

Aus dem Institut für Molekulare und Klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Untersuchungen zur Wirkung von Zink-Hydrogenaspartat auf die T-Zell-Aktivierung
in vitro und zum therapeutischen Potenzial einer oralen Applikation dieses Arzneimittels
in der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis
als Tiermodell der Multiplen Sklerose**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Claudia Schubert

aus Zwickau

Magdeburg 2015

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Schubert, Claudia:

Untersuchungen zur Wirkung von Zink-Hydrogenaspartat auf die T-Zell-Aktivierung *in vitro* und zum therapeutischen Potenzial einer oralen Applikation dieses Arzneimittels in der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis als Tiermodell der Multiplen Sklerose.

- 2015. - 91 Bl., 20 Abb., 6 Tab., 1 Anl.

Kurzreferat

Dem essentiellen Spurenelement Zink wird eine entscheidende regulatorische Rolle in der Immunhomöostase zugeschrieben. Humane Zinkmangelzustände sind häufig mit gestörten Immunfunktionen vergesellschaftet. Darüber hinaus wurden immunsuppressive Wirkungen des Biometalls in T-Zell-vermittelter Autoimmunität wie der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einem anerkannten Tiermodell der Multiplen Sklerose (MS) gezeigt. Untersuchungen der vorliegenden Arbeit belegen dosisabhängige suppressive Effekte von Zink-Hydrogenaspartat (Zink-HA), einem zugelassenen Arzneimittel mit sehr guter Bioverfügbarkeit, auf anti-CD3/CD28-Antikörper- und Pokeweed-Mitogen-stimulierte humane T-Zellen sowie murine Splenozyten, ohne dabei die Zellvitalität zu beeinflussen. Dies betrifft die Immunzellproliferation und deren Zytokinproduktion, wie IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-5 und IL-10. Des Weiteren wurde die Wirksamkeit einer 10-tägigen oralen Zink-HA-Applikation in der aktiven EAE an SJL/J-Mäusen geprüft. Eine perorale Therapie mit 6 μ g bzw. 12 μ g Zink-HA/Tag (0,3 bzw. 0,6 mg/kg Körpergewicht) in der Akutphase der EAE bewirkte eine signifikante Reduktion des Schweregrades der Erkrankung für mehr als 60 Tage nach Therapieende. Histopathologische Analysen des Rückenmarks erkrankter Tiere nach 10-tägiger oraler Zink-HA-Behandlung zeigten eine reduzierte Anzahl infiltrierender inflammatorischer Zellen und bestätigten somit die klinischen Befunde. Die Ergebnisse der Arbeit verdeutlichen das regulatorische Potential von Zink bei T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen. In zukünftigen klinischen Studien sollte der mögliche Einsatz einer kontrollierten immunsuppressiven Zinktherapie bei derartigen Erkrankungen geprüft werden.

Schlüsselwörter: Zink-Hydrogenaspartat, Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-10, IL-5, T-Zell-Aktivierung, Multiple Sklerose (MS)

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	V
1. EINLEITUNG	1
1.1 Das menschliche Immunsystem	1
1.2 Das Spurenelement Zink	2
1.2.1 Bedeutung von Zink für Körper und Stoffwechsel	3
1.2.2 Einfluss von Zink auf das Immunsystem	5
1.2.3 Zink und Autoimmunerkrankungen	8
1.3 Multiple Sklerose	9
1.3.1 Ätiologie der MS	9
1.3.2 Immunpathogenese der MS	10
1.3.3 Klinisches Bild und Verlauf der MS	15
1.3.4 Therapie der MS	15
1.4 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)	16
2. ZIELSTELLUNG DER ARBEIT	20
3. MATERIAL UND METHODEN	21
3.1 Material	21
3.1.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterial	21
3.1.2 Puffer und Medien	22
3.1.3 Geräte	22
3.1.4 Software	23
3.1.5 Antikörper	23
3.2 Methoden	24
3.2.1 Gewinnung von MNZ aus humanem peripheren Blut	24
3.2.2 Isolation von T-Zellen aus humanen MNZ	25
3.2.3 Messung der Zellvitalität	26
3.2.4 Messung der DNA-Synthese stimulierter humaner T-Zellen	27
3.2.5 Gewinnung humaner Zellkulturüberstände	28
3.2.6 Humaner Zytokin-Array	28
3.2.7 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	29

3.2.8	Separation muriner Zellen	30
3.2.9	Messung der DNA-Synthese stimulierter Splenozyten der Maus	31
3.2.10	Versuchstiere	32
3.2.11	Induktion der EAE an SJL/J-Mäusen	32
3.2.12	Therapeutische Applikationen von Zink-HA im klinischen Verlauf der EAE	33
3.2.13	Evaluierung des klinischen Schweregrades der EAE	33
3.2.14	Histopathologie des ZNS EAE-erkrankter SJL/J-Mäuse	34
3.2.15	Statistische Methoden	35
4.	ERGEBNISSE	36
4.1	Untersuchungen zur Wirkung von Zink-HA auf die DNA-Synthese und Zytokinproduktion stimulierter humaner T-Zellen	36
4.2	Untersuchungen zur Wirkung von Zink-HA auf die DNA-Synthese und Zytokinproduktion stimulierter Splenozyten der Maus	45
4.3	Untersuchungen zum klinischen Verlauf der EAE in SJL/J-Mäusen bei peroraler Therapie mit Zink-HA	49
4.4	Histopathologische Untersuchungen zur Wirkung von Zink-HA auf das ZNS von EAE-erkrankten SJL/J-Mäusen	54
5.	DISKUSSION	56
6.	ZUSAMMENFASSUNG	68
7.	LITERATURVERZEICHNIS	70
8.	DANKSAGUNG	85
9.	ERKLÄRUNG	86
10.	CURRICULUM VITAE	87
11.	LISTE DER VERÖFFENTLICHUNGEN	89
12.	ANHANG	90
12.1	Übersicht der Zytokine und Chemokine des Zytokin-Arrays	90

Abkürzungsverzeichnis

2-ME	2-Mercaptoethanol
ACK-Puffer	Ammonium-Chloride-Potassium-Puffer
AIMV	Serum Free Lymphocyte Medium
AK	Antikörper
APZ	Antigen Präsentierende Zelle
Bcl-2	B-Cell Lymphoma 2
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BHS	Bluthirnschranke
BSA	Bovines Serumalbumin
CCR	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation (Oberflächenmarker)
CFA	Complete Freund´s Adjuvant
CIA	Collagen-Induced Arthritis (Kollagen-induzierte Arthritis)
CIS	Clinical Isolated Syndrome (Klinisch Isoliertes Syndrom)
CNP	Zyklisches Nukleotid-3´Phosphodiesterase
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CTL	Cytotoxic T-Lymphocyte (Zytotoxische T-Zelle)
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
CXCR	CXC-Chemokinrezeptor
DC	Dendritic Cell (Dendritische Zellen)
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DSS	Dextran Sulfate Sodium
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FCS/FKS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Forward Scatter
GA	Glatirameracetat
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GDNF	Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor (Granulozyten/Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor)

HHV	H umanes H erpes v irus
HL-60	H uman Promyelocytic L eukemia Cells 60
HLA	H uman L eukocyte A ntigen (Humanes Leukozytenantigen)
HRP	H orseradish P eroxidase (Meerrettichperoxidase)
IFN	I nterferon
IKK	I κB K inase K omplex
IL	I nterleukin
IL-2R	I nterleukin- 2 R ezeptor
iNOS	I nduzierbare N O-Synthase
IRAK	I L-1 R ezeptor Typ 1-assozierte Proteinkinase
IκB	I nhibitor von NFκ B
JAK	J anus K inase
LIF	L eukemia I nhibitory F actor
KG	K örpergewicht
LPS	L ipopolysaccharid
LT	L ymphotoxin
M.	M orbus
MACS	M agnetic C ell S orting
MBP	M yelin- B asisches P rotein
MCP-1	M onocyte C hemotactic P rotein 1
MF	Makrophagen
MHC	M ajor H istocompatibility C omplex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MIF	M acrophage M igrations I nhibitory F actor
MIP	M acrophage I nflammatory P rotein
MMPs	M atrix- M etalloproteinasen
MNZ	(Periphere) M ononukleäre Z ellen
MOG	M yelin- O ligodendrozyten- G lykoprotein
MS	M ultiple S klerose
NADPH	N ikotinsäureamid- A denin- D inukleotid- P hosphat
NET	N eutrophil E xtracellular T raps (Neutrophile Extrazelluläre Fallen)
NFκB	N uclear F actor κ B
NGF	N erve G rowth F actor
NK-Zellen	N atürliche K iller z ellen
PBS	P hosphate B uffered S aline (Phosphat-Gepufferte Salzlösung)
PD-1	P rogrammed C ell D eath P rotein 1
PDE	P hosphodiesterase

PI	Propidiumiodid
PKC	Proteinkinase C
PLP	Proteolipid-Protein
PMA	Phorbol Myristate Acetate
PPMS	Primary Progressive Multiple Sclerosis
PWM	Pokeweed Mitogen
RA	Rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	Revolutions Per Minute (Umdrehungen pro Minute)
RRMS	Relapsing Remitting Multiple Sclerosis
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SD	Standardabweichung
SEM	Standard Error of Mean (Standardfehler)
sICAM-1	Soluble Intercellular Adhesion Molecule 1
SPMS	Secondary Progressive Multiple Sclerosis
SSC	Side Scatter
STAT	Signal Transducers And Activators Of Transcription
sTREM-1	Soluble Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 1
TCR	T-Cell Receptor (T-Zellrezeptor)
TGF	Transforming Growth Factor
Th-Zelle	T-Helferzelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor-α
Treg	Regulatorische T-Zelle
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VLA-4	Very Late Antigen 4
Zink-HA	Zinkhydrogenaspartat
Zip	Zrt- And Irt-Like Proteins (Zinkimporter)
Zn	Zink
ZnCl ₂	Zinkchlorid
ZnO	Zinkoxid
ZNS	Zentralnervensystem
ZnSO ₄	Zinksulfat
ZnT	Zinktransporter/Exporter

SI-Einheiten und Abkürzungen laut Duden werden hier nicht aufgeführt.

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Allgemeiner Überblick des Einflusses von Zink auf humane Organsysteme sowie Folgen eines Zinkdefizites.
- Abbildung 2: Zusammenhang zwischen einem Zinkmangel, einer Funktionsstörung des Immunsystems und dem damit vergesellschafteten sekundären Immundefekt.
- Abbildung 3: Immunpathogenese der Multiplen Sklerose.
- Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Zentrifugationsröhrchens vor (links) und nach (rechts) einer Dichtegradientenzentrifugation.
- Abbildung 5: Schematische Darstellung des Prinzips von Zytokin-Array und Zytokin-ELISA.
- Abbildung 6: Klinische und graphische Darstellung der EAE-Schweregrade.
- Abbildung 7: Zink-HA beeinflusst nicht die Vitalität stimulierter humaner Pan-T-Zellen.
- Abbildung 8: Zink-HA hemmt die DNA-Synthese stimulierter T-Zellen.
- Abbildung 9: Untersuchungen zur Wirkung von Zink-HA auf die Zytokin-Produktion humaner PWM-stimulierter T-Zellen mittels Zytokin-Array.
- Abbildung 10: Zink-HA hemmt in stimulierten T-Zellen die Produktion von IFN- γ , TNF- α und GM-CSF.
- Abbildung 11: Zink-HA hemmt in stimulierten T-Zellen die Produktion von IL-5 und IL-10.
- Abbildung 12: Zink-HA beeinflusst nicht die Vitalität stimulierter Splenozyten von SJL/J-Mäusen.
- Abbildung 13: Zink-HA hemmt die DNA-Synthese stimulierter Splenozyten von SJL/J-Mäusen.
- Abbildung 14: Zink-HA hemmt die Produktion von IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-5 und IL-10 in stimulierten Splenozyten von SJL/J-Mäusen.
- Abbildung 15: Wirkung oraler therapeutischer Zink-HA-Gaben auf den Schweregrad der EAE im 1. Versuch mit 6 μg und 30 μg Zink-HA/Tag.
- Abbildung 16: Wirkung oraler therapeutischer Zink-HA-Gaben auf den Schweregrad der EAE im 1. Versuch mit 60 μg und 120 μg Zink-HA/Tag.
- Abbildung 17: Wirkung oraler therapeutischer Zink-HA-Gaben auf den Schweregrad der EAE im 2. Versuch mit 6 μg und 12 μg Zink-HA/Tag.
- Abbildung 18: Wirkung einer therapeutischen oralen Gabe von Zink-HA auf den Schweregrad der EAE im 3. Versuch mit 12 μg Zink-HA/Tag.
- Abbildung 19: Die orale Zink-HA-Therapie reduziert die Anzahl inflammatorischer Zellen im ZNS von EAE-erkrankten SJL/J-Mäusen.
- Abbildung 20: Zusammenhang zwischen dem „Zinkstatus“ und der Immunhomöostase des Körpers.

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Stufentherapie der Multiplen Sklerose
- Tabelle 2: Effektor-Zytokine der EAE
- Tabelle 3: Positionen der entsprechenden Zytokine und Kontrollen des Zytokin-Arrays
- Tabelle 4: Klinische Graduierung der EAE
- Tabelle 5: Übersicht der Ergebnisse des Zytokin-Arrays: Wirkung von 150 μ M Zink-HA auf PWM-stimulierte humane Pan-T-Zellen und deren Zytokinproduktion.
- Tabelle 6: Übersicht über die Zytokine und Chemokine des Zytokin-Arrays

1. Einleitung

1.1 Das menschliche Immunsystem

Die Funktion des Immunsystems besteht im Schutz des Organismus vor Infektionen, wozu insbesondere die Abwehr körperfremder Pathogene und die Elimination körpereigener entarteter Zellen zählt. Neben mechanischen und chemischen Barrieren, welche Haut, Schleimhaut bzw. Magensäure einschließen, und der angeborenen Immunität, geprägt durch zelluläre Komponenten wie Monozyten, Makrophagen, Granulozyten oder andere Leukozyten und einer Vielzahl löslicher Proteine, verfügt der Mensch über ein erworbenes antigenspezifisches Immunsystem. Dies beinhaltet T- und B-Lymphozyten, antigenpräsentierende Zellen (APZ) sowie natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen). Während die humorale Immunantwort durch die von B-Lymphozyten gebildeten Antikörper vermittelt wird, gestalten T-Lymphozyten die zelluläre Immunität. Entsprechend ihrer Funktion können T-Zellen in zytotoxische $CD8^+$ -T-Lymphozyten, welche über Zell-Zell-Interaktionen den Zelltod beeinflussen, und in $CD4^+$ -T-Helferzellen unterteilt werden. Humane T-Helferzellen tragen maßgeblich zur Initiierung der spezifischen Immunantwort über T-Zell-Aktivierung sowie einer CD40-Liganden getriggerten Expansion von B-Zellen bei. Sie sind nur über MHC-II präsentierte Peptide in der Lage, diese Antigene mittels des T-Zellrezeptors zu erkennen. Man unterscheidet weitere Sub-Populationen von T-Helfer-Zellen: Typ 1 (Th1), Typ 2 (Th2) und Typ 17 (Th17) T-Helferzellen sowie regulatorische T-Zellen (Tregs). Jene Gruppierung basiert u.a. auf deren differierende Zytokin-Expression, welche die Immunantwort qualitativ beeinflussen kann. T-Zell-Zytokine sind lösliche, kurzlebige Botenstoffe und tragen zur Steuerung und Koordination von Immunreaktionen, zum Zellwachstum und zur Differenzierung sowie zu Reparaturvorgängen des Organismus bei. Th1-spezifische proinflammatorische Zytokine, wie Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-2 (IL-2) oder Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) sind hauptsächlich bei der Aktivierung von Makrophagen (zelluläre Immunantwort) beteiligt, während Th2-Zellen die Antikörperproduktion über Stimulation von B-Zellen via IL-4 anregen. Th17-Zellen produzieren verschiedene proinflammatorische Zytokine, im Besonderen IL-17A, wohingegen Tregs autoreaktive oder hypersensibilisierte T-Zellen mittels TGF- β oder IL-10 unterdrücken [1].

Für eine erfolgreiche spezifische Funktion muss das Immunsystem in der Lage sein, zwischen körpereigenen und körperfremden Substanzen zu unterscheiden. Geht diese erlernte

Selbsttoleranz verloren, kann es zum Angriff des Immunsystems auf körpereigene Strukturen mit chronisch entzündlichen Prozessen, zu schwerwiegenden Organdysfunktionen und zum Tod als potenzielle Folgen kommen. Dieses Phänomen wird als Autoimmunität bezeichnet. In der Pathogenese vieler Autoimmunerkrankungen scheinen autoreaktive CD4⁺-T-Lymphozyten über Stimulation zytotoxischer CD8⁺-T-Zellen und /oder Aktivierung von Makrophagen eine entscheidende Rolle zu spielen [2, 3]. Die Bedeutung eines weiteren Pathomechanismus liegt in der Bildung von Autoantikörpern oder der Induktion von proinflammatorisch wirkenden Th17-Lymphozyten begründet [4–7].

