5.	Stabilität der Färbungen	53
5.3.5.1.	Stabilität der <i>Green-fatty-acid</i> -Färbung	53
5.3.5.2.	Stabilität der <i>Orange-cell-tracker</i> -Färbung.....	54
5.4.	Schlussfolgerung	54
	Literaturverzeichnis.....	55

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schwann-Zell-Entwicklung[6]	2
Abb. 2: Pathomechanismus autoimmuner peripherer Polyneuropathien[45]	7
Abb. 3: Übersicht des Experimentaufbaus	29
Abb. 4: DRG, Sudan-Black-B-Färbung	30
Abb. 5: GFA-Färbung, nach 13 h Belichtung alle 4 min	31
Abb. 6: DRG-Kultur mit GFA-Färbung: Verlust der Fokusebene	31
Abb. 7: DRG-Kultur: GFA-Färbung	32
Abb. 8: T-Lymphozyten mit CFSE Färbung	33
Abb. 9: Vorversuch T-Lymphozyten: orange cell tracker	34
Abb. 10: T-Lymphozyten mit Orange-cell-tracker-Färbung	35
Abb. 11: FACS-Milzzellen	36
Abb. 12: FACS-Lymphknoten	37
Abb. 13: Co-Kultur DRG und T-Lymphozyten	38
Abb. 14: CD4⁺-T-Lymphozyten: Myelinkontakt	39
Abb. 15: CD8⁺-T-Lymphozyten: Myelinkontakt	40
Abb. 16: CD4⁺-T-Lymphozyten: Geschwindigkeit und Direktionalität	41
Abb. 17: CD8⁺-T-Lymphozyten: Geschwindigkeit und Direktionalität	42
Abb. 18: CD4⁺-T-Lymphozyten: Demyelinisierung	43
Abb. 19: CD8⁺-T-Lymphozyten: Demyelinisierung	44

1. Einleitung

1.1. Das periphere Nervensystem

Das periphere Nervensystem (PNS) umfasst den Teil des Nervensystems, der außerhalb von Gehirn und Rückenmark liegt. Die Efferenzen leiten die Informationen aus dem Gehirn in die Peripherie, und die Afferenzen führen den Informationsfluss in die umgekehrte Richtung. Somit ist das periphere Nervensystem das Bindeglied zwischen dem Gehirn und der Peripherie. Die kleinste funktionelle Einheit hierbei bildet das Neuron als erregungsübertragende Zelle. Zwischen den Neuronen muss die Übertragung über den synaptischen Spalt erfolgen. Dies geschieht über Transmitter, welche über spezifische Rezeptoren zur Entstehung eines Aktionspotenzials beim nachgeschalteten Neuron führen [1].

1.2. Der periphere Nerv

Der periphere Nerv besteht aus gebündelten Axonen [1]. In **Abb. 1** sind periphere Axone als Teil des peripheren Nervs im Querschnitt dargestellt [2]. Der gesamte Nerv ist von Epineurium umgeben. Er wird durch das Perineurium in einzelne Faszikel, also kleinere Bündel von Nervenfasern unterteilt. Innerhalb dieses Faszikels ist jedes Axon mit Endoneurium umhüllt. Periphere Nerven enthalten oft afferente und efferente Anteile und werden dann als gemischte Nerven bezeichnet [3].

1.2.1. Die Schwann-Zelle

Die Schwann-Zellen (*Schwann cell*, SC) liegen longitudinal entlang des Axons [4]. Die SC bietet Schutz und Organisation gegenüber dem Axon. Sie schützt das Axon vor Traumata durch Extension und Kompression [5]. In frühen Entwicklungsphasen regen SC durch Bildung von Wachstumsfaktoren das Aussprossen von Axonen in die Peripherie an. Diese Fähigkeit kommt auch im Rahmen von Verletzungen zum Tragen. SC entwickeln sich im Falle einer Axonschädigung zu einer früheren Entwicklungsstufe zurück. Diese kann wieder Wachstumsfaktoren produzieren und die Neubildung der Axone anregen. Da die Basallamina der SC bei vielen Nervenverletzungen erhalten bleibt, kann sie als Leitstruktur dienen, an der die Axone wieder auswachsen [5]. Man unterscheidet myelinisierte von unmyelinisierten Axonen. Unmyelinisierte Axone werden von SC in separierten Taschen geführt und somit gestützt [5, 6]. Zur Myelinisierung eines Axons wickelt sich die SC mehrfach um das Axon (**Abb. 1**) [7, 8]. Die Membranschichten liegen sehr eng aufeinander, so dass kaum Zytoplasma oder extrazelluläre Matrix die Isolierung mindert [4]. Der von Myelin umgebene Teil des Axons wird auch als Internodium, der Bereich dazwischen als Ranvier-Schnürring oder Nodium bezeichnet [4]. Jede SC bildet hierbei nur ein Internodium [4]. Das Internodium wird von kompaktem Myelin aus lamellären Schichten gebildet [5]. Durchzogen und begrenzt wird das kompakte Myelin immer wieder von nichtkompaktem Myelin [4]. Neben diesen

Aufgaben stellt die SC jedoch auch eine potenzielle unprofessionelle antigenpräsentierende Zelle (*antigen presenting cell*, APC) dar und könnte damit auch für Immunprozesse im peripheren Nervensystem relevant sein [9].

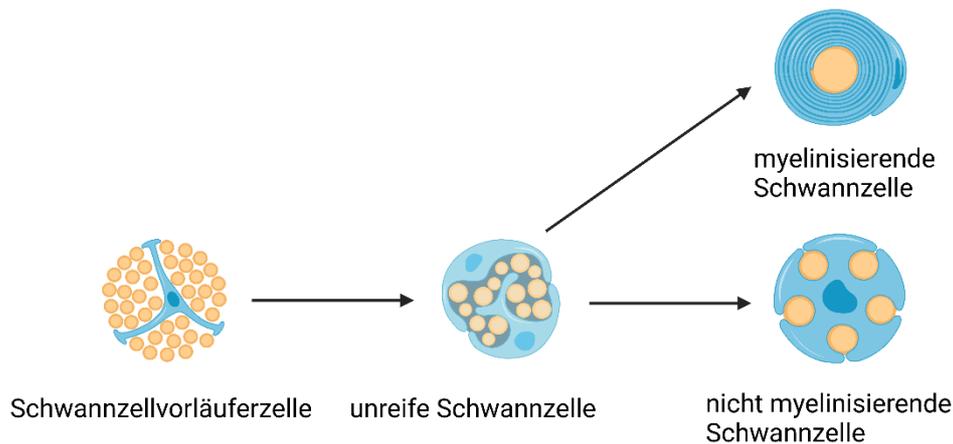


Abb. 1: Schwann-Zell-Entwicklung[6]

Die Abb. zeigt die Entwicklung der SC aus Vorläuferzellen über die unreife SC. Diese wickeln sich zur Myelinscheidenbildung mehrfach um das Axon. Nichtmyelinisierende SC führen Axone in separierten Taschen, Abb. modifiziert nach [6] und erstellt mit BioRender.com.

1.2.2. Reizweiterleitung

Die Reizweiterleitung im PNS verläuft entlang der Axone [4]. Im Bereich der Ranvier-Schnürringe befindet sich eine hohe Konzentration spannungsabhängiger Natriumkanäle. Diese werden durch die übergeleitete Spannung geöffnet [10]. Der Einstrom von Natriumionen führt zur Depolarisation. Diese wird passiv entlang des Internodiums bis zum nächsten Ranvier-Schnürring fortgeleitet [4]. Myelin ermöglicht dadurch eine schnellere Reizweiterleitung bei geringerem Energieaufwand und geringerem Durchmesser [7, 11]. Die Instanz der Myelinscheide ist daher von entscheidender Bedeutung für die effektive Informationsweiterleitung im peripheren Nervensystem, und eine Schädigung der Myelinschicht führt zu einer Verlangsamung oder einem Funktionsverlust der Reizweiterleitung [4].

1.2.3. Myelin

Bei Myelin handelt es sich um lipidhaltige Plasmamembranen, welche sich mehrfach um das Axon wickeln [4]. Myelin enthält eine hohe Konzentration an langen Fettsäureketten und einen Lipidanteil von 70–80%. Dieser hohe Lipidgehalt der Membran bedingt die elektrische Isolation und ermöglicht die schnelle Reizweiterleitung [4]. 20–30% des Trockengewichts bestehen aus Proteinen. In der Gruppe der Basisproteine finden sich u. a. das *myelin basic protein* (MBP) und das Myelin-P2-Protein (PMP2, P2). P2 ist an der zytoplasmatischen Seite des kompakten Anteils des Myelins vorzufinden [4]. Es hat fettsäurebindende Eigenschaften und könnte als Lipidtransportprotein fungieren, somit könnte es für die Integrität des Myelins relevant sein [4]. Das Myelin des peripheren Nervensystems unterscheidet sich bezüglich seiner Proteinzusammensetzung von dem des zentralen Nervensystems [12]. Zu der Gruppe der Proteine kommt eine große Gruppe Myelin-assoziiierter Glykoproteine (MAG) und Ganglioside als potenzielle Zielstruktur für das Immunsystem im Rahmen einer Autoimmunerkrankung [12].

1.2.4. Blut-Nerven-Schranke

Das PNS stellt einen durch die Blut-Nerven-Schranke (*blood-nerve barrier*, BNB) abgetrennten immunologischen Bereich dar. Die BNB wird vom Perineurium und endoneurial gelegenen Epithelzellen gebildet [13, 14]. Die mikrovaskulären Endothelzellen des Endoneuriums bilden hierbei *tight junctions* aus, welche die Grenze zwischen Gefäßsystem und Nervensystem bilden, wohingegen das Perineurium die endoneuriale Matrix nach außen abtrennt [14]. Die Durchlässigkeit der BNB unterscheidet sich abhängig von der Region; so ist sie einerseits zentral im Bereich der Nervenwurzel als auch peripher im Bereich der neuromuskulären Endplatte durchlässiger [12, 15, 16]. Die BNB verhindert das direkte Einwandern von Lymphozyten und humoralen Faktoren aus dem Blut in das PNS [16]. Einzelne patrouillierende T-Lymphozyten bilden gemeinsam mit Makrophagen die lokale Immunabwehr des PNS [17, 18]. Diese T-Lymphozyten zirkulieren und verlassen nach begrenzter Zeit das PNS wieder, nur im pathologischen Zustand kommt es zu einer Akkumulation von T-Lymphozyten im PNS [17]. Eine Störung in der BNB-Funktion wird daher als möglicher Faktor bei der Entstehung von immunmodulierten peripheren Polyneuropathien gesehen, weil durch den Zusammenbruch der BNB das massive Einwandern von Effektorzellen in das Immunsystem ermöglicht wird [16].

1.3. Autoimmunerkrankungen des peripheren Nervensystems

Bei einer Autoimmunerkrankung kommt es zum Verlust der Selbsttoleranz und somit zu einer Schädigung körpereigenen Gewebes durch das Immunsystem [19]. T-Lymphozyten sollen einerseits Fremdantigene erkennen und zur deren Eliminierung beitragen und andererseits kein körpereigenes Gewebe angreifen. Ein Mechanismus, um diese Selbsttoleranz bei der Entwicklung des

Immunsystems eines Organismus zu erreichen, ist eine zusätzliche Selektion der Zellen in ihrer Entwicklung im Thymus. Hier werden im ersten Schritt alle T-Lymphozyten mit einer leichten MHC-Bindung positiv selektiert. Da T-Lymphozyten später MHC-Moleküle erkennen müssen, ist dieser Schritt notwendig, um die generelle Affinität zu MHC-Molekülen zu sichern. Im zweiten Schritt erfolgt die eigentliche Sicherung der Selbsttoleranz. T-Lymphozyten, welche körpereigene MHC-Komplexe binden, werden negativ selektiert. T-Lymphozyten, die körpereigenes Gewebe angreifen, sollen zur Sicherung der Selbsttoleranz nicht in Umlauf kommen [20, 21]. Fehlfunktionen dieses Lernprozesses führen zu Autoimmunerkrankungen [22]. Autoreaktive Lymphozyten zerstören spezifisches Gewebe gezielt, autoimmune periphere Neuropathie entstehen entsprechend durch einen Verlust der autoimmunen Toleranz gegenüber peripherem Nervengewebe [19, 23].

1.3.1. Autoimmune inflammatorische Polyneuropathien

Autoimmune Neuropathien des peripheren Nervensystems sind bedingt durch einen Prozess, bei dem sich das Immunsystem gegen das körpereigene PNS richtet. Durch die Schädigung von Myelin und Axonen kommt es zum Funktionsverlust des PNS [24, 25]. Das Guillain-Barré-Syndrom (GBS) stellt eine akute, demyelinisierende Polyneuropathie des PNS dar, demgegenüber steht die chronisch-inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP) [26, 27]. GBS und CIDP stellen die häufigsten Formen autoimmunvermittelter Erkrankung des peripheren Nervensystems dar [23, 25]. Die Bandbreite der Symptome reicht von Taubheitsgefühl, Areflexie, Verlust des Vibrationsempfindens und Schwäche bis hin zu Paresen [26, 28, 29]. In Abgrenzung zum Guillain-Barré-Syndrom entwickelt sich die Symptomatik der CIDP nicht akut, sondern über mehr als acht Wochen und kann schubförmig, remittierend oder progressiv verlaufen [28-30]. Die maximale Symptomatik des GBS entwickelt sich innerhalb von vier Wochen [31]. Diesem Symptommhöhepunkt folgt eine längere Erholungsphase, in der sich die Symptome zurückbilden [31]. Bedingt sind die Symptome der peripheren Polyneuropathien durch eine multifokale Demyelinisierung, welche zu einer herabgesetzten Nervenleitgeschwindigkeit führt [30, 32, 33]. Von einer immunologischen Ursache dieser peripheren Polyneuropathien ging man seit den 1950er Jahren aus, als ein Ansprechen der Symptome auf eine Steroidtherapie gezeigt werden konnte [30, 34]. Heute wird sowohl von einer zellulären als auch einer humoralen Komponente der Erkrankung ausgegangen, je nach Unterform mit unterschiedlichem Schwerpunkt der Pathophysiologie [25]. Dabei wird die Schädigung am ehesten durch ein Zusammenspiel von T-Lymphozyten, Antikörpern, Komplementfaktoren und Makrophagen verursacht [24]. Aufgrund des mangelnden Verständnisses für die genaue Pathophysiologie ist die aktuelle Therapieleitlinienempfehlung eine unspezifische immunsuppressive Therapie mit Glukokortikosteroiden, intravenösen Immunglobulinen und Plasmapherese [35, 36].

1.3.2. Guillain-Barré-Syndrom

Das Guillain-Barré-Syndrom (GBS) ist eine akute Autoimmunerkrankung, die das PNS schädigt [24]. Klinisch zeigen sich Symptome wie symmetrische Parästhesien, aufsteigende schlaffe Paresen, bis hin zur Atemlähmung mit der Notwendigkeit zur Beatmung, aber auch Beeinträchtigungen des autonomen Nervensystems und die Beeinträchtigung von Hirnnerven [26, 31, 36, 37]. Das GBS umfasst eine heterogene Gruppe akuter, autoimmuner peripherer Polyneuropathien, welche sich teilweise auch in Klinik und Pathophysiologie unterscheiden [36, 38]. Die beiden häufigsten Formen sind die akute inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (AIDP) und die akute motorische axonale Neuropathie (AMAN) [38]. Schädigungen des peripheren Nervensystems können sowohl das Axon als auch das Myelin betreffen [31]. Während bei der AIDP die Schädigung der Myelinisierung im Vordergrund steht, ist bei der AMAN primär das Axon von der Schädigung betroffen [36]. Zielstruktur der Schädigung im Rahmen der AIDP könnte sowohl die Schwann-Zell-Oberfläche als auch das Myelin sein [38]. Die genauen molekularen Zielstrukturen der AIDP sind hierbei im Gegensatz zu der axonalen Form AMAN, welche mit Antigangliosid-Antikörpern assoziiert ist, nicht bekannt [39, 40]. Während Remyelinisierung einen natürlichen Regenerationsprozess darstellt, benötigen axonale Regenerationsprozesse sehr lange, falls sie nicht irreversibel sind [31]. Eine Schädigung des Axons kann auch sekundär bei zunehmender Demyelinisierung entstehen [31]. Insgesamt ist der Pathomechanismus der AIDP noch wenig verstanden, wobei für die AIDP zelluläre Mechanismen relevanter sein könnten und weiterer Forschung bedürfen [38].

1.3.3. Molekulare Mimikry

Es gibt verschiedene Theorien, wie solche Autoimmunerkrankungen entstehen können. Eine mögliche Erklärung ist der Mechanismus des molekularen Mimikry [19]. Aufgrund einer Ähnlichkeit zwischen dem Epitop eines Bakteriums und einem körpereigenen Epitop kommt es nach einer Infektion zu einer Immunreaktion, welche sich fälschlicherweise gegen körpereigene Strukturen richtet [19]. Der Infektion sollte im Fall eines molekularen Mimikry die Bildung spezifischer Antikörper bzw. T-Lymphozyten folgen [19]. Dieser Zusammenhang konnte unter anderem für eine Infektion mit dem Bakterium *Campylobacter (C.) jejuni* und GBS gezeigt werden [19]. Es besteht eine epidemiologische Assoziation zwischen einer Infektion mit *C. jejuni* und der folgenden Erkrankung an GBS [41]. Serumanalysen von GBS-Patienten konnten zum Teil spezifische Antikörper gegen Ganglioside, wie zum Beispiel GM1, GD1a, GD1b, nachweisen [40]. Zusätzlich muss eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen Autoantigenen und mikrobiellem Antigen bestehen [19]. Dies konnte für ein Oberflächen-Lipopolysaccharid von *C. jejuni* und Gangliosid GM1 gezeigt werden [42]. Zuletzt sollte die Theorie noch durch ein Tiermodell belegt werden [19]. Nach der Immunisierung mit dem mikrobiellen Antigen soll es zur Entwicklung spezifischer

Autoantigene und einer dem Menschen ähnlichen Klinik kommen [43]. Immunisierung mit GBS assoziierten *C.-jejuni*-Stämmen führten im Tiermodell zur Bildung von kreuzreaktiven Antikörpern gegen Ganglioside [43]. Ebenso konnte die Entwicklung einer Polyneuropathie durch Immunisierung mit *C.-jejuni*-Lipooligosacchariden im Tiermodell gezeigt werden [44]. Dieses Beispiel für ein molekulares Mimikry kann zwar einen Anteil einzelner Unterformen des GBS erklären, insbesondere die AMAN, welche mit Antikörpern gegen GM1- und GD1a-Gangliosiden assoziiert ist [38, 40]. Allerdings erklären diese einzelnen Beispiele alleine bis heute nicht die Bandbreite an autoimmun demyelinisierenden Polyneuropathien und die gesamte Pathophysiologie der Erkrankungen [23].

1.4 Pathomechanismus – bisherige Kenntnisse

Beim GBS kommt es nach dem Verlust der autoimmunen Toleranz zu einer spezifischen Schädigung des PNS [24]. Aktuell wird sowohl von einer humoralen als auch einer zellulären Komponente bei der Entstehung von autoimmunen peripheren Polyneuropathien ausgegangen [45]. Beide führen parallel oder gemeinsam zu einer Schädigung des PNS [23, 25, 46]. Relevant scheinen aktive T-Zellen, myelinspezifische Antikörper und Makrophagen als Effektorzellen zu sein; in **Abb. 2** werden Abläufe der Immunaktivierung dargestellt [45, 47]. Fraglich durch einen Auslöser werden T-Lymphozyten aktiviert, wodurch über Zytokine B-Lymphozyten zur Produktion von Antikörpern aktiviert werden. Diese Antikörper richten sich gegen Komponenten des Myelins oder des peripheren Nervensystems [45]. Es kommt zu einem zunehmenden Integritätsverlust der BNB. Leukozyten, Makrophagen und Antikörper können aufgrund des Zusammenbruchs der BNB ungehindert ins PNS einwandern [12]. Über aktivierte T-Lymphozyten werden proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet und das Entzündungsgeschehen durch Rekrutierung weiterer Immunzellen vor Ort verstärkt. Gegen Myelinprotein gerichtete Autoantikörper können nun frei ins PNS eindringen und zu einer Komplement- und Makrophagen-bedingten Schädigung führen. Makrophagen können hierbei direkt Myelin schädigen und als APC wirken. Zusätzlich können SC als unprofessionelle APC in das Entzündungsgeschehen eingreifen, und zugleich stellen sie eine potenzielle Zielstruktur dar [45]. Diese bisherigen Kenntnisse sind in **Abb. 2** zusammengefasst [45].

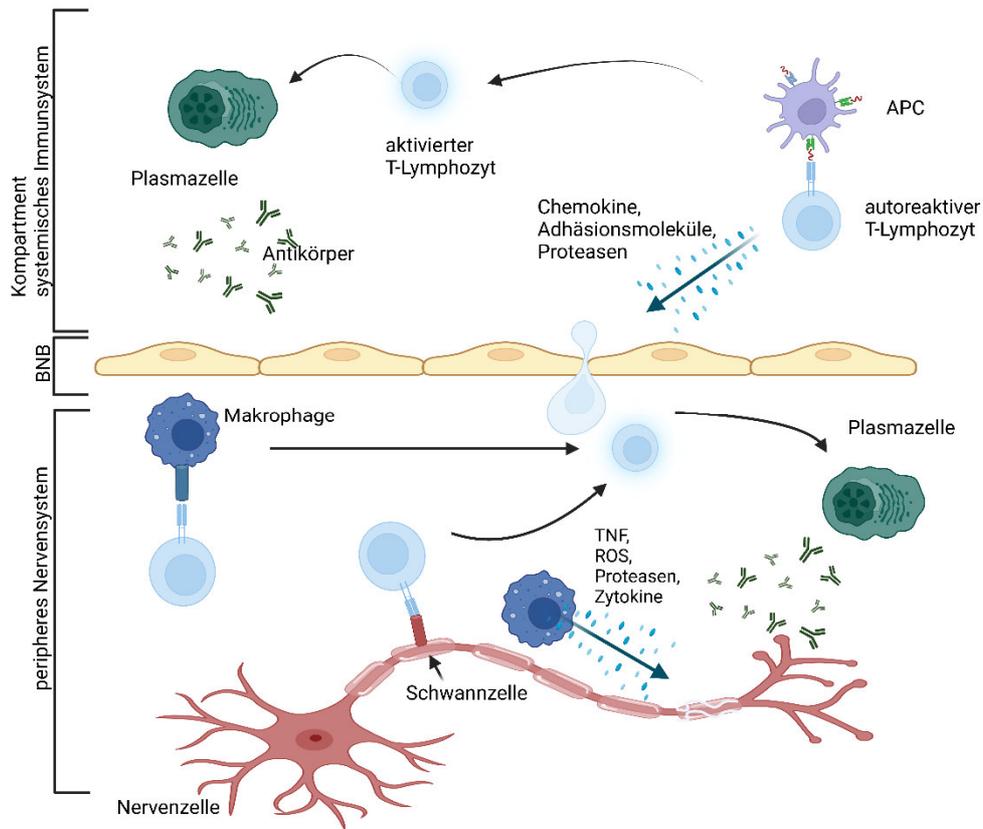


Abb. 2: Pathomechanismus autoimmuner peripherer Polyneuropathien[45]

Die Abb. fasst die bisherigen Erkenntnisse zum Pathomechanismus autoimmuner peripherer Polyneuropathien zusammen. Durch eine APC werden autoreaktive T-Lymphozyten aktiviert. Diese regen Plasmazellen zur Bildung von Autoantikörpern an. Zugleich wird die BNB durch Chemokine und Proteasen geschädigt. Immunzellen und Autoantikörper können vermehrt ins PNS einwandern. Makrophagen werden im PNS von autoreaktiven T-Lymphozyten angeregt und schädigen durch Tumornekrosefaktor (TNF), reaktive Sauerstoff-Spezies (*reactive oxygen species*, ROS) und Zytokine die Myelinscheiden. Neben den Makrophagen kann auch die SC als APC in Interaktion mit den T-Lymphozyten treten. Die Immunreaktion kann durch Apoptose der Immunzellen limitiert werden. Abb. modifiziert nach [45] und erstellt mit BioRender.com

1.4.1. Tiermodelle des GBS

Bisheriges Wissen über periphere Polyneuropathien beruht zu einem gewissen Teil auf Erkenntnissen aus Tiermodellen [48]. Die EAN (experimentelle autoimmune Neuritis) gilt als verlässliches und vielgenutztes Tiermodell des GBS [23, 49]. Am ehesten soll sie die pathologischen Vorgänge der AIDP darstellen [48]. Sie wird durch Immunisierung mit einem peripheren Myelinprotein induziert [49]. Klinisch manifestiert sich die Erkrankung zunächst durch eine aufsteigende Parese, beginnend mit einer Schwäche des Schwanzes, fortschreitend zu motorischen Einschränkungen der hinteren Extremitäten, Ataxie und Paraparese bis hin zur Tetraparese [50]. Histologisch zeigt sich eine perivaskuläre Infiltration von Lymphozyten und Monozyten als zelluläres Korrelat des Entzündungsprozesses sowie eine Schädigung des Myelins und des Axons als Folge der Entzündung [49, 51]. Eine EAN kann zudem durch passiven Transfer von Lymphozyten erkrankter Lewis-Ratten auf gesunde Lewis-Ratten induziert werden. Dies deutet auf eine entscheidende Rolle des zellulären Immunsystems hin [51, 52]. Die CIDP ist im Tiermodell schwieriger abzubilden. Es gibt Modelle, die eine remittierende EAN auslösen, welche sich nicht limitiert [23]. Das genaue Zielantigen von peripheren Polyneuropathien wie GBS und CIDP wird im Rahmen des EAN-Modells durch die Immunisierung bereits vorgegeben [48]. Im Rahmen des Versuchsaufbaus sind jedoch neben MBP und PMP2 andere Zielantigene denkbar [49]. Das EAN-Modell konnte die Relevanz zielgerichteter T-Zell-Klone und Antikörper zeigen und daher die Untersuchung dieser Komponente des Entzündungsprozesses ermöglichen [53, 54]. Zwar ähnelt die EAN in Klinik und Pathologie der AIDP, allerdings ist nicht belegt, dass der Pathomechanismus des Tiermodells die genauen Abläufe der humanen AIDP widerspiegelt, jedoch ermöglicht sie die Untersuchung einzelner Aspekte des Pathomechanismus [23]. Die EAN als Modell legt nahe, dass es sich bei der AIDP um eine von T-Lymphozyten gesteuerte Erkrankungen handelt [48]. Der Nachteil dieses Modells ist jedoch, dass eine Untersuchung des Pathomechanismus auf zellulärer Ebene nur zu vordefinierten Zeitpunkten möglich und somit die Untersuchung der Prozesse auf zellulärer Ebene erschwert ist [48].

1.4.2. Zusammenbruch der Blut-Nerven-Schranke

Der Verlust der Integrität der BNB gehört zum Frühstadium der Entstehung einer EAN [55] und korreliert mit dem Auftreten von mononuklearen Zellen im endoneurinalen Interstitium sowie einem diffusen endoneurinalen Ödem [56]. Die Untersuchung des Serums von Patienten mit CIDP zeigten im Zellmodell eine Erhöhung der Durchlässigkeit der Endothelzellen und eine Erhöhung der Anzahl der Zelladhäsionsmoleküle [57]. Der Zusammenbruch der BNB wird durch Antikörper oder humorale Faktoren begünstigt [57]. Hinzu kommen Faktoren wie Adhäsionsmoleküle [58] und Enzyme wie Matrix-Metalloproteasen, welche die Durchlässigkeit der BNB erhöhen und ein

Einwandern von Immunzellen im Falle einer immunmodulierten Polyneuropathie ins PNS ermöglichen [59].

1.4.3. Zelluläre Komponente

Das EAN-Modell lässt eine relevante zelluläre Immunreaktion als Pathomechanismus vermuten [48]. Auch die Untersuchungen von Patienten mit peripheren autoimmunen Polyneuropathien weisen auf eine relevante zelluläre Immunkomponente hin [12]. Histologisch konnte in peripheren Nerven von Patienten mit GBS eine Infiltration durch T-Lymphozyten und Makrophagen im Bereich der peripheren Nerven sowie Zeichen segmentaler Demyelinisierung gezeigt werden [60]. Auch die histologischen Untersuchungen der peripheren Nerven von Patienten mit CIDP zeigen zelluläre Infiltrationen. Es zeigt sich hier eine Makrophagen-bedingte Demyelinisierung und T-Zell-Infiltration des Endoneuriums. Als Zeichen der Myelinschäden werden frei liegende Myelinfragmente sowie de- und unmyelinisierte Axone sichtbar. In einer weiteren Subgruppenanalyse zeigten sich sowohl CD8⁺- (*cluster of differentiation*, Oberflächenmarker-Unterscheidungsgruppen, CD) als auch CD4⁺-T-Lymphozyten [61]. Dies kann als Hinweis auf eine relevante Rolle der T-Lymphozyten an der Erkrankung gewertet werden [62].

1.4.3.1. T-Lymphozyten

Naive T-Lymphozyten zirkulieren durch das Lymphsystem. Durch hoch endotheliale Venolen treten sie in Lymphknoten ein. Im Kortexbereich lagern antigenpräsentierende dendritische Zellen. Diese präsentieren Antigene über Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC). MHC-Moleküle dienen der Präsentation von Antigenen auf der Zelloberfläche. T-Zell-Rezeptoren erkennen nur zusammenhängende Aminosäuresequenzen. Diese sind in der gefalteten Proteinstruktur zuweilen nicht zugänglich. Daher ist eine Entfaltung des Proteins und eine Präsentation über das MHC-Molekül notwendig. So fungieren Antigen und MHC erst gemeinsam als Ligand für den T-Zell-Rezeptor. Spezialisierte APC präsentieren über MHC-II unbegrenzt lange Aminosäuresequenz aus vesikulären Zellkompartimenten, also extrazelluläre Proteine. Prinzipiell geht man davon aus, dass MHC-II-Moleküle die primäre Präsentationsform spezialisierter Zellen wie Makrophagen, dendritische Zellen oder B-Zellen für extrazelluläre, also aufgenommene Proteine sind. Verstärkt werden kann die Expression von MHC-Molekülen durch Interferon gamma (IFN- γ), ein Zytokin, welches während des Entzündungsprozesses ausgeschüttet wird. Bindet ein T-Lymphozyt an die passende antigenpräsentierende Zelle, führt dies über kostimulatorische Signale und Zytokinausschüttung zu einer Entwicklung zur Effektorzelle. Auslösend für die Weiterentwicklung nach der Stimulation ist zunächst ein Eintreten in die G1-Phase des Zellzyklus und die Produktion von Interleukin (IL)-2. IL-2 führt zum Durchlaufen des

Zellzyklus, zur Proliferation und zur Weiterentwicklung zur T-Effektorzelle. Effektorzellen können nach ihrer Aktivierung den Lymphknoten verlassen und durch chemotaktischer Signale zum Ort der Entzündung gelangen. Die Entwicklung zur Effektorzelle kann neben dendritischen Zellen auch durch B-Lymphozyten und Makrophagen angeregt werden [20, 21]. Im Gegensatz zu einer naiven T-Zelle benötigt die Effektorzelle kein kostimulatorisches Signal mehr und kann daher jede MHC-präsentierende Zelle angreifen [20, 21]. Sofern die T-Lymphozyten hier nicht auf ein passendes Antigen treffen, verlassen sie den Lymphknoten und zirkulieren weiter. Effektorzellen verlassen ebenfalls den Lymphknoten und gelangt über die Blutbahn zum Fokus der Entzündung. Die T-Lymphozyten wandern in das periphere Nervensystem ein und locken durch Ausschüttung von Chemokinen, Makrophagen und weiteren T-Lymphozyten an den Herd der Entzündung [20, 23]. In den Biopsien der sensorischen Nerven von Patienten mit GBS zeigten sich vermehrte Infiltrationen von T-Lymphozyten und lassen eine Rolle der T-Lymphozyten für die Erkrankung vermuten [63]. Ein weiterer Hinweis für eine relevante Rolle der T-Lymphozyten für den Krankheitsprozess liefert das Tiermodell EAN. Durch den adoptiven Transfer von spezifischen T-Lymphozyten ist die Induktion einer EAN möglich. Nach der Immunisierung mittels Myelinprotein wurden hierfür EAN-erkrankten Tieren die Lymphknoten entnommen und die daraus gewonnenen Zellen gesunden Versuchstieren übertragen; diese Übertragung führte zur Entwicklung einer EAN bei den zuvor gesunden Versuchstieren [52]. In späteren Versuchen konnte dies auch über einen T-Zell-Transfer von erkrankten auf zuvor gesunde Versuchstiere repliziert werden [64]. Die Induktion einer EAN durch den alleinigen adoptiven Transfer von P2- oder P0-spezifischen T-Lymphozyten deutet auf eine führende Rolle von T-Lymphozyten für den Krankheitsprozess hin [49]. T-Zell-defiziente Ratten hingegen können keine EAN entwickeln, so dass die T-Lymphozyten für die EAN absolut essenziell erscheinen [65]. Auch eine Fehlfunktion der T-Lymphozyten hat einen Einfluss auf die Entwicklung einer EAN, durch α/β -T-Zell-Rezeptor-Antikörper kann eine EAN in Ratten verhindert bzw. therapiert werden [66]. Eine Erhöhung von IL-2 im Serum konnte für GBS-Patienten gezeigt werden und ist ein weiteres Indiz, dass es bei der Erkrankung zu einer Aktivierung von T-Lymphozyten kommt [67].

1.4.3.1.1. CD4⁺-T-Lymphozyten

CD4⁺-T-Lymphozyten binden an MHC-II-Moleküle. Diese werden beispielsweise von B-Lymphozyten, dendritischen Zellen oder Makrophagen exprimiert [68]. Man unterscheidet Untergruppen von CD4⁺-T-Lymphozyten. Ein naiver CD4⁺-T-Lymphozyt kann sich abhängig von äußeren Faktoren in T_{H1}, T_{H2}, T_{H17} und T_{regs} (regulatorische T-Zellen) entwickeln. T_{H1}-Zellen aktivieren Makrophagen zur Abtötung intravesikulärer Erreger, T_{H2}-Zellen regen B-Zellen zur Produktion von Antikörpern an, und T_{H17}-Zellen rekrutieren neutrophile Granulozyten zum Ort der Entzündung [20, 68, 69]. Hierbei können T_{regs} regulierend bzw. supprimierend auf die anderen T-

Zell-Subtypen wirken und eine überschießende der Immunreaktion verhindern [22, 69]. CD4⁺-T-Lymphozyten scheinen für die EAN eine zentrale Rolle zu spielen, da der adoptive Transfer spezifischer CD4⁺-T-Lymphozyten auf ein gesundes Tier zur Ausbildung einer EAN führt [70]. Hierbei können CD4⁺-T-Lymphozyten über verschiedene Wege zur Demyelinisierung beitragen, einerseits über eine Aktivierung von Makrophagen, welche als Effektorzellen das Myelin angreifen, oder über eine Aktivierung von B-Lymphozyten, die myelinspezifische Antikörper ausschütten [45, 46]. Im peripheren Blut bei Patienten mit GBS zeigt sich eine Vermehrung der T-Helferzellen, während die T_{regs} eher vermindert sind [71]. Dies ist als Zeichen einer Fehlregulation des Immunsystems zu verstehen und auch bei anderen Autoimmunerkrankungen der Fall [71]. Neben der Modulation des Entzündungsgeschehens über andere Zellen des Immunsystems ist auch ein Eingreifen der CD4⁺-T-Lymphozyten im Sinne direkter Effektorzellen denkbar, unter zusätzlicher Stimulation konnte auch eine zytotoxische Aktivität von CD4⁺-T-Lymphozyten gezeigt werden [72]. In der Zellkultur war nach Infektion mit *Mycobacterium leprae* eine direkte Schädigung der SC durch die Interaktion mit CD4⁺-T-Lymphozyten zu beobachten. Hier wurde eine direkte zytotoxische Schädigung, eine Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige Aktivierung eines purinergen Rezeptors oder die Ligandenbindung an einen Todesrezeptor mit darauffolgender Apoptose diskutiert [73-75].

1.4.3.1.2. CD8⁺-T-Lymphozyten

CD8⁺-T-Lymphozyten werden auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet, da sie Zellen direkt angreifen können. CD8⁺-T-Lymphozyten binden an MHC-I-Moleküle. Diese werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert. MHC-I präsentiert 8–10 Aminosäuren lange Peptide aus dem Zytosol, also intrazelluläre Proteine. Hierrüber kann jede kernhaltige Zelle intrazelluläre Antigene für das Immunsystem präsentieren und beispielsweise eine Virusinfektion der Zelle für die CD8⁺-T-Lymphozyten sichtbar machen, so dass CD8⁺-T-Lymphozyten die Zelle angreifen können. Trifft ein CD8⁺-T-Lymphozyt auf eine MHC-I-präsentierende Zelle mit passendem Antigen, kommt es zur direkten zytotoxischen Schädigung. CD8⁺-T-Lymphozyten enthalten lytische Granula; diese lagern sich in Membran der Zielzelle zu Membranporen zusammen und zerstören so die Integrität der Zellmembran. Proteasen lösen im Zellinnern eine Kaskade aus, welche letztendlich zum Abbau der DNS (Desoxyribonukleinsäure) führt. Zusätzlich löst auch der ausgeschüttete Fas-Ligand den programmierten Zelltod der Zielzelle aus. So können virusinfizierte Zellen von zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen eliminiert werden [20, 76]. CD8⁺-Lymphozyten könnten daher direkt zytotoxisch auf Myelin als auch auf das Axon wirken [46]. Über lange Zeit hat sich ein großer Teil der Forschung auf die Rolle der CD4⁺-T-Lymphozyten konzentriert, weshalb lange wenig Daten zur Rolle der CD8⁺-T-Lymphozyten vorlagen [46]. Frühe Untersuchungen von Zellverteilungen im peripheren Blut von GBS-Patienten zeigen eine Erhöhung der CD8⁺-Fraktion und lassen eine Beteiligung dieser Zellgruppe am Pathomechanismus vermuten [71]. Eine Analyse von T-Zell-Rezeptorlängen-

Verteilung im peripheren Blut von CIDP-Patienten ergab Aktivitätszeichen für CD8⁺-T-Lymphozyten [77]. Im Gegensatz zu den CD4⁺-T-Lymphozyten zeigte sich bei den CD8⁺-T-Lymphozyten eine oligoklonale Expansion der T-Zell-Rezeptorlänge [77]. Die Oligoklonalität deutet auch darauf hin, dass mehrere Peptide als Zielstruktur dienen [77]. Diese Ergebnisse weisen auf einen durch CD8⁺-Lymphozyten vermittelte Schädigung des peripheren Nervensystems hin, wobei das Zielantigen unklar bleibt [46]. CD8⁺-T-Lymphozyten könnten hierbei direkt zytotoxisch ohne weitere Effektorzellen schädigend gegenüber Komponenten des PNS sein [46].

1.4.3.2. B-Lymphozyten

Nach der Aktivierung der spezifischen B-Lymphozyten durch die passenden T-Lymphozyten entwickeln sich diese zu antikörperproduzierenden Plasmazellen. Die produzierten Antikörper können eine komplementvermittelte Zerstörung der Zelle auslösen, oder die Zelle für eine makrophagenvermittelte Schädigung markieren [20, 23, 78]. Auch für einzelne autoimmune periphere Polyneuropathien wird eine antikörpervermittelte Komponente des Krankheitsprozesses vermutet [45]. Hierbei lassen sich für das GBS die Unterformen AMAN und AIDP getrennt betrachten [45]. Für die AMAN lässt sich vermuten, dass es nach einer Infektion zur Ausbildung von Autoantikörpern gegen Ganglioside kommt; diese binden axonal und führen zu einer Aktivierung des Komplementsystems [19, 37]. Es kommt zur komplementvermittelten axonalen Schädigung und anschließendem Abbau durch Makrophagen [37]. Weiterer Beleg für die Relevanz von Autoantikörpern ist die Wirkung von Plasmapheresen bei GBS-Patienten, welche die Entfernung von Antikörpern zum Ziel hat [23]. Autoantikörper aktivieren zusätzlich das Komplementsystem, welches bei GBS-Patienten vermehrt arbeitet [23, 79]. Zwar gibt es Untersuchungen, welche eine Komplementaktivierung im Bereich der SC-Oberfläche in AIDP-Nerv-Biopsien zeigen, allerdings ist u. a. für die AIDP noch kein spezifischer Antikörper gefunden worden, so dass die Relevanz von Autoantikörpern für die AIDP nicht vollständig verstanden ist [31, 37, 38, 45, 80]. Nach der Immunisierung kommt es bei der EAN zur Bildung autoreaktiver T-Lymphozyten, welche B-Lymphozyten zur Proliferation und zur Bildung von autoreaktiven Antikörpern anregen. Diese Autoantikörper könnten auch SC schädigen [80, 81]. Auch die Produktion von neuritogenen Antikörpern durch B-Zellen scheint den Verlauf der EAN zu beeinflussen. Die Hinzugabe von Serumimmunglobulinen zu neuritogenen CD4⁺-T-Lymphozyten führte zu einer verstärkten Demyelinisierung im Tiermodell, verglichen mit dem alleinigen adoptiven Transfer von CD4⁺-T-Lymphozyten, die Antikörper waren jedoch nicht Voraussetzung, um eine EAN auszulösen [70].

1.4.3.3. Makrophagen und dendritische Zellen

Dendritische Zellen stellen professionelle APC (*antigen-presenting cells*) des Immunsystems dar, welche zunächst als unreife Zellen in der Peripherie verweilen, Antigene prozessieren und präsentieren. Nach der Reifung erfolgt eine Wanderung in sekundäre lymphatische Organe zur

Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung [82, 83]. Damit könnten APC eine wichtige Rolle bei der Initiierung der autoimmunen peripheren Polyneuropathien spielen [45]. Eine erhöhte Anzahl von dendritischen Zellen im Liquor von Patienten mit peripheren Polyneuropathien könnte ein Hinweis auf eine zusätzliche Verstärkung des Entzündungsgeschehens durch weitere Rekrutierung von Immunzellen durch die dendritischen Zellen sein [83]. Die relevanten Effektorzellen des Nervenschadens der peripheren autoimmunen Polyneuropathien stellen die Makrophagen dar [45, 48]. Makrophagen lassen sich auch im entzündlichen Nerv bei einer EAN nachweisen [84]. Monozyten werden durch Zytokine von T-Lymphozyten zur Transformation zu Makrophagen angeregt und finden ihren Weg zum Entzündungsherd [82, 85]. Makrophagen können als professionelle APC sowohl selbst durch $CD4^+$ -T-Lymphozyten aktiviert werden als auch $CD8^+$ -T-Lymphozyten aktivieren und damit die zytotoxische Wirkung verstärken [82]. Zusätzlich können Makrophagen als Effektorzellen direkt durch Phagozytose und zytotoxisch wirkende reaktive Sauerstoffspezies das Myelin angreifen [85]. Hinzu kommen die komplement- oder antikörperabhängige direkte Schädigung des Myelins bzw. Axons [85].

1.4.3.4. Schwann-Zellen als antigenpräsentierende Zellen

SC sind unter bestimmten Bedingungen in der Lage, MHC-II-Moleküle zu exprimieren. Sowohl $IFN-\gamma$ als auch P_2 -spezifische T-Lymphozyten regen eine Präsentation von MHC-II an [86, 87]. Dies gelang auch für humane In-vitro-DRG-Kulturen mithilfe von $IFN-\gamma$ [88]. Untersuchungen von Nervenbiopsien konnten ebenso die MHC-II-Präsentation durch SC bei Patienten mit GBS wie auch bei CIDP-Patienten nachweisen [89, 90]. Bedingt sein könnte dies durch die Ausschüttung von $IFN-\gamma$ durch mononukleare Zellen im Entzündungsprozess, welche in das PNS eingewandert sind [86]. Durch $IFN-\gamma$ lässt sich *in vitro* die Präsentation von MHC-I steigern und MHC-II induzieren [91]. Hierrüber können SC sowohl $CD8^+$ - als auch $CD4^+$ -Lymphozyten aktivieren [9]. SC könnten somit an der Modulierung und Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses beteiligt sein [9]. Auch proinflammatorische Zytokine wie IL-17, welches im Plasma von GBS-Patienten erhöht ist, scheinen die Fähigkeit der SC als unprofessionelle APC zu fungieren zu verstärken [92]. Zudem konnten bei In-vitro-Versuchen auch zytotoxische Effekte von $CD4^+$ -T-Lymphozyten auf MHC-II-präsentierenden SC gezeigt werden, welche sich jedoch in anderen Versuchen nicht reproduzieren ließen [9, 93]. Damit stellt die SC sowohl eine mögliche Angriffsstruktur als auch einen Modulator des Entzündungsprozesses dar [91, 94].

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Sowohl der Einfluss zellulärer Komponenten als auch humoraler Faktoren wurde in bisherigen Studien als Teil des GBS-Pathomechanismus vermutet, wobei genau Abläufe bis heute nicht verstanden sind [45, 46]. Forschungsergebnisse haben immer wieder auf eine relevante Rolle von T-Lymphozyten bei der Entstehung autoimmuner peripherer Polyneuropathien hingewiesen. Ein

genaues Verständnis über die Abläufe dieses Vorgangs auf zellulärer Ebene besteht bisher nicht [45]. Zielsetzung dieser Arbeit ist es daher, ein Modell zur Studie der Interaktion zwischen T-Lymphozyten und Myelin in Echtzeit zu entwickeln, um hiermit weitere Aufschlüsse über die Rolle der T-Lymphozyten zu gewinnen. Hierbei soll zwischen $CD4^+$ -T-Lymphozyten und $CD8^+$ -T-Lymphozyten differenziert werden und überprüft werden, ob es zu einer Veränderung des Migrationsverhalten der T-Lymphozyten kommt, von dem auf einen Kontakt zwischen T-Lymphozyten und Myelin geschlossen werden kann. Hierbei wäre sowohl ein direkter Kontakt zwischen $CD8^+$ -T-Lymphozyten und Myelin denkbar, als auch ein direkter Kontakt zwischen $CD4^+$ -T-Lymphozyten und MHC-II der SC [9, 95]. Zusätzlich soll eine Schädigung des Myelins nach Kontakt mit neuritogenen T-Lymphozyten quantifiziert werden, um damit Rückschlüsse ziehen zu können, ob es sich um einen direkten Schädigungsprozess zwischen T-Lymphozyt und Myelin oder SC handelt.

2. Methoden

2.1. DGR-Kultur

2.1.1. Plattenbeschichtung

Für die Zellkultur wurden 24-*well*-Platten verwendet. Zur Plattenbeschichtung wurde mithilfe einer Injektionskanüle der Boden karoförmig eingeritzt und anschließend mit 15 µl folgender Kollagenmatrix beschichtet.

Kollagenmatrix: 142,8 µl Kollagen Typ I (5 mg/ml) + 857,2 µl Essigsäure (0,02 N)

Mithilfe der Rückseite einer Pasteur-Pipette aus Glas wurde die Beschichtung verteilt und die Platte zum Trocknen belassen. Dieser Schritt wurde wiederholt und die Platte nach Trocknung zur Zellkultur verwendet. Für die Verwendung von Glas als Matrixunterlage wurden Glasplättchen mit einem Durchmesser von 13 mm verwendet, welche in die einzelnen *wells* vor der Beschichtung eingesetzt und dann ebenfalls zweifach mit Kollagenmatrix unter der gleichen Anleitung beschichtet wurden [96].

2.1.2. DRG-Modell

Als In-vitro-Modell für den peripheren Nerv diente das DRG-Modell. Für das DRG-Modell wurden 16 Tage alte Embryonen (E16) verwendet. Die tragenden Ratten wurden über Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bezogen. Sie wurden durch eine inhalative Isofluranüberdosierung geopfert. Das verwendete Präparationsbesteck wurde vor jeder Anwendung in 75% Ethanol und anschließend in PBS gehalten. Die Lewis-Ratte wurde auf dem Rücken liegend zunächst oberflächlich von der Vorderseite mit 75% Ethanol desinfiziert. Mithilfe einer chirurgischen Pinzette und Schere wurde die Bauchhöhle der Lewis-Ratte eröffnet, die 16 Tage alten Embryonen aus der Gebärmutter isoliert und in eine mit Leibovitz Medium befüllte 94/16-mm-Petrischale überführt. Die Embryonen wurden von Plazenta und Fruchtblase befreit und in der Petrischale auf Eis gelagert. Nach Entfernung des Kopfes wurden die Embryonen auf dem Bauch liegend an den Extremitäten mithilfe von Insektennadeln fixiert. Unter einem Stereomikroskops wurde mithilfe zweier Pinzetten das Rückenmark durch Auftrennung der Haut freigelegt und entnommen. Dadurch wurde der Zugang zu den DRG frei. Die DRG wurden mithilfe einer Pinzette entnommen und in eine mit Leibovitz Medium gefüllte 35/10-mm-Petrischale überführt. Die Petrischale mit den entnommenen DRG wurde bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

2.1.3. Anlagen der DRG-Kultur

Sämtliche DRG wurden in einem 15-ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt und 10 min bei 4 Grad Celsius (°C) und $300 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die DRG in

Neurobasalmedium resuspendiert. Die DRG wurden auf einer beschichteten 24-*well*-Platte ausgesät. Je 200 µl des DRG-Neurobasalmediums wurde in jedes *well* überführt und nach Kontrolle unter dem Lichtmikroskop auf eine adäquate Anzahl von DRG auf 1 ml Medium aufgefüllt. Das Neurobasalmedium wurde wie folgt angesetzt und steril filtriert.

Neurobasalmedium: DMEM, Glutamin 2 mM, Pferdeserum 1%, Penicillin Streptomycin 50 µg/ml, Nervenwachstumsfaktor 100 µg/ml, Glukose 4 g/l

Das Auswachsen der Axone wurde 1 Woche bei 37 °C und 10% CO₂ im Brutschrank initiiert.

2.2. Myelinisierung der DRG-Kultur

Nach einer Woche der initiierten Axonauswachsung wurde die Myelinisierung der DRG-Kultur in Neurobasalmedium eingeleitet. Hierfür wurde Myelinisierungsmedium wie folgt angesetzt.

Myelinisierungsmedium: MEM Medium, Glutamin 2 mM, Pferdeserum 0,5%, Penicillin Streptomycin 50 µg/ml, Glukose 4 g/l, Nervenwachstumsfaktor 50 ng/ml, *pituitary extract bovine* 20 µg/ml, N2 *supplement* 1×

50 ml des Mediums wurden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und folgende Reagenzien direkt vor der weiteren Verwendung zugegeben:

Ascorbinsäure 50 mg/l, Forskolin 0,5 µM, Mannitol 20 µg/ml

Das Medium wurde nach Zugabe der Zusätze mithilfe einer 50-ml-Perfusorspritze und eines 0,45-µm-Sterilfilters steril filtriert und in einem 50-ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die Platten wurden dem Brutschrank entnommen, der Überstand des alten Mediums mithilfe einer Glas-Pasteur-Pipette und einer Pumpe abgenommen und je 1 ml des Myelinisierungsmediums in jedes *well* zugegeben. Zweimal pro Woche erfolgte ein Wechsel des Mediums. Hierfür wurde das Medium zunächst abgesaugt und 1 ml neu angesetztes Medium zugefügt. Danach wurden die Platten wieder im Brutschrank bei 37 °C und 10% CO₂ gelagert.

2.2.1. Myelinfärbung mit *Green-fatty acid*-Färbung

Zur Färbung des Myelins in lebender Kultur wurde *green fatty acid* (grüne Fettsäure, GFA) verwendet. Hierfür wurde zunächst Myelinisierungsmedium nach obiger Beschreibung angesetzt. Zu dem Myelinisierungsmedium wurde GFA im Verhältnis 1:1000 gegeben und nach Absaugung des alten Mediums 1 ml des GFA-Mediums zugegeben. Die Platten wurden 2 Tage bei 37 °C und 10% CO₂ im Brutschrank inkubiert [96].

2.2.2. Stimulation der MHC-Präsentation mit Interferon gamma

Das Medium wurde 24 h vor Versuchsbeginn abgenommen und Maus-Myelinisierungsmedium nach obiger Beschreibung angesetzt. Zu dem Medium wurde IFN- γ und GFA im Verhältnis 1:1000 gegeben und nach Absaugung des alten Mediums 1 ml mit IFN- γ und GFA versetztem Medium zugegeben. Die Platten wurden bei 37 °C und 10% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und jedes *well* zweifach mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend 1 ml Myelinisierungsmedium mit den entsprechenden T-Lymphozyten in Co-Kultur gebracht und entweder bei 37 °C und 10% CO₂ im Brutschrank inkubiert oder zur Migrationsbeurteilung in den Brutkasten des Mikroskops bei 10% CO₂ und 37 °C eingebracht.