1.2 Das Spurenelement Zink

1869 wurde Zink erstmals von Raulin als notwendiger Wachstumsfaktor von *Aspergillus niger* beschrieben [8]. Nahezu ein Jahrhundert später konnte Prasad erstmals die bedeutende Rolle von Zink für den menschlichen Organismus belegen [9, 10]. Zink ist ein essentielles Spurenelement, welches für Zellwachstum, -entwicklung und -differenzierung, für DNA-Synthese, RNA-Transkription sowie Zellaktivität und -teilung aller Organismen entscheidend ist [11–14]. Als Bestandteil und Cofaktor von mehr als 300 Enzymen - beispielsweise verschiedener Dehydrogenasen (z. B. Alkohol-, Glutamat-, Malat-, Lactat-Dehydrogenase), Carboanhydrasen, Matrix-Metalloproteinasen und alkalischer Phosphatase - verfügt Zink über katalytische (z. B. Carboanhydrase), cokatalytische (z. B. Phospholipase C) und struktur-unterstützende (z. B. Proteinkinase C) Funktionen [15–19]. Des Weiteren fungiert Zink als Enzyminduktor sowie -inhibitor (z. B. diverse Phosphatasen), als Stabilisator biologischer Membranen und als Bestandteil genregulatorischer Transkriptionsfaktoren, deren Proteinarchitektur - sogenannte Zink-Finger-Motive - die DNA-Bindung ermöglicht. Außerdem ist es in der Anordnung von Multiproteinkomplexen (z. B. T-Zell-Corezeptoren) involviert. Durch die Beteiligung an zellulären De- und Phosphorylierungsprozessen ist Zink u. a. in der Lage als intrazelluläres Signalmolekül zu agieren und somit die Wirkung von Wachstumsfaktoren, Hormonen und Zytokinen zu modifizieren [12, 13, 18, 20, 21]. Eine Rolle als intrazellulärer Second Messenger wird diesem Biometall ebenso zugeschrieben [21, 22]. Biologisch aktiv ist Zink nur als zweiwertiges Kation [23]. Zinkionen sind stereochemisch flexibel; sie fungieren als Lewis-Säuren und interagieren sowohl mit harten als auch mit weichen Atomdonatoren [24]. Zudem wird Zink in einer Vielzahl von Studien als Antioxidans beschrieben. Diese Schutzfunktion der Zelle vor freien Radikalen bezieht sich auf einen schmalen

Konzentrationsbereich, in dem jenes Spurenelement nicht redoxaktiv ist [25–28]. Diese biochemischen Eigenschaften unterstreichen die essentielle Bedeutung von Zink für Wachstum, Entwicklung und Aufrechterhaltung humaner Funktionen.

1.2.1 Bedeutung von Zink für Körper und Stoffwechsel

Im Durchschnitt enthält der Körper eines Erwachsenen 2 - 3 g Zn; dabei sind 85% des Gesamtbestandes in Knochen und Muskelgewebe sowie 11% in Leber und Haut gespeichert. Die verbleibenden 4% verteilen sich auf alle anderen Gewebe, wobei sich hohe Konzentrationen in Prostata, Testes, Auge, Gehirn, Herz und Pankreas nachweisen lassen [27, 29–31]. Die für das Immunsystem essentielle Plasma-Zinkkonzentration beträgt nur 0,1% der Gesamtgehaltes [27, 32, 33]. 99% des humanen Spurenelementes befinden sich intrazellulär; 50% sind im Zytosol, 30% bis 40% innerhalb des Nukleus und die restlichen Anteile sind membranständig lokalisiert [11, 13]. Die intrazelluläre Homöostase wird durch Zink-Importeure (Zip) [34, 35], Zink-Transporter (ZnT), welche den Export aus dem Zytosol ermöglichen [35, 36] und zinkbindende Proteine realisiert. Metallothioneine als hochaffine Vertreter dieser Proteine binden bis zu 20% des intrazellulären Zinks. Sie schützen folglich vor Metalltoxizität und oxidativem Stress [37]. Als freies und damit biologisch aktives Zink bezeichnet man den in membranständigen Vesikeln (Zinkosomen) gespeicherten und den niedrigaffin an Proteine gebunden Anteil. Dieser kann zügig ins Zytosol verlagert werden (sogenanntes „Zink-Signal“ [21, 38]), um als Signaltransduktor aktiv an der Genregulation teilnehmen zu können [12, 39].

Zum Erhalt einer Zinkhomöostase wird eine tägliche orale Zinkzufuhr von 7 mg für Frauen und 10 mg für Männer von der „*Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V.*“ unter Berücksichtigung einer durchschnittlichen Absorptionsrate von 30% sowie obligatorischen und fakultativen Zinkverlusten empfohlen. Tierische Produkte wie Geflügel, Rind- und Schweinefleisch oder Milchprodukte stellen gute Zinklieferanten dar [40, 41]. Durch einen hohen Phytatgehalt der Nahrung (bspw. in pflanzlichen Produkten) kann infolge einer Bildung schwerlöslicher Komplexe die Resorption stark reduziert werden. Einige Aminosäuren (z. B. Lysin und Cystein) und Glukose wirken hingegen resorptionsfördernd [40, 42–45]. Oral aufgenommenes Zink wird im Jejunum und Ileum unter Vermittlung der Zinktransporter ZnT1 und ZIP 5 resorbiert, anschließend zu 60% an Albumin gebunden und vor Aufnahme ins Gewebe wieder freigesetzt. Die hochaffine Bindung an α_2 -Makroglobulin (30%) und Transferrin (10%) bedingt, dass Zink in dieser Form als transportierbares Element nicht zur Verfügung steht [46]. Die Exkretion erfolgt überwiegend über den Stuhl sowie über

Urin, Haare, Hautschuppen und Schweiß [47]. Abbildung 1 gibt einen allgemeinen Überblick über den Einfluss von Zink auf die jeweiligen Organsysteme und zeigt potenzielle Auswirkungen eines Mangels.

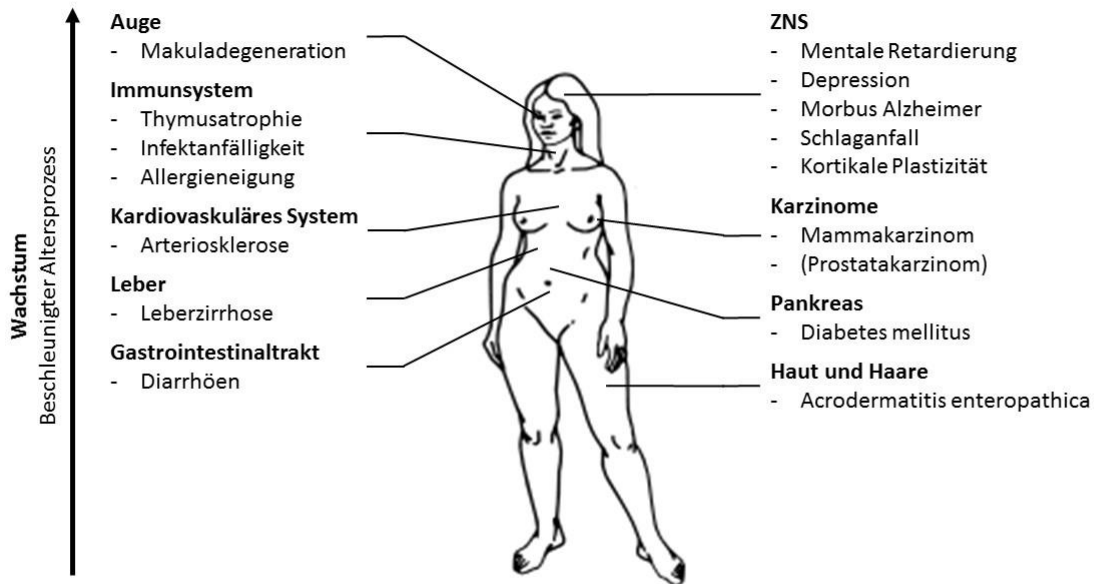


Abbildung 1: Allgemeiner Überblick des Einflusses von Zink auf humane Organsysteme sowie Folgen eines Zinkdefizites, modifiziert nach [33].

Ein Zinkdefizit kann alimentär (allgemeine Mangel- oder Fehlernährung, phytatreiche Kost oder parenterale Ernährung), iatrogen (bspw. durch Therapie mit Glukokortikoiden, Antikonzeptiva, Penicillamin) oder genetisch (Sichelzellanämie, Acrodermatitis enteropathica) bedingt sein; sowie durch Absorptionsstörungen (chronische entzündliche Darmerkrankungen, Pankreasinsuffizienz), erhöhten Bedarf (Schwangerschaft, vermehrtes Wachstum, chronische Erkrankungen, Leistungssport) oder verstärkte Zinkausscheidung (Niereninsuffizienz, Leberzirrhose) verursacht werden [31, 33, 45, 48–50]. Ein schwerwiegender Zinkmangel ist aktuell eine der Ursachen für die erhöhte Morbidität und Mortalität in Entwicklungsländern [51, 52]. Unter einem marginalen Defizit leiden hingegen 42,5% der Menschen in Industriestaaten [33]. Klinische Symptome eines Zinkmangels äußern sich u.a. in einer Minderung des Appetits sowie des Geschmackempfindens; in Form von Diarrhöen, Haarausfall, Dermatitis, in neurologischen und psychiatrischen Auffälligkeiten sowie in einer Wachstumsretardierung und Minderung der Reproduktionsfähigkeit [31, 33, 45, 53]. Außerdem existieren enge Wechselwirkungen zwischen diesem essentiellen Spurenelement und dem Immunsystem.

1.2.2 Einfluss von Zink auf das Immunsystem

Basierend auf der regulatorischen, katalytischen und struktur-erhaltenden Funktion vieler Enzyme und Transkriptionsfaktoren, verfügt Zink über einen enormen Einfluss auf die stark proliferierenden Zellen des Immunsystems [32, 33, 54–56]. Eindrucksvoll lässt sich dies an der seltenen autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung *Acrodermatitis enteropathica* verdeutlichen. Die Gen-Mutation SLC39A4, codierend für den intestinalen Zink-Importeur ZIP 4, führt zu einem schweren Zinkmangel-Syndrom [57, 58], dessen immunologische Kardinalsymptome durch Thymusatrophie, quantitative und funktionelle Minderung von Lymphozyten sowie erhöhte Infektanfälligkeit gekennzeichnet sind [45, 59]. Eine komplette klinische Remission erzielt man mittels einer oralen Hochdosis-Therapie von 30-150 mg Zink/Tag [60].

Störungen der Zinkhomöostase wirken sich sowohl auf das angeborene als auch auf das erworbene Immunsystem aus [35]. Zinkmangelzustände des Menschen führen dabei zu einer gestörten Immunfunktion und sind häufig mit einem sekundären Immundefekt vergesellschaftet (Abb. 2).

Im Falle einer Entzündung beeinflusst Zink u. a. Chemotaxis, Phagozytose und oxidativen Burst innater Immunzellen. Zinkmangel führt zur verminderten Chemotaxis dieser Zellen [13, 32, 61], wohingegen hohe Konzentrationen von 500 μM Zink als Chemotaxis-fördernd beschrieben werden [62]. Die Hemmung der NADPH-Oxidase durch erhöhte als auch erniedrigte Zinkkonzentrationen führt zu einer reduzierten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und folglich zur verminderten Phagozytose [13, 19, 63–65]. Eine Zink-vermittelte Komplexbildung mit NETs (Neutrophile extrazelluläre Fallen) bewirkt ebenfalls eine Einschränkung der Phagozytosefähigkeit innater Immunzellen [13, 14, 66]. Außerdem vermitteln die Chemokine MCP-1 und PMA ein intrazelluläres Zinksignal, welches die Monozytenadhäsion an Endothelzellen und somit die Auswanderung derer ins Gewebe begünstigt [13, 67, 68]. Ein Zinkdefizit führt ebenso zur numerischen und funktionellen Minderung von NK-Zellen. NK-Zellen erkennen und eliminieren u. a. Virus-infizierte Zellen oder Tumorzellen über Zink-vermittelte MHC-I-Detektion [13, 69, 70]. Die durch Zinkmangel bedingte, herabgesetzte lytische Funktion dieser Zellen basiert vermutlich auf der verminderten IL-2-Stimulation durch T-Zellen [71]. Auch die Aktivität sowie die Anzahl dendritischer Zellen (u. a. Langerhans Zellen der Haut) ist unter jener defizitären Bedingung des Spurenelementes gemindert [72].

Abweichungen der Zinkhomöostase wirken sich im Rahmen des adaptiven Immunsystems besonders stark auf Bildung, Reifung und Funktion von T-Zellen aus [13, 30, 73, 74].

Daneben führt ein Zinkdefizit auch zu einer verminderten B-Zell-Reifung und zu einer verringerten T-Zell-abhängigen Antikörperproduktion [35].

Im Thymus erfolgt die Reifung von Thymozyten (Prä-T-Lymphozyten) zu T-Lymphozyten unter Vermittlung von Thymulin. Dieses Peptidhormon benötigt Zink als Cofaktor für seine biologisch aktive Form. Folglich beeinflusst Zinkmangel die T-Zellreifung negativ und bewirkt, wie im Mausmodell gezeigt wurde, eine Thymusatrophie mit einem 50%igen Verlust an Thymozyten [73, 75, 76]. Außerdem führt ein Zinkdefizit zu einem erhöhten Glukokortikoid-Spiegel, welcher im Zusammenhang mit einer modifizierten Bcl-2-Expression zur vermehrten Prä-T-Lymphozyten-Apoptose führen kann [73]. Schließlich bedarf die IL-2-abhängige Proliferation von aktivierten T-Zellen ein intrazelluläres Zinksignal [77]. Zink nimmt ebenfalls eine entscheidende Rolle bei T-Zell-Differenzierungsprozessen ein. Beispielsweise führt ein Zinkmangel, welcher durch Diarrhöen verursacht wurde, bei Kindern zu einer verminderten Rate an naiven T-Zellen zu Gedächtnis-T-Lymphozyten und unterstreicht damit die Notwendigkeit dieses Spurenelementes zur Generierung von naiven T-Zellen [65]. Des Weiteren sinkt in einer defizitären Situation die $CD4^+/CD8^+$ -Ratio, wobei Anzahl und Funktionsfähigkeit von $CD4^+$ -Zellen unter diesen Bedingungen abnimmt [75, 78, 79]. Ebenso kommt es zu einer Th1/Th2-Imbalance mit verringerter Anzahl an Th1-Lymphozyten und deren Zytokin-Produktion (IL-2, IFN- γ , TNF- α) während Th2-Zellen und damit die IL-4- und IL-10-Produktion wenig beeinflusst werden [35, 71, 78]. Unter physiologischen Bedingungen führt Zink zu einer verstärkten Th1-Antwort mittels erhöhter IFN- γ -Produktion. Dies hat eine vermehrte Anzahl an Makrophagen, höhere Konzentrationen von Komplementfaktoren und freien Radikalen wie NO zur Folge und trägt somit zu einer verbesserten Abwehr intrazellulärer Pathogene bei [80]. Im Gegensatz dazu zeigten Hayashi und dessen Mitarbeiter eine Zink-abhängige IFN- γ -Produktionshemmung durch Verwendung erhöhter Zinkkonzentrationen in Jurkat-Zellen, einer humanen T-Zell-Linie [81]. Ein biphasischer Effekt von Zink auf die IFN- γ -Produktion aktivierter T-Zellen mit maximaler Stimulation durch 3,1 μ M und beginnender Hemmung ab 25 μ M Zink konnte durch Aydemir et al. gezeigt werden [82]. Für PWM-aktivierte mononukleäre Zellen (MNZ) demonstrierte unsere Arbeitsgruppe bereits die potenziell regulatorische Rolle dieses Spurenelementes für deren DNA-Synthese und Zytokinproduktion. Zink-Konzentrationen bis 100 μ M stimulierten die DNA-Synthese und Zytokinproduktion von IL-6 und IL-10, während Gaben von 200 bis 400 μ M Zink diese dosisabhängig hemmten. Konzentrationen höher als 500 μ M wurden als toxisch für jene Immunzellen beschrieben [83]. Eine mögliche Erklärung für diese

divergierenden Effekte auf MNZ könnte ein konzentrationsabhängiger Zinkeffekt auf verschiedene Signalwege der Zytokinproduktion sein. Beispielsweise könnten niedrige Dosen des Spurenelementes das Zinksignal triggern, welches bei der Zytokinproduktion von Monozyten in Reaktion auf bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) involviert ist [54]. Hingegen scheinen hohe Zinklevel in der Lage zu sein, die zyklische Phosphodiesterase (PDE) und dadurch die Aktivierung der Proteinkinase A zu hemmen und folglich zu einer geminderten Zytokinproduktion zu führen [84, 85]. Außerdem könnte die Zink-abhängige Suppression inflammatorischer Zytokine mit einer Induktion der Deubiquitinyase A20 assoziiert sein. A20 entfaltet seine immunsuppressive Wirkung durch Inhibition einer NF κ B getriggerten proinflammatorischen Immunreaktion. Dieser Mechanismus schützt Immunzellen vor LPS- und TNF- α -induzierter Zytotoxizität. Es wurde gezeigt, dass Zink A20 induziert und damit zu einer reduzierten TNF- α -Expression führt [28, 86].

Hohe Zinkkonzentrationen reduzieren des Weiteren die Entwicklung von Th17-Zellen in Mausmodellen. Th17-Lymphozyten produzieren diverse proinflammatorische Zytokine und spielen eine entscheidende Rollen in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen [87–89].