2.3. T-Lymphozyten

2.3.1. Immunisierung mit P2

Zur Gewinnung neuritogener T-Lymphozyten wurde eine EAN in der Lewis-Ratte induziert [97]. Hierfür wurden weibliche Lewis-Ratten verwendet. Diese wurden über Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bezogen. Jede Ratte wurde mit 100 μ l Immunisierungsmedium, dessen Zusammensetzung **Tabelle 1** zu entnehmen ist, pro Hinterpfote immunisiert.

Reagenz	Pro Ratte	Endkonzentration
PBS	80 μ l	
P2 ₅₅₋₇₈ (5 mg/ml)	20 μ l	1 mg/ml
CFA (komplettes Freund-Adjuvans), Mtb-konzentration: 4 mg/ml	100 μ l	2 mg/ml

Tabelle 1: Immunisierungsmedium

In der Tabelle ist die Zusammensetzung des Immunisierungsmediums in μ l zur Induktion einer EAN aufgeführt. Hierbei gibt die zweite Spalte die Menge für ein Tier an und die dritte Spalte die Endkonzentration. Diese wurden gemischt und je 100 μ l pro Hinterpfote appliziert.

Hierfür wurden zunächst komplettes Freund-Adjuvans (*complete freund adjuvans*, CFA) mit *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) auf eine Konzentration von 4 mg/ml in einem Mikroreagenzgefäß eingestellt. Ebenso wurden P2₅₅₋₇₈ und phosphatgepufferte Salzlösung (*phosphate-buffered saline*, PBS) mithilfe einer Pipette in einem Mikroreagenzgefäß vermischt. Der Inhalt beider Gefäße wurde über eine Injektionsnadel jeweils in eine 5-ml-Spritze aufgezogen. Anschließend wurden die Nadeln entfernt, die Spritzen über einen Dreiwegehahn verbunden und über diesen die Inhalte beider Spritzen vermischt. Dieser Durchmischungsvorgang wurde so lange fortgesetzt, bis sich eine weißliche, pastöse Konsistenz gebildet hatte. Der Inhalt wurde nun auf eine 1-ml-Spritze aufgezogen und eine Injektionsnadel aufgesetzt. Die zu immunisierende Lewis-Ratte wurde unter Inhalationsnarkose mit Isofluran sediert und mit 100 µl des Immunisierungsmediums je Hinterpfote subkutan immunisiert. Nach Abklingen der Sedierung wurde die Lewis-Ratte wieder in den Käfig gesetzt und für 10 Tage bis zur Entwicklung einer EAN belassen.

2.3.2. Präparation von Milz und Lymphknoten zur T-Lymphozyten-Gewinnung

Zur Präparation der Milzzellen wurden nicht immunisierte Lewis-Ratten für die Gewinnung nicht neuritogener Lymphozyten verwendet. Diese wurden über Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bezogen. Die Versuchstiere wurden durch eine inhalative Isofluranüberdosierung geopfert. Zur Entnahme der Milz wurden die Ratten auf die rechte Seite gelegt und oberflächlich mit 75% Ethanol desinfiziert. Die Haut wurde mithilfe einer chirurgischen Pinzette und Schere auf der linken Seite unterhalb des Brustkorbes durchtrennt. Die Peritonealhöhle wurde eröffnet. Nach Abtrennung der ligamentären Verbindung zum Pankreas erfolgte die Entnahme der Milz. Die Milz wurde in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen mit 8 ml Medium (IMDM, FCS 5%, Glukose 1%, Penicillin-Streptomycin 1%, β-Mercaptoethanol 0,1%) überführt. Zur Gewinnung der neuritogenen Lymphozyten wurden die Lymphknoten der zuvor immunisierten Tiere gewonnen. Hierfür wurden die immunisierten Ratten 10 Tage nach der Immunisierung mittels einer inhalativen Isofluranüberdosierung geopfert. Die Ratten wurden auf den Rücken gelegt und die Hinterbeine oberflächlich mit 75% Ethanol desinfiziert. Die Oberschenkelinnenseite wurde mithilfe einer Schere eröffnet und der *Nervus ischiadicus* freipräpariert. Entlang des Nervenverlaufs wurden die Lymphknoten aufgesucht, entfernt und in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen mit 5 ml Medium überführt. Die Isolation der Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten wurde nach der Isolation beider Organe nach gleicher Methode fortgesetzt. Zur Zellisolation wurde ein 40-µm-Zellsieb in eine 94/16-mm-Petrischale gestellt, der Inhalt des Zentrifugenröhrchens mit Milz bzw. Lymphknoten in dieses entleert und mithilfe des Stempels einer 2-ml-Spritze durch das Zellsieb gerieben. Das Sieb wurde vor Entfernung mit Medium gespült. Danach wurde der Inhalt der Petrischale in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Petrischale wurde mit Medium mehrfach nachgespült und auch dieses Medium in dem Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die Zellsuspensionen wurden bis zur

weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Im Anschluss wurde das Zentrifugenröhrchen zentrifugiert (10 min, $300 \times g$, 6°C) und der Überstand abgesaugt. Die Milzzellen wurden in 2 ml Erylyse (83% NH_4CL -Puffer) resuspendiert und für 2 min bei Raumtemperatur belassen. Dann wurden 10 ml IMDM-Medium zugegeben, die Zellen resuspendiert und zentrifugiert (10 min, $300 \times g$, 6°C). Anschließend wurde die Zellzahl mithilfe einer Zählkammer bestimmt.

2.3.3. Zellzählung

Zur Zellzählung wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Mithilfe des Farbstoffs Trypanblau wurden die toten Zellen zur Differenzierung gegenüber den vitalen Zellen angefärbt [98]. Hierzu wurde eine 1:1-Färbung der Zellsuspension mit Trypanblau versetzt. $10 \mu\text{l}$ der Suspension wurden in die Zählkammer pipettiert und unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Vier große Quadranten bestehend aus 16 kleinen Quadranten wurden ausgezählt und die Anzahl der Zellen wie folgt berechnet: Die Anzahl der Zellen wurde geteilt durch die Anzahl der ausgezählten großen Quadranten und multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor und mit 10^4 . Es resultierte die Anzahl der vitalen Zellen pro ml.

$$[(4n/4) \times \text{Verdünnungsfaktor}] \times 10^4 = n \text{ vitale Zellen/ml}$$

2.3.4. Magnetische Zellseparation

Die magnetaktivierte Zellseparation (*magnetic activated cell sorting*, MACS) dient zur Trennung von Zellsubpopulationen mit unterschiedlichen Oberflächenmarkern. Hierbei werden Antikörper mit Magnetpartikeln (*micro beads*) gekoppelt und binden spezifisch an bestimmte Strukturen auf der Zelloberfläche. Beim Durchlaufen der magnetischen Säule werden die Zellen mit dem Zieloberflächenmarker, im Gegensatz zu den anderen Zellen, zurückgehalten. In einem zweiten Schritt werden die Säulen vom Magneten gelöst, und die Zielzellen können aus der Säule gewaschen werden [99]. Zur Isolation einer CD4^+ - bzw. CD8^+ -T-Lymphozyten-Population wurde die zuvor gewonnene Milzzellsuspension und Lymphknotenzellsuspension verwendet. Zur Herstellung des MACS-Puffers wurden die folgenden Reagenzien in Lösung gebracht und im Anschluss entgast und steril filtriert.

MACS Puffer: PBS, Albumin Fraktion V 0,5%, EDTA 5 mM

Die Zellen wurden in je $90 \mu\text{l}$ MACS-Puffer und $10 \mu\text{l}$ CD4^+ - oder CD8^+ -*micro beads* pro 10^7 Zellen resuspendiert und für 15 min geschützt vor Lichteinfluss im Kühlschrank inkubiert. Um die nicht gebundenen *beads* auszuwaschen, wurden die Zellen in 10 ml des MACS-Puffers resuspendiert und anschließend zentrifugiert (10 min, $300 \times g$, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in $500 \mu\text{l}$ MACS-Puffer pro 10^8 Zellen resuspendiert. Hierbei wurde auch bei einer geringeren

Zellzahl eine mindestmenge von 500 µl MACS-Puffer zur Resuspension verwendet. Die MACS-Säulen wurden an der Magnetbank befestigt und die Zellen je nach Zellzahl entsprechend den Herstellerangaben auf eine MS- oder LS-MACS-Säule aufgetragen. Die Säulen wurden dreimal gewaschen (MS-MACS-Säulen: 500 µl MACS-Puffer, LS-MACS-Säulen: 3 ml MACS-Puffer), um eine möglichst effektive Trennung von der Negativfraktion zu erreichen. Zur Elution der Positivfraktion wurden die Säulen aus der Magnetvorrichtung entnommen, mit Puffer beladen (MS-MACS-Säulen: 2 ml MACS-Puffer, LS-MACS-Säulen: 5 ml MACS-Puffer) und mithilfe des beigelegten Stempels in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen mit 5 ml Medium (IMDM, FCS 5%, Glukose 1%, Penicillin-Streptomycin 1%, β-Mercaptoethanol 0,1%) überführt. Anschließend wurde die Positivfraktion zentrifugiert (10 min, 300 × g, 4 °C), der Überstand abgenommen und die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert und mithilfe einer Zählkammer wie oben beschrieben gezählt.

2.3.5. Färbung der T-Lymphozyten mit *orange cell tracker*

Die Anwendung des *orange cell tracker* erfolgte gemäß der Herstellerempfehlung. Der *orange cell tracker* wurde auf eine Konzentration von 10 mM verdünnt. Dafür wurde 1 mg *orange cell tracker* in 180 µl DMSO gelöst. Serum freies IMDM-Medium wurde im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die zu färbenden Zellen wurden zentrifugiert (10 min, 300 × g, 6 °C). Die zentrifugierten Zellen wurden vom Überstand befreit und in serumfreiem IMDM-Medium resuspendiert. Den resuspendierten Zellen wurde der *orange cell tracker* in einer Endkonzentration von 5 µM zugegeben und resuspendiert. Die Zellen wurden für 45 min bei 37 °C im Wasserbad aufbewahrt. Zur gleichen Zeit wurde Medium (IMDM, FCS 5%, Glukose 1%, Penicillin-Streptomycin 1%, β-Mercaptoethanol 0,1%) im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Nach 45 Minuten wurden die Zellen mit 10 ml dieses vorgewärmtem Medium resuspendiert und zentrifugiert (10 min, 300 × g, 20 °C). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, Medium zugeben, resuspendiert und 4 h im Brutschrank bei 37 °C und 10% CO₂ mit aufliegendem Deckel inkubiert. Danach wurde das Zentrifugenröhrchen mit vorgewärmtem Medium aufgefüllt und die Zellen resuspendiert. Die Zellen wurden zentrifugiert (10 min, 300 × g, 20 °C) und der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden in Medium resuspendiert und mit Hilfe einer Zählkammer und Trypanblau wie oben beschrieben ausgezählt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (10 min, 300 × g, 20 °C) und in der Konzentration 2 Mio. Zellen pro 100 µl Myelinisierungsmedium resuspendiert und vor weiterer Verwendung auf Eis gelagert. Bei der Färbung war durchschnittlich mit 20% Zellverlust zu rechnen.

2.3.6. Färbung der T-Lymphozyten mit CFSE-Färbung

Die Färbung mit CFSE erfolgte gemäß Herstellerempfehlung. Die Zellen wurden in PBS in einer Konzentration von 10 Mio. Zellen pro ml in einem Zentrifugenröhrchen gelöst, dann erfolgte die Zugabe von CFSE in einer Konzentration von 5 µM. Die Zellsuspension wurde vorsichtig

durchmischt. Die Zellsuspension wurde bei geöffnetem Zentrifugenröhrchendeckel für 20 min in einem Brutschrank bei 10% CO₂ und 37 °C belassen; in diesem Zeitraum wurde die Suspension alle 5 min durch leichtes Schwenken gemischt. Nach der Inkubationszeit wurde das Zentrifugenröhrchen mit Medium (RPMI-1640, FCS 10%) aufgefüllt und anschließend zentrifugiert (10 min, 300 × g, 6 °C). Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in Medium (RPMI-1640, FCS 10%) resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 min, 300 × g, 6 °C). Dieser Schritt wurde wiederholt und die Zellen in der Konzentration 2 Mio. Zellen pro 100 µl Myelinisierungsmedium resuspendiert und vor weiterer Verwendung auf Eis gelagert.

2.3.7. Durchflusszytometrie der T-Lymphozyten

Um die Reinheit der CD4⁺- bzw. CD8⁺-Zellpopulation zu überprüfen, wurde *fluorescence-activated cell scanning* (FACS) verwendet. Beim FACS, einer Unterform der Durchflusszytometrie, werden Zellen aufgrund ihrer Fluoreszenzfärbung unterschieden. Die Zellen werden hierbei zunächst mit einem spezifischen Fluorochrom-konjugierten Oberflächenmerkmal Antikörpern angefärbt. Zur Messung wird die Probe von einer Kanüle angesaugt. Die Zellen werden hydrodynamisch fokussiert, so dass sie einzeln durch den Laserstrahl fliegen. Hat die Zelle den entsprechenden fluorochromkonjugierten Antikörper gebunden, emittiert sie Fluoreszenz, welche das Gerät misst und anschließend graphisch darstellt [100]. Zur Überprüfung des Erfolgs der magnetischen Zellseparation für CD4⁺-T-Lymphozyten und CD8⁺-T-Lymphozyten wurden probeweise die Positivfraktion der magnetischen Zellseparation durchflusszytometrisch überprüft. Hierfür wurden je 10⁶ Zellen in 1 ml FACS-Puffer (2% BSA in PBS) gelöst und zentrifugiert (10 min, 300 × g, 4 °C). Der Überstand wurde abgekippt und die Zellen mit je 25 µl FACS-Puffer sowie 0,5 µl konjugiertem Antikörper resuspendiert. Die Proben wurden für 15 min geschützt vor Lichteinfluss auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 2 ml FACS-Puffer zugeben und die Proben nach Resuspension erneut zentrifugiert (10 min, 300 × g, 4 °C). Nach Abkippen des Überstandes wurden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer gelöst und zur FACS-Analyse verwendet. Hierfür wurde zur Analyse nach Zytometrie FACSDiva 8.0 and FlowJo 10.0 verwendet.

2.3.8. Videoaufnahme der Lymphozyten-DRG-Co-Kultur

Zur Erstellung der Videos wurden die DRG-Kulturen und die gefärbten Zellen gemeinsam in Kultur gebracht. In einem abgeschlossenen System wurden 10% CO₂ und 37 °C konstant überwacht und gehalten. Bilder wurden alle 4 min aufgenommen.

2.4. Myelinquantifizierung

2.4.1. Plattenfixierung nach DRG-T-Lymphozyten-Co-Kultur

Zur Fixierung der Kultur wurde zunächst das Medium mithilfe einer Pasteurpipette und einer Pumpe abgesaugt und jedes *well* anschließend zweifach mit 1 ml PBS gewaschen. Zur eigentlichen Fixierung wurde PFA (4%) verwendet. Pro *well* wurde 1 ml PFA für 1 h belassen, abgesaugt und wiederum zweifach mit 1 ml PBS gewaschen. Zur Lagerung wurde jedes *well* mit 1 ml PBS bedeckt und die Platten bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

2.4.2. Myelinfärbung mit *Sudan-Black-B*-Färbung

Myelin des PNS besteht zu einem hohen Anteil aus Lipiden [101]. Osmiumtetroxid oxidiert ungesättigten Doppelbindungen der Lipide. Das reduzierte Osmiumtetroxid lagert sich am Reaktionsort als *osmium black* ab und fixiert [102]. *Sudan Black B* ist ein Lipidfärbemittel und methodisch für das Anfärben des Myelins des PNS etabliert [103, 104]. Zur Darstellung von Myelin in der fixierten Kultur wurde die *Sudan-Black-B*-Färbung mit Osmiumtetroxid verwendet. Die Kulturen wurden entsprechend der obigen Beschreibung fixiert. Die nachfolgenden Schritte wurden unter einem Abzug durchgeführt. 200 µl Osmium (0,1%) wurde pro *well* zugegeben, so dass jedes *well* vollständig mit der Osmiumlösung bedeckt war und für eine Stunde belassen und danach abgenommen wurde. In der Zwischenzeit wurde eine absteigende Alkoholreihe mit Ethanol und sterilem Wasser angesetzt. Anschließend wurde je 1 ml der Alkoholreihe bestehend aus 25% Ethanol, 50% Ethanol und 75% Ethanol in aufsteigender Reihenfolge für 5 min auf jedes *well* gegeben und abgesaugt. Währenddessen wurde eine *Sudan-Black-B*-Lösung (0,5%) hergestellt. Hierfür wurden 50 mg *Sudan Black B* in 10 ml 75% Ethanol gelöst und durch einen 0,45 µm Spritzenfilter steril filtriert. Nach Absaugen des Ethanols wurden pro *well* 500 µl der *Sudan Black B* Lösung zugegeben, so dass jedes *well* bedeckt war. Die *Sudan Black B* Lösung wurde 1h belassen. Danach wurde zur Entfärbung eine absteigende Alkoholreihe bestehend aus 75% Ethanol, 50% Ethanol und 25% Ethanol verwendet und davon je 1 ml für 1 min in dem *well* belassen und wiederum abgesaugt. Zur weiteren Aufbewahrung wurden alle *wells* abgesaugt, mit 1 ml PBS befüllt, mit Parafilm luftdicht verschlossen und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

2.5. Migrationsauswertung

Zur Migrationsauswertung wurde das ibidi-manual-Tracking-Programm genutzt und anhand des Startbildes zufällig Zellen zur Migrationsauswertung gewählt. Die Verfolgung der Zellen erfolgte hierbei rein manuell. Betrachtet wurde die Direktionalität (Abstand zwischen Start- und Endpunkt/zurückgelegte Strecke) und die Geschwindigkeit (Strecke/Zeit).

2.6. Zellkontaktauswertung

Die Auswertung der Zellkontakte erfolgte manuell an allen im Bildausschnitt befindliche Zellen. Zur Auswertung des prozentualen Anteils des Zellkontakts wurde Image J verwendet.

2.7. Datenanalyse

Zur Datenanalyse wurde GraphPadPrism 5.0 verwendet. Zur Untersuchung einer Signifikanz diente der t-Test. Unterschiede wurden ab einem p-Wert $<0,05$ als signifikant gewertet.

3. Materialien

3.1. Geräte

Absaugpumpe	Haep Labor Consult	Bovenden
Autoklav	Fritz Gössner	Hamburg
Brutschrank	Heraeus	Hanau
CO ₂	Linde	München
CO ₂ -Inkubator (Cell Heraeus)	Thermo Scientific	Osterode
Durchflusszytometer, FACS CantoII System 8-color BD	Biosciences	Heidelberg
FACSCanto II flow Zytometer	BD Biosciences	Heidelberg
FACSDiva 8.0	BD Biosciences	Heidelberg
Feinwaage Mettler AE 163	Mettler Toledo	Gießen
FlowJo 10.0	LCC	Oregon, USA
Fluorescence microscope (Leica Dmi8 Inverted Microscope)		
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr	Biberach an der Riss
GraphPadPrism 5.0	GraphPad Software	La Jolla, US
Image J	NIH	Bethesda, USA
Konfokalmikroskop LSM 510	Zeiss	Wetzlar
Mikroskop Axioplan 2	Zeiss	Wetzlar
Stereomikroskop, Leica M80	Leica Microsystems	Wetzlar
Sterilbank (HERA Safe)	Thermo Scientific	Osterode
Vortexer	Sartorius Stedim Biotech	Darmstadt
Waage (KB 1600-2)	Kern & Sohn	Balingen
Wasserbad (W 350) zen 2.1	Memmert	Schwabach
Zentrifuge, Rotana 46 RC	Zeiss	Wetzlar
	Hettich	Tutlingen

3.2. Chemikalien

Albumin Fraktion V	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Ammoniumchlorid	Merk	Darmstadt
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Bovine Pituitary Extract (BPE)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
CD4 ⁺ APC-Färbung FACS	Biolegend	San Diego, USA
CD4 ⁺ Micro Beads, rat	Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladbach
CD8 ⁺ Micro Beads, rat	Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladbach

CD8⁺ PE-Färbung FACS
 CellTracker Orange
 CFA
 CFSE-Färbung

 DMSO
 Dulbecco's Modified Eagle Medium,
 pyruvate (DMEM)
 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
 (DPBS-), no calcium, no magnesium
 Essigsäure 100%
 Ethanol 99,8%
 foetales Kälbs serum (fetal calf serum, FCS)
 Forskolin (FSK)
 GFA, BODIPY® FL, C16

 Glukose
 Glutamin

 Glutamin (L-Glutamine [200 mM])

 IFA
 IMDM Medium

 IMDM Medium, Serum frei

 Interferon γ , Ratte
 Isofluran

 Leibovitz's L-15 medium

 Lewis-Ratten

 Mannitol
 Minimum Essential Medium (MEM)

 N2-Supplement (100X)

 Nervenwachstumsfaktor, Ratte
 Neurobasal medium Thermo

 Osmium tetroxide Lösung (4%)
 P2 55-78
 Penicillin-Streptomycin (5000 U/ml)

 PFA
 Pferdeserum

 Kollagen

Biolegend	San Diego, USA
invitrogen	Carlsbad, USA
BD	Heidelberg
Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Carl Roth	Karlsruhe
Carl Roth	Karlsruhe
PAA-Laboratories	Pasching
Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Merck	Darmstadt
Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
BD	Heidelberg
Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Sigma Aldrich	St. Louis, USA
AbbVie	North Chicago, USA
Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Janvier Labs	Le Genest-Saint-Isle
Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Sigma Aldrich	St. Louis, USA
JPT Peptides	Berlin
Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
R&D Systems	Minneapolis, USA

RPMI+ Medium	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
<i>Sudan Black B</i>	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Tris-HCl 1M UltraPure™, pH 8.0	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Trypanblau Lösung 0,4%	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Trypsin-Inhibitor	Worthington Biochemical Corporation	Lakewood, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA

3.3. Material

24-well Nunc™ Cell Culture Multidish	Thermo Fisher Scientific	Waltham
chirurgische Schere – 12 cm	Fine Science Tools	Heidelberg
Deckgläschen (13 mm Durchmesser)	Thermo Fisher Scientific	Langenselbold
Discofix C Dreiwegehahn blau	B. Braun	Melsungen
Einmalspritzen (1, 2, 5, 10, 20 ml)	B. Braun	Melsungen
Einmalspritzen 1 ml	B. Braun	Melsungen
Einmalspritzen 5 ml	B. Braun	Melsungen
FACS-Röhrchen (75×12 mm)	BD Falcon	Heidelberg
Falcon 15 ml konische Zentrifugenröhrchen	Thermo Fisher Scientific	Waltham
Falcon 50 ml konische Zentrifugenröhrchen	Thermo Fisher Scientific	Waltham
Filterpipettenspitzen, 10 µl, steril	StarLab	Ahrensburg
Filterpipettenspitzen, 100 µl, steril	StarLab	Ahrensburg
Filterpipettenspitzen, 1000 µl, steril	StarLab	Ahrensburg
Filterpipettenspitzen, 20 µl, steril	StarLab	Ahrensburg
Filterpipettenspitzen, 200 µl, steril	StarLab	Ahrensburg
Insektennadel, Größe 3 rostfrei	Biologiebedarf Thorns	Deggendorf
LS-MACS-Säulen	Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladbach
MACS Multi Stand	Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladbach
Minisart™ NML Syringe Filters, Pore Size 0.45 µM	Fisher Scientific	Waltham
MS-MACS-Säulen	Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladbach
Parafilm	Carl Roth	Karlsruhe
Pasteurpipetten, Natron-Kalk-Glas	Brand	Wertheim
Perfusorspritzen (50 ml)	B. Braun	Melsungen
Petrischale 35/10 mm	Greiner Bio-One	Solingen
Petrischale 94/16 mm	Greiner Bio-One	Solingen
Pinzette, extra fein, No5	Oehmen Labortechnik	Essen

Pipette 0,1–2,5 µl, Research® plus
 Pipette 0,5–10 µl, Research® plus
 Pipette 100–1,000 µl, Research® plus
 Pipette 20–200 µl, Research® plus
 Pipette 2–20 µl, Research® plus
 Pipettierhilfe (IBS Pipetboy acu)
 Quatro MACS Starting Kit

Reagiergefäße 0,5 ml, safe seal
 Reagiergefäße 1,5 ml, safe seal
 Standard Pattern Forceps
 Sterican Kanülen 30 G 0,3×12 mm
 Sterican® Gr. 1, G 20 × 1 1/2" / ø 0,90 x 40 mm, gelb "
 Sterican® Gr. 17, G 24 × 1"/ ø 0,55 × 25 mm, lila
 Stripette, 10 ml
 Stripette, 25 ml
 Stripette, 5 ml
 Zählkammer Neubauer
 Zellsieb (Nylon, 40 µM)

Eppendorf	Hamburg
VWR International	Darmstadt
Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladbach
Sarstedt	Nümbrecht
Sarstedt	Nümbrecht
Fine Science Tools	Heidelberg
B. Braun	Melsungen
B. Braun	Melsungen
B. Braun	Melsungen
Corning	Kaiserslautern
Corning	Kaiserslautern
Corning	Kaiserslautern
Brand	Wertheim
BD Falcon	Heidelberg

Aktenzeichen des LANUV: 8.87-50.10.37.09.275

4. Ergebnisse

4.1. Etablierung eines neuen In-vitro-Modells

Mit einer Kombination verschiedener etablierter Methoden gelang es, ein neues In-vitro-Modell des PNS zur Beurteilung der Interaktion zwischen Myelin und T-Lymphozyten im Rahmen autoimmuner Polyneuropathien zu etablieren. Die angezüchteten DRG-Kulturen wurden mittels GFA zur Sichtbarmachung des Myelins gefärbt. Die Ratten wurden mit P2₅₅₋₇₈ immunisiert und entwickelten eine EAN. Die neuritogenen T-Lymphozyten wurden aus den Lymphknoten der Tiere isoliert. Die neuritogenen T-Lymphozyten wurden mittels *orange cell tracker* angefärbt und in die DRG-Kultur eingebracht. Die Färbungen von Myelin und T-Lymphozyten ermöglichte *live imaging* der Co-Kultur. Hierbei wurde die Migration der T-Lymphozyten und der T-Lymphozyten Myelinkontakt ausgewertet. Der Grad der Demyelinisierung durch die Co-Kultur mit den neuritogenen T-Lymphozyten wurde mittels *Sudan-Black-B*-Färbung ausgewertet. In **Abb. 3** ist der beschriebene Versuchsaufbau des Modells skizziert.

Aufbau des Experiments

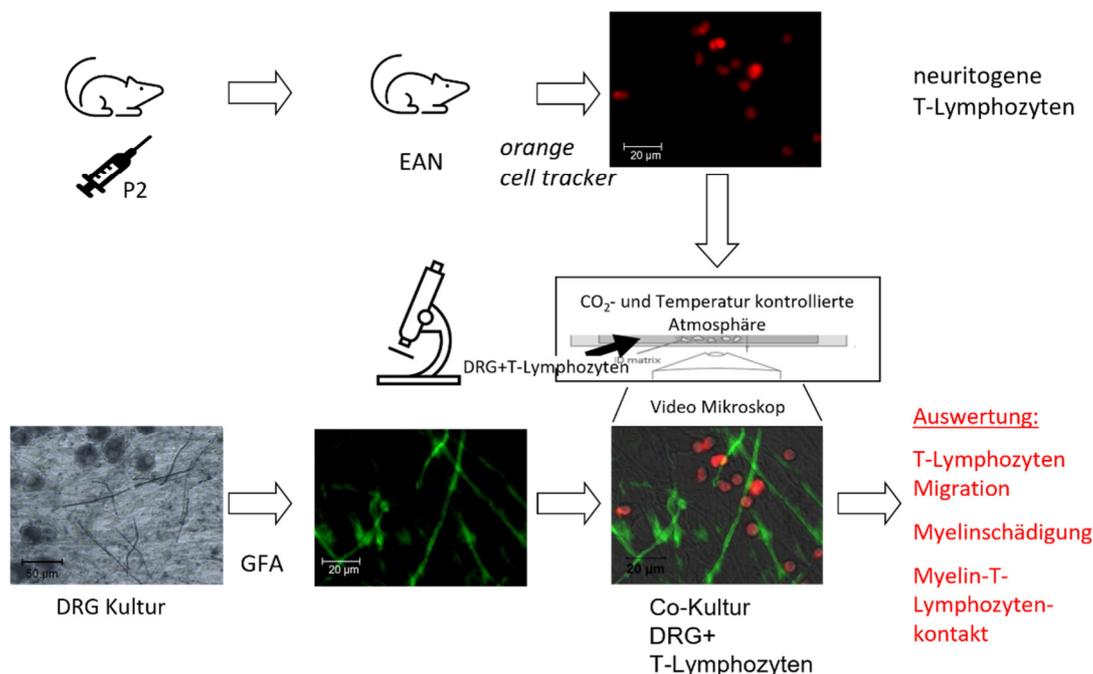


Abb. 3: Übersicht des Experimentaufbaus

Die Abb. gibt einen Überblick über den gesamten Versuchsaufbau des Modells. Die Ratten wurden mit P2₅₅₋₇₈ immunisiert und entwickelten eine EAN. Aus den immunisierten Ratten wurden die T-Lymphozyten entnommen und mittels *orange cell tracker* gefärbt. Die DRG-Kulturen wurden nach der Myelinisierung über 23 Tage mit GFA. DRG-Kultur und die T-Lymphozyten wurden in Co-Kultur gebracht. Mit einer CO₂- und Temperatur-kontrollierten Kammer war eine weitere Überwachung mit dem Mikroskop mittels *live imaging* möglich. Im Anschluss konnten die Aufnahmen auf die T-Lymphozyten-Migration und die Kontakte zwischen T-Lymphozyten und Myelin analysiert werden. Zudem konnte mit einer anschließenden *Sudan-Black-B*-Färbung das Ausmaß der Myelinschädigung nach 3 Tagen Co-Kultur beurteilt werden.

4.2. Myelin

Zur Untersuchung der Interaktion von T-Lymphozyten und Myelin wurde das DRG-Modell als ein etabliertes und zuverlässiges In-vitro-Modell für die Myelinisierung des PNS verwendet [96]. Die ausreichende Myelinisierung in der DRG-Kultur wurde durch zwei verschiedene Methoden überprüft. Einerseits durch die *Sudan-Black-B*-Färbung [96], in welcher sich das Myelin schwarz darstellt, und andererseits mithilfe der GFA-Färbung, in welcher sich Myelin grün darstellt [96, 103]. Beide Färbungen zeigten übereinstimmend eine ausgeprägte Myelinisierung der Kultur. Bezüglich der notwendigen Zeit bis zu Entstehung einer ausreichenden Myelinisierung testeten wir verschiedene Inkubationszeiten und wählten schließlich 23 Tage, da zu dem Zeitpunkt eine gut ausgeprägte Myelinisierung zur weiteren Untersuchung in einem Großteil der einzelnen DRG

stattgefunden hatte. In **Abb. 4** ist die myelinisierte DRG-Kultur nach Färbung mit *Sudan Black B* dargestellt. Mit dem Modell ergab sich ein zuverlässig In-vitro-Myelinisierungsmodell des PNS [96].

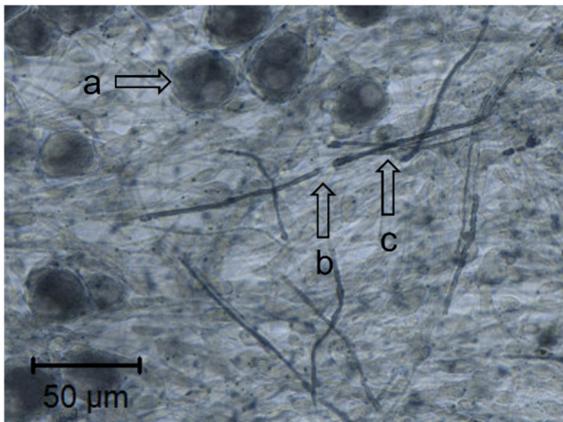


Abb. 4: DRG, *Sudan-Black-B*-Färbung

Die Abb. zeigt die DRG-Kultur nach 23 Tagen Myelinisierung nach *Sudan-Black-B*-Färbung. Es zeigen sich zentral gelegene Neurone mit den ausgewachsenen Axonen und dem schwarz gefärbten Myelin, a: Neuron, b: Nodium, c: Internodium, Vergrößerung gemäß Maßstab

Um die Interaktion zwischen T-Lymphozyten und Myelin in Echtzeit bewerten zu können, war eine In-vitro-Myelinfärbung notwendig. Die GFA-Färbung zeigte in der DRG-Kultur eine zuverlässige Anfärbung des Myelins. Für das *life imaging* musste zudem eine ausreichende Beständigkeit der Myelinfärbung bei intermittierender Belichtung gewährleistet sein. Hierfür untersuchten wir im Rahmen der Vorversuche die DRG-Kulturen nach GFA-Färbung auf ihre Beständigkeit bei Bildaufnahmen über die Zeit. Hierbei zeigte sich ein Ausbleichen der Färbung abhängig vom Überwachungszeitraum und der Bildfrequenz. Umso länger die Überwachungszeit und umso höher die Bildfrequenz, desto stärker war der Ausbleicheffekt. So zeigt sich in **Abb. 5** ein vollständiges Ausbleichen der GFA-Färbung im Belichtungsbereich bei einer mehrstündigen Bildaufnahme.

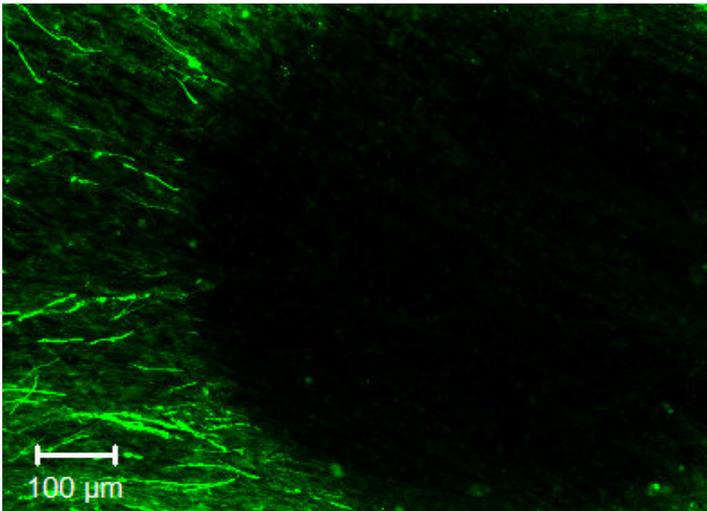


Abb. 5: GFA-Färbung, nach 13 h Belichtung alle 4 min

Die Abb. zeigt eine Aufnahme der DRG-Kultur nach 23 Tagen Myelinisierung. Die DRG-Kultur wurde 48 h mit GFA inkubiert. Zur Bildaufnahme erfolgte eine 13-h-Belichtung, mit Aufnahmen alle 4 min mit einer Expositionszeit von 500 ms mit einem 40er Objektiv. Die Aufnahme ist mit einem 10er Objektiv nach der Durchführung des Experiments erfolgt. Es zeigt sich eine rundliche, abgeblasste Stelle im Bereich der Belichtung. Im nicht belichteten Bereich zeigt sich eine weiterhin gut erhaltene GFA-Färbung, Vergrößerung gemäß Skala

Da wir von einer frühen Interaktion zwischen T-Lymphozyten und Myelin ausgingen, ergab sich zunächst eher eine Notwendigkeit einer dichteren Bildfrequenz bei einem Verzicht auf einen längeren Überwachungszeitraum. In der Zeit zwischen den einzelnen Aufnahmen musste ausreichend Zeit sein, um alle *wells* abzulichten, zudem musste der Bildabstand eine Verfolgung der einzelnen T-Lymphozyten ermöglichen. Auch in Zusammenhang mit den Vorversuchen der T-Lymphozyten ergab sich eine Bildfrequenz von einer Aufnahme alle 4 Minuten mit einem Überwachungszeitraum von 120 Minuten. Problematisch zeigte sich in den Vorversuchen ein Verlust der Fokusebene der DRG-Kultur über die Zeit. **Abb. 6** zeigt über die Zeit die zunehmend unscharf abgebildete DRG-Kultur nach GFA-Färbung. Im Rahmen einer Versuchsreihe ergab sich als Ursache die Temperaturveränderung bei nicht vorgewärmtem Objektträger und Mikroskopkammer als Ursache.

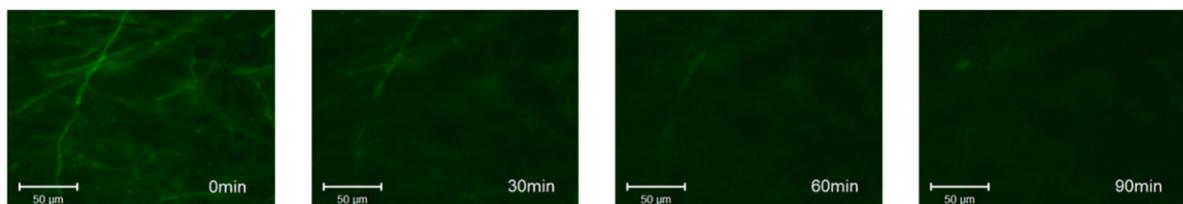


Abb. 6: DRG-Kultur mit GFA-Färbung: Verlust der Fokusebene

Die Abb. zeigt die DRG Kultur nach 23 Tagen Myelinisierung und GFA-Färbung über einen 90-min-Überwachungszeitraum mit einer Bildaufnahme alle 4 min. Es zeigt sich ein Verlust der Fokusebene bereits nach 30 min, der Effekt nimmt über die Zeit weiter zu. Die Fehlersuche ergab die Ausdehnungsänderung durch die Temperaturveränderung in der beheizten Mikroskopkammer als Ursache. Vergrößerung gemäß Skala

In **Abb. 7** zeigt sich, dass nach einer vorangehenden Temperaturanpassung des Mikroskopbrutkastens mit einer Aufwärmzeit von eine Stunde der Effekt ausgeglichen werden konnte. Unter diesen Bedingungen zeigte sich die GFA-Färbung des Myelins ausreichend stabil. In **Abb. 7** ist die GFA-Färbung über 210 min ohne weitere Bildoptimierung trotz des leichten Ausbleichens abgebildet.

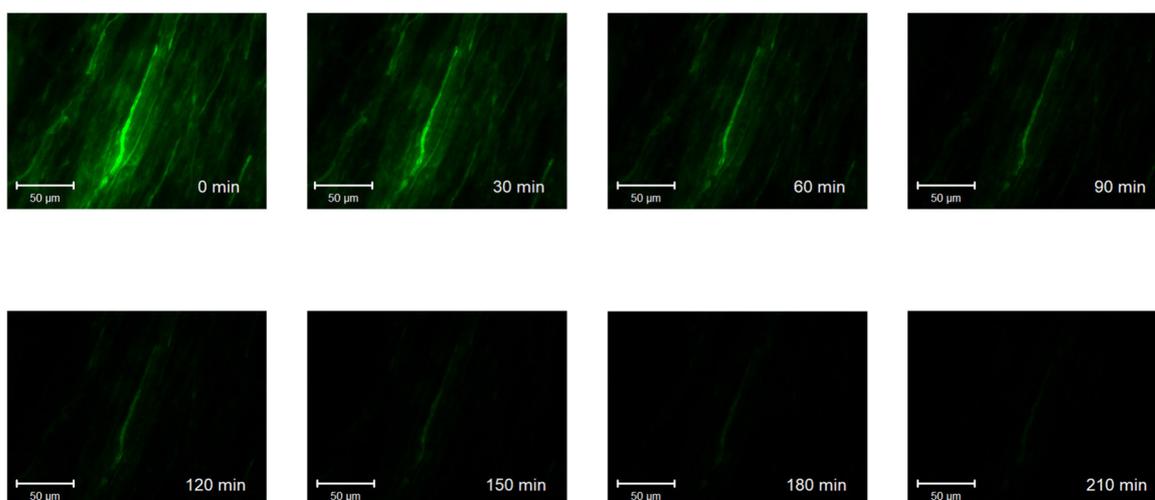


Abb. 7: DRG-Kultur: GFA-Färbung

Die DRG Kultur wurde nach 23 Tagen Myelinisierung für 2 Tage mit GFA inkubiert. Die Abb. zeigen die DRG-Kultur nach der GFA-Färbung im Verlauf des *live imaging*. Die Belichtung erfolgte alle 4 min. Die Abb. zeigen den Verlauf der ersten 210 min ohne weitere Bildoptimierung. Es zeigt sich ein zunehmendes Ausbleichen der GFA-Färbung über der Zeit unter der Belichtung. Für die ersten 120 min zeigt sich die Färbung jedoch ausreichend stabil. Vergrößerung gemäß Skala

4.3. T-Lymphozyten

4.3.1. Immunisierung

Die durchgeführte Immunisierung erfolgte mit P2₅₅₋₇₈ Peptid, einem Peptid des peripheren Myelins [105]. Zehn Tage nach der Immunisierung zeigte sich eine klinische Veränderung der Ratten entsprechend einer Verschlechterung der Motorik mit Nachziehen der Beine. Somit entwickelten die Versuchstiere durch die Immunisierung mittels P2₅₅₋₇₈ erfolgreich eine klinische EAN. Dies wurde als Hinweis auf eine ausreichende Immunisierung und der Bildung von P2-spezifischen, neuritogenen T-Lymphozyten gewertet.

4.3.2. T-Zell-Gewinnung

Für die Gruppe der neuritogenen T-Lymphozyten konnte nach der Immunisierung mit P2₅₅₋₇₈ Peptid eine ausreichende Menge an Zellen aus dem Lymphknoten der Lewis-Ratten gewonnen werden. Im Gegensatz dazu erbrachte die Isolierung der T-Lymphozyten aus den Lymphknoten des nicht immunisierten, gesunden Tieres keine ausreichende Menge an Zellen. Es erfolgte daher die Isolierung von Lymphozyten aus der Milz gesunder Versuchstiere. Hier konnte eine ausreichende Menge an T-Lymphozyten isoliert werden.

4.3.3. Färbung T-Lymphozyten

4.3.3.1. CFSE-Färbung

Um die Interaktion zwischen Myelin und T-Lymphozyten darstellen zu können, war eine stabile Färbung der T-Lymphozyten notwendig. Zudem musste der Farbstoff sich gut gegenüber der Myelin-Färbung differenzieren lassen. Die ersten T-Lymphozyten-Färbungen erfolgten mit der CFSE-Färbung, welche sich grün darstellt. **Abb. 8** zeigt die angefärbten T-Lymphozyten. Hiermit konnte eine über einen mehrstündigen Überwachungszeitraum stabile Färbung erreicht werden. Da sich für die Myelinfärbung im Rahmen der Vorversuche die *Green-fatty-acid*-Färbung durchsetzte, war der initial verwendete grüne Farbstoff für die T-Lymphozyten nicht gut von der Myelinfärbung differenzierbar und konnte daher für den Einsatz in der Co-Kultur nicht verwendet werden.

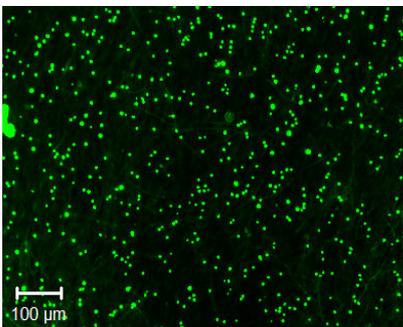


Abb. 8: T-Lymphozyten mit CFSE

Die Abb. zeigt T-Lymphozyten mit der CFSE-Färbung, entsprechend der in 2.3.6 beschriebenen Anwendung. Die CFSE-Färbung zeigte eine gute Anfärbung der Zellen und Stabilität über den Überwachungszeitraum. Jedoch war sie nicht farblich von der GFA-Färbung des Myelins abgrenzbar. Vergrößerung gemäß Skala

4.3.3.2. *Orange-cell-tracker-Färbung*

Um eine Zellfärbung zu finden, welche sich gut vom grün gefärbten Myelin unterscheiden lässt, führten wir an T-Lymphozyten eine Testreihe für den *orange cell tracker* durch. Über die Beobachtungszeit zeigte sich hierbei initial ein Verlust des Farbstoffes in das Kulturmedium bei längerer Beobachtungszeit, wie **Abb. 9** zeigt.

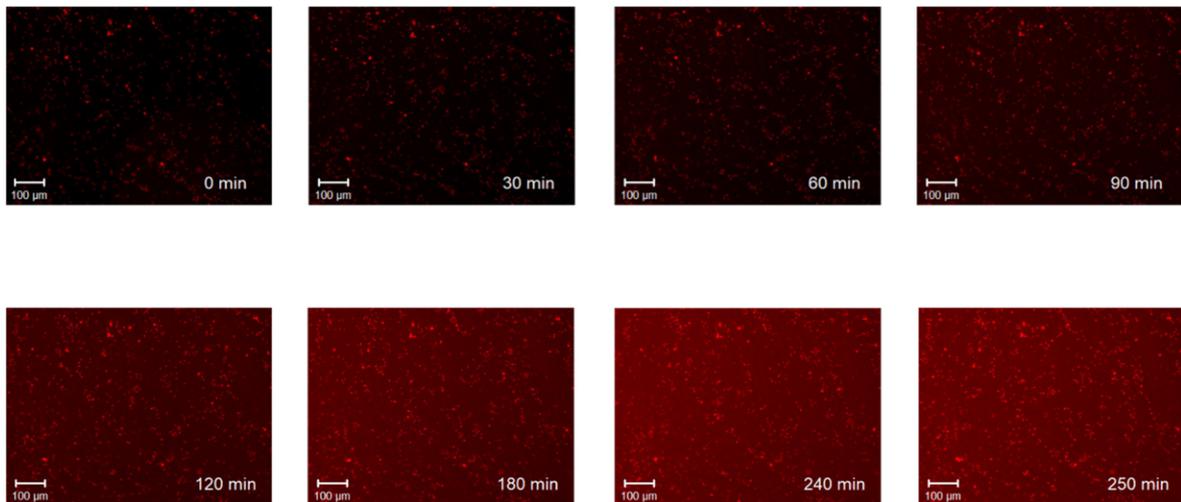


Abb. 9: Vorversuch T-Lymphozyten: orange cell tracker

Die Abb. zeigen die Vorversuche mit dem *orange cell tracker*. Die T-Lymphozyten wurde 15 min mit dem *orange cell tracker* inkubiert. Die Abb. zeigen die Mikroskopaufnahmen der ersten 250 min mit einer Belichtung alle 4 min. Es zeigt sich neben einem leichten Abblässen der Zellfärbung eine zunehmende Anfärbung des Mediums über die Zeit. Vergrößerung gemäß Skala

Um das Einfärben des Mediums durch den Farbstoff zu vermeiden, erfolgte eine Verlängerung der Inkubationszeit mit dem *orange cell tracker* im Rahmen des Zeitfensters der Herstellerempfehlung auf 45 min und ein erneuter Mediumwechsel vor Versuchsbeginn. Wie die **Abb. 10** zeigt, unterlag der *orange cell tracker* durch die Belichtung trotz hoher Bildfrequenz nur geringer Ausbleichung, im Gegensatz zur GFA-Färbung des Myelins. Um die Migration der T-Lymphozyten beurteilen zu können, durfte der zeitliche Abstand zwischen den Bildern nicht zu groß gewählt sein. Zudem war die Zeit eines Durchlaufs des Mikroskops über alle *wells* ein limitierender Faktor für die Bildabstandszeit. In den Vorversuchen ergaben sich 4 Minuten als ausreichende Zeit, um eine klare Zuordnung der Zellen im Folgebild zu sichern und zugleich den Ausbleichungseffekt durch die Belichtung so gering wie möglich zu gestalten.

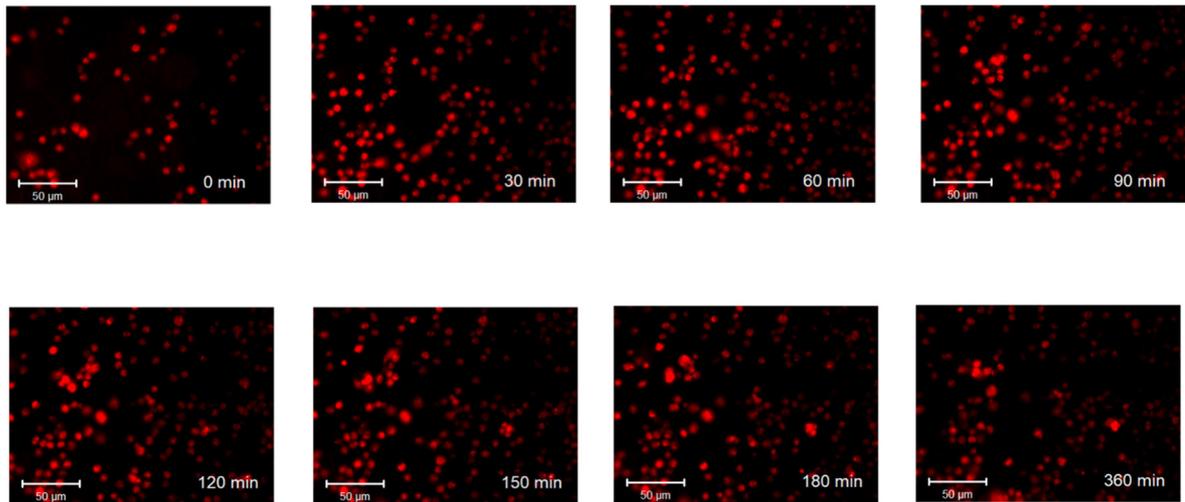


Abb. 10: T-Lymphozyten mit *Orange-cell-tracker*-Färbung

Die Abb. zeigen die T-Lymphozyten nach Färbung mit dem *orange cell tracker* mit 45 min Inkubationszeit und einem weiteren Mediumswechsel vor Versuchsbeginn, um ein Anfärben des Mediums durch den Farbstoff zu vermeiden. Es erfolgte eine Bildaufnahme alle 4 min. Die Bilder zeigen das Überwachungsintervall der ersten 360 min. Es zeigt sich ein minimaler Ausbleichungseffekt und ein deutlich reduzierte Anfärbung des Mediums durch den zusätzlichen Waschschrift. Vergrößerung gemäß Skala

4.3.4. T-Lymphozyten in Co-Kultur

Zur Beurteilung der Interaktion zwischen T-Lymphozyten und Myelin musste die Vitalität der T-Lymphozyten in der DRG-Kultur gesichert werden. Dafür musste eine stabile Temperatur und eine stabiler pH-Wert während des gesamten Überwachungsintervalls gewährleistet werden. Die Temperaturkontrolle im Brutkasten des konfokalen Mikroskops zeigte hierbei stabile Werte; aufgrund der Vorversuche wurde der Brutkasten bereits eine Stunde vor Versuchsbeginn vorgeheizt, um einen Verlust der Fokusebene zu vermeiden. Die Stabilität des pH-Werts wurde visuell anhand der konstanten Mediumfarbe überprüft.

4.3.5. Trennung der CD4⁺/CD8⁺-T-Lymphozyten

Um den Effekt der CD8⁺-T-Lymphozyten und CD4⁺-T-Lymphozyten getrennt betrachten zu können, war eine effektive Trennungsmethode notwendig. Die Separation der CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten wurde daher mittels FACS auf ihre Verlässlichkeit geprüft. **Abb. 11** und **Abb. 12** zeigen jeweils die FACS-Analyse für CD8⁺- und CD4⁺-Zellen für die gesamte Zellpopulation der Milz und des Lymphknotens. Danach folgt die erneute Analyse nach erfolgter Trennung mit MACS

nach CD4⁺ und CD8⁺. Mit Hilfe der FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass durch die Methode eine effektive Trennung in eine CD4⁺- und CD8⁺-Subpopulation erreicht wurde.