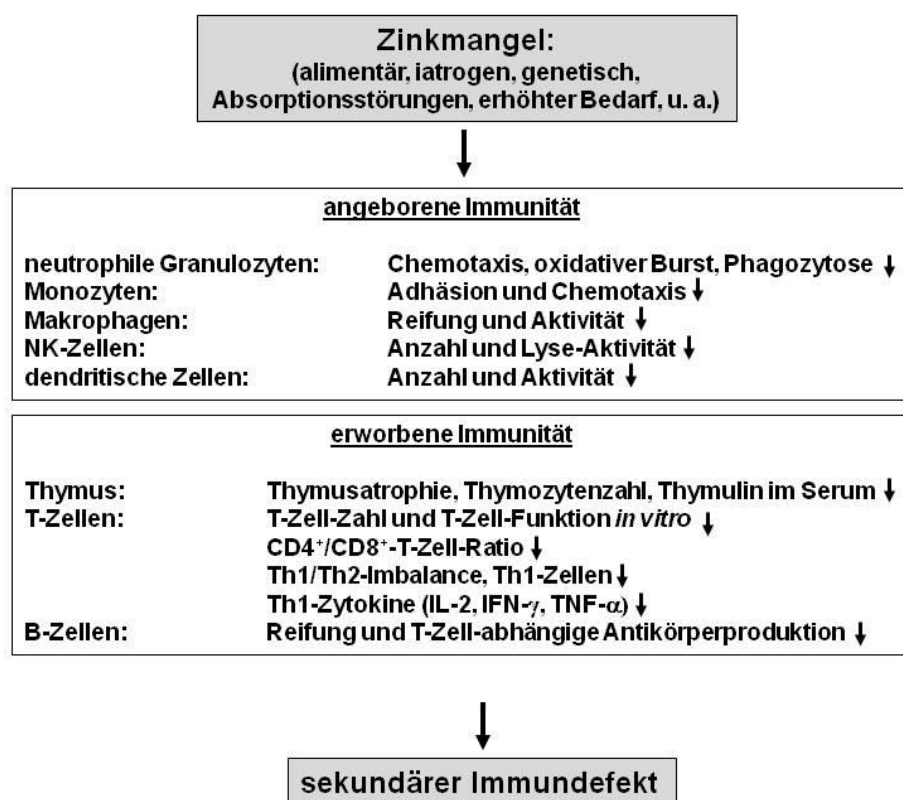


Abbildung 2: Zusammenhang zwischen einem Zinkmangel, einer Funktionsstörung des Immunsystems und dem damit vergesellschafteten sekundären Immundefekt [90].

1.2.3 Zink und Autoimmunerkrankungen

Ohkawara et al. berichteten 2005 über eine Zink-induzierte Milderung der Dextran Sulfate Natrium- (DSS-) induzierten Kolitis – einer im Mausmodell hervorgerufenen Autoimmunerkrankung des Darmes - und beschreiben Zink als potentiellen Suppressor von Autoimmunphänomenen [91, 92]. Als Ursache für diverse Autoimmunphänomene wurde eine Inhibition der T-Zell-Aktivierung durch Beeinflussung der IL-6-induzierten STAT3-Aktivität, welches die Entwicklung von Th17-Zellen triggert, vermutet [89]. Th17-Lymphozyten und deren proinflammatorische Zytokine tragen entscheidend zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen bei [5–7, 93]; beispielsweise sind IL-17A-defizitäre Mäuse resistent gegen Autoimmunmodelle wie die Collagen-induzierte Arthritis (CIA) oder die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) [89, 94]. Präventive Zinkgaben hemmen *in vivo* die Reifung von naiven CD4⁺-T-Zellen zu Th17-Zellen mittels direkter STAT3-Bindung. Dies führt zum Verlust der α -helikalen Struktur und zur Entfaltung von STAT3 mit einhergehendem Aktivitätsverlust sowie Hemmung der Phosphorylierung von Janus-Kinasen (JAK) [33, 89]. Minderung der Th17-Proliferation sowie eine erniedrigte Serumkonzentration von IL-17A sind die Folge. Interessanterweise führt eine Zinkbehandlung nach dem Transfer pathogener Th17-Zellen in EAE-erkrankten Tieren nicht zur Milderung der Symptomatik. Dies suggeriert, dass Zink keinen Einfluss auf die Th17-Lymphozyten-modulierte Immunantwort hat, sondern deren Entwicklung inhibiert. Des Weiteren wurde die durch Zink getriggerte IFN- γ -Produktion, welche die Entwicklung von Th17-Zellen negativ beeinflusst, als mögliche Ursache der CIA-Symptomreduktion unter Zinkapplikation diskutiert [95]. Eine Dysfunktion regulatorischer T-Zellen könnte ebenfalls zur Entstehung von Autoimmunität beitragen. Deren immunsuppressive Funktion ist stark von dem Th1-Zytokin IL-2 abhängig, welches in Zinkmangel-Situationen vermindert sekretiert wird [96].

Zu den häufigsten Autoimmunerkrankungen des Menschen zählen neben den autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen, die Rheumatoide Arthritis (RA), die Zöliakie, der Diabetes mellitus Typ I, der Systemische Lupus Erythematoses (SLE) sowie autoimmune Erkrankungen der Leber und die MS. Zudem sind eine Reihe dieser Autoimmunerkrankungen mit einem Zinkdefizit vergesellschaftet. Beispielsweise wurden von verschiedenen Autoren verminderte Serum- bzw. Plasma-Zinkkonzentrationen von RA-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen [97–101]. Yazar und dessen Mitarbeiter [102] fanden hingegen keine Unterschiede in den Zink-Plasmaspiegel von RA-erkrankten Personen. Auch Patienten mit einer Zöliakie [103–106], einem Diabetes mellitus Typ I [107, 108], einem SLE

[109, 110], einer autoimmunen Hepatitis [111, 112] sowie einer Primär Biliären Zirrhose [113, 114] und einem Pemphigus vulgaris [115] wiesen erniedrigte Serum-Zinkkonzentrationen auf. Im Hinblick auf die MS zeigten diverse Arbeitsgruppen ebenfalls eine Minderung der Plasma- [116–118] bzw. Serumspiegel [119] jenes Spurenelementes.

Abschließend lässt sich sagen, dass Zink ein mögliches Therapeutikum in der Behandlung von Th17-vermittelten Autoimmunerkrankungen wie der EAE, einem etablierten Mausmodell der MS, darstellen könnte.

1.3 Multiple Sklerose

Die MS ist eine chronisch entzündliche demyelinisierende Autoimmunerkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS) [120], welche sich meist im Alter von 20 bis 40 Jahren manifestiert, wobei in den vergangenen Jahren ein Prävalenzanstieg im Kindes- und Jugendalter zu verzeichnen ist [121, 122]. Frauen leiden im Verhältnis von 3:1 deutlich häufiger an dieser Krankheit (Gynäkotropie) [120]. Derzeit sind weltweit ca. 2,5 Mio. Menschen an MS erkrankt, darunter rund 120.000 in Deutschland [123, 124]. Als häufigste Ursache erworbener Behinderung im jungen Erwachsenenalter manifestiert sich die MS oftmals in Form von Sensibilitätsstörungen, Paresen oder als Optikusneuritis. Bemerkenswert ist eine ausgesprochene Heterogenität der Symptomatik.

1.3.1 Ätiologie der MS

Die Ätiologie der MS ist nicht abschließend geklärt. In Zusammenschau der aktuellen Datenlage handelt es sich um ein multifaktorielles Krankheitsgeschehen mit intrinsischen sowie extrinsischen Risikofaktoren.

Neben der Autoimmunpathogenese (siehe 1.3.2) gilt eine genetische Komponente als gesicherter intrinsischer Faktor [125]. Im Vergleich zur Gesamtbevölkerung (ca. 0,1%) ist die Inzidenz Verwandter ersten Grades um das 20fache (ca. 2%) [126], bei monozygoten Zwillingen sogar 200fach (25-30%) gesteigert [127]. Des Weiteren variiert die Erkrankungswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der ethnischen Zugehörigkeit – Kaukasier erkranken häufiger an MS als Afrikaner, Asiaten oder andere ethnische Gruppen (bspw. Hispanics) [128–130]. Bei der MS handelt es sich um ein polygenes Krankheitsbild. Auf genomischer Ebene besteht eine HLA-Assoziation auf Chromosom 6p21.3 [125, 131]; dabei

werden die für MHC-Klasse II codierenden Gene (HLA-DRB₁, HLA-DRB₂ sowie HLA-DQB₁) als ein Suszeptibilitätslocus der MS angesehen [132, 133].

Als extrinsische Risikofaktoren werden diverse Umweltfaktoren, die durch geographische Prävalenzunterschiede sowie Migrationsstudien untermauert werden, diskutiert. Die Prävalenz der Erkrankung ist im Bereich des Äquators am geringsten und steigt zu den Polen hin an. Auf diese Tatsache stützt sich die Vitamin-D-Stoffwechselftheorie, da in Vitamin-D₃-Mangel-Regionen die MS häufiger auftritt und ein erniedrigter Serumspiegel bei klinischer MS zu eruieren ist [134, 135]. Vitamin D₃ wirkt vermutlich über die Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen wie TGF- β oder IL-4 regulatorisch auf die Aktivität von T-Zellen und Makrophagen [136, 137].

Als auslösende Faktoren der MS und deren Schübe werden außerdem virale (Epstein-Barr-Virus (EBV), Herpes-Simplex-Virus, Humanes Herpesvirus 6 (HHV 6)) [138] und bakterielle (Chlamydien, Spirochäten, Rickettsien) Infektionen in Form eines molekularen Mimikry diskutiert [139]. Bei MS-Patienten besteht bspw. eine nahezu 100%ige Seropositivität für EBV [140] sowie eine Korrelation zwischen der EBV-Infektion und dem Erkrankungsbeginn der MS [141, 142]. Weitere mögliche Umweltfaktoren sind regelmäßiger Nikotinabusus [143], Adipositas in der Kindheit [144] und Umweltgifte wie Amalgam [145]. Zusammenfassend ist das Relativgewicht der einzelnen Komponenten bei der Krankheitsentstehung ebenso wie deren gemeinsame Ätiologie weiterhin unklar.

1.3.2 Immunpathogenese der MS

Die MS zählt zu den chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankungen des ZNS, bei der es im Rahmen von Entzündung zur herdförmigen (fokalen) Demyelinsierung der Markscheiden und deren Ausläufern (Oligodendrozyten) kommt. Schließlich führt dies zur Axonschädigung und zur Ausbildung einer reaktiven Gliose mit sklerotischen Plaques. Die Myelin- oder Markscheide fungiert als elektrischer Isolator von Nervenfasern und ermöglicht eine saltatorische Reizleitung. Deren Funktionsverlust verursacht Störungen in der Nervenleitung und bedingt eine Vielzahl neurologischer Defizite der MS.

Autoimmunphänomene sind durch den Verlust der immunologischen Toleranz gegenüber körpereigener Strukturen in genetisch prädisponierten Personen gekennzeichnet [146]. Eine Zusammenfassung der allgemein akzeptierten MS-Immunpathogenese ist in Abb. 3 dargestellt. Initial erfolgt eine periphere Aktivierung autoreaktiver T-Lymphozyten mittels APZ über die Interaktion zwischen dem T-Zell-Rezeptor und dem MHC I- bzw.

MHC II-präsentierten Autoantigen. Kostimulatorische Signale, wie bspw. die kostimulatorischen Rezeptoren CD80/CD86 [147], welche an CD28 binden oder das an CD40-Ligand bindende CD40, scheinen die T-Zell-Aktivierung zu modifizieren.

Über welchen Mechanismus die periphere T-Zell-Aktivierung erfolgt, ist weiterhin unbekannt. Das sogenannte „molekulare Mimikry“ - die molekulare „Ähnlichkeit“ körperfremder (z. B. virale Proteine) und körpereigener Oberflächenstrukturen - wird einerseits als eine potenzielle Variante diskutiert [148, 149]. Die Immunantwort richtet sich somit nicht nur gegen die Erreger, sondern auch gegen körpereigene Organe [150].

Andererseits besteht die Möglichkeit, dass potenzielle autoreaktive T-Lymphozyten die negative Selektion im Thymus umgehen, was auch beim Gesunden vorkommt [151, 152]. Bei gesunden Personen werden diese jedoch umgehend durch Tregs eliminiert [153]. Deren immunsuppressive und regulatorische Funktion scheint bei MS-Patienten gestört zu sein [154, 155], was auf einer Reifungsstörung im Thymus beruhen könnte [156]. Folge dieser Dysfunktion ist bspw. eine verminderte Kontrolle der Th-17-Lymphozyten, welche in Anwesenheit von IL-23 das Zytokin IL-17A produzieren. IL-17A ist mit IL-22 in der Lage die Integrität der Bluthirnschranke (BHS) zu stören und die Transmigration peripherer Zellen zu erleichtern (siehe unten). Th-17-Zellen scheinen somit eine entscheidende Rolle in der Immunpathogenese der MS zu spielen [157, 158].

Eine weitere Variante zur Generierung autoreaktiver Zellen wird in Form einer verstärkten Synthese von „Neo-Epitopen“ diskutiert. In einem angenommen durch Infektionen bedingten inflammatorischen Milieu kommt es durch die Aktivierung von APZ zur verstärkten Antigenprozessierung, was wiederum zur Präsentation von Autoantigenen führen könnte. Des Weiteren besteht die Möglichkeit einer gesteigerten antigenunabhängigen Stimulation bereits vorhandener autoreaktiver T-Lymphozyten im entzündlichen Milieu [159, 160].

Nach peripherer Aktivierung folgt die transendotheliale Migration von T-Lymphozyten und weiteren Entzündungszellen (B-Zellen, Makrophagen) über die BHS in das ZNS [161]. Eine komplexe Kaskade von Adhäsionsmolekülen (z. B. Hochregulation von VLA-4/VCAM-1 [162]), Chemokinen (z. B. MCP-1) sowie Chemokin-Rezeptoren (z. B. CCR1) und löslichen Zytokinen (z. B. TNF- α , IFN- γ) [163] ist an der Transmigration beteiligt, ebenso wie das Vorhandensein von abnormalen Tight Junctions [164]. Die von den infiltrierenden Zellen sezernierten Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) dienen zum Verdau der extrazellulären Matrix und ermöglichen den Immunzellen endgültig den Weg ins ZNS [165] (Abb. 3.1).

Im ZNS erfolgt eine Reaktivierung von CD4⁺-T-Zellen sowie CD8⁺-T-Zellen durch ortsständige, professionelle APZ (bspw. Mikroglia) [166]. Die dafür benötigten

HLA-Moleküle werden unter dem Einfluss von $\text{IFN-}\gamma$ vermehrt produziert. Diese Reaktivierung führt zur klonalen Expansion und Polarisierung autoreaktiver Zellen, zur lokalen Entzündungsreaktion sowie zur Sekretion proinflammatorischer Mediatoren (z. B. $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$) [167]. Jene entzündungsfördernden Zytokine stimulieren einerseits Astrozyten und Mikrogliazellen, welche die Myelinscheide und das Axon direkt schädigen können und rekrutieren andererseits weitere Entzündungszellen (CD8^+ -T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen) aus der Peripherie [146, 168] (Abb. 3.2).

Zudem aktivieren Makrophagen u. a. mittels $\text{TNF-}\alpha$ CD8^+ -T-Lymphozyten. Diese schädigen Oligodendrozyten direkt über MHC-I-Bindung und sind in der Lage, Axone zu durchtrennen sowie die Gefäßpermeabilität zu steigern [169]. Ein weiteres zytotoxisches Effektormolekül ist Stickstoffmonoxid (NO), welches durch die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) unter dem aktivierenden Einfluss von $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ und IL-1 vermehrt produziert wird. Das neurotoxische NO kann im akuten MS-Schub vermehrt in MNZ-Zellkulturen der Patienten nachgewiesen werden [170], besitzt die Fähigkeit einer reversiblen Erregungsblockade des Axons [171] und führt zur axonalen Degeneration. Eine mitochondriale Dysfunktion des Axons sowie eine durch Calcium- und Natriuminflux bedingte Desintegration des Zytoskeletts tragen ebenfalls zur axonalen Degeneration bei [172] (Abb. 3.3).

Des Weiteren werden B-Zellen via Th2-Zell-Stimulation zur myelinspezifischen Autoantikörperbildung angeregt, welche ebenfalls zur Gewebszerstörung beitragen [173, 174] (Abb. 3). Außerdem besteht die Möglichkeit der Antikörper-bedingten Aktivierung des Komplementsystems mit Ausbildung eines, die Zielstruktur zerstörenden Membranangriffskomplexes (C5b-9) [175].

Zusammenfassend führt nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand eine gesteigerte Phagozytose sowie eine erhöhte Produktion von freien Radikalen (z. B. NO, Lymphotoxin, ROS) und zytotoxischen Zytokinen wie $\text{TNF-}\alpha$ ebenso wie die Produktion spezifischer Autoantikörper, ein aktiviertes Komplementsystem und zytotoxische T-Zellen zur Demyelinisierung und axonalen Schädigung mit Ausbildung neurodegenerativer Plaques (Abb. 3). Das Gleichgewicht der Entzündungsreaktion wird dabei durch pro- und antiinflammatorische (z. B. $\text{TGF-}\beta 1$, IL-10) Zytokine reguliert, bspw. in Form einer IL-2 induzierten T-Zell-Apoptose. Interessanterweise weist die Sekretion proinflammatorischer Mediatoren ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$) geschlechtsspezifische Unterschiede auf und könnte ein Erklärungsansatz für die Gynäkotropie sein. Die Translation des $\text{IFN-}\gamma$ -Gens wird durch Östrogene positiv beeinflusst [176].

Trotz der ausgeprägten klinischen Heterogenität ist die Zusammensetzung der entzündlichen Infiltrate aus Makrophagen, Mikrogliazellen und Lymphozyten weitgehend konstant. Nach Lucchinetti et al. werden histopathologisch vier Schädigungsmuster unterschieden [167]. Unabhängig vom Schädigungsmuster ist ein Nebeneinander von Plaques verschiedenen Alters für die MS typisch.

Während der Inflammation finden bereits Reparaturvorgänge statt, wobei der Grad der Remyelinisierung von der Anzahl überlebender Oligodendrozyten abhängt. Das Prinzip der „neuroprotektiven Immunität“ beschreibt die positiven Aspekte der Entzündung auf die Remyelinisierung, bspw. durch Sekretion von Wachstumsfaktoren, welche das Überleben sowie die Proliferation und Differenzierung von Oligodendrozyten fördern [177]. Dazu zählen Neurotrophine wie *nerve growth factor* (NGF), *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) oder die Neuropoetine *leukemia inhibitory factor* (LIF) und *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) [178]. In MS-Läsionen konnte BDNF und dessen Rezeptor immunhistochemisch nachgewiesen werden, ebenso wie ein stärkerer BDNF-Anstieg im akuten Krankheitsschub und in der Erholungsphase bei primär schubförmig remittierender MS im Vergleich zur sekundär progressiven Form [179–181]. BDNF kann durch neuroprotektive Effekte Läsionen an Neuronen und am Axon verhindern. Solch protektive Funktion ist auch für Moleküle des CNTF-Signalweges beschrieben [182, 183]. Besteht die Möglichkeit eines *restitutio ad integrum* nicht, folgt die Ausbildung einer reaktiven Gliose sowie der Verlust von Axonen.

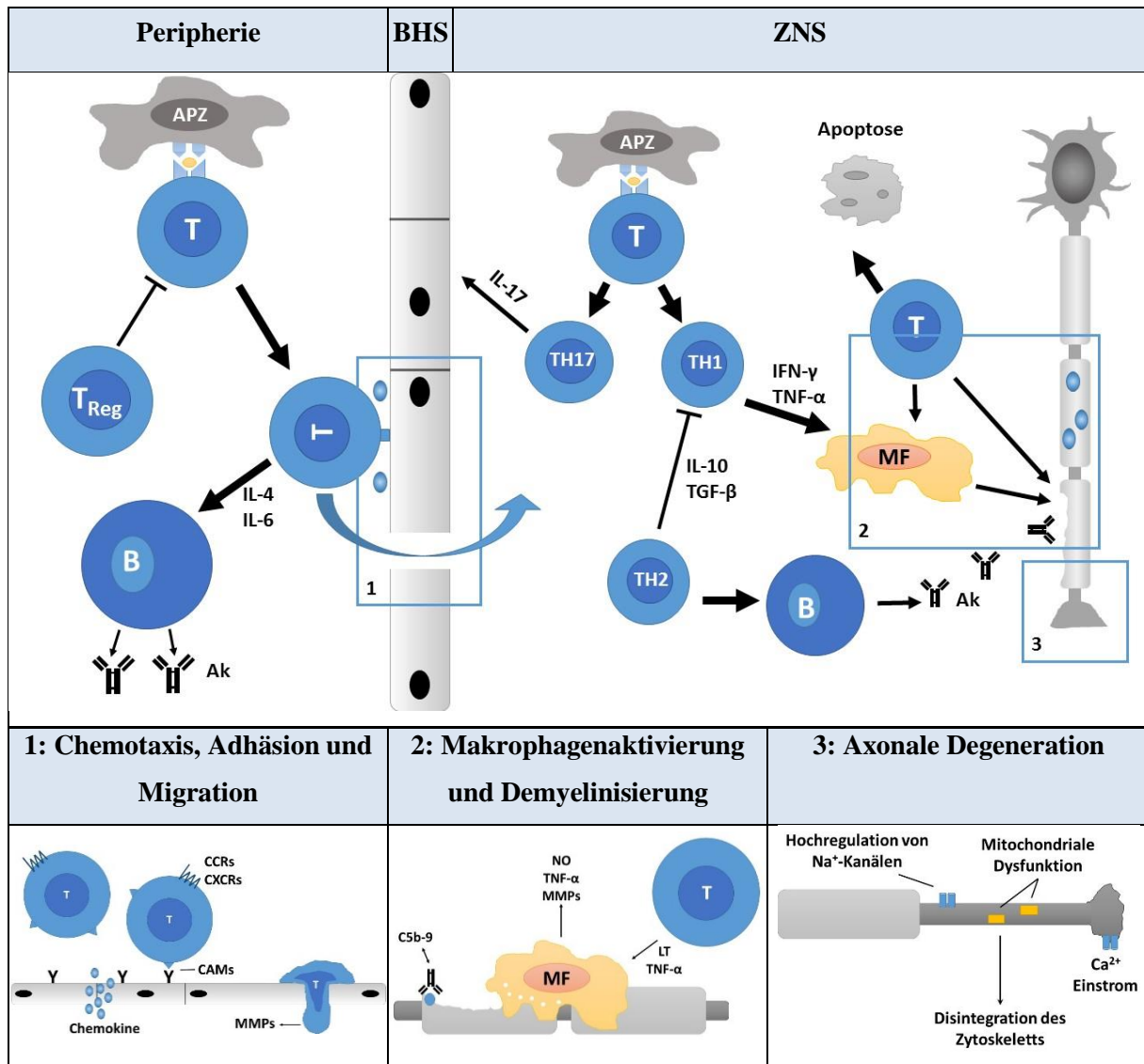


Abbildung 3: Immunpathogenese der Multiplen Sklerose, modifiziert nach [120]. Zunächst erfolgt die periphere Aktivierung autoreaktiver T-Zellen (T) durch antigenpräsentierende Zellen (APZ). Eine komplexe Kaskade von Adhäsionsmolekülen (CAMs), Chemokinen, Chemokin-Rezeptoren (CCRs, CXCRs) und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) ist an der transendothelialen Migration von aktivierten T-Lymphozyten über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) in das ZNS beteiligt (Abb. 3.1). Im ZNS werden die eingewanderten T-Zellen reaktiviert und stimulieren u. a. Makrophagen (MF), was wiederum zur gesteigerten Phagozytose und Produktion von freien Radikalen sowie Zytokinen (TNF- α , Lymphotoxin (LT), Stickstoffmonoxid (NO)) führt. Demyelinisierung und axonale Schädigung sind die Folgen (Abb. 3.2). Die von B-Zellen (B) produzierten Auto-Antikörper (Ak) tragen selbst und durch Aktivierung des Komplementsystems mit Ausbildung eines Membranangriffskomplexes (C5b-9) (Abb. 3.2) zum Schädigungsmuster bei. Die axonale Degeneration ist außerdem Folge einer Dysintegration des Zytoskeletts bedingt durch mitochondriale Dysfunktion sowie Elektrolytstörungen (Abb. 3.3). Das Gleichgewicht der Entzündungsreaktion wird durch pro- und antiinflammatorische Zytokine reguliert, bspw. in Form einer IL-2 induzierten T-Zell-Apoptose.

1.3.3 Klinisches Bild und Verlauf der MS

Im Anfangsstadium der Krankheit werden im Wesentlichen zwei Verlaufsformen voneinander unterschieden. In der Mehrzahl der Krankheitsfälle (85-90%) handelt es sich um eine schubförmig remittierende Variante (engl. *relapsing remitting*, RRMS), welche durch Episoden klinischer Progredienz, Remission und Stabilität charakterisiert ist. Nach einer Latenz von ca. 10 bis 15 Jahren gehen unbehandelt ca. 50% der Patienten einer RRMS in eine sekundär progrediente MS (engl. *secondary progressive*, SPMS) über [184]. Diese ist durch langsames Fortschreiten neurologischer Defizite über mindestens sechs Monate mit dem möglichen Auftreten zusätzlicher Schübe gekennzeichnet. Davon abzugrenzen sind ca. 10-15% der MS-Erkrankten mit initial progredienten Krankheitsverlauf (engl. *primary progressive*, PPMS) [184–186]. Die Klinik der MS, bedingt durch den multifokalen und potenziell ubiquitären Befall des ZNS, ist äußerst heterogen, interindividuell verschieden und umfasst ein Vielzahl von Symptomkomplexen, wie Sensibilitätsstörungen, Visuseinschränkungen, Paresen, Ataxie, Blasen- und Mastdarmstörungen, Beeinträchtigung der Sexualfunktion, Fatigue sowie kognitive Defizite (bis hin zur subkortikalen Demenz [187, 188]) und psychiatrische Auffälligkeiten (vor allem des Affektes [189–191]). Das klinische Bild manifestiert sich bei 79% der Patienten zunächst monofokal [192]. Aus diesem Grund hat sich der Begriff des „clinical isolated syndrome“ (CIS), bei dem die Diagnose MS in Folge fehlender zeitlicher Dissemination nicht gerechtfertigt ist, eingebürgert, um einen zügigen Therapiebeginn zu gewährleisten [193, 194].

1.3.4 Therapie der MS

Ein kurativer Therapieansatz der MS ist bislang nicht bekannt. Mit dem Ziel die Unabhängigkeit des Patienten im Alltag zu erhalten und dabei eine möglichst hohe Lebensqualität zu gewährleisten, gestaltet sich das Therapiekonzept individuell, interdisziplinär und multizentrisch. Neben symptomatischen Maßnahmen basiert die Stufentherapie der MS auf einer immunmodulatorischen Behandlung des akuten Schubes und einer verlaufsmodifizierenden Medikation, bestehend aus Basistherapie sowie der Möglichkeit einer Eskalation. Tabelle 1 stellt die aktuelle Therapieempfehlung der 2014 überarbeiteten Leitlinie der deutschen Gesellschaft für Neurologie dar [195].

Tabelle 1: Stufentherapie der Multiplen Sklerose

Indikation	CIS		RRMS			SPMS	
Verlaufsmodifizierende Therapie	(Hoch-) aktive Verlaufsform		1. Wahl Alemtuzumab Fingolimod Natalizumab	2. Wahl Mitoxantron (Cyclophosphamid)	3. Wahl Experimentelle Verfahren	Mit aufgesetzten Schüben	Ohne aufgesetzte Schübe
	Milde/moderate Verlaufsform	Glatiramer-acetat Interferon-β	Dimethylfumarat Glatirameracetat Interferon-β Teriflunomid (Azathioprin) (IVIg)			Interferon-β Mitoxantron (Cyclophosphamid)	Mitoxantron (Cyclophosphamid)
Schubtherapie	2. Wahl		Plasmapherese bzw. Immunadsorption				
	1. Wahl		Glukokortikoidsteroid-Plustherapie				

Die Stufentherapie der Multiplen Sklerose wurde nach der deutschen Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der Multiplen Sklerose (MS) modifiziert [195]. Je nach Verlaufsform der MS (CIS (clinical isolated syndrome), RRMS (relapsing remitting MS), SPMS (secondary progressive MS)) wird neben der akuten Schubtherapie eine verlaufsmodifizierende Basistherapie mit der Möglichkeit einer Eskalation angestrebt. Die Darstellung der Substanzen erfolgt dabei in alphabetischer Reihenfolge und impliziert keine Überlegenheit eines Medikamentes gegenüber einem anderen in der Indikationsgruppe (in Form eines Kastens abgebildet). Beim Versagen der Standardtherapie kann der Einsatz von Reservepräparaten (dargestellt in Klammern) erwogen werden.

1.4 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)

Eine Vielzahl von Therapieansätzen der MS sind in der EAE, einem tierexperimentellen Modell der CD4⁺-T-Zell-vermittelten Autoimmunität gegen Antigene der Myelinschicht, entwickelt und geprüft wurden [196, 197]. Folgende Myelinproteine spielen dabei eine entscheidende Rolle als Auto-Antigene: Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG), Proteolipidprotein (PLP) und Myelin-Basisches Protein (MBP). Die immunogenen Peptide dieser Proteine können synthetisch hergestellt und zusammen mit bakterienhaltigen Adjuvantien suszeptiblen Versuchstieren (Mäuse, Ratten oder Affen) subkutan injiziert werden. Nach erfolgter aktiver Immunisierung werden unterschiedliche klinische Verläufe der EAE je nach Tierstamm und injiziertem Peptid ausgelöst. Diese EAE-Formen ähneln klinisch und pathologisch den divergierenden Verläufen einer MS. Beispielsweise spiegelt die PLP (139-151)-Peptid-induzierte EAE von SJL/J-Mäusen die Relapsing-remitting-Form der MS wieder, während das MOG (35-55)-Peptid in C57BL/6-Mausstämmen eher den chronisch-progressiven Verlauf hervorruft [198, 199]. Diese sogenannte „aktive EAE“ ist

besonders zur Studie immunologischer Prozesse in der Induktionsphase der Erkrankung geeignet.

Eine weitere Form der EAE-Induktion stellt der Transfer von antigenspezifischen T-Helferzellen von erkrankten auf gesunde Mäuse dar, dem sogenannten passiven oder adoptiven Transfer der EAE. Viren (z. B. Theiler Virus) oder toxische Agentien (z. B. Cuprizone) werden ebenfalls zur Induktion von demyelinisierenden Erkrankungen in Tiermodellen genutzt [199].

Die derzeitige Studienlage schreibt Th17-Lymphozyten eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der EAE zu [199–202]. Indirekt lässt sich dies durch gemilderte oder EAE-resistente Formen in IL-6-, TGF- β -, IL-21-, IL-23 oder IL-17A-defizitären Mäusen belegen [203–207]. Die Zytokine IL-6, TGF- β und IL-21 tragen zur Th17-Differenzierung bei, während IL-23 für die Formstabilität der Th17-Zellen notwendig ist. IL-17A, ein Th17-Zytokin, welches Epithel- und Endothelzellen anregt, proinflammatorische Zytokine und Chemokine zu produzieren, triggert den Verlust der Immuntoleranz und führt zur Ausbildung der EAE [208, 209]. Ein weiteres proinflammatorisches Effektormolekül der Th17-Population ist GM-CSF. Die entzündungsfördernde Wirkung von GM-CSF basiert u. a. auf der gesteigerten Expression von MHC-II- und kostimulatorischen Molekülen (bspw. CD80/CD86) durch infiltrierende sowie ortsständige APZ [210]. Zudem begünstigt dieses Zytokin die IL-6- und IL-23-Sekretion dendritischer Zellen, was wiederum das Überleben und die Bildung von Th17-Lymphozyten fördert [211]. Die Rolle von IL-22, einem weiteren Th17-Zytokin, bei T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen ist nicht abschließend geklärt. Einerseits trägt IL-22 zur Desintegrität der BHS bei [212], andererseits zeigen IL-22-Knockout-Mäuse keinen gemilderten EAE-Verlauf [213].

Der Transfer antigenspezifischer Th9-Zellen führt ebenfalls zur Induktion einer EAE und untermauert damit den proinflammatorischen Charakter des Th9-Zytokins IL-9 [214]. Einerseits fördert IL-9 die Produktion des Chemokins CCL20 durch Astrozyten, welches wiederum die Migration von Th17-Lymphozyten ins ZNS begünstigt. Zudem beeinflusst dieses Zytokin das Überleben sowie die Akkumulation von Th17-Zellen in positiver Weise [215]. Andererseits unterstützt IL-9 direkt die immunsuppressive Funktion der Treg-Population [216].

Die das ZNS infiltrierenden autoreaktiven Th1-Lymphozyten haben ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf den Pathomechanismus der EAE. Unter Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IFN- γ aktivieren diese Zellen Makrophagen und ortsständige Mikroglia. Des Weiteren regen Th1-Zellen die Produktion von Proteasen und

reaktiven Sauerstoffradikalen an, welche u. a. für die Myelinscheide toxisch sind [217]. Das Th1-Zytokin IFN- γ stimuliert zudem die Differenzierung von Th1-Zellen [218], aktiviert zytotoxische CD8⁺T-Lymphozyten sowie NK-Zellen [219] und regt Makrophagen an, proinflammatorische Zytokine (bspw. TNF- α , IL-6, IL-1) zu produzieren [220]. Aus diesem Grund ist IFN- γ entscheidend an der Entwicklung einer EAE beteiligt. An dem durch Th1-Lymphozyten verursachten Gewebsschaden ist auch der Botenstoff TNF- α involviert. TNF- α entfaltet seine Wirkung über die Rezeptoren TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) und TNF-Rezeptor 2 (TNFR2). Während über den TNFR1 zytotoxische und proapoptotische Signale vermittelt werden, führt der TNFR2-Signalweg zur Modifikation der Apoptose und kann u. a. in Zellwachstum und -differenzierung resultieren [221]. TNF- α wird demnach nicht nur eine Myelin-schädigende Rolle, sondern auch eine immunregulatorische sowie remyelinisierende Wirkung zu geschrieben [4].

Abschließend lässt sich sagen, dass trotz ihrer differierenden Funktionen die Th17-, die Th9-Lymphozyten sowie die Th1-Zellen und deren Zytokine in der Immunpathogenese der EAE als auch der MS involviert sind [214]. Tabelle 2 gibt einen allgemeinen Überblick über die Effektor-Zytokine der EAE, deren Funktion sowie die jeweiligen produzierenden Zellen.

Von essentieller Bedeutung zur Aufrechterhaltung der Immuntoleranz sind Tregs; numerische oder funktionelle Abweichungen derer führen zur Ausbildung von Autoimmunphänomenen [222–224]. Zunächst wurde eine Treg-vermittelte Hemmung der Auswanderung autoraktiver T-Zellen ins ZNS vermutet [225]. Tregs wandern jedoch auch selbst an den Ort des Geschehens aus, um dort über verschiedene immunsuppressive Mechanismen, bspw. durch Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen (TGF- β , IL-10), aktiv zu werden [226].

Tabelle 2: Effektor-Zytokine der EAE, modifiziert nach [4].