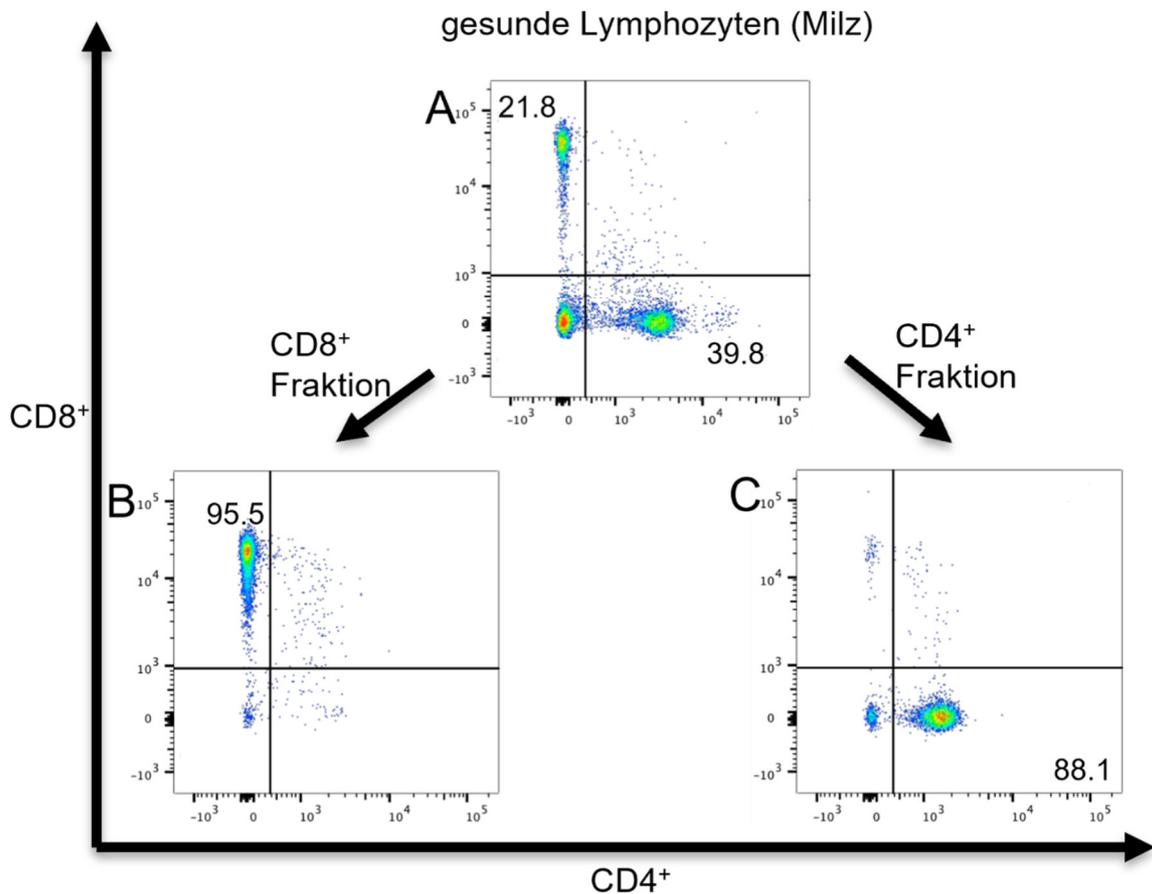


Abb. 11: FACS-Milzzellen

Den gesunden Versuchstieren wurde die Milz entnommen und die Zellen aus der Milz isoliert. Die Graphen zeigen die Durchflusszytometrie der gesunden Lymphozyten aus der Milz. Auf der X-Achse jeweils aufgeführt zeigt sich die Signalintensität der CD4-spezifischen APC-Färbung, auf der Y-Achse zeigt sich die Signalintensität der CD8⁺-spezifischen PE-Färbung. Die gesamten Lymphozyten (A) wurden mittels MACS in CD8⁺ (B) und CD4⁺ (C) Zellen getrennt. In der FACS-Analyse der gesamten Lymphozyten der Milz (A) zeigt sich eine Population mit CD4⁺-Lymphozyten, eine mit CD8⁺-Lymphozyten und eine CD4⁻/CD8⁻-Zellpopulation. Hierbei macht die CD8⁺-Zellpopulation 21,8% und die CD4⁺-Zellpopulation 39,8% aller Events aus. Die FACS-Analyse der CD8⁺-Fraktion nach MACS (B) zeigt eine deutliche Population CD8⁺-Zellen, diese macht 95,5% aller Events aus. Die FACS-Analyse der CD4⁺-Fraktion nach MACS (C) zeigt eine deutliche Population CD4⁺-Zellen, diese macht 88,1% aller Events aus. Die FACS-Analyse konnte somit eine gute Trennung in CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten durch MACS bestätigen.

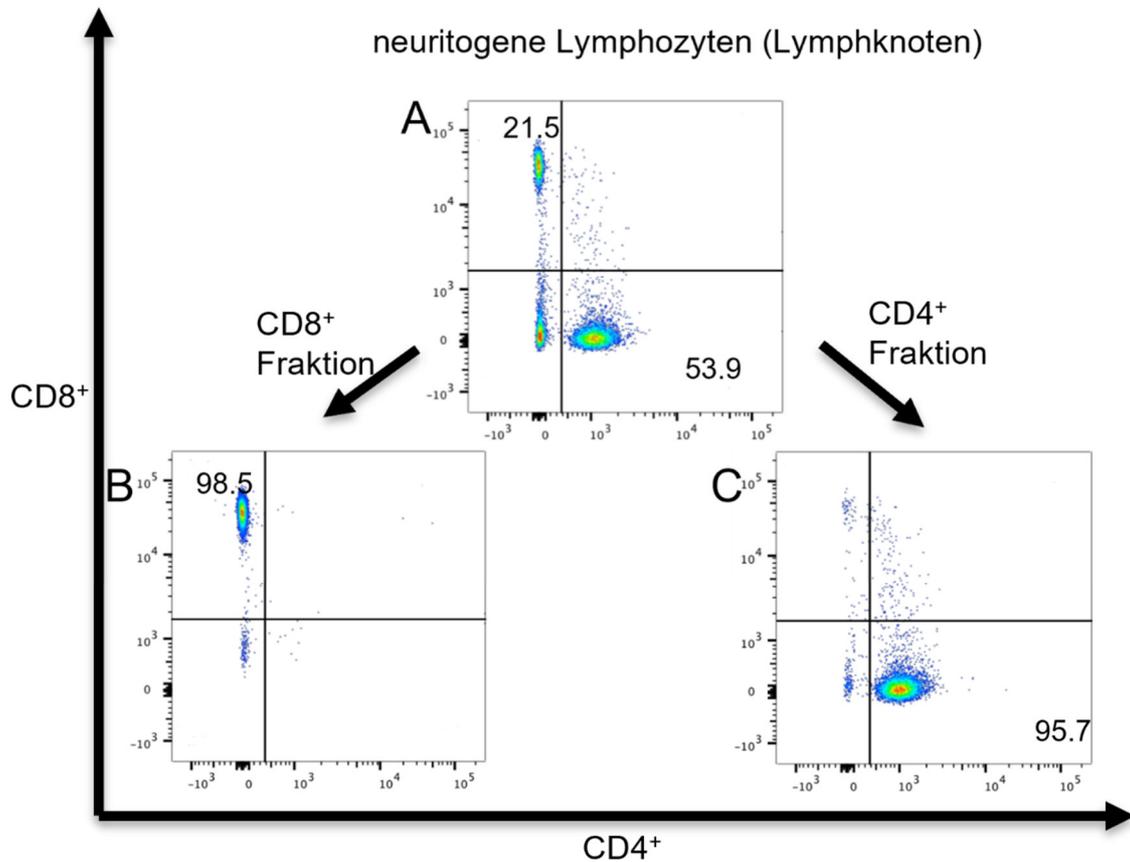


Abb. 12: FACS-Lymphknoten

Nach der Immunisierung mit P2₅₅₋₇₈ wurden den Versuchstieren nach 10 Tagen die Lymphknoten entnommen und die Zellen aus dem Lymphknoten isoliert. Die Graphen zeigen die Durchflusszytometrie der neuritogenen Lymphozyten aus dem Lymphknoten. Auf der X-Achse jeweils aufgeführt zeigt sich die Signalintensität der CD4-spezifischen APC-Färbung, auf der Y-Achse zeigt sich die Signalintensität der CD8-spezifischen PE-Färbung. Die gesamten Lymphozyten (A) wurden mittels MACS in CD8⁺ (B) und CD4⁺ (C) Zellen getrennt. In der FACS-Analyse der gesamten Lymphozyten (A) zeigt sich eine Population mit CD4⁺-Lymphozyten, eine mit CD8⁺-Lymphozyten und eine CD4⁻/CD8⁻-Zellpopulation. Hierbei macht die CD8⁺-Zellpopulation 21,5% und die CD4⁺-Zellpopulation 53,9% aller Events aus. Die FACS-Analyse der CD8⁺-Fraktion nach MACS (B) zeigt eine deutliche Population CD8⁺-Zellen, diese macht 98,5% aller Events aus. Die FACS-Analyse der CD4⁺-Fraktion nach MACS (C) zeigt eine deutliche Population CD8⁺-Zellen, diese macht 95,7% aller Events aus. Die FACS-Analyse konnte somit eine gute Trennung in CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten durch MACS bestätigen.

4.3.6. T-Zell-Kontakte

Die Auswertung der T-Zell-Kontakte erfolgte zu fest definierten Zeitpunkten. Als Startpunkt wurde hierbei das Absinken der Zellen in die Fokusebene des Myelins definiert. Es wurden hierfür die ersten 120 Minuten nach dem Absinken der Zellen beurteilt. Dieser Zeitraum wurde gewählt, da ein früher Kontakt zwischen Lymphozyten und Zielstruktur vermutet wurde. Die Kontakte zwischen T-Lymphozyten und Myelin wurden visuell im 2D-Bild ausgewertet. Hierbei wurde der prozentuelle Anteil der Zellen mit Kontakt zum Myelin im Vergleich zu im Bildausschnitt vorhandener Zellzahl ausgewertet. Dies geschah für die fest definierten Zeitpunkte 0 min, 30 min, 90 min und 120 min nach Absinken der Zellen. Die Subpopulation der CD4⁺-T-Lymphozyten wurden hierbei getrennt von den CD8⁺-T-Lymphozyten betrachtet. Hierfür wurden die jeweiligen Farbkanäle wie in **Abb. 13** übereinandergelegt. Die Differenzierung der roten T-Lymphozyten und des grünen Myelins war aufgrund der Färbung weiterhin möglich.

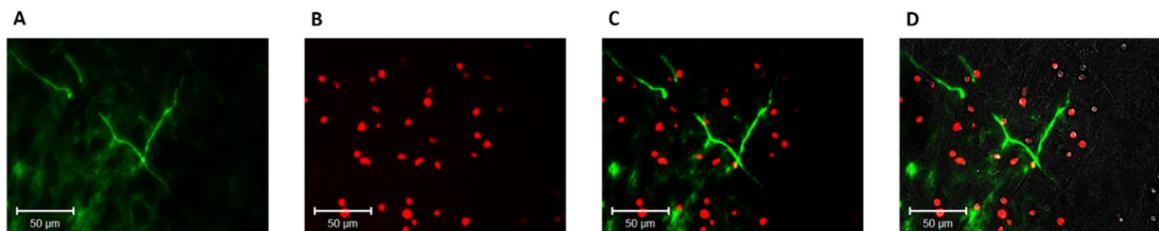


Abb. 13: Co-Kultur DRG und T-Lymphozyten

Die Abb. zeigen die Co-Kultur von myelinisierter DRG-Kultur und T-Lymphozyten. (A) Der grüne Kanal zeigt das mit GFA gefärbte Myelin. (B) Der rote Kanal zeigt die mit *orange cell tracker* gefärbten T-Lymphozyten. (C) Durch das Zusammenlegen des roten und des grünen Kanals können Myelin und T-Lymphozyten in ihrer räumlichen Beziehung beurteilt werden. (D) nach Hinzunahme des lichtmikroskopischen Bildes sind die Strukturabgrenzungen erleichtert, Vergrößerung gemäß Skala

4.3.6.1. CD4⁺-T-Lymphozyten

Der Anteil von Myelin-T-Lymphozyten-Kontakten wurde für neuritogene CD4⁺-T-Lymphozyten und CD4⁺-T-Lymphozyten gesunder Kontrolltiere betrachtet. Bezüglich des zeitlichen Verlaufs der prozentualen Myelin-CD4⁺-T-Lymphozytenkontakte beider Populationen zeigte sich in **Abb. 14** zu Beginn ein vergleichbarer Anteil beider Gruppen mit Kontakt zum Myelin. In der Gruppe der neuritogenen CD4⁺-T-Lymphozyten hielt sich der Anteil der Zellen mit Myelinkontakt im Vorlauf konstant, wohingegen es in der Kontrollgruppe zu einem Abfall der Kontakte über die beobachtete Zeit kam.

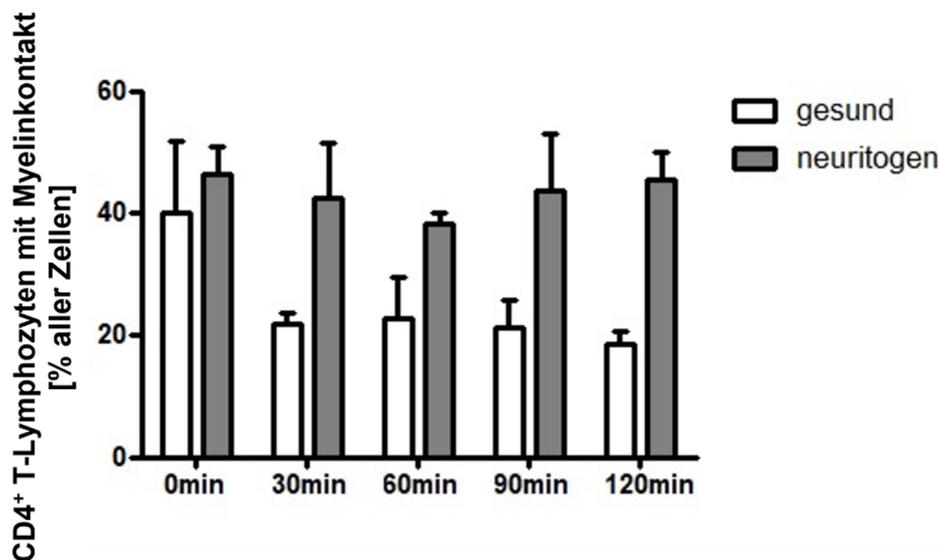


Abb. 14: CD4⁺-T-Lymphozyten: Myelinkontakt

In der Co-Kultur der DRG-Kultur und den CD4⁺-T-Lymphozyten wurden die T-Lymphozyten-Myelin-Kontakte alle 30 min für 120 min ausgewertet. Hierbei wurde der prozentuale Anteil der T-Lymphozyten mit Myelinkontakt im 2D-Bild ausgewertet. Auf der Y-Achse wurde der prozentuale Anteil der CD4⁺-T-Lymphozyten mit Myelinkontakt aufgetragen. Auf der X-Achse ist die Zeit ab dem Absinken der CD4⁺-T-Lymphozyten in die Fokusebene aufgezeichnet. Während der Anteil prozentualen T-Lymphozyten-Myelin-Kontakte zu Beginn in beiden Untergruppen gleich ist, kommt es in der Kontrollgruppe zu einem Abfall der prozentualen T-Lymphozyten-Myelin-Kontakte. In der Gruppe der neuritogenen CD4⁺-T-Lymphozyten zeigte sich der Anteil an Myelinkontakten stabil. (Mittelwert + Standardabweichung)

4.3.6.2. CD8⁺-T-Lymphozyten

Parallel dazu wurde unter den gleichen Versuchsbedingungen der Anteil an Myelinkontakten in der Gruppe der CD8⁺-T-Lymphozyten untersucht. Hierbei wurden ebenfalls neuritogene CD8⁺-T-Lymphozyten mit CD8⁺-T-Lymphozyten gesunder Kontrolltiere verglichen. Es zeigt sich in **Abb. 15** erneut zu Beginn des Beobachtungszeitraums ein vergleichbarer Anteil von Myelinzellkontakten in beiden Subgruppen. In der Gruppe der neuritogenen CD8⁺-T-Lymphozyten kam es im

Überwachungsintervall von 2 Stunden zu einem prozentuellen Anstieg der Kontakte. In der Kontrollgruppe zeigte sich hingegen ein Abfall der Kontakte, sodass über die Zeit betrachtet mehr neuritogene CD8⁺-T-Lymphozyten in Myelinkontakt standen als in der Kontrollgruppe.

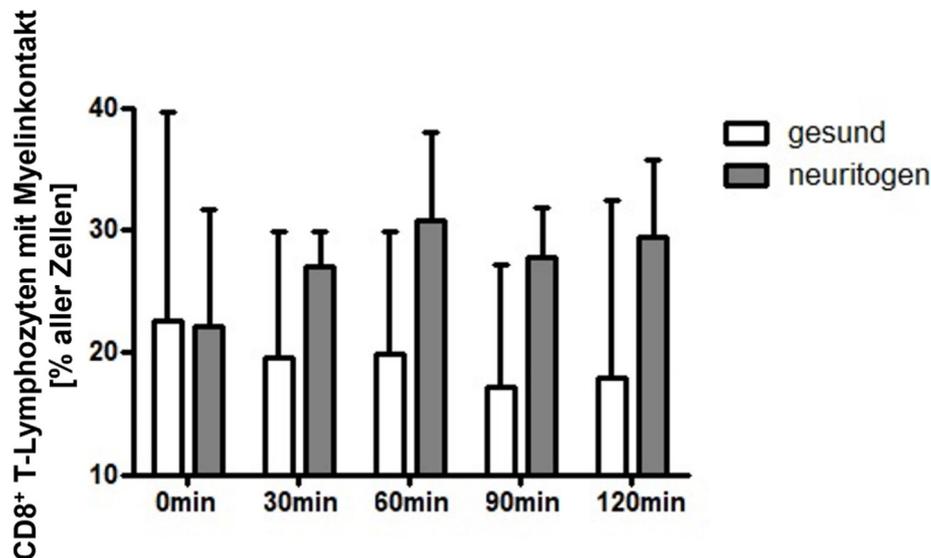


Abb. 15: CD8⁺-T-Lymphozyten: Myelinkontakt

In der Co-Kultur der DRG-Kultur und den CD8⁺-T-Lymphozyten wurden die T-Lymphozyten-Myelin-Kontakte alle 30 min für 120 min ausgewertet. Hierbei wurde der prozentuale Anteil der T-Lymphozyten im 2D-Bild mit Myelinkontakt ausgewertet. Auf der Y-Achse wurde der prozentuale Anteil der CD8⁺-T-Lymphozyten mit Myelinkontakt aufgetragen. Auf der X-Achse ist die Zeit ab dem Absinken der CD8⁺-T-Lymphozyten in die Fokusebene aufgezeichnet. Zu Beginn der Untersuchung zeigte sich der Anteil an T-Lymphozyten-Myelin-Kontakten in beiden Gruppen gleich. Während es in der Gruppe der neuritogenen T-Lymphozyten zu einem Anstieg der prozentualen T-Lymphozyten-Myelin-Kontakten kommt, fällt der Anteil der T-Lymphozyten-Myelin-Kontakte in der Kontrollgruppe ab. (Mittelwert + Standardabweichung)

4.3.7. Direktionalität und Geschwindigkeit

Die weitere Auswertung der Migration der T-Lymphozyten erfolgte zudem bezüglich ihrer Geschwindigkeit und Direktionalität. Hierbei wurde die Geschwindigkeit als zurückgelegte Strecke pro Zeit definiert. Direktionalität wurde als Verhältnis von kürzestem Abstand zwischen Start und Endpunkt der Zellposition zu der tatsächlich von der Zelle zurückgelegten Strecke betrachtet. Je direkter die Strecke zurückgelegt wird, desto höher ist die Direktionalität, desto länger der zurückgelegte Weg verglichen mit der tatsächlichen Entfernung von Start und Endpunkt, desto ungerichteter ist die Migration [106].

4.3.7.1. CD4⁺-T-Lymphozyten

Für die Gruppe der neuritogenen CD4⁺-T-Lymphozyten ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Geschwindigkeit verglichen mit der Kontrollgruppe, wie **Abb. 16** zeigt. Hingegen zeigte sich in der Gruppe der neuritogenen CD4⁺-T-Lymphozyten eine signifikant erhöhte

Direktionalität für die ersten 60 Minuten. Betrachtet man die T-Lymphozyten-Kontakte in diesem Zeitraum, zeigt sich in diesem frühen Zeitfenster die Auftrennung der prozentuellen T-Lymphozyten-Kontakte zwischen der Kontrollgruppe und den neuritogenen CD4⁺-T-Lymphozyten.

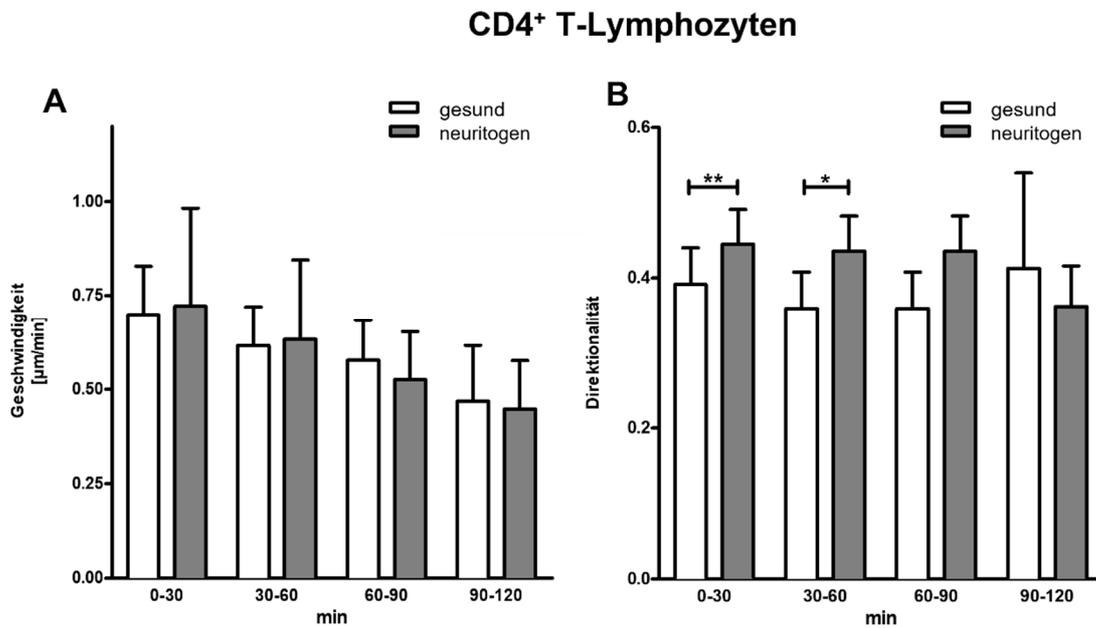


Abb. 16: CD4⁺-T-Lymphozyten: Geschwindigkeit und Direktionalität

Die Co-Kultur aus myelinisierter DRG-Kultur und T-Lymphozyten wurde mittels *live imaging* überwacht. Der linke Graph (A) zeigt auf der Y-Achse die Geschwindigkeit in $\mu\text{m}/\text{min}$, auf der X-Achse wurden die einzelnen 30 min Zeitabschnitte über das Überwachungsintervall von 120 min aufgetragen. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied in beiden Gruppen. Der rechte Graph (B) zeigt auf der Y-Achse die Direktionalität, auf der X-Achse wurden die einzelnen Zeitabschnitte über das Überwachungsintervall von 120 min aufgetragen. Hier zeigte sich über die ersten 60 min eine erhöhte Direktionalität in der Gruppe der neuritogenen CD4⁺-T-Lymphozyten. (Mittelwert + Standardabweichung, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

4.3.7.2. CD8⁺-T-Lymphozyten

Für die Gruppe der neuritogenen CD8⁺-T-Lymphozyten ergab sich eine signifikant reduzierte Geschwindigkeit verglichen mit der Kontrollgruppe, wie sich in **Abb. 17** zeigt. Eine reduzierte Geschwindigkeit in der Gruppe der neuritogenen CD8⁺-T-Lymphozyten über den gesamten Überwachungszeitraum könnte hierbei als Zeichen einer nichtzielgerichteten Migration gewertet werden. Hingegen zeigte sich in der Gruppe der neuritogenen CD8⁺-T-Lymphozyten eine signifikant

erhöhte Direktionalität in der Zeit zwischen 60 und 90 min nach Versuchsstart.

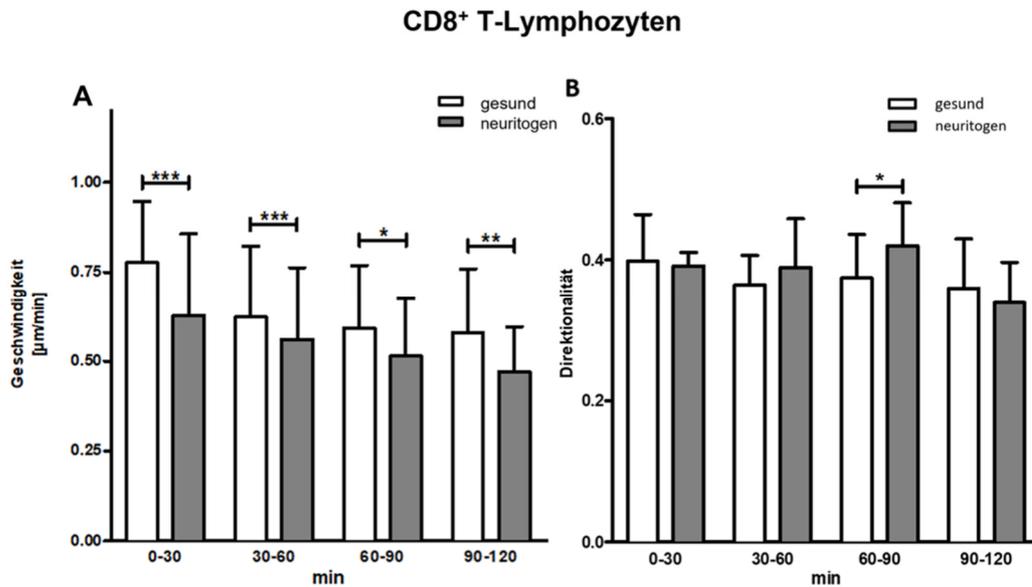


Abb. 17: CD8⁺-T-Lymphozyten: Geschwindigkeit und Direktionalität

Die Co-Kultur aus myelinisierter DRG-Kultur und T-Lymphozyten wurde mittels *live imaging* überwacht. Der linke Graph zeigt auf der Y-Achse die Geschwindigkeit in µm/min, auf der X-Achse die einzelnen 30 min Zeitabschnitte über der Überwachungsintervall von 120 min aufgetragen. Hier zeigte sich über den gesamten Überwachungszeitraum von 120 min eine reduzierte Geschwindigkeit in der Gruppe der neuritogenen CD8⁺-T-Lymphozyten. Der rechte Graph zeigt auf der Y-Achse die Direktionalität, auf der X-Achse wurden die einzelnen Zeitabschnitte des Überwachungsintervall von 120 min aufgetragen. Hier zeigte sich im Zeitraum 60–90 min eine erhöhte Direktionalität in der Gruppe der neuritogenen CD8⁺-T-Lymphozyten. (Mittelwert + Standardabweichung, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001)

4.3.8. Demyelinisierung

Zusätzlich wurde der Effekt der T-Lymphozyten auf die Myelinisierung ausgewertet. Auch hier wurde erneut eine Trennung zwischen CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten durchgeführt und der Effekt der Zellpopulation getrennt betrachtet. Verglichen wurden erneut neuritogene T-Lymphozyten mit T-Lymphozyten gesunder Kontrolltiere. Die DRG-Kulturen wurden mit den T-Lymphozyten für 3 Tage kultiviert und anschließend fixiert. Zur Beurteilung der Myelinisierung erfolgte die Auswertung der Nodiumslänge und Internodiumslänge nach Färbung mit *Sudan Black B*. Hierbei ist eine Vergrößerung des Nodiums und eine Verminderung der Internodiumslänge als Zeichen einer Demyelinisierung zu werten.