Zytokin	produzierende Zellen	Rolle in der EAE	Ref.
GM-CSF	Makrophagen, T-Zellen, dendritische Zellen, Endothelzellen, Mesothelzellen, Fibroblasten	Inflammation über erhöhte MHC-II-Expression; vermehrte IL-6-, IL-23-Sekretion von DC und Makrophagen → Überleben/Differenzierung von Th17-Zellen	[210, 211]
IL-9	Th9-Zellen, Th2-Zellen, Tregs, Mastzellen	Erhöhung der Suppressorfunktion von Tregs Proliferation/Akkumulation von Th17-Zellen Expression CCL20 durch Astrozyten	[214–216]
IL-17A	Th17-Zellen, CD8 ⁺ -T-Zellen, NK-Zellen, Monozyten	Induktion proinflammatorischer Zytokine/Chemokine; aktiviert Mikrogliazellen Endothelaktivierung → Desintegrität der BHS; indirekt: Generierung von Th17-Zellen	[4, 199, 201, 206]
IL-21	Th17-Zellen NK-Zellen	Generierung von Th17-Zellen Differenzierung von B- zu Plasmazellen	[206, 207, 227]
IL-22	Th17-Zellen, NK-Zellen	nicht abschließend geklärt	[212, 213]
IFN-γ	T-Zellen, NK-Zellen	aktiviert Makrophagen zur Produktion proinflammatorischer Zytokine; fördert Th1-Zell-, supprimiert Th2-Zell-Differenzierung; aktiviert zytotoxische T- und NK-Zellen; proapoptotisch	[218, 219, 220, 228, 229]
TNF α	Makrophagen, Monozyten, Mikrogliazellen, Astrozyten, DC, NK-Zellen, T-Zellen, B-Zellen	via TNFR1: zytotoxisch, proapoptotisch, proinflammatorisch via TNFR2: Apoptose-Modulation, Zellwachstum und -proliferation	[4, 221]

2. Zielstellung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Untersuchungen zur potentiellen Wirksamkeit und zum Wirkmechanismus von Zink-Hydrogenaspartat (Zink-HA, Unizink 50) bei T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose durchzuführen.

Dazu wurde einerseits *in vitro* an stimulierten humanen T-Zellen gesunder Probanden und an murinen Splenozyten die Wirkung von Zink-HA auf die T-Zell-Proliferation und die Produktion ausgewählter Zytokine untersucht.

Andererseits wurden *in vivo*-Untersuchungen in einem Tiermodell der MS, der aktiven EAE in SJL/J-Mäusen, durchgeführt, um die Frage zu beantworten, ob eine orale Applikation des zugelassenen Arzneimittels Zink-HA in diesem Modell therapeutisch wirksam ist.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Reagenzien

1,4 M NaOH/0,7 M HEPES	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, Deutschland
³ H-Thymidin (1 mCi/ml)	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
Antibiotikum/Antimykotikum (10.000 U/ml Penicillin G, 1000 µg/ml Streptomycin, 25 µg/ml Amphotericin B)	Gibco BRL, Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland
Biocoll Separating Solution	BIOCHROM AG, Berlin, Deutschland
BSA (Bovines Serumalbumin Fraction V)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
CD4 ⁺ -T-Cell-Isolation human Kit II	Milteny Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD8 ⁺ -T-Cell-Isolation human Kit	Milteny Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, Deutschland
FCS (Fetal Calf Serum)	PAN Biotec, Aidenbach, Deutschland
Formaldehydlösung 4%	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, Deutschland
HCl 5 M	Zentralapotheke, Universitätsklinikum Magdeburg, Deutschland
Heparin (5000 U/ml)	BIOCHROM AG, Berlin, Deutschland
Complete Freund's Adjuvant (CFA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Mycobacterium tuberculosis	Difco Laboratories, Augsburg, Deutschland
Pan T-Cell-Isolation human Kit II	Milteny Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Pertussis Toxin	List Biological Laboratories, Campell, CA, USA
Pierce® ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland
Proteolipidprotein PLP (139-151)-Peptid	Dr. J. Faust, MLU Halle, Deutschland
Proteome Profiler™ (Antibody Arrays) Human Cytokine Array Panel A Array Kit	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
PWM (Pokeweed Mitogen)	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
Quantikine Human GM-CSF-ELISA	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Quantikine Human IFN-γ-ELISA	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Quantikine Human IL-10-ELISA	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Quantikine Human IL-5-ELISA	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Quantikine Human TNF-α-ELISA	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Quantikine Mouse GM-CSF-ELISA	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Quantikine Mouse IFN-γ-ELISA	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Quantikine Mouse IL-10-ELISA	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Quantikine Mouse IL-5-ELISA	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

Quantikine Mouse TNF- α -ELISA	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Unizink (Zink- bis (hydrogen-DL-aspartat))	Köhler Pharma GmbH, Alsbach-Hähnlein, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland

Verbrauchsmaterialien

24-Kammer-Zellkulturplatten	TPP, Trasadingen, Schweiz
96-Kammer-Mikrotiterplatten	TPP, Trasadingen, Schweiz
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, UK
Costar 96-Kammer-Rundbodenplatte	Corning Inc., New York, USA
Discofix	Braun, Melsungen, Deutschland
Glasspritzen	Poulten Graf, Wertheim, Deutschland
Nylon Zellsieb, 70 μ m	Falcon, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

3.1.2 Puffer und Medien

AIM-V-Medium	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco`s MEM	BIOCHRRROM AG, Berlin, Deutschland
Erythrozytenlyse-Puffer (ACK-Puffer)	0,15 M Na ₄ Cl; 0,01 MKHCO ₃ ; 0,1 mM EDTA
MACS-Puffer	10xPBS + 0,5% BSA + 2 mM EDTA
PBS Dulbecco (w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺)	BIOCHRRROM AG, Berlin, Deutschland
Propidiumiodid/RNase Färbe-Puffer	BD, Bioscience, Heidelberg, Deutschland
RPMI 1640-Medium (w 2,0 g/l NaHCO ₃)	BIOCHRRROM AG, Berlin, Deutschland

3.1.3 Geräte

Absorptionsreader	Anthos Laptec Instruments, Krefeld, Deutschland
Auto MACS-Seperator	Milteny Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Becton Dickinson FACSCalibur	BD, Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Brutschrank Steri-cult 200-Incubator	Forma Scientific, Labotec, Göttingen, Deutschland
CAWO Entwicklungsmaschine Cawomat 2000 IR	Bender Gruppe, Baden-Baden, Deutschland
Hämatologieautomat Ac T diff2™	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Heraeus Biofuge Fresco	DJB labcare, Hanau, Deutschland
Inotech Cell-Harvester	Inotec, Wohlen, Schweiz, über Wallac, Turkey, Finnland
Microbeta Liquid Scintillation Counter	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau Jügesheim, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen Deutschland
Varistain™ 24-4 Automatic Slide Stainer	Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland
Zentrifuge Hettich Rotanta/TR	Hettich Zenrifuge, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Universal 30F	Hettich Zenrifuge, Tuttlingen, Deutschland

3.1.4 Software

Cell Quest Pro™	BD, Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Citavi 4.1	Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, San Diego, USA
KODAK 1D Image Analysis Software	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Microbeta Liquid Scintillation Counter	Wallac, Turku, Finnland
Microsoft™ Excel Version 2003/2007	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Microsoft™ Powerpoint Version 2003/2007	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Microsoft™ Word Version 2003/2007	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Mikrotek-Software	Mikrotek Laborsysteme, Overath, Deutschland

3.1.5 Antikörper

Maus-anti-Human CD28-Antikörper Hybridomüberstände, Klon 248.23.2	Institut für Molekulare und Klinische Immunologie, Magdeburg, Deutschland
Antikörper für Durchflusszytometrie Simultest γ 1 FITC/ γ 2A PE Simultest CD45 FITC/ CD14 PE Simultest CD3 FITC/ CD16 + CD56 PE Simultest CD3 FITC/CD19 PE	BD Biosciences, San José, USA
Ziege-anti-Maus-IgM + IgG	Dianova, Hamburg, Deutschland
Maus-anti-Human CD3-Antikörper Hybridomüberstände, Klon OKT.3	Institut für Molekulare und Klinische Immunologie, Magdeburg, Deutschland
Hamster-anti-Maus CD3	BD Biosciences, San José, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Gewinnung von MNZ aus humanem peripheren Blut

Die Gewinnung von MNZ aus dem peripheren Blut gesunder Spender erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Diese Methode basiert auf der Trennung verschiedener Zellpopulationen in einem Dichtegradienten zwischen dem peripheren Blut und einer Polysaccharoselösung (Biocoll Separating Solution mit einer Dichte von 1,077 g/ml). Erythrozyten und Granulozyten haben eine höhere Dichte als Biocoll; MNZ hingegen eine geringere. Plasma und Thrombozyten verfügen schließlich über die geringste Dichte. Gleichzeitig werden bei der Separation lebende Zellen mit niedriger Dichte von toten Zellen mit hoher Dichte getrennt. Abbildung 4 zeigt die Entstehung der klassischen Schichten durch die Dichtegradientenzentrifugation [230].

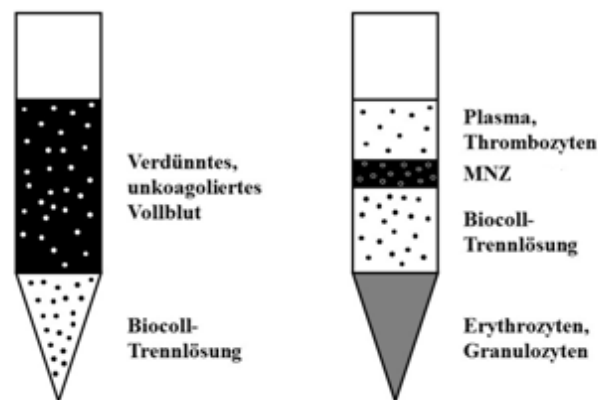


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Zentrifugationsröhrchens vor (links) und nach (rechts) einer Dichtegradientenzentrifugation, modifiziert nach [231].

Durchführung

Gesunden humanen Spendern wurden 200 ml Blut aus der Peripherie entnommen. Für die Blutentnahme lag ein positives Votum der Ethikkommission der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg vor. Zudem willigten die Spender schriftlich zur Entnahme sowie zur wissenschaftlichen Verwendung ihres Blutes ein. Das entnommene Material wurde im Verhältnis 2:1 mit 100 ml Heparin-versetztem RPMI 1640-Medium (5 U/ml) gemischt. Die in einem sterilen 50 ml-Röhrchen bereitgestellten 12,5 ml Biocoll-Lösung wurden mit 30 ml heparinisiertem Vollblut vorsichtig überschichtet und bei 18 °C, mit 500 x g und einem mäßigen Auslauf (Zentrifuge Hettich Rotanta/TR, Bremse, Stufe 2) für 30 Minuten zentrifugiert. Die entstandene Interphase zwischen der Biocoll-Lösung und dem Plasma enthielt die MNZ. Der Interphase-Ring wurde vorsichtig

abgenommen und in ein frisches 50 ml-Röhrchen überführt. Die drei anschließenden Waschschritte mit RPMI 1640-Medium bestanden aus je einer 10-minütigen Zentrifugation (400 x g; Bremse, Stufe 9) bei Raumtemperatur, gefolgt von einer Resuspension des Pellets und der Vereinigung der Zell-Sedimente von jeweils zwei Röhrchen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte anschließend mittels eines vollautomatischen Zählgerätes (Hämatologie-Automat Ac T diff2™, Beckman-Coulter).

3.2.2 Isolation von T-Zellen aus humanen MNZ

Zur Isolation spezifischer Zellpopulationen wurde die Methode der magnetischen Zelltrennung (magnetic cell sorting, MACS) angewandt. Einzelne Subpopulationen immunologischer Zellen unterscheiden sich in ihren Oberflächenmolekülen (Cluster of differentiation „CD“). Werden MNZ gemeinsam mit supramagnetischen Partikeln, an die spezifische monoklonale Antikörper gegen diese CD-Antigene gekoppelt sind, inkubiert und anschließend über eine Säule mit einem starken permanenten Magnetfeld geleitet, haften die Antikörper-Magnetpartikel-markierten Zellen an dieser Säule. Alle nicht markierten Zellen durchlaufen die Säule und können somit von der markierten Zellfraktion separiert werden.

Die MACS-Zellsortierung kann als „Anreicherung“ oder als „Aussortierung“ durchgeführt werden. Bei einer „Anreicherung“ werden die zu isolierenden Subpopulationen markiert, bei einer „Aussortierung“ hingegen die Verwendung nicht-markierter Zellfraktionen.

Die Isolation von Pan (CD3⁺)-T-Zellen sowie CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen erfolgte durch indirekte Separation/„Aussortierung“ mittels Isolations-Kits der Firma Miltenyi Biotec nach entsprechenden Protokollen. Dazu wurden frisch isolierte MNZ in eiskaltem MACS-Puffer (0,5% BSA in PBS) bei Raumtemperatur gewaschen (Zentrifugation für 10 Minuten bei 500 x g) und anschließend in MACS-Puffer aufgenommen (100 Millionen Zellen/400 µl). Nach Zugabe entsprechender biotinylierter Antikörper und einer Inkubation von 10 Minuten auf Eis folgte die Zugabe von MACS-Puffer und anti-Biotin-Mikrobeads und eine erneute 15-minütige Inkubation auf Eis. Um überschüssige Antikörper zu entfernen, schloss sich ein weiterer Waschschritt mit anschließender Resuspension (10⁸ Zellen in 500 µl MACS-Puffer) an. Die „Aussortierung“ erfolgte am autoMACS (Miltenyi Biotec). Die gewonnenen CD4⁺-, CD8⁺- und Pan-T-Zellen wurden in AIM-V-Medium aufgenommen und die entsprechenden Zellzahlen mittels eines Hämatologie-Automaten (Ac T diff2™, Beckman-Coulter) bestimmt.

Typisierung der T-Zellfraktionen mittels Durchflusszytometer

Zur Zell-Typisierung und zur Bestimmung des Reinheitsgrades der Pan-T-Zellfraktionen wurden 100 µl T-Zellen (10^6 Zellen/ml) mit 15 µl der monoklonalen Antikörper $\gamma 1$ FITC/ $\gamma 2A$ PE (Kontrolle), CD45 FITC/ CD14 PE (Monozyten-Marker), CD3 FITC/ CD16/ + CD56 PE (NK-Zell-Marker) und CD3 FITC/CD19 PE (B-Zell-Marker) gefärbt (15 Minuten Dunkelinkubation). Der darauf folgende Waschschrift beinhaltet sowohl die Zugabe von PBS-Puffer mit 0,5% BSA als auch eine fünfminütige Zentrifugation ($400 \times g$) bei 18 °C und ermöglichte schließlich eine Zellfixierung in 300 µl PBS mit 0,5% BSA und 1% PFA. Die Messung und Auswertung erfolgte am Durchflusszytometer FACS-Calibur (BD Biosciences). Die Reinheit der in den Experimenten verwendeten T-Zell-Präparationen betrug $97 \pm 2\%$.

3.2.3 Messung der Zellvitalität

Klassische Methoden der Vitalitätsbestimmung nutzen die Integrität der Plasmazellmembran als Nachweiskriterium. Für ausgewählte kationische Farbstoffe stellt die intakte Plasmamembran eine unüberwindbare Barriere dar. Trypanblau, zu den Azofarbstoffen gehörend, bindet an zytosolische Proteine, wodurch tote Zellen lichtmikroskopisch blau erscheinen, während vitale Zellen farblos bleiben [231]. Der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) interkaliert hingegen in doppelsträngige Nukleinsäuren (DNA, rRNA) und zeigt in einem gewissen Konzentrationsbereich eine stöchiometrische Wechselwirkung mit der jeweiligen Nukleinsäure. Das Eindringen von PI in Zellen mit gestörter Membranintegrität kann mittels Durchflusszytofluorimeter bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einem Emissionsmaximum von 617 nm bestimmt werden. Tote Zellen erscheinen hierbei orange-rot [231, 232].

Die Durchflusszytofluorimetrie ist ein lasergestütztes, optisches Messverfahren. Mit Hilfe von Fluoreszenz- und Streulichtsignalen können Zellen anhand ihrer Größe und Granularität analysiert werden. Hierfür werden die zu untersuchenden Partikel an einem Argonlaser (Emissionsspektrum 488 nm) in einem laminaren Probenstrom vorbeigeleitet. Dabei entstehen entsprechend der Lichtstreuung Beugemuster. Das parallel zur Auftreffrichtung des Lichtes entstandene Beugemuster bezeichnet man als „Forward Scatter“ (FSC). Dieses dient zur Bestimmung der Zellgröße. Das Beugemuster in 90°-Richtung (Side Scatter, SSC) fungiert als Granularitätsmaß. Andere Zelleigenschaften wie beispielsweise DNA-Gehalt oder Rezeptorexpression lassen sich über spezifische Antikörper- oder Konjugat-gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe analysieren [232].

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Vitalitätstestung humane T-Zellen, wie in Kapitel 3.2.3. beschrieben, und murine Splenozyten (siehe Kapitel 3.2.8) isoliert und in An- und Abwesenheit verschiedener Zink-HA Konzentrationen für 4 und 24 Stunden in einem befeuchteten, 37 °C, 7% CO₂-Inkubator kultiviert. Kontrollkulturen wurden mit der entsprechenden Menge an AIM-V-Medium versetzt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach 0, 4 und 24 Stunden mittels Trypanblau-Färbung. 20 µl einer gut gemischten Zellsuspension wurden dazu 1:1 mit Trypanblau versetzt, gevortext und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um anschließend in eine Neubauer-Zählkammer überführt zu werden. Lichtmikroskopisch wurde zunächst die Gesamtzahl der Zellen und die Anzahl toter Zellen mäanderförmig ausgezählt, um somit den prozentualen Anteil toter und lebender Zellen zu ermitteln. Diese Prozedur wurde pro Zellsuspension in Form von zwei unabhängigen Messungen durchgeführt und die Mittelwerte der Messergebnisse gebildet.

Die PI-Färbung wurde im Anschluss an eine vierstündige Inkubationszeit der Zellen mit oder ohne Zink-HA durchgeführt. Nach Pelletierung der Zellen (Zentrifugation für 10 Minuten bei 1800 x g) und Dekantierung des Überstandes erfolgte die PI-Färbung unter Verwendung des PI/RNase Färbepuffer (10 µg/ml) bei Raumtemperatur im Rahmen einer 15-minütigen Dunkelinkubation. Anschließend wurden die Proben am Durchflusszytometer FACSCalibur (BD Biosciences) vermessen und hinsichtlich des prozentualen Anteils toter und lebender Zellen mit Hilfe des Cell Quest Pro-Programms analysiert.

3.2.4 Messung der DNA-Synthese stimulierter humaner T-Zellen

Frisch isolierte Pan-T-Zellen sowie CD4⁺-, CD8⁺-T-Zellen wurden in serumfreiem AIM-V-Medium (10⁶ Zellen/ml) resuspendiert und in 96-well-Flachbodenplatten mit PWM (2 µg/ml) oder anti-CD3/CD28-Antikörpern in An- und Abwesenheit verschiedener Zink-HA-Konzentrationen (25; 50; 100; 150; 200 µM) kultiviert. Kontrollkulturen wurden mit der entsprechenden Menge an AIM-V-Medium versetzt. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 72 Stunden in einem befeuchteten 37 °C, 7% CO₂-Inkubator. In den letzten 6 Stunden erfolgte die Zugabe von 20 µl/well [³H]-Thymidin (0,33 µCi/well) zur Erfassung der DNA-Synthese. Anschließend wurde die Zell-DNA mit einem Inotech Cell-Harvester (PerkinElmer LAS GmbH) auf Glasfiltermatten geerntet und die DNA-Synthese mittels eines Microbeta Liquid Scintillation Counter (PerkinElmer LAS GmbH) bestimmt.

In Versuchsansätzen mit anti-CD3/CD28-Antikörper-Stimulation wurden die Platten zuvor mit 10 µl/ml Ziege-anti-Maus Antikörpern über Nacht bei 4 °C beschichtet und anschließend drei Mal mit je 400 µl sterilem PBS-Puffer gewaschen, um überschüssige Antikörper zu

entfernen. Im nächsten Schritt folgte die Beschichtung mit anti-CD3/CD28-Antikörpern in einer 1:100 Verdünnung mit PBS für 2 Stunden im befeuchteten CO₂-Inkubator (37 °C; 7% CO₂). Abschließend wurden die Platten erneut dreimalig, wie oben beschrieben, gewaschen.

3.2.5 Gewinnung humaner Zellkulturüberstände

Zur Gewinnung von Zellkulturüberständen wurden humane T-Zellen (10⁶ Zellen/ml) in 24-well-Flachbodenplatten in serumfreiem AIM-V-Medium mit PWM (2 µg/ml) oder anti-CD3/CD28-Antikörpern in An- und Abwesenheit verschiedener Zink-HA-Konzentrationen (50; 100; 150; 200 µM) in einem befeuchteten Inkubator (37 °C; 7% CO₂) kultiviert. Nach 4, 24, 48 und 72 Stunden erfolgte die Gewinnung von Zellkulturüberständen mittels einer zwei-minütigen Zentrifugation (3300 x g). Danach konnten die Überstände abgenommen und bei -20°C gelagert werden.

3.2.6 Humaner Zytokin-Array

Zur semiquantitativen Analyse von Zytokinkonzentrationen in Zellkulturüberständen unstimulierter und PWM-stimulierter humaner T-Zellen (10⁶ Zellen/ml) nach einer 72-stündigen Inkubation in An- und Abwesenheit von 150 µM Zink-HA wurde der „Human Cytokine Array Panel A Kit“ (R&D Systems) verwendet. Durch punktförmige Anordnung spezifischer Antikörper auf einer Nitrozellulosemembran konnten gleichzeitig 36 Zytokine in Doppelbestimmung gemessen werden (Tab. 3). Diese Methode basiert auf dem „Sandwich“-Prinzip (Abb. 5) und fungierte als Screeningtest zur Analyse der Wirkung von Zink-HA auf die Produktion verschiedener Zytokine. Alle Inkubationen fanden, soweit nicht anders ausgewiesen, auf einem Schüttler (50x/min) bei Raumtemperatur statt. Zunächst wurden die Membranen mit der Antikörper-beschichteten Seite nach oben in speziell dafür vorgesehene 4-Kammer-Multischalen gegeben und eine Stunde mit 2 ml Blockierungs-Puffer inkubiert. Nach Entfernung des Blockierungs-Puffers erfolgte die Zugabe eines Gemisches aus 1 ml Zellkulturüberstand, 0,5 ml Puffer und 15 µl biotinyliertem Detektions-Antikörper-Cocktail. Daraufhin erfolgte über Nacht eine Inkubation bei 4 °C. Die in den Kulturüberständen enthaltenen Zytokine banden an entsprechende immobilisierte anti-Zytokin-Antikörper der Membran und an die dazugehörigen zytokinspezifischen Detektions-Antikörper. Den darauffolgenden dreigängigen Waschschrift führte man in gesonderten Gefäßen (20 ml Wasch-Puffer für je 10 Minuten) durch, um die Membranen

schließlich für 30 Minuten mit 1,5 ml 1:1000 verdünnter Streptavidin-HRP in gereinigten 4-Kammer-Multischalen zu inkubieren. Hieran schloss sich ein weiterer Waschschrift an. Danach wurden 1,5 ml Detektionspuffer (Luminol und Wasserstoffperoxid) gleichmäßig über die Membranen verteilt, diese vorsichtig aus der Kavität entnommen, angetrocknet und unter ECL-Film-Exposition (GE Healthcare Limited) in eine Autoradiographiekassette überführt. Die HRP katalysierte unter alkalischen Bedingungen eine Oxidation von Luminol, welches in einen angeregten Zustand überführt wurde und Licht emittierte [231]. Während einer 10-minütigen Belichtungszeit ließ sich ein durch die Chemolumineszenz hervorgerufenen Signal detektieren, welches proportional zu der gebundenen Zytokinkonzentration war. Anschließend wurden die ECL-Filme mit dem Cawomat 2000 IR (Bender Gruppe) entwickelt, eingescannt und mittels KODAK 1D Image Analysis Software (Sigma-Aldrich) analysiert.

Tabelle 3: Positionen der entsprechenden Zytokine und Kontrollen des Zytokin-Arrays

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A	Pos		C5a		CD40L		G-CSF		GM-CSF		CXCL1		CCL1		sICAM-1		IFN- γ		Pos	
B			IL-1 α		IL-1 β		IL-ra		IL-2		IL-4		IL-5		IL-6		IL-8			
C			IL-10		IL-12p70		IL-13		IL-16		IL-17		IL-17E		IL-23		IL-27			
D			IL-32 α		IP-10		CXCL11		MCP-1		MIF		MIP-1 α		MIP-1 β		Serpin E1			
E	Pos		RANTES		CXCL12		TNF- α		sTREM-1											Neg

(Pos: Positivkontrolle; Neg: Negativkontrolle; Abkürzungen der Zytokine: siehe Anhang)

3.2.7 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Bestimmung humaner sowie muriner GM-CSF-, IL 5-, IL 10-, TNF- α - und IFN- γ -Konzentrationen in Zellkulturüberständen erfolgte mittels kommerzieller ELISA-Testsysteme der Firma R&D Systems (Wiesbaden; Deutschland) nach entsprechenden Testvorschriften.

Die verwendeten Assays basieren auf dem Sandwich-Prinzip – einer Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der das zu quantifizierende Antigen zwischen zwei Antikörpern eingebettet wird (Abb. 5). Als Grundlage dienten 96-well Mikrotiterplatten, welche mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen die jeweiligen Zytokine beschichtet sind. Zellkulturüberstände und Standardproben wurden in die Platte pipettiert und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Antigenbindung an den jeweiligen immobilisierten Antikörper zu ermöglichen. Zur Quantifizierung der Proben wurde nach vier (human) bzw. fünf (murin) Waschschriften ein zweiter, enzymmarkierter, polyklonaler

Detektionsantikörper zugegeben und für weitere 2 Stunden zur Antigenbindung inkubiert. Anschließende Waschschritte ermöglichten die Zugabe einer Substratlösung, welche aus gleichen Anteilen der Farbreagenz A (stabilisierendes Wasserstoffperoxid) und der Farbreagenz B (Tetramethylbenzidine) bestand. Die durch das gebundene Enzym ausgelöste Farbreaktion war in ihrer Stärke direkt proportional zur Antigen/Zytokin-Konzentration. Die Messung der Extinktionen nach abgestoppter Farbreaktion erfolgte bei 450 nm im Mikrotiterplatten-ELISA-Reader (Anthos Laptec Instruments) mit anschließender Konzentrationsberechnung über entsprechend mitgeführte Standardkurven mit Hilfe der Mikrotek-Software (Mikrotek Laborsysteme).

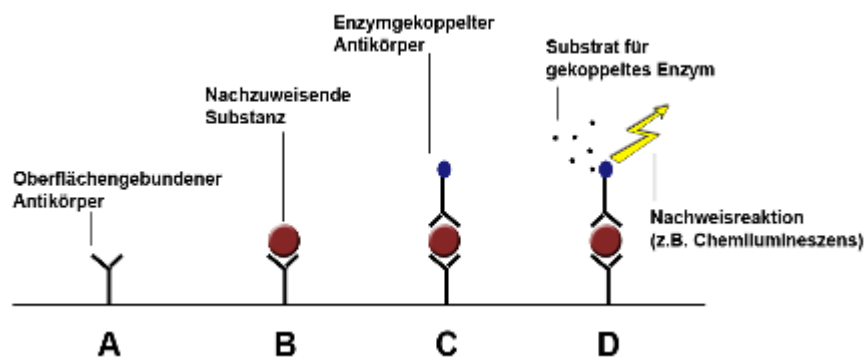


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Prinzips von Zytokin-Array und Zytokin-ELISA, modifiziert nach [231].

3.2.8 Separation muriner Zellen

Organentnahme

Zur Isolation von Maus-Splenozyten wurden SJL/J-Mäuse entsprechend der geltenden Richtlinien getötet, in Rückenlage fixiert und die angehobene Bauchdecke mit einem Medianschnitt eröffnet. Zur Wahrung aseptischer Bedingungen erfolgte ein Besteckwechsel. Im Anschluss wurde die Bauchhaut zur Splenektomie eröffnet. Die Milz überführte man in separate Gefäße mit RPMI 1640-Medium und lagerte diese vorübergehend bei 4 °C.

Zellisolation

Die unter sterilen Bedingungen entnommenen Spleni wurden anschließend in ein 70 µm Nylonsieb überführt und der Gewebeverband in frischem RPMI 1640-Medium durch vorsichtiges Drücken mit dem Stempel einer sterilen 2 ml Plastikspritze homogenisiert. Mit einer Plastik-Pasteurpipette wurden die Zellen anschließend mit RPMI 1640-Medium durch das Sieb in ein steriles Röhrchen gespült. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 600 x g wurde

der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 15 ml RPMI 1640-Medium resuspendiert. Diese Splenozyten wurden nach dem ersten Waschschrift in 500 µl ACK-Puffer aufgenommen und für 5 Minuten zur Erythrozytenlyse bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die erneute Aufnahme der Splenozyten in RPMI 1640-Medium. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer am Lichtmikroskop ermittelt.

Zur Berechnung der Zellzahl diente folgende Formel:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Anzahl Zellen} \times 10^4 \text{ (Kammerfaktor)} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Kammerfaktor einer Neubauer Zellkammer wird als Produkt von Höhe (0,1 mm) und Fläche (1,0 mm²) eines Großquadrates angegeben und spiegelt somit das Volumen (0,1 µl) eines von vier Großquadraten wieder.

Gewinnung muriner Zellkulturüberstände

Zur Gewinnung von Zellkulturüberständen wurden Splenozyten gesunder SJL/J-Mäuse in 24-well-Flachbodenplatten (TPP) mit PWM (1 µg/ml) oder anti-CD3-Antikörpern in An- und Abwesenheit verschiedener Zink-HA-Konzentrationen (25; 50; 100; 150 µM) in einem befeuchteten CO₂-Inkubator (37 °C; 7% CO₂) kultiviert. Pro Mikrotiterplattenvertiefung befanden sich 3 x 10⁶ Splenozyten in 1 ml AIM-V-Medium mit 10⁻⁵ M 2-Mercaptoethanol (2-ME), welchen Zink-HA zugesetzt wurde. Kontrollkulturen wurden mit der entsprechenden Menge an AIM-V-Medium versetzt. Nach 4, 24, 48 und 72 Stunden erfolgte die Gewinnung von Zellkulturüberständen mittels zweiminütiger Zentrifugation (3300 x g) und anschließender Abnahme der Überstände sowie Lagerung bei -20 °C. In Versuchsansätzen mit anti-CD3-Antikörper-Stimulation wurden die Platten mit Hamster-anti-Maus-CD3-Antikörpern (5 µg/ml PBS) über Nacht bei 4 °C beschichtet und anschließend drei Mal mit 100 µl (96-well-Platten) bzw. 400 µl (24-well-Platten) PBS gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen.

3.2.9 Messung der DNA-Synthese stimulierter Splenozyten der Maus

Splenozyten gesunder SJL/J-Mäuse wurden in einer Konzentration von 1 x 10⁶/ml in AIM-V-Medium mit 10⁻⁵ M 2-ME suspendiert und in 96-well-Rundbodenplatten mit PWM (1 µg/ml) oder anti-CD3-Antikörper in An- und Abwesenheit verschiedener Zink-HA-Konzentrationen (25; 50; 100; 150 µM) kultiviert. Kontrollkulturen wurden mit der

entsprechenden Menge an AIM-V-Medium versetzt. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 72 Stunden in einem befeuchteten CO₂-Inkubator (37 °C; 7% CO₂). In den letzten 16 Stunden wurden 20 µl ³H-Thymidin (0,33 µCi/well) zur Messung der DNA-Synthese zugesetzt. Anschließend wurde die DNA der Zellen mit einem Inotech Cell-Harvester (PerkinElmer LAS GmbH) auf Glasfiltermatten geerntet und die DNA-Synthese mittels eines Microbeta Liquid Scintillation Counters (PerkinElmer LAS GmbH) bestimmt.

3.2.10 Versuchstiere

Für *in-vivo*-Experimente wurden 12 bis 16 Wochen alte weibliche SJL/J-Mäuse (JANVIER, LE GENEST-ST-ISLE, Frankreich) verwendet. Die Tierhaltung erfolgte in Kleingruppen bis maximal 10 Mäuse pro Käfig unter pathogenarmen Bedingungen. Alle Tiere durchliefen einen 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus und erhielten eine Standarddiät für Mäuse und Leitungswasser *ad libitum*. Eingewöhnungsphasen von mindestens 2 Wochen vor Versuchsbeginn wurden beachtet.

3.2.11 Induktion der EAE an SJL/J-Mäusen

Zur Induktion der EAE an weiblichen SJL/J-Mäusen erfolgte eine einmalige subkutane Applikation von 200 µg PLP (139-151)-Peptid à 50 µl fraktioniert in 4 Flankendepots. Dazu wurde eine 1:1 Emulsion aus in sterilem PBS gelöstem PLP (139-151)-Peptid und Complete Freund's Adjuvant (CFA) mit 4 mg/ml abgetöteten *M. tuberculosis* hergestellt. Diese Emulsion wurde in einem geschlossenen Glasspritzen-System intensiv gemischt. CFA verwendet man insbesondere zur Immunisierung von Tieren, um eine starke Th1-Immunreaktion zu induzieren, welche u. a. eine Voraussetzung für die Entstehung einer EAE ist [233, 234]. Um die EAE-Immunreaktion zu verstärken und die Erkrankung mit einer größeren Wahrscheinlichkeit zu induzieren (Erkrankungsrate ca. 90%), erfolgte am Tag 0 und am Tag 2 eine intraperitoneale Injektion von je 200 ng Pertussis-Toxin (PTX) (1 ng/µl) pro Maus. PTX „öffnet“ die BHS und erzeugt eine zusätzliche Adjuvanswirkung zur Verstärkung der Th1-Immunreaktion [235].

3.2.12 Therapeutische Applikationen von Zink-HA im klinischen Verlauf der EAE

Zur Untersuchung der Wirkung oraler therapeutischer Gaben von Zink-HA auf den klinischen Verlauf der EAE von SJL/J-Mäusen erhielten die entsprechenden Versuchstiere in PBS-gelöstes Zink-HA in Konzentrationen von 6, 12, 30 oder 120 µg. Die tägliche Applikation erfolgte peroral mittels Eppendorf-Pipetten für einen Zeitraum von 10 Tagen, beginnend ab Tag 10. Als Kontrollgruppe fungierten in allen Experimenten Versuchstiere, welche täglich entsprechende Mengen PBS per os erhielten.

3.2.13 Evaluierung des klinischen Schweregrades der EAE

Zur klinischen Verlaufsbeobachtung der EAE wurden SJL/J-Mäuse beginnend ab Tag 8 nach der Immunisierung täglich auf Symptome der Erkrankung untersucht. Die EAE manifestiert sich in Form einer aufsteigenden Lähmung, deren Schweregrade, entsprechend Tabelle 4 und Abbildung 6, graduiert wurden. Für die tägliche Dokumentation der Erkrankungszustände wurden die Mittelwerte aller individuellen Erkrankungsniveaus jeder einzelnen Versuchstiergruppe verwendet. Die Tierversuche wurden von der staatlichen Behörde genehmigt (Genehmigungsnummer 42502-2-1110 UniMD) und entsprechend der geltenden Vorschriften durchgeführt. Mäuse mit einem EAE-Grad größer/gleich 3 oder stark eingeschränktem Allgemeinzustand wurden euthanasiert.