4.3.8.1. CD4⁺-T-Lymphozyten

Nach der Inkubation der DRG-Kulturen mit den CD4⁺-T-Lymphozyten über 3 Tage zeigte sich in der *Sudan-Black-B*-Färbung eine Vergrößerung der Nodiumlänge nach der Co-Kultur mit neuritogenen CD4⁺-T-Lymphozyten verglichen mit der Kontrollgruppe. **Abb. 18** zeigt die Nodiums- und Internodiumslänge nach 3 Tagen Co-Kultur der DRG-Kultur mit den T-Lymphozyten. Die Internodiumslänge hingegen verkleinerte sich durch den Kontakt mit den neuritogenen CD4⁺-T-Lymphozyten. Somit wurde eine Schädigung des Myelins verursacht.

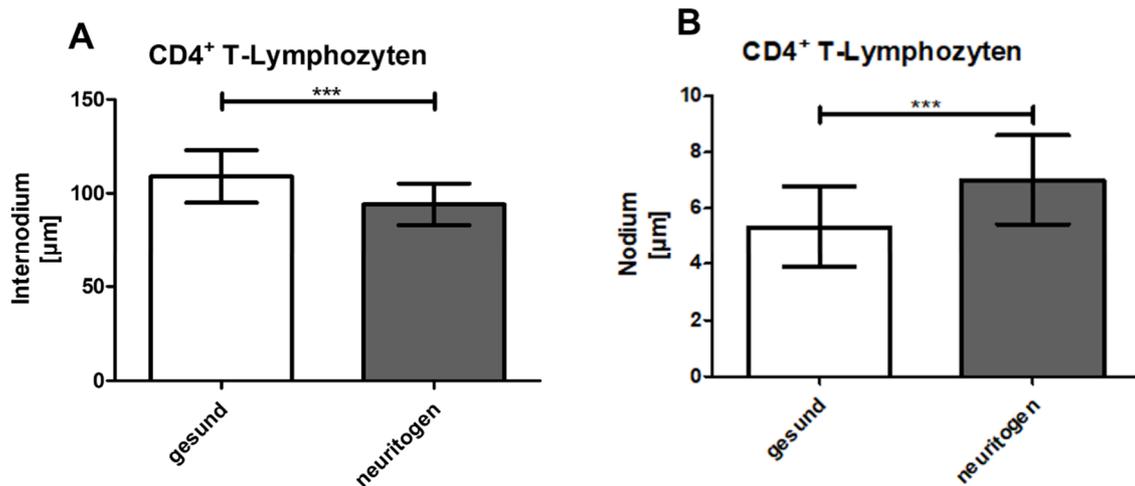


Abb. 18: CD4⁺-T-Lymphozyten: Demyelinisierung

Die CD4⁺-T-Lymphozyten wurden für 3 Tage mit der myelinisierten DRG-Kultur (23 Tage Myelinisierung) inkubiert. Danach erfolgte zur Quantifizierung der Myelinisierung eine *Sudan-Black-B*-Färbung. A: Auf der Y-Achse ist die Internodiumslänge nach 3 Tagen Co-Kultur der DRG-Kultur mit den CD4⁺-T-Lymphozyten gezeigt. Für die Länge des Internodiums in µm zeigt sich eine signifikante Reduktion in der Gruppe der neuritogenen CD4⁺-T-Lymphozyten, verglichen mit der Kontrollgruppe (Mittelwert + Standardabweichung; ***p-Wert: <0,0001). B: Auf der Y-Achse ist die Nodiumslänge in µm nach 3 Tagen Co-Kultur der DRG-Kultur mit den CD4⁺-T-Lymphozyten gezeigt. Für die Länge des Nodiums zeigt sich eine signifikante Vergrößerung in der Gruppe der neuritogenen CD4⁺-T-Lymphozyten verglichen mit der Kontrollgruppe (Mittelwert + Standardabweichung; ***p-Wert: <0,0001)

4.3.8.2. CD8⁺-T-Lymphozyten

Wir betrachteten die Nodiums- und Internodiumslänge in der *Sudan-Black-B*-Färbung nach 3 Tagen Co-Kultur mit neuritogenen CD8⁺-T-Lymphozyten im Vergleich zu 3 Tagen Co-Kultur mit CD8⁺-T-Lymphozyten gesunder Versuchstiere. In **Abb. 19** zeigte sich keine signifikante Vergrößerung der Nodiumslänge durch den Kontakt der neuritogenen Zellen verglichen mit der Kontrollgruppe, jedoch eine leichte Tendenz zur Vergrößerung der Nodiumslänge nach Co-Kultur mit den neuritogenen CD8⁺-T-Lymphozyten. Die Internodiumslänge hingegen verkleinerte sich nach der Co-Kultur mit den neuritogenen CD8⁺-T-Lymphozyten signifikant. Dies deutet auf eine Schädigung des Myelins durch die neuritogenen CD8⁺-T-Lymphozyten hin.

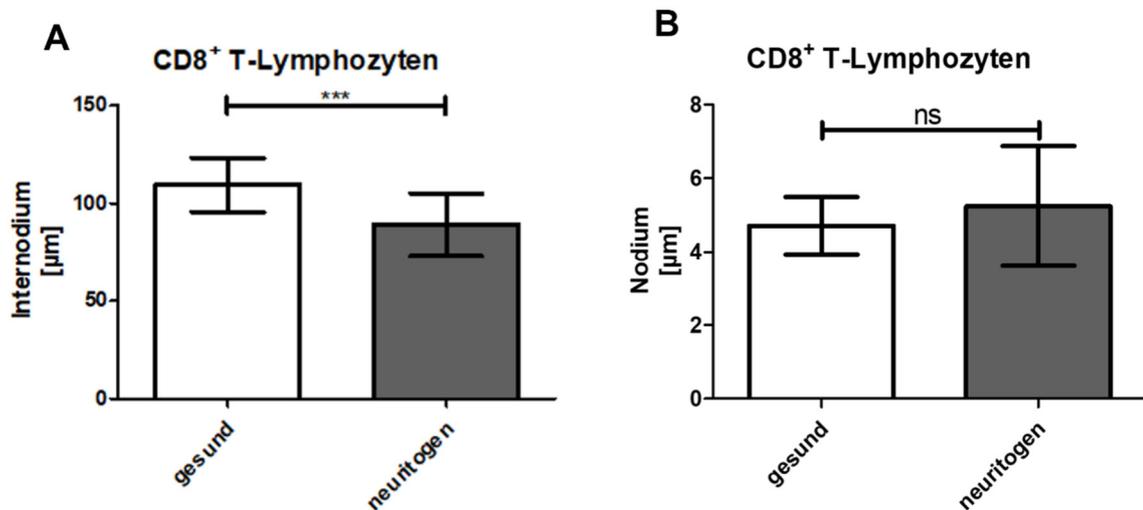


Abb. 19: CD8⁺-T-Lymphozyten: Demyelinisierung

Die CD8⁺-T-Lymphozyten wurden für 3 Tage mit der myelinisierten DRG-Kultur (23 Tage Myelinisierung) inkubiert. A: Auf der Y-Achse ist die Internodiumslänge in µm nach 3 Tagen Co-Kultur der DRG-Kultur mit den CD8⁺-T-Lymphozyten gezeigt. Für die Länge des Internodiums zeigt sich eine signifikante Reduktion in der Gruppe der neuritogenen CD8⁺-T-Lymphozyten, verglichen mit der Kontrollgruppe, (Mittelwert + Standardabweichung; ***p-Wert: <0,001). B: Auf der Y-Achse ist die Nodiumslänge in µm nach 3 Tagen Co-Kultur der DRG-Kultur mit den CD8⁺-T-Lymphozyten gezeigt. Für die Länge des Nodiums zeigt sich eine nicht signifikante Vergrößerung in der Gruppe der neuritogenen CD8⁺-T-Lymphozyten verglichen mit der Kontrollgruppe (Mittelwert + Standardabweichung; p-Wert:0,1173, ns: nicht signifikant)

5. Diskussion

Das Ziel unseres Modells ist es, die direkte Interaktion von T-Lymphozyten, Myelin und SC auf zellulärer Ebene untersuchen zu können, um den Pathomechanismus autoimmuner demyelinisierender peripherer Polyneuropathien besser zu verstehen und damit langfristig neue Therapieansätze zu finden [45, 107]. Hierbei sollte einerseits untersucht werden, ob es einen direkten Kontakt zwischen T-Lymphozyten und Myelin mit einer daraus resultierenden direkten Schädigung des Myelins durch die T-Lymphozyten gibt. CD4⁺-T-Lymphozyten und CD8⁺-T-Lymphozyten sollten getrennt betrachtet werden, um dadurch Rückschlüsse auf den Pathomechanismus zu ermöglichen. Zudem sollte die Rolle der SC als mögliche Angriffsstruktur für T-Lymphozyten oder als potenzieller Moderator der autoimmunen Schädigung untersucht werden [23, 45, 108]. Im Folgenden sollen die Ergebnisse näher beurteilt und auf die jeweiligen Vor- und Nachteile der Methode eingegangen werden.

5.1. Die Rolle der T-Lymphozyten in autoimmunen peripheren Polyneuropathien

T-Lymphozyten stellen die primären Effektorzellen unseres Modells dar. Wie zuvor beschrieben, ist das EAN-Modell ein gut etabliertes Tiermodell der autoimmunen demyelinisierenden peripheren Polyneuropathien, insbesondere des GBS [51, 109]. T-Lymphozyten scheinen eine relevante Rolle in der Pathogenese der EAN zu spielen. Sowohl CD4- als auch CD8-defiziente Mäuse entwickeln deutlich geringere pathologische Veränderungen in der Histologie und einen mildereren klinischen Verlauf als die Wildtypen-Vergleichsgruppe [110]. Da ein adoptiver Transfer von neuritogenen T-Lymphozyten eine EAN auslösen kann, ist von einer T-Lymphozyten-abhängigen Pathophysiologie der EAN auszugehen [111]. In unserem Modell konnte eine Demyelinisierung in der Co-Kultur mit neuritogenen T-Lymphozyten beobachtet werden, wobei T-Lymphozyten in unserem Modell die alleinigen professionellen Effektorzellen des Immunsystems darstellen. Die Relevanz der T-Lymphozyten für autoimmune periphere Polyneuropathien zeigt sich auch in klinischen Studien. Im Liquor von Patienten mit GBS und CIDP konnte ein erhöhter Anteil von HLA-DR⁺ T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um aktivierte T-Lymphozyten als Hinweis auf eine Beteiligung der T-Lymphozyten an der Pathogenese [112]. Im Serum von Patienten mit GBS oder CIDP konnte teilweise ein erhöhter IL-2-Spiegel gezeigt werden. IL-2 wird von aktivierten T-Helferzellen produziert und bewirkt eine weitere T-Zell-Differenzierung. Damit stellt es ebenfalls einen Hinweis auf eine relevante Rolle der T-Lymphozyten im Entzündungsprozess der autoimmunen peripheren Polyneuropathien dar [113]. Im Serum von Patienten mit GBS konnten geringe Mengen gegen Myelinprotein gerichtete, IFN- γ -produzierende T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Dies zeigt eine Aktivierung gegen Myelin zielgerichteter T-Lymphozyten bei Patienten mit GBS [114]. Bei Patienten mit CIDP zeigten sich diese myelinantigenspezifischen T-

Lymphozyten unter der Therapie mit intravenösen Immunglobulinen rückläufig [115]. Daraus ergibt sich ein Hinweis auf einen relevanten, zielgerichteten Effekt der T-Lymphozyten im Rahmen der demyelinisierenden peripheren Polyneuropathien [45]. Ein Ziel unserer Arbeit war es, die einzelnen T-Lymphozyten-Subgruppen und ihre Interaktion mit dem Myelin getrennt zu betrachten und dadurch auf den Pathomechanismus der Demyelinisierung schließen zu können.

5.1.1. Die Rolle der CD8⁺-T-Lymphozyten in der DRG-Co-Kultur

Die Beurteilung des Myelins nach einer Co-Kultur mit den CD8⁺-T-Lymphozyten zeigte eine signifikante Reduktion des Internodiums im Sinne einer Demyelinisierung. Die tendenzielle Vergrößerung des Nodiums, als Zeichen einer Demyelinisierung nach Co-Kultur mit CD8⁺-T-Lymphozyten, zeigte sich hingegen nicht signifikant. Die Demyelinisierung nach der Co-Kultur ohne weitere Effektorzellen lässt eine direkte zytotoxische Schädigung des Myelins durch die CD8⁺-T-Lymphozyten vermuten [95]. Dabei ist von einer MHC-I-Komplex vermittelten Schädigung auszugehen, bei der das periphere Nervensystem durch neuritogene CD8⁺-T-Lymphozyten angegriffen wird [95]. Zahlreiche klinische Studien zu Patienten mit peripheren autoimmunen Polyneuropathien lassen aufgrund erhöhter CD8⁺-T-Lymphozyten-Level eine zentrale Rolle der CD8⁺-T-Lymphozyten in vielen autoimmunen neurodegenerativen Erkrankungen vermuten [95]. Im Liquor von Patienten mit CIDP konnte eine erhöhte Zahl an CD8⁺-T-Lymphozyten verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe gezeigt werden [112]. Verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe zeigte sich im peripheren Blut von Patienten mit GBS die Anzahl von CD8⁺-T-Lymphozyten ebenfalls erhöht, zudem zeigten sich die CD8⁺-T-Lymphozyten über den Krankheitsverlauf langsam rückläufig [71]. Ebenso zeigte sich die Anzahl der CD8⁺-T-Lymphozyten im peripheren Blut der GBS-Patienten unter der Therapie mit intravenösen Immunglobulinen rückläufig [77, 116]. Als Zeichen für den lokalen Effekt konnten CD8⁺-T-Lymphozyten histologisch vermehrt in den Nervenbiopsien von Patienten mit CIDP und GBS nachgewiesen werden [61, 117]. In den Nervenbiopsien von Patienten mit CIDP konnte eine monoklonale CD8⁺-T-Lymphozyten-Population nachgewiesen werden; diese zeigte teilweise gleiche monoklonale T-Zell-Rezeptormuster wie die CD8⁺-T-Lymphozyten-Population im Blut der Patienten. Dies spricht für eine spezifische Zielstruktur der CD8⁺-T-Lymphozyten bei autoimmunen demyelinisierenden peripheren Polyneuropathien [95]. Bei CIDP-Patienten mit Therapieansprechen unter intravenöser Immunglobulintherapie zeigten sich die myelinantigenspezifischen CD8⁺-T-Lymphozyten in der Gruppe mit Therapieansprechen rückläufig [115]. Eine führende Rolle der CD8⁺-T-Lymphozyten in der Pathogenese autoimmuner peripherer Polyneuropathien könnte erklären, weshalb Patienten mit einer fortgeschrittenen HIV-Erkrankung, also einer reduzierten T-Helferzahl, ebenfalls ein GBS entwickeln können. Der Erkrankungsprozess scheint nicht alleine durch CD4⁺-T-Lymphozyten getragen zu werden [118]. Im Rahmen unseres Modells wurde der Kontakt zwischen T-Lymphozyten

und Myelin, als Hinweis auf eine direkte zytotoxische Schädigung, ausgewertet. Hier zeigt sich in der Gruppe der neuritogenen CD8⁺-T-Lymphozyten der Prozentsatz der Zellen mit Myelinkontakt erhöht. Insbesondere zeigt sich in der Gruppe der neuritogenen CD8⁺-T-Lymphozyten der Anteil an Myelinkontakten im Rahmen des Beobachtungszeitraums zunehmend, im Gegensatz zu dem stabilen bzw. abfallenden Anteil an Myelinkontakten in der Kontrollgruppe. Der vermehrte Kontakt lässt sich als direkter Kontakt zwischen MHC-I-Komplex und T-Zell-Rezeptor interpretieren. Hierbei ist die Zunahme der Kontakte in der Gruppe der neuritogenen CD8⁺-T-Lymphozyten möglicherweise dadurch zu erklären, dass zu den bereits eingegangenen Myelin-Lymphozytenbindungen über den Überwachungszeitraum weitere Myelin-Lymphozytenbindungen hinzukommen, während in der Kontrollgruppe die CD8⁺-T-Lymphozyten weiter diffundieren und keine weitere Bindung zum Myelin eingehen. Die Ergebnisse lassen einen direkten Kontakt mit direkter zytotoxischer Schädigung des Myelins durch die CD8⁺-T-Lymphozyten vermuten. Zur Überprüfung dieser Hypothese ist die Auswertung eines Assays für zytotoxische Zellschädigung nach Inkubation der DRG-Kultur mit den CD8⁺-T-Lymphozyten denkbar. In der Auswertung des Myelins nach der Co-Kultur wurde die Nodiums- und Internodiumslänge mittels einer *Sudan-Black-B*-Färbung des Myelins beurteilt [96]. Eine Internodiumsverkürzung und eine Nodiumsverlängerung stellen hierbei eine Demyelinisierung dar [96]. Diese Demyelinisierung resultiert durch den Verlust der elektrischen Isolierung in einer Reduktion der elektrischen Leitgeschwindigkeit [53]. Zwar zeigte sich in der Analyse der *Sudan-Black-B*-Färbung eine Demyelinisierung im Sinne einer Internodiumsverkürzung nach Co-Kultur mit den neuritogenen CD8⁺-T-Lymphozyten, jedoch nur eine nicht signifikante Vergrößerung des Nodiums. Hier sind mehrere Probleme im Versuchsaufbau denkbar. Einerseits könnte die Inkubationszeit von 3 Tagen eine nicht ausreichende Zeitperiode darstellen und damit der Zeitraum zu kurz für eine ausreichende Schädigung durch einen zytotoxischen Effekt sein. Alternativ könnten hier im Verlauf weitere Zeitpunkte untersucht werden, um die Dynamik einer Schädigung besser einschätzen zu können. Eine weitere Ursache für eine geringe Demyelinisierung könnte sein, dass die Schädigung durch die CD8⁺-T-Lymphozyten ohne weitere Immunzellen keinen ausreichenden Effekt zeigt. In L27-Mauslinien, einer Mauslinie mit CD8⁺-T-Effektorzellen, entwickelten diese keine spontanen autoimmunen peripheren Polyneuropathien, und in den immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich ein niedriges Level an kostimulatorischen Signalen auf Makrophagen. Dies zeigt die Notwendigkeit einer weiteren T-Lymphozyten-Aktivierung durch die Makrophagen, um den akuten Entzündungsprozess aufrechtzuerhalten. Wurde durch eine Nervenschädigung die kostimulatorische B7.2-Expression auf Makrophagen erhöht, entwickelten diese Tiere eine autoimmune Polyneuropathie. Die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer autoimmunen peripheren Polyneuropathie konnte durch das gezielte Blockieren von kostimulatorischen Signalen auf der Makrophagenoberfläche beeinflusst werden. Dies deutet darauf hin, dass synergistisch arbeitende Makrophagen für eine ausreichende Aktivierung der

Immunantwort nötig sind [119]. Makrophagen könnten auch als Myelin-destruierende Effektorzellen den größeren Schädigungseffekt verursachen, daher könnte die alleinige Co-Kultur mit CD8⁺-T-Lymphozyten eine geringere Demyelinisierung verursachen [120].

5.1.2. Die Rolle der CD4⁺-Lymphozyten in der DRG-Co-Kultur

CD4⁺-T-Lymphozyten stellen als modulierende Zellpopulation der EAN den langjährigen Forschungsschwerpunkt im Bereich der autoimmunen peripheren Polyneuropathien dar [46, 121]. CD4⁺-T-Lymphozyten können das Entzündungsgeschehen durch Rekrutierung von Makrophagen, die Aktivierung von B-Lymphozyten zur Antikörperproduktion und über Zytokine beeinflussen [46]. Hierbei lassen sich die einzelnen Untergruppen der CD4⁺-T-Lymphozyten getrennt betrachten. Untersuchungen des peripheren Bluts von Patienten mit GBS zeigten eine Erhöhung von T_H1-T-Lymphozyten und assoziierter Zytokine im akuten Entzündungsstadium und eine erhöhte T_H2-T-Lymphozytenzahl in der späteren Rekonstitutionsphase der Krankheit [122]. Eine Metaanalyse zeigte erhöhte Zytokinlevel von T_H1-, T_H2- und T_H17-T-Lymphozyten, wobei hier eine Phasenzuteilung des GBS aufgrund der unterschiedlichen Studien nur bedingt möglich ist [123]. Eventuell ist das Profil der T-Lymphozyten-Subpopulation abhängig von der Unterform des GBS, so dass bei eher antikörpervermittelnden Unterformen eine erhöhte T_H2-Zellzahl vorkommt [124]. Ähnlich wie bei anderen autoimmunen Erkrankungen, zeigen sich regulatorische CD4⁺-T-Lymphozyten im Blut von Patienten mit GBS reduziert, wohingegen CD4⁺-T-Helferzellen erhöht sind [71]. Zudem scheinen regulatorische CD4⁺-T-Lymphozyten einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf zu haben. So konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass eine frühe Reduktion regulatorischer T-Lymphozyten den Krankheitsverlauf aggraviert, [125]. In unserem Modell wurde die alleinige Interaktion von CD4⁺-T-Lymphozyten und SC bzw. Myelin ohne weitere Effektorzellen des Immunsystems betrachtet. In einer frühen Untersuchung mit neuritogenen CD4⁺-T-Lymphozyten zeigten sich *in vitro* Cluster an SC, welche einen direkten Kontakt mit MHC-II-Komplexen der SC vermuten lassen [126]. Dies deckt sich mit unserer Betrachtung der prozentualen CD4⁺-T-Lymphozyten-Myelin-Kontakte. In der Gruppe der neuritogenen CD4⁺-T-Lymphozyten zeigt sich über die Zeit ein stabiler Prozentsatz an T-Lymphozyten-Myelin-Kontakten, wohingegen der Prozentsatz der T-Lymphozyten-Myelin-Kontakte in der Kontrollgruppe abnahm. Dies deutet auf einen spezifischen Kontakt zwischen den neuritogenen CD4⁺-T-Lymphozyten und dem Myelin hin. Nach der Co-Kultur von CD4⁺-T-Lymphozyten und der DRG-Kultur erfolgte die Beurteilung des Myelins nach der Myelinfärbung mit *Sudan Black B* [96]. In der Analyse des Myelins nach Co-Kultur mit den neuritogenen CD4⁺-T-Lymphozyten zeigt sich eine signifikante Vergrößerung des Nodiums und eine signifikante Verkleinerung des Internodiums. Damit ergibt sich eine Demyelinisierung durch die Co-Kultur mit den neuritogenen CD4⁺-T-Lymphozyten. Insgesamt weisen unsere Ergebnisse auf eine relevante Rolle der CD4⁺-T-Lymphozyten bei der

Demyelinisierung hin, hierbei scheint es sich um eine direkt vermittelte Schädigung zu handeln. Es bleibt jedoch unklar, welcher Schädigungsmechanismus zwischen CD4⁺-T-Lymphozyten und Myelin ohne weitere Effektorzellen erfolgt. Einzelne Untersuchungen weisen auf eine mögliche zytotoxische Aktivität CD4⁺-T-Lymphozyten unter bestimmten Bedingungen wie Virusinfektionen und eine Präsentation von Virusantigenen über MHC-II hin, jedoch ergibt sich aus unserem Modell kein Beleg für einen solchen Effekt [127]. Da unser Modell keine Makrophagen enthält, ist der demyelinisierende Effekt der CD4⁺-T-Lymphozyten eventuell eingeschränkt, da keine durch CD4⁺-T-Lymphozyten modulierte Myelinschädigung durch Makrophagen stattfinden kann [128]. Wenn auch sich in Co-Kultur mit den CD4⁺-T-Lymphozyten Hinweise für einen vermehrten Kontakt zwischen CD4⁺-T-Lymphozyten und Myelin sowie eine Demyelinisierung nach der Co-Kultur zeigen, lassen unsere Ergebnisse keinen klaren Schluss auf den Pathomechanismus zu. Zur Überprüfung ist hier die Durchführung eines Assays für Apoptose und zytotoxische Schädigung nach der Co-Kultur denkbar.