Tabelle 4: Klinische Graduierung der EAE

Grad	Klinik
0	Keine Symptome
0,5	Partieller Tonusverlust des Schwanzes
1	Tonusverlust des Schwanzes
1,5	Tonusverlust des Schwanzes, verlangsamtes Aufrichten aus der Rückenlage
2	Parese mindestens einer hinteren Extremität
2,5	Nachziehen mindestens einer hinteren Extremität
3	Plegie mindestens einer hinteren Extremität
3,5	Beginnende Parese einer vorderen Extremität
4	Zusätzlich schwere Parese mindestens einer vorderen Extremität
5	Moribund oder tot

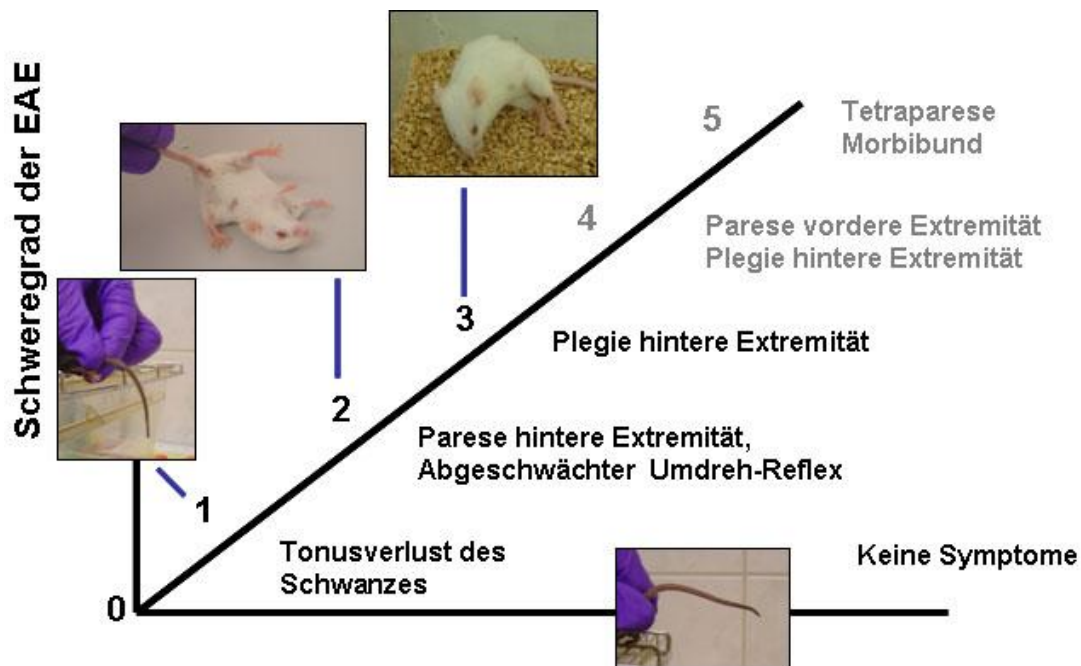


Abbildung 6: Klinische und graphische Darstellung der EAE-Schweregrade

3.2.14 Histopathologie des ZNS EAE-erkrankter SJL/J-Mäuse

Zur Untersuchung krankheitsbedingter inflammatorischer Infiltrate im Rückenmark wurden SJL/J-Mäuse mit PLP (139-151)-Peptid-induzierter EAE während der aktiven Erkrankung am Tag 21 nach 10-tägiger oraler Therapie mit oder ohne 12 µg Zink-HA euthanasiert. Die Präparation des Rückenmarks erfolgte in fixierter Bauchlage nach Eröffnung der Haut mittels Medianschnitt und Entnahme der gesamten Wirbelsäule. Wirbelkörper für Wirbelkörper wurde an der anterioren Seite mit einer spitzen Schere durchtrennt, das Rückenmark in ganzer Länge vorsichtig aus dem Wirbelkanal gelöst, für mindestens 24 Stunden in 4% Formaldehydlösung fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Mit Hilfe eines Mikrotoms (IHE-Automat; Leica SM 2000R) wurden 4 µm dünne Längs- und Querschnitte vom Zervikal-, Thorakal- und Lumbalmark angefertigt, auf einem beschichteten Objektträger aufgezogen, über Nacht bei 60 °C getrocknet und schließlich mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt (Färbe-Automat Varistein 24-4; Shandon Labortechnik GmbH) [231]. Lichtmikroskopisch wurde die Anzahl infiltrierender Zellen der weißen Substanz des Rückenmarkes aus 3 repräsentativen Schnitten verblindet ausgezählt und deren Mittelwert gebildet.

3.2.15 Statistische Methoden

Datenerhebung, Statistik und Textverarbeitung erfolgte unter Verwendung kommerziell erhältlicher Softwareprogramme (Microsoft™ Word, Microsoft™ Excel, Microsoft™ Powerpoint, GraphPad Prism 6, Cell Quest Pro™). Alle Messdaten wurden, soweit nicht anders ausgewiesen, als Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) oder Standardfehler (SEM) angegeben.

Für Untersuchungen der Proliferation und Vitalität von Zellen sowie für die Zytokinsynthese konnte eine Normalverteilung angenommen und *ANOVA-Methoden* zur statistischen Prüfung eingesetzt werden. Soweit nicht anders angegeben wurden alle Hypothesen zweiseitig („two-tailed“) formuliert. Der Dunnett's T_3 -Test diente als Post-hoc-Test.

Für die statistische Analyse der EAE-Verläufe wurden zunächst für jeden Versuchstag sowie jede Versuchsgruppe die Medianwerte der EAE-Scores ermittelt. Anschließend kam der nonparametrische, ungepaarte *Mann-Whitney Rangsummen-Test* zum Einsatz [236].

Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von $\leq 0,05$ festgelegt. „p“ gibt dabei die Wahrscheinlichkeit an, mit der die Nullhypothese zu Unrecht verworfen werden kann. In den Abbildungen wurden signifikante Unterschiede mit „*“ gekennzeichnet [237].

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Wirkung von Zink-HA auf die DNA-Synthese und Zytokinproduktion stimulierter humaner T-Zellen

DNA-Synthese stimulierter humaner T-Zellen

Zinkmangel aber auch hohe Konzentrationen dieses Spurenelementes verursachen Funktionsstörungen im Immunsystem. Diese Beobachtungen suggerieren eine Zink-vermittelte Homöostase der Immunantwort [238–240].

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Untersuchung möglicher Effekte des zugelassenen Therapeutikums Zink-HA auf die T-Zell-Aktivierung die Wirkung auf die DNA-Synthese stimulierter humaner Pan-T-Zellen und T-Zell-Subpopulationen untersucht. Zunächst erfolgte eine Vitalitätsbestimmung zum Ausschluss potenzieller zytotoxischer Effekte von Zink-HA auf die T-Zell-Populationen. Humane Pan-T-Zellen wurden mit PWM oder mit anti-CD3/CD28-Antikörpern in Gegenwart verschiedener Zink-HA-Konzentrationen stimuliert. Die Bestimmung der Zell-Vitalität erfolgte in Parallelkulturen nach 4 Stunden (Abb. 7 a) und 24 Stunden (Abb. 7 b) mittels Trypanblau-Färbung sowie mit Hilfe einer PI-Färbung nach 4 Stunden (Abb. 7 c).

Die Vitalität der T-Zellen im Trypanblau-Test war zu beiden Zeitpunkten in dem untersuchten Konzentrationsbereich von bis zu 200 μM unbeeinflusst von Zink-HA. In den anti-CD3/CD28-Antikörper-Ansätzen betrug die maximale Schwankung der Vitalität nach 4 Stunden 2,2% des Ausgangswertes lebender Zellen in Abwesenheit von Zink-HA ($99,3 \pm 0,4\%$); nach 24 Stunden variierte diese zwischen ca. 1% (25 μM) und 10% (150 μM Zink-HA) des Ausgangswertes ($99,4 \pm 0,6\%$). Die maximale Schwankung der Vitalität PWM-stimulierter humaner T-Zellen betrug 2,4% des Ausgangswertes ($99,0 \pm 0,6\%$) nach 4-stündiger Inkubation. Nach 24 Stunden schwankte die Vitalität dieser Zellen zwischen rund 1% (25 μM) und 6,5% (200 μM Zink-HA) des Ausgangswertes ($98,5 \pm 0,4\%$).

Zur Überprüfung dieser lichtmikroskopisch erhobenen Daten mittels des Trypanblau-Testes wurde nachfolgend die durchflusszytometrische Vitalitätsmessung mit PI durchgeführt. Auch mit dieser automatisierten Analysemethode konnte in dem untersuchten Konzentrationsbereich kein Einfluss von Zink-HA auf die Vitalität humaner Pan-T-Zellen beobachtet werden. Die maximale Schwankung der Vitalität anti-CD3/CD28-Antikörper stimulierter humaner T-Lymphozyten betrug 0,7% des Ausgangswertes lebender Zellen in

Abwesenheit von Zink-HA ($99,6 \pm 0,4\%$), die Vitalität der PWM-stimulierten Zellen hingegen $0,5\%$ des Ausgangswertes ($99,6 \pm 0,4\%$).

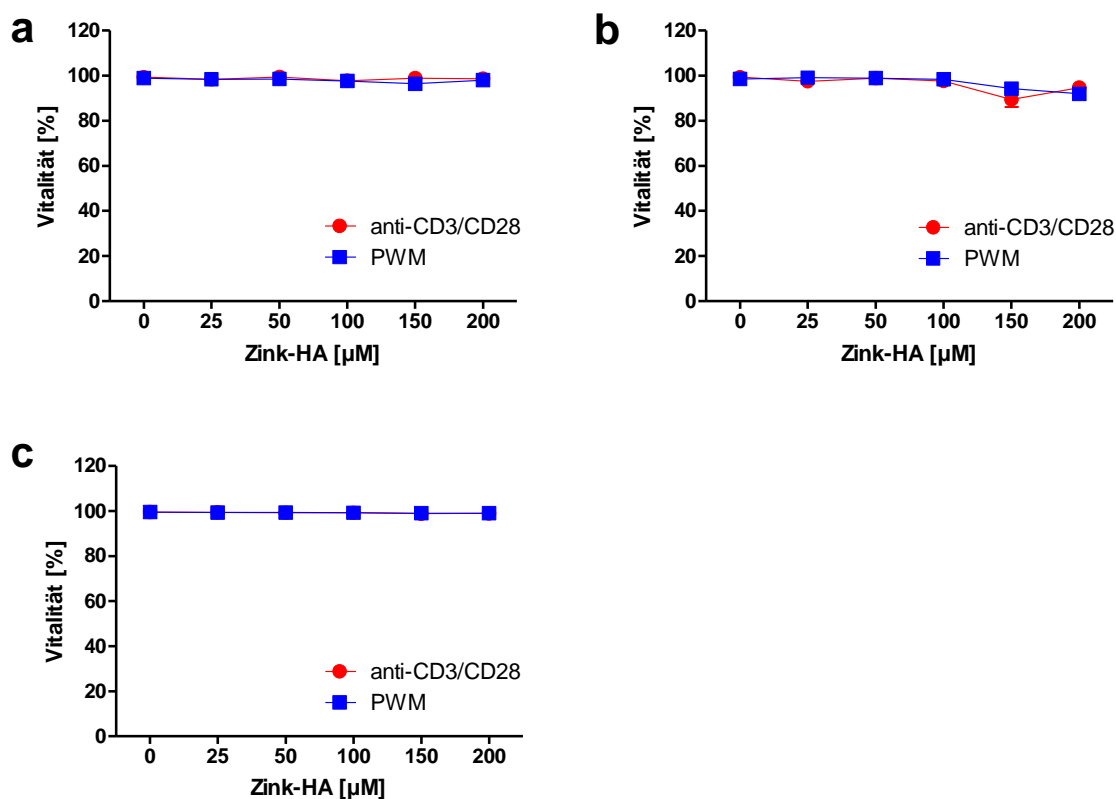


Abbildung 7: Zink-HA beeinflusst nicht die Vitalität stimulierter humaner Pan-T-Zellen. Humane Pan-T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-Antikörpern oder mit PWM in Gegenwart verschiedener Zink-HA-Konzentrationen stimuliert. Die Zell-Vitalität wurde nach 4 h (a) und 24 h (b) mittels Trypanblau-Färbung sowie nach 4 h (c) mit Hilfe einer PI-Färbung bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil lebender Zellen an der Gesamtzellzahl als Mittelwert \pm SEM aus 4 unabhängigen Experimenten.

Anschließend folgten Untersuchungen zur DNA-Synthese humaner Pan-T-Zellen sowie $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zell-Subpopulationen, welche mit dem Mitogen PWM oder mit anti-CD3/CD28-Antikörpern in Gegenwart verschiedener Zink-HA-Konzentrationen (0, 25, 50, 100, 150 und 200 μ M) aktiviert wurden. Nach 96 h erfolgte die Quantifizierung der DNA-Synthese der Zellen mittels Einbau von 3H -Thymidin (Abb. 8).

Es konnte beobachtet werden, dass Zink-HA die DNA-Synthese stimulierter humaner Pan-T-Zellen konzentrationsabhängig hemmt. In den Experimenten mit PWM-stimulierten humanen Pan-T-Zellen betrug die IC_{50} der DNA-Synthese ca. 125 μ M Zink-HA und im anti-CD3/CD28-Antikörper-Stimulationssystem ca. 80 μ M Zink-HA (Abb. 8 a). Während in anti-CD3/CD28-Antikörper stimulierten T-Zellen eine nahezu lineare dosisabhängige Hemmung der DNA-Synthese zu verzeichnen war, hatte Zink-HA in PWM-stimulierten

T-Zell-Kulturen bis zu einer Konzentration von 100 μM Zink-HA keinen wesentlichen Einfluss auf die DNA-Synthese. Konzentrationen von 150 μM und 200 μM Zink-HA führten schließlich zu einer signifikanten Hemmung ($p < 0,05$).

Um diese Beobachtungen zu vertiefen, wurde in weiteren Experimenten der Einfluss von Zink-HA auf die DNA-Synthese von CD4^+ - und CD8^+ -T-Zell-Subpopulationen untersucht. In stimulierten humanen CD4^+ -T-Zellen hemmte Zink-HA konzentrationsabhängig die Proliferation mit IC_{50} -Werten von 100 μM in beiden Stimulationssystemen (Abb. 8 b). Die für Pan-T-Zellen beobachtete dosisabhängige Wirkung von Zink-HA spiegelte sich auch in der Proliferationshemmung stimulierter humaner CD8^+ -T-Zellen wieder (Abb. 8 c). Die IC_{50} -Werte betragen ca. 130 μM (PWM) und ca. 110 μM (anti-CD3/CD28-Antikörper-Stimulation).

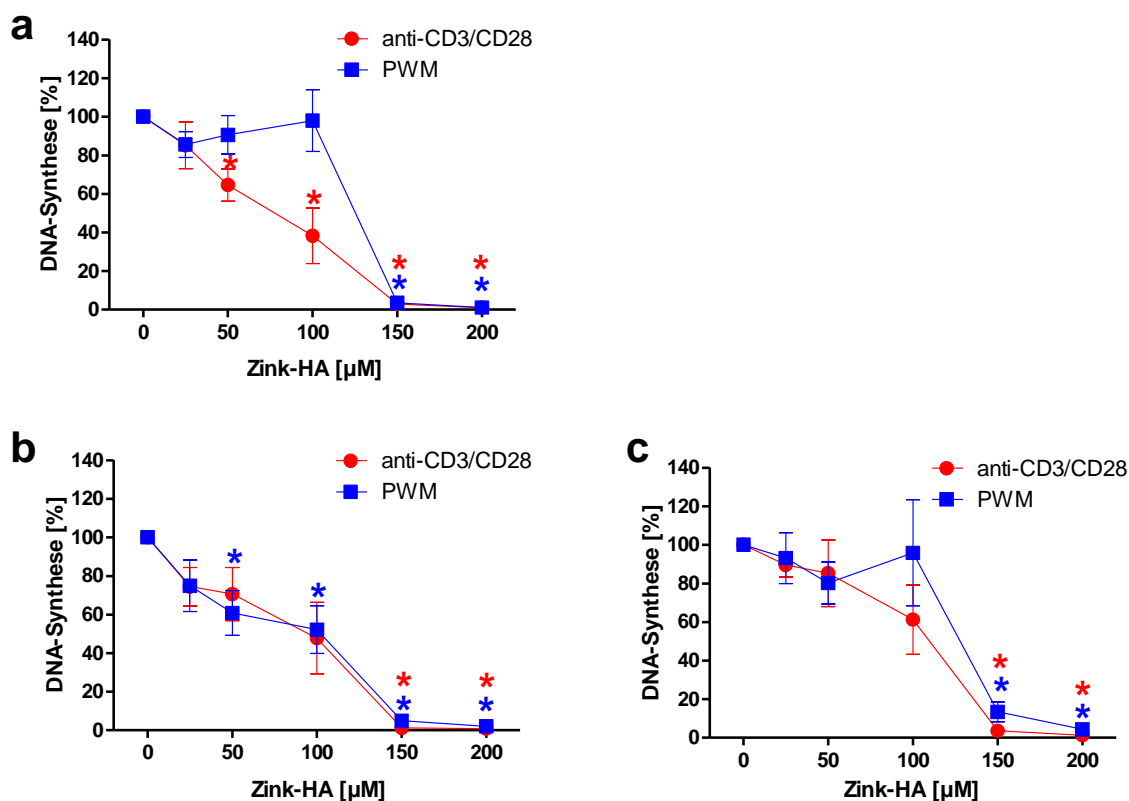


Abbildung 8: Zink-HA hemmt die DNA-Synthese stimulierter T-Zellen. Humane Pan-, CD4^+ - und CD8^+ -T-Zellen wurden mit PWM oder anti-CD3/CD28-Antikörpern in Gegenwart verschiedener Zink-HA-Konzentrationen kultiviert. Nach 96 h erfolgte die Bestimmung der DNA-Synthese durch Einbau von ^3H -Thymidin. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 7 (Pan-T-Zellen (a)) bzw. 4 (CD4^+ - (b) und CD8^+ -T-Zellen (c)) unabhängigen Experimenten in Relation zur DNA-Synthese stimulierter Zellen in Abwesenheit von Zink-HA. (Pan T-Zellen: anti-CD3/CD28: 22440 ± 5480 cpm, PWM: 25739 ± 5321 cpm; CD4^+ -T-Zellen: anti-CD3/CD28: 76866 ± 3732 cpm, PWM: 41123 ± 1854 cpm; CD8^+ -T-Zellen: anti-CD3/CD28: 49334 ± 2820 cpm, PWM: 17804 ± 1327 cpm). * $p < 0,05$.