5.1.3. T_H17-Lymphozyten als mögliche Effektorzellen

Mit den T_H17-Lymphozyten rückt eine Untergruppe der CD4⁺-T-Lymphozyten immer mehr in den Fokus der Forschung zu autoimmunen peripheren Polyneuropathien. Diese Zellen produzieren u. a. IL-17, ein proinflammatorisches IL [129]. Untersuchungen weisen auf eine wichtige Rolle von IL-17 beim Pathomechanismus von entzündlichen Erkrankungen hin [130]. In EAN-Ratten konnte während des Erkrankungsspeaks ein erhöhter Serumspiegel von IL-17 nachgewiesen werden [131]. In der klinischen Forschung zeigen sich im Liquor und Serum von Patienten mit GBS erhöhte Level für IL-17 [92]. IL-17 wird nicht exklusiv von T_H17-Lymphozyten, sondern auch von CD8⁺-T-Lymphozyten und Neutrophilen gebildet [129]. Bei Patienten mit akut aktiver CIDP konnten erhöhte Level von T_H17-Lymphozyten im peripheren Blut und im Liquor nachgewiesen werden. Bei diesen Patienten zeigt sich der IL-17-Spiegel im Serum erhöht, sowohl gegenüber nicht erkrankten als auch gegenüber Patienten mit remittierender CIDP [132]. Für die experimentelle autoimmune Enzephalitis, das Tiermodell der multiplen Sklerose, konnte ebenfalls ein relevanter Einfluss von IL-17 gezeigt werden. IL-17-defiziente Mäuse entwickelten hier erst verzögert eine Erkrankung, und der adoptive Transfer von CD4⁺-T-Zellen konnte nur ineffektiv eine erneute Erkrankung induzieren [133]. SC exprimieren im DRG-Modell regulär IL-17-Rezeptor A und B, was auf einen möglichen Effekt durch IL-17 auf SC hindeutet [94]. Die Wirkung von IL-17 wurde in DRG-Kulturen untersucht. Hier konnte eine verminderte Myelinsynthese und eine reduzierte Genexpression der Myelinsyntheseproteine auf mRNA-Ebene gezeigt werden. Dabei wurde jedoch eine Exposition von 21 Tagen IL-17 in dem DRG-Modell untersucht [94]. In unserem Modell könnte daher die Zeit der Exposition für den Effekt auf RNA-Ebene zu kurz sein. In den bisherigen Untersuchungen mit IL-17 in DRG-Kulturen zeigte sich in der Untersuchung kein Hinweis auf einen durch IL-17 ausgelösten

oxidativen Stress, welcher eine akute, schnelle Schädigung auslösen könnte [94]. Ein weiterer möglicher Mechanismus ist ein direkter Apoptosetrigger durch IL-17 auf die SC. Einzelne Untersuchungen zeigten eine fragliche IL-17-induzierte Apoptose der SC in einem Modell zu neuropathischem Schmerz. Hier konnte auch ein indirekter Kontakt in Zellkultur eine Apoptose auslösen, weshalb ein IL-getriggert Effekt vermutet wurde [134]. Hingegen zeigten andere Untersuchungen keine vermehrte Apoptose in der DRG-Kultur nach Co-Kultur mit IL-17 [94]. IL-17 stellt jedoch auch in unserem Modell einen möglichen Mediator der Demyelinisierung durch die Beeinflussung von SC dar; dies könnte durch eine Messung von IL-17 nach Inkubation von DRG-Kultur und CD4⁺-T-Lymphozyten in Co-Kultur überprüft werden.

5.1.4. Schwann-Zellen als Angriffsstruktur und Moderator der Entzündung

SC stellen neben T-Lymphozyten die zweite im Modell untersuchte Zellpopulation dar. Sie bilden eine mögliche Angriffsstruktur für die T-Lymphozyten. In unserer Untersuchung konnte ein vermehrter Kontakt sowohl neuritogener CD4⁺-T-Lymphozyten als auch neuritogener CD8⁺-T-Lymphozyten mit dem Myelin gezeigt werden. SC sind in der Lage, Proteine über MHC-Komplexe auf ihrer Oberfläche zu präsentieren und dadurch in Interaktion mit T-Lymphozyten treten [9]. Hierbei können SC auch endogene Myelinproteine auf ihrer Oberfläche präsentieren [135]. Endogene Proteine, wie Myelinantigene, können regulär über MHC-I-Komplexe von SC präsentiert werden, eine Steigerung der Expression von MHC-I konnte durch inflammatorische Zytokine wie Interferon gamma *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden [88, 91]. Somit können SC im Rahmen einer akuten Entzündungsreaktion als antigenpräsentierende Zelle verstanden werden [91]. Durch die Expression von endogenem Myelinprotein über MHC-I-Komplexe ist damit eine direkte Interaktion mit neuritogenen CD8⁺-T-Lymphozyten möglich [23, 136]. Für eine Interaktion mit CD4⁺-T-Lymphozyten ist die Präsentation eines Antigenes über MHC-II-Komplexe notwendig [20, 136]. Somit muss die SC für eine Interaktion mit P2-spezifischen CD4⁺-T-Lymphozyten endogene Myelinproteine über MHC-II präsentieren können. MHC-II-Moleküle sind die primäre Präsentationsform spezialisierter APC des Immunsystems, wie Makrophagen und dendritische Zellen [20, 137]. SC können unter bestimmten Bedingungen MHC-II-Moleküle ebenfalls exprimieren. So konnte die Expression von MHC-II auf der Schwann-Zell-Oberfläche *in vitro* durch Interferon gamma und durch P2-spezifische T-Lymphozyten ausgelöst werden [86, 87]. Auch an humanen SC konnte *in vitro* unter Interferon gamma eine Expression von MHC-II-Komplexen nachgewiesen werden [88]. Im Rahmen des Entzündungsprozesses wandern vermehrt Immunzellen ins PNS; diese können Interferon gamma auszuschütten und dadurch zu einer Hochregulation von MHC-II-Molekülen führen [86]. Somit stellen SC eine potenzielle APC im Rahmen des Entzündungsgeschehens der peripheren autoimmunen Polyneuropathien dar [138]. Auch in der Untersuchung von Nervenbiopsien von Patienten mit Guillain-Barré-Syndrom und CIDP konnten

MHC-II-Komplexe auf der Zelloberfläche der SC nachgewiesen werden [89, 90]. In unserem Versuchsaufbau wurde zur Aktivierung der Zelle und der Hochregulation der MHC-Präsentation Interferon gamma zum Kulturmedium zugegeben und dadurch ein Entzündungsprozess simuliert. In einzelnen In-vitro-Experimenten gelang es nicht zu zeigen, dass hierbei auch endogene Proteine, wie Myelinproteine, über MHC-II-Komplexe präsentiert werden [9, 138]. Im Rahmen des Entzündungsprozesses wird vermehrt Myelin abgebaut und bietet daher ein potenzielles exogenes Antigen zur Präsentation [138]. Der MHC-II-Komplex stellt nicht nur eine mögliche Angriffsstruktur, sondern auch den Schlüssel zur modulierenden Funktion von SC dar. Der klinische Effekt dieser MHC-II-Antigen-Präsentation durch SC konnte im Tierversuchsmodell gezeigt werden. Durch eine Kreuzung wurde im Mausmodell gezielt eine Veränderung in der β -Kette und damit ein nicht funktionsfähiger MHC-II-Komplex hervorgerufen. Im Gegensatz zu der Kontrollgruppe zeigte die genetisch veränderte Mauslinie keine Expression von MHC-II-Komplexen nach einer Nervenschädigung. In dem Modell für posttraumatische Nervenschädigung konnten einerseits weniger $CD4^+$ -T-Lymphozyten intraneural und eine geringere axonale Schädigung in der Gruppe mit nicht funktionsfähigen MHC-II-Komplexen nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich eine Reduktion der posttraumatischen thermischen Hyperalgesie in der Gruppe der SC mit MHC-II-Verlust. Dies spricht für eine MHC-II-vermittelte Modulation des Entzündungsprozesses [139]. SC könnten über extrazelluläre Matrixveränderungen Einfluss auf den Verlauf der Nervenschädigung nehmen [140]. Einzelne Studien lassen auch eine mögliche direkte Beeinflussung der Immunantwort durch Zytokinausschüttung oder Antigenpräsentation der SC vermuten [141]. SC können unter dem Einfluss von inflammatorischen Zytokinen T-Zell-Apoptose induzieren und dadurch die Immunantwort modulieren [141]. Mithilfe der Präsentation von Antigenen über MHC-Komplexe ist eine auch eine modulierende Rolle der SC im Sinne einer Aktivierung von sowohl $CD8^+$ - als auch $CD4^+$ -Lymphozyten im Entzündungsprozess denkbar [9]. *In vitro* konnte analog dazu eine gesteigerte Proliferation von P2-spezifischen T-Lymphozyten in Co-Kultur mit SC gezeigt werden [138]. Zudem konnte in Untersuchungen der Nerven von Patienten mit CIDP beispielsweise CD58 auf den Schwann-Zell-Oberflächen nachgewiesen werden, ein Oberflächenmarker, der eine Rolle im Rahmen der T-Zell-Aktivierung spielt. [142]. Zudem könnten SC das Einwandern von Makrophagen an den Ort der Entzündung moderieren [143]. Durch diese Mechanismen könnten SC auch die Entzündung modulieren [9]. Als unprofessionelle APC könnten die SC den begonnen Entzündungsprozess weiter vorantreiben und aufrechterhalten [138]. Dies stellt die Frage, inwieweit die SC nicht nur eine mögliche Angriffsstruktur darstellen, sondern auch den Entzündungsprozess modulieren [108, 142]. Somit stellen sie auch einen möglichen Therapieangriffspunkt dar [144].

5.2. Myelinschädigung bei autoimmunen peripheren Polyneuropathien

Unsere Ergebnisse zeigen eine Demyelinisierung durch den Kontakt mit neuritogenen CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten. Untersuchungen zur EAN in Kaninchen zeigen histologisch insbesondere eine Desorganisation der Myelinschichten. Hierbei zeigt sich eine Auftrennung der Myelinschichten und eine vesikuläre Umorganisation des Myelins. Diese Veränderungen wurden primär Makrophagen zugeschrieben, wobei Veränderungen histologisch auch in Abschnitten ohne Makrophagen nachweisbar waren [120]. Die histologischen Untersuchungen von EAN-Lewis-Ratten zeigte zudem ein Myelinödem sowie eine resultierende Verminderung von Axonen. In den betroffenen Myelinabschnitten mit Schwellung und Myelinschichtauftrennung zeigten sich T-Lymphozyten als dominierende Zellpopulation. Jedoch lassen sich auch hier Makrophagen nachweisen, welche in unserem Modell nicht vorhanden sind. Der SC-Marker S 100 zeigte sich in den Färbungen reduziert, was als bereits erfolgte myelingerichtete Immunreaktion gewertet wurde. Hierbei ist beispielsweise auch eine gerichteter T-Lymphozyten-Effekt denkbar [145].

5.3. Limitationen im verwendeten Modell

5.3.1. DRG-Modell

Bei dem DRG-Modell als In-vitro-Modell für des periphere Nervensystem werden Hinterstrangganglien in Zellkultur gebracht [96]. Bei dem Hinterstrangganglion handelt es sich anatomisch um die Zellkörper afferenter sensorische Neuronen [146]. Im Rahmen des GBS sind jedoch nicht nur sensorische, sondern auch motorische Nerven betroffen [36]. Die klassische CIDP betrifft sensorische und motorische Nerven, wobei nur ca. 50% diese klassische Form der CIDP aufweisen [147, 148]. Die CIDP umfasst damit eine heterogene Erkrankungsgruppe [147]. Je nach Studie zeigen sich beispielsweise ca. 15% eine rein sensorische Polyneuropathie auf, mehrere Studien konnten eine Patientengruppe mit primär sensorischen Symptomen zeigen [147-149]. Hierbei kann die Heterogenität der Erkrankungen ein Hinweis auf unterschiedliche Pathomechanismen sein [148]. In unserem Modell liegt der Fokus auf der Interaktion zwischen T-Lymphozyten und Myelin. Die Untersuchungen zur Beschaffenheit des Myelins sensorischer und motorischer Nerven des PNS afferenter sensorischer Neuronen zeigen Unterschiede in der Zusammensetzung des Myelins, beispielsweise in der Häufigkeit einzelner Gangliosidunterformen [150]. Diese Ganglioside sind wiederum potenzielle Angriffsstrukturen für das Immunsystem im Rahmen der autoimmunen peripheren Polyneuropathien [151].

5.3.2. P2 als Zielstruktur

Im Rahmen unseres Modells wurde durch die Immunisierung mit P2-Peptid die Angriffsstruktur festgelegt. Darüber hinaus sind noch weitere möglichen Zielstrukturen des Immunangriffs im Rahmen autoimmuner peripherer Polyneuropathien bekannt [35]. P2-gerichtete T-Lymphozyten

konnten im Blut von atypischen CIDP-Patienten nachgewiesen werden, daneben zeigte sich eine erhöhte Zahl für andere myelinantigenspezifische T-Lymphozyten [152]. Prinzipiell ist durch eine vorangehende Immunisierung der Versuchstiere mit einem anderen Myelinantigen auch die Betrachtung anderer neuritogener T-Lymphozyten denkbar. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob sich mit anderen Zielpeptiden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit reproduzieren lassen. Die Fragestellung der Interaktion zwischen Myelin und T-Lymphozyt ist mit diesem spezifischen Myelinantigen möglich gewesen.

5.3.3. Der Myelin-T-Zell-Kontakt

Ein technisches Problem stellt die rein visuelle Auswertung der Kontakte zwischen Myelin und T-Lymphozyt im 2D-Bild dar. Hierbei lässt sich der direkte Kontakt nicht sicher belegen. Der T-Lymphozyt könnte im Raum über dem Myelin im Medium sein, ohne direkten Kontakt zum Myelin aufzunehmen. Hierbei sind weitere Versuche mittels 3D-Darstellung ein möglicher Ansatz zum Nachweis direkter Zellkontakte.

5.3.4. Aktivierte T-Lymphozyten

In unserem Versuchsaufbau wurden die T-Lymphozyten der Kontrollgruppe aus der Milz gesunder Versuchstiere entnommen. In der Milz befinden sich auch naive T-Lymphozyten, welche noch keinen Kontakt mit dem spezifischen Antigen hatten und daher noch nicht aktiviert sind. Dem gegenüber wurden T-Lymphozyten aus Lymphknoten nach einer Immunisierung entnommen. Diese enthalten daher mutmaßlich mehr aktivierte Lymphozyten. Eine alternative Option wäre eine Immunisierung mit einem nichtendogenen Protein, um ebenfalls aktivierte T-Lymphozyten aus einem Lymphknoten in ausreichender Zahl gewinnen zu können. Eine weitere Überprüfung der Vitalität und Funktionsfähigkeit der T-Lymphozyten erfolgte zudem nicht.

5.3.5. Stabilität der Färbungen

5.3.5.1. Stabilität der *Green-fatty-acid*-Färbung

Bei der *Green-fatty-acid*-Färbung zeigte sich aufgrund der regelmäßigen Belichtung ein ausgeprägtes Ausbleichen der Färbung über die Zeit, insbesondere bei erhöhter Bildfrequenz. Hieraus ergibt sich eine Limitierung der Methode bezüglich der Überwachungsdauer und der Frequenz der Bildaufnahmen. Daher eignet sich die Methode primär zur Beobachtung einer frühen Interaktion von T-Lymphozyten und Myelin.

5.3.5.2. Stabilität der *Orange-cell-tracker*-Färbung

Ähnlich dem Problem mit der *Green-fatty-acid*-Färbung verhält es sich mit dem *orange cell tracker*. Dieser zeigte sich in dem von uns gewählten Überwachungsintervall stabil, zeigt jedoch ebenso eine Reduzierung der Intensität über die Zeit. Auch hierdurch sind Überwachungsintervall und Bildfrequenz limitiert und stellen eine besondere Herausforderung dar.

5.4. Schlussfolgerung

Aufgrund des fehlenden Verständnisses des genauen Erkrankungsmechanismus autoimmuner peripherer Polyneuropathien besteht die Therapie in erster Linie aus unspezifischer Immunsuppression, beispielsweise mit Steroiden oder intravenösen Immunglobulinen. Die Hoffnung besteht weiterhin, langfristig durch ein besseres Verständnis der Erkrankung gezieltere Therapien entwickeln zu können [24, 112]. Dieses Modell eignet sich nicht zur Darstellung des komplexen Ablaufs der Erkrankung im menschlichen Körper. Es ermöglicht hingegen die Untersuchung klar definierter, einzelner Faktoren des Pathomechanismus. Die Entstehung einer Autoimmunerkrankung wird durch ein Zusammenspiel aus Zytokinen, Antikörpern, Komplementsystem, T- und B-Lymphozyten und Makrophagen gesteuert, deren Rolle im Weiteren entschlüsselt werden muss [23, 24]. Die Ergebnisse der Arbeit weisen auf eine relevante Rolle von sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Lymphozyten bei der Pathogenese von autoimmunen peripheren Polyneuropathien hin. Ebenso stellen SC einen möglichen Modulator im Rahmen der Entzündung dar. Weitere Forschungen sind nötig, um Erkenntnisse über die Interaktion zwischen T-Lymphozyten und Myelin mit dem Ziel spezifischer Therapieoptionen bei Patienten mit autoimmuner peripherer Polyneuropathie zu gewinnen.

Literaturverzeichnis

1. Markl, J., D. Sadava, D.M. Hillis, H.C. Heller, and S.D. Hacker, Nervenzellen, Gliazellen und Nervensysteme, in Purves Biologie. 10. Aufl. 2019, Berlin: Springer Spektrum: p: 1345-1376.
2. Campbell, E.O., R.A. Samlan, N.T. McMullen, S. Cook, S. Smiley-Jewell, and J. Barkmeier-Kraemer, Developmental changes in the connective tissues of the porcine recurrent laryngeal nerve. *J Anat*, 2013. 222(6): p. 625-33.
3. Trepel, M., Neuroanatomie. 6. Aufl. 2015, München: Elsevier, Urban & Fischer: p. 10-24
4. Garbay, B., A.M. Heape, F. Sargueil, and C. Cassagne, Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol*, 2000. 61(3): p. 267-304.
5. Kidd, G.J., N. Ohno, and B.D. Trapp, Biology of Schwann cells. *Handb Clin Neurol*, 2013. 115: p. 55-79.
6. Jessen, K.R. and R. Mirsky, The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci*, 2005. 6(9): p. 671-82.
7. Raphael, A.R. and W.S. Talbot, New insights into signaling during myelination in zebrafish. *Curr Top Dev Biol*, 2011. 97: p. 1-19.
8. Bunge, R.P., Glial cells and the central myelin sheath. *Physiol Rev*, 1968. 48(1): p. 197-251.
9. Meyer zu Horste, G., H. Heidenreich, A.K. Mausberg, H.C. Lehmann, A.L. ten Asbroek, J.T. Saavedra, F. Baas, H.P. Hartung, H. Wiendl, and B.C. Kieseier, Mouse Schwann cells activate MHC class I and II restricted T-cell responses, but require external peptide processing for MHC class II presentation. *Neurobiol Dis*, 2010. 37(2): p. 483-90.
10. Waxman, S.G. and J.M. Ritchie, Molecular dissection of the myelinated axon. *Ann Neurol*, 1993. 33(2): p. 121-36.
11. Hartline, D.K. and D.R. Colman, Rapid conduction and the evolution of giant axons and myelinated fibers. *Curr Biol*, 2007. 17(1): p. 29-35.
12. Bourque, P.R., J.W. Chardon, and R. Massie, Autoimmune peripheral neuropathies. *Clin Chim Acta*, 2015. 449: p. 37-42.
13. Bell, M.A. and A.G. Weddell, A descriptive study of the blood vessels of the sciatic nerve in the rat, man and other mammals. *Brain*, 1984. 107 (Pt 3): p. 871-98.
14. Yosef, N., R.H. Xia, and E.E. Ubogu, Development and characterization of a novel human in vitro blood-nerve barrier model using primary endoneurial endothelial cells. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2010. 69(1): p. 82-97.
15. Koller, H., B.C. Kieseier, S. Jander, and H.P. Hartung, Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *N Engl J Med*, 2005. 352(13): p. 1343-56.
16. Kanda, T., Biology of the blood-nerve barrier and its alteration in immune mediated neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2013. 84(2): p. 208-12.
17. Cornblath, D.R., D.E. Griffin, D. Welch, J.W. Griffin, and J.C. McArthur, Quantitative analysis of endoneurial T-cells in human sural nerve biopsies. *J Neuroimmunol*, 1990. 26(2): p. 113-8.
18. Griffin, J.W., R. George, and T. Ho, Macrophage systems in peripheral nerves. A review. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1993. 52(6): p. 553-60.
19. Ang, C.W., B.C. Jacobs, and J.D. Laman, The Guillain-Barre syndrome: a true case of molecular mimicry. *Trends Immunol*, 2004. 25(2): p. 61-6.
20. Murphy, K.P., Travers, P., Walport, M., and Janeway, C. A, Janeway Immunologie. 7. Aufl. 2009, Heidelberg u.a.: Spektrum, Akad. Verl. : p. 3-581.
21. Koch, U. and F. Radtke, Mechanisms of T cell development and transformation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011. 27: p. 539-62.
22. Moise, L., S. Beseme, R. Tassone, R. Liu, F. Kibria, F. Terry, W. Martin, and A.S. De Groot, T cell epitope redundancy: cross-conservation of the TCR face between pathogens and self and its implications for vaccines and autoimmunity. *Expert Rev Vaccines*, 2016. 15(5): p. 607-17.

23. Meyer zu Horste, G., H.P. Hartung, and B.C. Kieseier, From bench to bedside-- experimental rationale for immune-specific therapies in the inflamed peripheral nerve. *Nat Clin Pract Neurol*, 2007. 3(4): p. 198-211.
24. Wong, A.H. and N. Yuki, Autoimmune inflammatory neuropathies: updates in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Curr Opin Neurol*, 2015. 28(5): p. 468-73.
25. Kieseier, B.C., R. Kiefer, R. Gold, B. Hemmer, H.J. Willison, and H.P. Hartung, Advances in understanding and treatment of immune-mediated disorders of the peripheral nervous system. *Muscle Nerve*, 2004. 30(2): p. 131-56.
26. Hughes, R.A. and D.R. Cornblath, Guillain-Barre syndrome. *Lancet*, 2005. 366(9497): p. 1653-66.
27. Hughes, R., Chronic Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy. *J Clin Immunol*, 2010. 30 Suppl 1: p. S70-3.
28. Van den Bergh, P.Y., R.D. Hadden, P. Bouche, D.R. Cornblath, A. Hahn, I. Illa, C.L. Koski, J.M. Leger, E. Nobile-Orazio, J. Pollard, C. Sommer, P.A. van Doorn, and I.N. van Schaik, European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society - first revision. *Eur J Neurol*, 2010. 17(3): p. 356-63.
29. Walling, A.D. and G. Dickson, Guillain-Barre syndrome. *Am Fam Physician*, 2013. 87(3): p. 191-7.
30. Vallat, J.M., C. Sommer, and L. Magy, Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: diagnostic and therapeutic challenges for a treatable condition. *Lancet Neurol*, 2010. 9(4): p. 402-12.
31. Willison, H.J., B.C. Jacobs, and P.A. van Doorn, Guillain-Barre syndrome. *Lancet*, 2016. 388(10045): p. 717-27.
32. Lewis, R.A. and A.J. Sumner, The electrodiagnostic distinctions between chronic familial and acquired demyelinating neuropathies. *Neurology*, 1982. 32(6): p. 592-6.
33. Kohne, A., M. Stettner, P. Jangouk, T. Dehmel, H.P. Hartung, H.C. Lehmann, and B.C. Kieseier, Fingolimod impedes Schwann cell-mediated myelination: implications for the treatment of immune neuropathies? *Arch Neurol*, 2012. 69(10): p. 1280-9.
34. Austin, J.H., Recurrent polyneuropathies and their corticosteroid treatment; with five-year observations of a placebo-controlled case treated with corticotrophin, cortisone, and prednisone. *Brain*, 1958. 81(2): p. 157-92.
35. Rodriguez, Y., N. Vatti, C. Ramirez-Santana, C. Chang, O. Mancera-Paez, M.E. Gershwin, and J.M. Anaya, Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy as an autoimmune disease. *J Autoimmun*, 2019. 102:p.8-37.
36. Esposito, S. and M.R. Longo, Guillain-Barre syndrome. *Autoimmun Rev*, 2017. 16(1): p. 96-101.
37. Yuki, N. and H.P. Hartung, Guillain-Barre syndrome. *N Engl J Med*, 2012. 366(24): p. 2294-304.
38. Kuwabara, S., Guillain-Barre syndrome: epidemiology, pathophysiology and management. *Drugs*, 2004. 64(6): p. 597-610.
39. Burns, T.M., Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Arch Neurol*, 2004. 61(6): p. 973-5.
40. Ogawara, K., S. Kuwabara, M. Mori, T. Hattori, M. Koga, and N. Yuki, Axonal Guillain-Barre syndrome: relation to anti-ganglioside antibodies and *Campylobacter jejuni* infection in Japan. *Ann Neurol*, 2000. 48(4): p. 624-31.
41. Jacobs, B.C., P.H. Rothbarth, F.G. van der Meche, P. Herbrink, P.I. Schmitz, M.A. de Klerk, and P.A. van Doorn, The spectrum of antecedent infections in Guillain-Barre syndrome: a case-control study. *Neurology*, 1998. 51(4): p. 1110-5.
42. Yuki, N., T. Taki, F. Inagaki, T. Kasama, M. Takahashi, K. Saito, S. Handa, and T. Miyatake, A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barre syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *J Exp Med*, 1993. 178(5): p. 1771-5.

43. Ang, C.W., M.A. De Klerk, H.P. Endtz, B.C. Jacobs, J.D. Laman, F.G. van der Meche, and P.A. van Doorn, Guillain-Barre syndrome- and Miller Fisher syndrome-associated *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides induce anti-GM1 and anti-GQ1b Antibodies in rabbits. *Infect Immun*, 2001. 69(4): p. 2462-9.
44. Yuki, N., K. Susuki, M. Koga, Y. Nishimoto, M. Odaka, K. Hirata, K. Taguchi, T. Miyatake, K. Furukawa, T. Kobata, and M. Yamada, Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide causes Guillain-Barre syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(31): p. 11404-9.
45. Kieseier, B.C., E.K. Mathey, C. Sommer, and H.P. Hartung, Immune-mediated neuropathies. *Nat Rev Dis Primers*, 2018. 4(1): p. 31.
46. Yang, M., C. Peyret, X.Q. Shi, N. Siron, J.H. Jang, S. Wu, S. Fournier, and J. Zhang, Evidence from Human and Animal Studies: Pathological Roles of CD8(+) T Cells in Autoimmune Peripheral Neuropathies. *Front Immunol*, 2015. 6: p. 532.
47. Dalakas, M.C., Pathogenesis of immune-mediated neuropathies. *Biochim Biophys Acta*, 2015. 1852(4): p. 658-66.
48. Soliven, B., Animal models of autoimmune neuropathy. *Ilar j*, 2014. 54(3): p. 282-90.
49. Maurer, M., K.V. Toyka, and R. Gold, Immune mechanisms in acquired demyelinating neuropathies: lessons from animal models. *Neuromuscul Disord*, 2002. 12(4): p. 405-14.
50. Taylor, J.M. and J.D. Pollard, Neurophysiological changes in demyelinating and axonal forms of acute experimental autoimmune neuritis in the Lewis rat. *Muscle Nerve*, 2003. 28(3): p. 344-52.
51. Smith, M.E., L.S. Forno, and W.W. Hofmann, Experimental allergic neuritis in the Lewis rat. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1979. 38(4): p. 377-91.
52. Hughes, R.A., M. Kadlubowski, I.A. Gray, and S. Leibowitz, Immune responses in experimental allergic neuritis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1981. 44(7): p. 565-9.
53. Heininger, K., G. Stoll, C. Linington, K.V. Toyka, and H. Wekerle, Conduction failure and nerve conduction slowing in experimental allergic neuritis induced by P2-specific T-cell lines. *Ann Neurol*, 1986. 19(1): p. 44-9.
54. Koehler, N.K., R. Martin, and H. Wiethölter, The antibody repertoire in experimental allergic neuritis: evidence for PMP-22 as a novel neuritogen. *J Neuroimmunol*, 1996. 71(1-2): p. 179-89.
55. Hahn, A.F., T.E. Feasby, and J.J. Gilbert, Blood-nerve barrier studies in experimental allergic neuritis. *Acta Neuropathol*, 1985. 68(2): p. 101-9.
56. Hahn, A.F., Experimental allergic neuritis (EAN) as a model for the immune-mediated demyelinating neuropathies. *Rev Neurol (Paris)*, 1996. 152(5): p. 328-32.
57. Shimizu, F., S. Sawai, Y. Sano, M. Beppu, S. Misawa, H. Nishihara, M. Koga, S. Kuwabara, and T. Kanda, Severity and patterns of blood-nerve barrier breakdown in patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: correlations with clinical subtypes. *PLoS One*, 2014. 9(8): p. e104205.
58. Archelos, J.J., S.C. Previtali, and H.P. Hartung, The role of integrins in immune-mediated diseases of the nervous system. *Trends Neurosci*, 1999. 22(1): p. 30-8.
59. Kieseier, B.C., J.M. Clements, H.B. Pischel, G.M. Wells, K. Miller, A.J. Gearing, and H.P. Hartung, Matrix metalloproteinases MMP-9 and MMP-7 are expressed in experimental autoimmune neuritis and the Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol*, 1998. 43(4): p. 427-34.
60. Asbury, A.K., B.G. Arnason, and R.D. Adams, The inflammatory lesion in idiopathic polyneuritis. Its role in pathogenesis. *Medicine (Baltimore)*, 1969. 48(3): p. 173-215.
61. Matsumuro, K., S. Izumo, F. Umehara, and M. Osame, Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: histological and immunopathological studies on biopsied sural nerves. *J Neurol Sci*, 1994. 127(2): p. 170-8.
62. Ubogu, E.E., Inflammatory neuropathies: pathology, molecular markers and targets for specific therapeutic intervention. *Acta Neuropathol*, 2015. 130(4): p. 445-68.

63. Winer, J., S. Hughes, J. Cooper, A. Ben-Smith, and C. Savage, gamma delta T cells infiltrating sensory nerve biopsies from patients with inflammatory neuropathy. *J Neurol*, 2002. 249(5): p. 616-21.
64. Rostami, A., J.B. Burns, M.J. Brown, J. Rosen, B. Zweiman, R.P. Lisak, and D.E. Pleasure, Transfer of experimental allergic neuritis with P2-reactive T-cell lines. *Cell Immunol*, 1985. 91(2): p. 354-61.
65. Brosnan, J.V., R.I. Craggs, R.H. King, and P.K. Thomas, Reduced susceptibility of T cell-deficient rats to induction of experimental allergic neuritis. *J Neuroimmunol*, 1987. 14(3): p. 267-82.
66. Jung, S., S. Kramer, H.J. Schluesener, T. Hunig, K. Toyka, and H.P. Hartung, Prevention and therapy of experimental autoimmune neuritis by an antibody against T cell receptors-alpha/beta. *J Immunol*, 1992. 148(12): p. 3768-75.
67. Hartung, H.P. and K.V. Toyka, T-cell and macrophage activation in experimental autoimmune neuritis and Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol*, 1990. 27 Suppl: p. S57-63.
68. Luckheeram, R.V., R. Zhou, A.D. Verma, and B. Xia, CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*, 2012. 2012: p. 925135.
69. Lee, G.R., The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. *Int J Mol Sci*, 2018. 19(3). p.730.
70. Taylor, J.M. and J.D. Pollard, Dominance of autoreactive T cell-mediated delayed-type hypersensitivity or antibody-mediated demyelination results in distinct forms of experimental autoimmune neuritis in the Lewis rat. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2001. 60(6): p. 637-46.
71. Dahle, C., M. Vrethem, and J. Ernerudh, T lymphocyte subset abnormalities in peripheral blood from patients with the Guillain-Barre syndrome. *J Neuroimmunol*, 1994. 53(2): p. 219-25.
72. Mucida, D., M.M. Husain, S. Muroi, F. van Wijk, R. Shinnakasu, Y. Naoe, B.S. Reis, Y. Huang, F. Lambolez, M. Docherty, A. Attinger, J.W. Shui, G. Kim, C.J. Lena, S. Sakaguchi, C. Miyamoto, P. Wang, K. Atarashi, Y. Park, T. Nakayama, K. Honda, W. Ellmeier, M. Kronenberg, I. Taniuchi, and H. Cheroutre, Transcriptional reprogramming of mature CD4⁺ helper T cells generates distinct MHC class II-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Nat Immunol*, 2013. 14(3): p. 281-9.
73. Spierings, E., T. De Boer, L. Zulianello, and T.H. Ottenhoff, The role of Schwann cells, T cells and Mycobacterium leprae in the immunopathogenesis of nerve damage in leprosy. *Lepr Rev*, 2000. 71 Suppl: p. S121-9.
74. Spierings, E., T. De Boer, L. Zulianello, and T.H. Ottenhoff, Novel mechanisms in the immunopathogenesis of leprosy nerve damage: the role of Schwann cells, T cells and Mycobacterium leprae. *Immunol Cell Biol*, 2000. 78(4): p. 349-55.
75. Spierings, E., T. de Boer, B. Wieles, L.B. Adams, E. Marani, and T.H. Ottenhoff, Mycobacterium leprae-specific, HLA class II-restricted killing of human Schwann cells by CD4⁺ Th1 cells: a novel immunopathogenic mechanism of nerve damage in leprosy. *J Immunol*, 2001. 166(10): p. 5883-8.
76. Mittrücker, H.W., A. Visekruna, and M. Huber, Heterogeneity in the differentiation and function of CD8⁺ T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2014. 62(6): p. 449-58.
77. Mausberg, A.K., M. Dorok, M. Stettner, M. Muller, H.P. Hartung, T. Dehmel, C. Warnke, G. Meyer Zu Horste, and B.C. Kieseier, Recovery of the T-cell repertoire in CIDP by IV immunoglobulins. *Neurology*, 2013. 80(3): p. 296-303.
78. Nutt, S.L., P.D. Hodgkin, D.M. Tarlinton, and L.M. Corcoran, The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol*, 2015. 15(3): p. 160-71.
79. Basta, M., I. Illa, and M.C. Dalakas, Increased in vitro uptake of the complement C3b in the serum of patients with Guillain-Barre syndrome, myasthenia gravis and dermatomyositis. *J Neuroimmunol*, 1996. 71(1-2): p. 227-9.

80. Hafer-Macko, C.E., K.A. Sheikh, C.Y. Li, T.W. Ho, D.R. Cornblath, G.M. McKhann, A.K. Asbury, and J.W. Griffin, Immune attack on the Schwann cell surface in acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol*, 1996. 39(5): p. 625-35.
81. Halstead, S.K., G.M. O'Hanlon, P.D. Humphreys, D.B. Morrison, B.P. Morgan, A.J. Todd, J.J. Plomp, and H.J. Willison, Anti-disialoside antibodies kill perisynaptic Schwann cells and damage motor nerve terminals via membrane attack complex in a murine model of neuropathy. *Brain*, 2004. 127(Pt 9): p. 2109-23.
82. Cabeza-Cabrerizo, M., A. Cardoso, C.M. Minutti, M. Pereira da Costa, and C. Reis e Sousa, Dendritic Cells Revisited. *Annu Rev Immunol*, 2021. 39: p. 131-166.
83. Press, R., I. Nennesmo, M. Kouwenhoven, Y.M. Huang, H. Link, and M. Pashenkov, Dendritic cells in the cerebrospinal fluid and peripheral nerves in Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neuroimmunol*, 2005. 159(1-2): p. 165-76.
84. Hartung, H.P., B. Schafer, K. Heininger, G. Stoll, and K.V. Toyka, The role of macrophages and eicosanoids in the pathogenesis of experimental allergic neuritis. Serial clinical, electrophysiological, biochemical and morphological observations. *Brain*, 1988. 111 (Pt 5): p. 1039-59.
85. Kiefer, R., B.C. Kieseier, G. Stoll, and H.P. Hartung, The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol*, 2001. 64(2): p. 109-27.
86. Tsai, C.P., J.D. Pollard, and P.J. Armati, Interferon-gamma inhibition suppresses experimental allergic neuritis: modulation of major histocompatibility complex expression of Schwann cells in vitro. *J Neuroimmunol*, 1991. 31(2): p. 133-45.
87. Samuel, N.M., K.R. Jessen, J.M. Grange, and R. Mirsky, Gamma interferon, but not *Mycobacterium leprae*, induces major histocompatibility class II antigens on cultured rat Schwann cells. *J Neurocytol*, 1987. 16(2): p. 281-7.
88. Armati, P.J., M. Karakotchian, J.D. Pollard, and A.L. Constable, The effect of exposure time to interferon-gamma on MHC molecule expression in cultures of human dorsal root ganglia. *Mol Cell Neurosci*, 1990. 1(1): p. 49-57.
89. Pollard, J.D., P.A. McCombe, J. Baverstock, P.A. Gatenby, and J.G. McLeod, Class II antigen expression and T lymphocyte subsets in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neuroimmunol*, 1986. 13(2): p. 123-34.
90. Pollard, J.D., J. Baverstock, and J.G. McLeod, Class II antigen expression and inflammatory cells in the Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol*, 1987. 21(4): p. 337-41.
91. Meyer Zu Horste, G., H. Heidenreich, H.C. Lehmann, S. Ferrone, H.P. Hartung, H. Wiendl, and B.C. Kieseier, Expression of antigen processing and presenting molecules by Schwann cells in inflammatory neuropathies. *Glia*, 2010. 58(1): p. 80-92.
92. Li, S., M. Yu, H. Li, H. Zhang, and Y. Jiang, IL-17 and IL-22 in cerebrospinal fluid and plasma are elevated in Guillain-Barre syndrome. *Mediators Inflamm*, 2012. 2012: p. 260473.
93. Argall, K.G., P.J. Armati, J.D. Pollard, and J. Bonner, Interactions between CD4+ T-cells and rat Schwann cells in vitro. 2. Cytotoxic effects of P2-specific CD4+ T-cell lines on Lewis rat Schwann cells. *J Neuroimmunol*, 1992. 40(1): p. 19-29.
94. Stettner, M., B. Lohmann, K. Wolffram, J.P. Weinberger, T. Dehmel, H.P. Hartung, A.K. Mausberg, and B.C. Kieseier, Interleukin-17 impedes Schwann cell-mediated myelination. *J Neuroinflammation*, 2014. 11: p. 63.
95. Schneider-Hohendorf, T., N. Schwab, N. Uceyler, K. Gobel, C. Sommer, and H. Wiendl, CD8+ T-cell immunity in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Neurology*, 2012. 78(6): p. 402-8.
96. Stettner, M., K. Wolffram, A.K. Mausberg, C. Wolf, S. Heikaus, A. Derksen, T. Dehmel, and B.C. Kieseier, A reliable in vitro model for studying peripheral nerve myelination in mouse. *Journal of Neuroscience Methods*, 2013. 214(1): p. 69-79.

97. Jung, S., S. Gaupp, H.P. Hartung, and K.V. Toyka, Oral tolerance in experimental autoimmune neuritis (EAN) of the Lewis rat. II. Adjuvant effects and bystander suppression in P2 peptide-induced EAN. *J Neuroimmunol*, 2001. 116(1): p. 21-8.
98. Strober, W., Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*, 2015. 111: p. A3.B.1-a3.B.3.
99. Laghmouchi, A., C. Hoogstraten, J.H.F. Falkenburg, and I. Jedema, Long-term in vitro persistence of magnetic properties after magnetic bead-based cell separation of T cells. *Scand J Immunol*, 2020. 92(3): p. e12924.
100. Jayasinghe, S.N., Reimagining Flow Cytometric Cell Sorting. *Adv Biosyst*, 2020. 4(8): p. e2000019.
101. O'Brien, J.S., E.L. Sampson, and M.B. Stern, Lipid composition of myelin from the peripheral nervous system. Intradural spinal roots. *J Neurochem*, 1967. 14(3): p. 357-65.
102. Di Scipio, F., S. Raimondo, P. Tos, and S. Geuna, A simple protocol for paraffin-embedded myelin sheath staining with osmium tetroxide for light microscope observation. *Microsc Res Tech*, 2008. 71(7): p. 497-502.
103. Stilwell, D.L., A sudan black B myelin stain for peripheral nerves. *Stain Technol*, 1957. 32(1): p. 19-23.
104. Pfüller, U., H. Franz, and A. Preiss, Sudan Black B: chemical structure and histochemistry of the blue main components. *Histochemistry*, 1977. 54(3): p. 237-50.
105. Weise, M.J., D. Hsieh, P.M. Hoffman, J.M. Powers, and S.W. Brostoff, Bovine peripheral nervous system myelin P2 protein: chemical and immunological characterization of the cyanogen bromide peptides. *J Neurochem*, 1980. 35(2): p. 393-9.
106. Petrie, R.J., A.D. Doyle, and K.M. Yamada, Random versus directionally persistent cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. 10(8): p. 538-49.
107. Sanvito, L., A. Makowska, N. Gregson, R. Nemni, and R.A. Hughes, Circulating subsets and CD4(+)CD25(+) regulatory T cell function in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Autoimmunity*, 2009. 42(8): p. 667-77.
108. Meyer zu Horste, G., W. Hu, H.P. Hartung, H.C. Lehmann, and B.C. Kieseier, The immunocompetence of Schwann cells. *Muscle Nerve*, 2008. 37(1): p. 3-13.
109. Gold, R., H.P. Hartung, and K.V. Toyka, Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Mol Med Today*, 2000. 6(2): p. 88-91.
110. Zhu, Y., L. Bao, S. Zhu, Z. Chen, P. van der Meide, I. Nennesmo, B. Winblad, H.G. Ljunggren, and J. Zhu, CD4 and CD8 T cells, but not B cells, are critical to the control of murine experimental autoimmune neuritis. *Exp Neurol*, 2002. 177(1): p. 314-20.
111. Linington, C., S. Izumo, M. Suzuki, K. Uyemura, R. Meyermann, and H. Wekerle, A permanent rat T cell line that mediates experimental allergic neuritis in the Lewis rat in vivo. *J Immunol*, 1984. 133(4): p. 1946-50.
112. Heming, M., A. Schulte-Mecklenbeck, T. Brix, J. Wolbert, T. Ruland, L. Klotz, S.G. Meuth, C.C. Gross, H. Wiendl, and G. Meyer Zu Horste, Immune Cell Profiling of the Cerebrospinal Fluid Provides Pathogenetic Insights Into Inflammatory Neuropathies. *Front Immunol*, 2019. 10: p. 515.
113. Hartung, H.P., K. Reiners, B. Schmidt, G. Stoll, and K.V. Toyka, Serum interleukin-2 concentrations in Guillain-Barre syndrome and chronic idiopathic demyelinating polyradiculoneuropathy: comparison with other neurological diseases of presumed immunopathogenesis. *Ann Neurol*, 1991. 30(1): p. 48-53.
114. Csurhes, P.A., A.A. Sullivan, K. Green, M.P. Pender, and P.A. McCombe, T cell reactivity to P0, P2, PMP-22, and myelin basic protein in patients with Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 2005. 76(10): p. 1431-1439.
115. Klehmet, J., C. Meisel, and A. Meisel, Efficiency of long-term treatment with intravenous immunoglobulins correlates with reduced autoreactive T cell responses in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy patients. *Clin Exp Immunol*, 2014. 178 Suppl 1: p. 149-50.

116. Hou, H.Q., J. Miao, X.D. Feng, M. Han, X.J. Song, and L. Guo, Changes in lymphocyte subsets in patients with Guillain-Barré syndrome treated with immunoglobulin. *BMC Neurol*, 2014. 14: p. 202.
117. Wanschitz, J., H. Maier, H. Lassmann, H. Budka, and T. Berger, Distinct time pattern of complement activation and cytotoxic T cell response in Guillain-Barre syndrome. *Brain*, 2003. 126(Pt 9): p. 2034-42.
118. Brannagan, T.H., 3rd and Y. Zhou, HIV-associated Guillain-Barré syndrome. *J Neurol Sci*, 2003. 208(1-2): p. 39-42.
119. Yang, M., X.Q. Shi, C. Peyret, O. Oladiran, S. Wu, J. Chambon, S. Fournier, and J. Zhang, Effector/memory CD8(+) T cells synergize with co-stimulation competent macrophages to trigger autoimmune peripheral neuropathy. *Brain Behav Immun*, 2018. 71: p. 142-157.
120. Allt, G., The node of Ranvier in experimental allergic neuritis: an electron microscope study. *J Neurocytol*, 1975. 4(1): p. 63-76.
121. Brostoff, S.W., S. Levit, and J.M. Powers, Induction of experimental allergic neuritis with a peptide from myelin P2 basic protein. *Nature*, 1977. 268(5622): p. 752-3.
122. Nyati, K.K., K.N. Prasad, A. Rizwan, A. Verma, and V.K. Paliwal, TH1 and TH2 response to *Campylobacter jejuni* antigen in Guillain-Barre syndrome. *Arch Neurol*, 2011. 68(4): p. 445-52.
123. Sun, T., X. Chen, S. Shi, Q. Liu, and Y. Cheng, Peripheral Blood and Cerebrospinal Fluid Cytokine Levels in Guillain Barré Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Neurosci*, 2019. 13: p. 717.
124. Che, Y., J. Qiu, T. Jin, F. Yin, M. Li, and Y. Jiang, Circulating memory T follicular helper subsets, Tfh2 and Tfh17, participate in the pathogenesis of Guillain-Barré syndrome. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 20963.
125. Meyer zu Horste, G., S. Cordes, A.K. Mausberg, A.L. Zozulya, C. Wessig, T. Sparwasser, C. Mathys, H. Wiendl, H.P. Hartung, and B.C. Kieseier, FoxP3+ regulatory T cells determine disease severity in rodent models of inflammatory neuropathies. *PLoS One*, 2014. 9(10): p. e108756.
126. Argall, K.G., P.J. Armati, J.D. Pollard, E. Watson, and J. Bonner, Interactions between CD4+ T-cells and rat Schwann cells in vitro. 1. Antigen presentation by Lewis rat Schwann cells to P2-specific CD4+ T-cell lines. *J Neuroimmunol*, 1992. 40(1): p. 1-18.
127. Marshall, N.B. and S.L. Swain, Cytotoxic CD4 T cells in antiviral immunity. *J Biomed Biotechnol*, 2011. 2011: p. 954602.
128. Koike, H. and M. Katsuno, Pathophysiology of Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy: Insights into Classification and Therapeutic Strategy. *Neurol Ther*, 2020. 9(2):p. 213-227.
129. Weaver, C.T., R.D. Hatton, P.R. Mangan, and L.E. Harrington, IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol*, 2007. 25: p. 821-52.
130. Kim, C.F. and G. Moalem-Taylor, Interleukin-17 contributes to neuroinflammation and neuropathic pain following peripheral nerve injury in mice. *J Pain*, 2011. 12(3): p. 370-83.
131. Liu, S., Y. Liu, Z. Xiao, S. Pan, Q. Gong, and Z. Lu, Th17 cells and their cytokines serve as potential therapeutic target in experimental autoimmune neuritis. *Brain Behav*, 2019. 9(12): p. e01478.
132. Chi, L.J., W.H. Xu, Z.W. Zhang, H.T. Huang, L.M. Zhang, and J. Zhou, Distribution of Th17 cells and Th1 cells in peripheral blood and cerebrospinal fluid in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst*, 2010. 15(4): p. 345-56.
133. Komiyama, Y., S. Nakae, T. Matsuki, A. Nambu, H. Ishigame, S. Kakuta, K. Sudo, and Y. Iwakura, IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 2006. 177(1): p. 566-73.
134. Li, J., G.H. Wei, H. Huang, Y.P. Lan, B. Liu, H. Liu, W. Zhang, and Y.X. Zuo, Nerve injury-related autoimmunity activation leads to chronic inflammation and chronic neuropathic pain. *Anesthesiology*, 2013. 118(2): p. 416-29.

135. Wekerle, H., M. Schwab, C. Linington, and R. Meyermann, Antigen presentation in the peripheral nervous system: Schwann cells present endogenous myelin autoantigens to lymphocytes. *Eur J Immunol*, 1986. 16(12): p. 1551-7.
136. Gay, D., P. Maddon, R. Sekaly, M.A. Talle, M. Godfrey, E. Long, G. Goldstein, L. Chess, R. Axel, J. Kappler, and et al., Functional interaction between human T-cell protein CD4 and the major histocompatibility complex HLA-DR antigen. *Nature*, 1987. 328(6131): p. 626-9.
137. Kambayashi, T. and T.M. Laufer, Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nat Rev Immunol*, 2014. 14(11): p. 719-30.
138. Lilje, O., The processing and presentation of endogenous and exogenous antigen by Schwann cells in vitro. *Cell Mol Life Sci*, 2002. 59(12): p. 2191-8.
139. Hartlehnert, M., A. Derksen, T. Hagenacker, D. Kindermann, M. Schäfers, M. Pawlak, B.C. Kieseier, and G. Meyer Zu Horste, Schwann cells promote post-traumatic nerve inflammation and neuropathic pain through MHC class II. *Sci Rep*, 2017. 7(1): p. 12518.
140. Allard, D.E., Y. Wang, J.J. Li, B. Conley, E.W. Xu, D. Sailer, C. Kimpston, R. Notini, C.J. Smith, E. Koseoglu, J. Starmer, X.L. Zeng, J.F. Howard, Jr., A. Hoke, S.S. Scherer, and M.A. Su, Schwann cell-derived periostin promotes autoimmune peripheral polyneuropathy via macrophage recruitment. *J Clin Invest*, 2018. 128(10): p. 4727-4741.
141. Bonetti, B., P. Valdo, G. Ossi, L. De Toni, B. Masotto, S. Marconi, N. Rizzuto, E. Nardelli, and G. Moretto, T-cell cytotoxicity of human Schwann cells: TNFalpha promotes fasL-mediated apoptosis and IFN gamma perforin-mediated lysis. *Glia*, 2003. 43(2): p. 141-8.
142. Van Rhijn, I., L.H. Van den Berg, W.M. Bosboom, H.G. Otten, and T. Logtenberg, Expression of accessory molecules for T-cell activation in peripheral nerve of patients with CIDP and vasculitic neuropathy. *Brain*, 2000. 123 (Pt 10): p. 2020-9.
143. Tofaris, G.K., P.H. Patterson, K.R. Jessen, and R. Mirsky, Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. *J Neurosci*, 2002. 22(15): p. 6696-703.
144. Gruter, T., A. Blusch, J. Motte, M. Sgodzai, H. Bachir, R. Klimas, B. Ambrosius, R. Gold, G. Ellrichmann, and K. Pitarokoili, Immunomodulatory and anti-oxidative effect of the direct TRPV1 receptor agonist capsaicin on Schwann cells. *J Neuroinflammation*, 2020. 17(1): p. 145.
145. Yuan, X.J., Y.J. Wei, Q. Ao, K. Gong, J.Y. Wang, Q.S. Sun, L. Zhang, Z.C. Zheng, and L. Chen, Myelin ultrastructure of sciatic nerve in rat experimental autoimmune neuritis model and its correlation with associated protein expression. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015. 8(7): p. 7849-58.
146. Trepel, M., *Neuroanatomie*. 6. Aufl. 2015, München: Elsevier, Urban & Fischer: p. 10-27.
147. Mathey, E.K., S.B. Park, R.A. Hughes, J.D. Pollard, P.J. Armati, M.H. Barnett, B.V. Taylor, P.J. Dyck, M.C. Kiernan, and C.S. Lin, Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: from pathology to phenotype. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2015. 86(9): p. 973-85.
148. Lehmann, H.C., D. Burke, and S. Kuwabara, Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: update on diagnosis, immunopathogenesis and treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2019. p. 981-987.
149. Rotta, F.T., A.T. Sussman, W.G. Bradley, D. Ram Ayyar, K.R. Sharma, and R.T. Shebert, The spectrum of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neurol Sci*, 2000. 173(2): p. 129-39.
150. Ogawa-Goto, K., N. Funamoto, Y. Ohta, T. Abe, and K. Nagashima, Myelin gangliosides of human peripheral nervous system: an enrichment of GM1 in the motor nerve myelin isolated from cauda equina. *J Neurochem*, 1992. 59(5): p. 1844-9.
151. Yu, R.K., S. Usuki, and T. Ariga, Ganglioside molecular mimicry and its pathological roles in Guillain-Barre syndrome and related diseases. *Infect Immun*, 2006. 74(12): p. 6517-27.

152. Staudt, M., J.M. Diederich, C. Meisel, A. Meisel, and J. Klehmet, Differences in peripheral myelin antigen-specific T cell responses and T memory subsets in atypical versus typical CIDP. *BMC Neurol*, 2017. 17(1): p. 81.

BioRender.com Lizenznummer Abb.1: CY24CZGXVY

BioRender.com Lizenznummer Abb.2: AD24CZPP2R