Zytokinproduktion stimulierter humaner T-Zellen

Hayashi et al. (2008) sowie Aydemir und Mitarbeiter (2009) haben in unterschiedlichen experimentellen Systemen mit differierenden Zinkkonzentrationen einen hemmenden Einfluss von Zinkverbindungen auf die IFN- γ -Produktion von Immunzellen gezeigt [81, 241].

Um die Wirkung des Therapeutikums Zink-HA auf die Zytokinproduktion stimulierter humaner T-Zellen zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst in Form einer Screeningmethode ein Zytokin-Array (Human Cytokine Array Panel A Kit) durchgeführt. Mit diesem Testsystem konnten semiquantitativ die Konzentrationen von 36 verschiedenen Zytokinen, Chemokinen und Akute-Phase-Proteinen (Abb. 9 a) in Zellkulturüberständen unstimulierter sowie PWM-stimulierter humaner Pan-T-Zellen analysiert werden, welche über 72 h in An- und Abwesenheit von 150 μ M Zink-HA kultiviert wurden.

Wie aus Abb. 9 ersichtlich ist, produzieren unstimulierte T-Zellen nur geringe Mengen an den untersuchten Zytokinen. Lediglich IL-16, MIF und CCL5/RANTES ebenso wie sICAM-1 und Serpin E1 konnten in den Zellkulturüberständen unstimulierter T-Zellen nachgewiesen werden. Ein signifikanter Einfluss von PWM oder Zink-HA auf diese Zytokine konnte nicht detektiert werden. Die durchgeführten Zytokin-Array-Analysen zeigten im Vergleich zu den unstimulierten T-Lymphozyten an PWM-stimulierten T-Zellen eine signifikante Stimulation der Produktion von GM-CSF, IFN- γ , IL-2, IL-5, IL-13, MIP-1 α und MIP-1 β und TNF- α (Zunahme der Summenintensität $> 2 \times 10^4$). Die Produktion weiterer Zytokine, wie IL-6 oder IL-10, IL-17, IL-17E, IL-23 und IL-27 wurden durch PWM ebenfalls stimuliert; die Zunahme der Summenintensität war für diese Parameter kleiner als 2×10^4 . Eine Inkubation PWM-stimulierter T-Zellen mit 150 μ M Zink-HA bewirkte in diesen T-Zell-Kulturen eine eindeutige Produktionshemmung der genannten Zytokine (Tab. 5). Die Produktion von IL-8 wurde durch die PWM-Stimulation der T-Zellen stark induziert (Zunahme der Summenintensität $> 2 \times 10^4$), jedoch nicht durch 150 μ M Zink-HA supprimiert.

Die Ergebnisse des Zytokin-Arrays bildeten die Grundlage für fortführende, verifizierende und vertiefende Untersuchungen mit Hilfe von spezifischen Zytokin-ELISA.

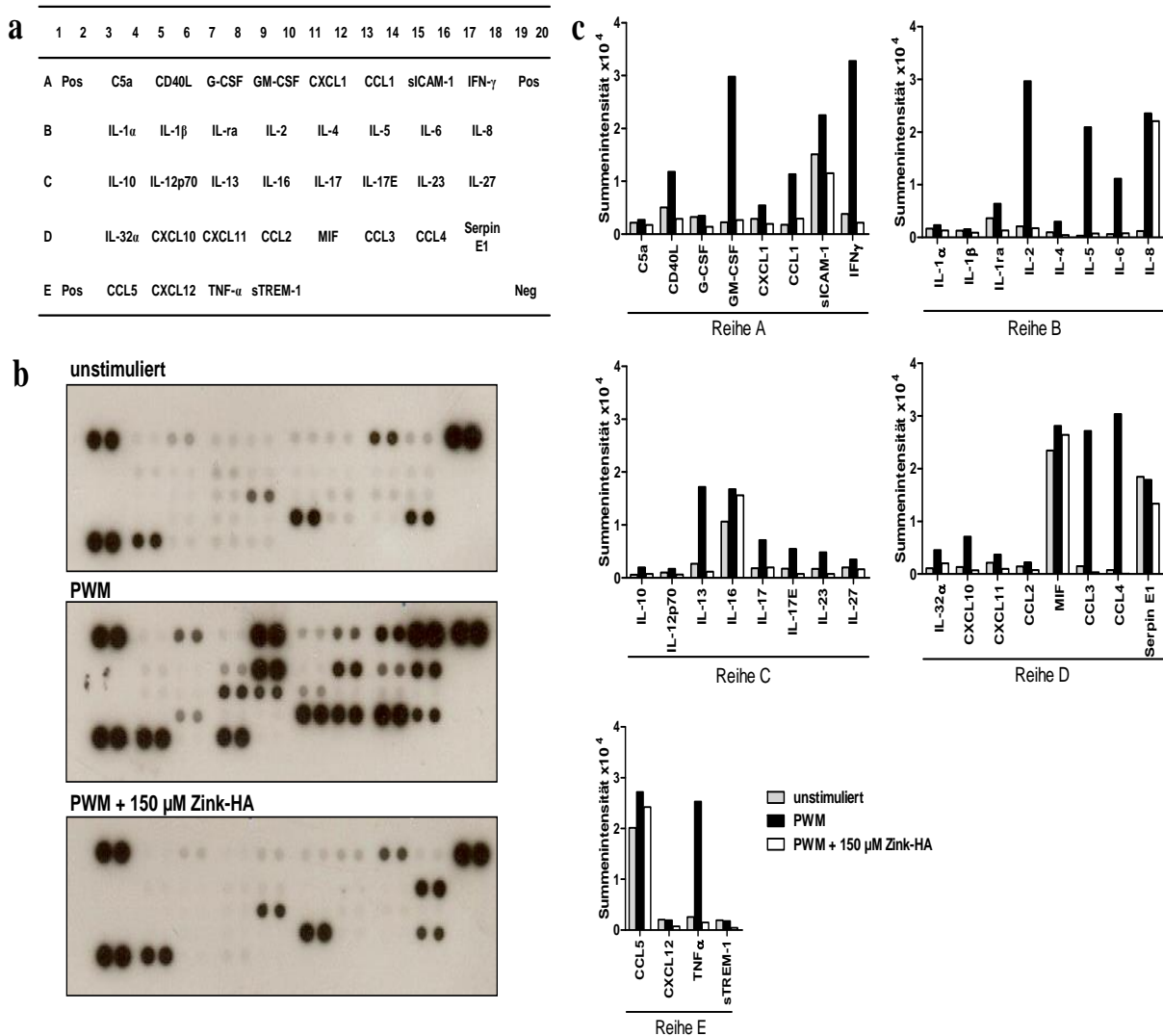


Abbildung 9: Untersuchungen zur Wirkung von Zink-HA auf die Zytokin-Produktion humaner PWM-stimulierter T-Zellen mittels Zytokin-Array. Analyse der Zytokinproduktion in Zellkulturüberständen unstimulierter sowie für 72 h mit PWM stimulierter humaner Pan-T-Zellen in An- und Abwesenheit von 150 μ M Zink-HA. **a)** Lokalisation der jeweiligen Zytokine und Kontrollen auf dem Array. **b)** Die Abbildungen zeigen Ergebnisse von X-Ray-Röntgenfilmaufnahmen eines repräsentativen von 3 unabhängigen Experimenten nach 10-minütiger Belichtungszeit. **c)** Ergebnisse der semiquantitativen Graustufenanalyse als Maß der entsprechenden Zytokinkonzentrationen, welche mit KODAK 1D 3.6 Image Analysis Software ermittelt wurden. Dargestellt sind die Hintergrund-korrigierten Summenintensitäten der einzelnen Arrayspots.

Tabelle 5: Übersicht der Ergebnisse des Zytokin-Arrays: Wirkung von 150 µM Zink-HA auf PWM-stimulierte humane Pan-T-Zellen und deren Zytokinproduktion.

T-Zell-Produkte		Produkte von Monozyten, Neutrophilen, DC		Chemokine	
Zytokin	Einfluss von Zink-HA	Zytokin	Einfluss von Zink-HA	Chemokin	Einfluss von Zink-HA
IL-2	↓↓↓	IL-1α		CCL 1	
IL-4		IL-1β		MCP-1	
IL-5	↓↓	IL-1 ra		MIP-1α	↓↓↓
IL-6	↓	IL-12 p70		MIP-1β	↓↓↓
IL-10		IL-23		RANTES	
IL-13	↓↓	IL-32		CXCL 1	
IL-16		G-CSF		IL-8	
IL-17	↓	MIF		IP-10	
IL-25(IL-17E)	↓	sTREM-1		CXCL 11	
CD 40 L	↓			CXCL 12	
GM-CSF	↓↓↓				
IFN-γ	↓↓↓				
TNF-α	↓↓↓				

sonstige Produkte	
Zytokin	Einfluss von Zink-HA
C 5α	
Serpin E ₁	
s ICAM-1	

Die Pfeile verdeutlichen die Stärke der Zytokinproduktionshemmung PWM-stimulierter humaner Pan-T-Zellen unter Zugabe von 150 µM Zink-HA durch Minderung der Summenintensität.

↓↓↓ = Abnahme der Summenintensität $> 2,5 \times 10^4$;

↓↓ = Abnahme der Summenintensität $2,5 \times 10^4 < X < 1,5 \times 10^4$;

↓ = Abnahme der Summenintensität $1,5 \times 10^4 < X < 1,0 \times 10^4$

Unsere Arbeitsgruppe untersuchte in früheren Arbeiten bereits den Einfluss von Zink-HA auf die IL-2- und IL-17-Produktion stimulierter humaner T-Zellen. Dabei konnte gezeigt werden, dass Zink-HA in anti-CD3/CD28-Antikörper- sowie in PWM- stimulierten humanen T-Zellen konzentrationsabhängig die Produktion von IL-2 und IL-17 hemmt [240].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Wirkung von Zink-HA auf die IFN-γ-, TNF-α-, GM-CSF-, IL-5- und IL-10-Produktion stimulierter T-Zellen durchgeführt, um dazu beizutragen, die potentielle Wirksamkeit von Zink-HA zur therapeutischen Beeinflussung T-Zell-vermittelter Autoimmunerkrankungen zu prüfen und den Wirkmechanismus aufzuklären.

Humane Pan-T-Zellen wurden dazu mit anti-CD3/CD28-Antikörpern oder mit PWM in Gegenwart verschiedener Zink-HA-Konzentrationen kultiviert, die Zellkulturüberstände nach 72 h geerntet und die darin enthaltenen Zytokinkonzentrationen mittels spezifischen ELISA gemessen.

In Abbildung 10 ist die IFN- γ -, TNF- α - und GM-CSF-Synthese und in Abbildung 11 die IL-5- sowie IL-10-Produktion stimulierter humaner T-Zellen in An- und Abwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Zink-HA dargestellt. In Kulturüberständen unstimulierter T-Zellen waren nur geringe Konzentrationen dieser Zytokine vorhanden. Es konnte nachgewiesen werden, dass Zink-HA in PWM- und anti-CD3/CD28-Antikörper-stimulierten humanen T-Zellen konzentrationsabhängig die Produktion aller untersuchten Zytokine hemmt.

In anti-CD3/CD28-Antikörpern-stimulierten T-Zellen supprimierten Zink-HA-Konzentrationen höher als 100 μ M (IL-5; IL-10) und 150 μ M (IFN- γ ; GM-CSF; TNF- α) die Zytokinproduktion signifikant ($p < 0,05$). In den Kulturen PWM-stimulierter T-Zellen führten Zink-HA-Konzentrationen von mehr als 100 μ M (IFN- γ ; IL-10), 150 μ M (IL-5; TNF- α) und 200 μ M (GM-CSF) zu einer signifikanten Hemmung der Zytokinsynthese ($p < 0,05$).

Die Ergebnisse der mittels ELISA untersuchten Zytokine bestätigen somit eindeutig die mit dem Zytokin-Array ermittelten Daten.

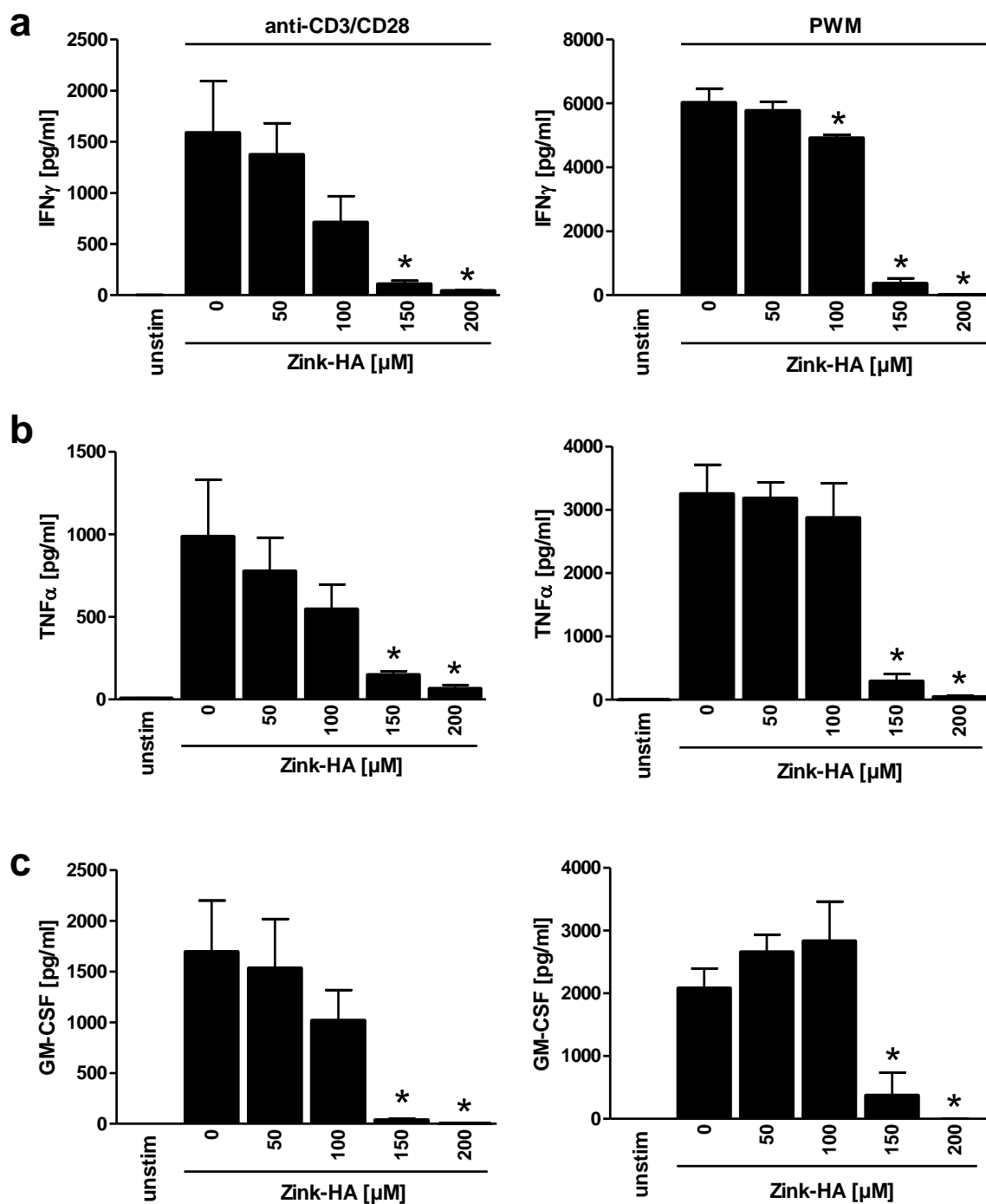


Abbildung 10: Zink-HA hemmt in stimulierten T-Zellen die Produktion von IFN- γ , TNF- α und GM-CSF. Humane T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-Antikörpern (linke Spalte) oder PWM (rechte Spalte) in Gegenwart verschiedener Zink-HA-Konzentrationen kultiviert, die Zellkulturüberstände nach 72 h geerntet und die Zytokin-Konzentrationen mittels spezifischer ELISA-Systeme gemessen. Die Produktion von IFN- γ (a), TNF- α (b) und GM-CSF (c) ist dargestellt als Mittelwert + SEM von 4 unabhängigen Experimenten; unstim = Zellkulturen ohne Stimulation; * $p < 0,05$.

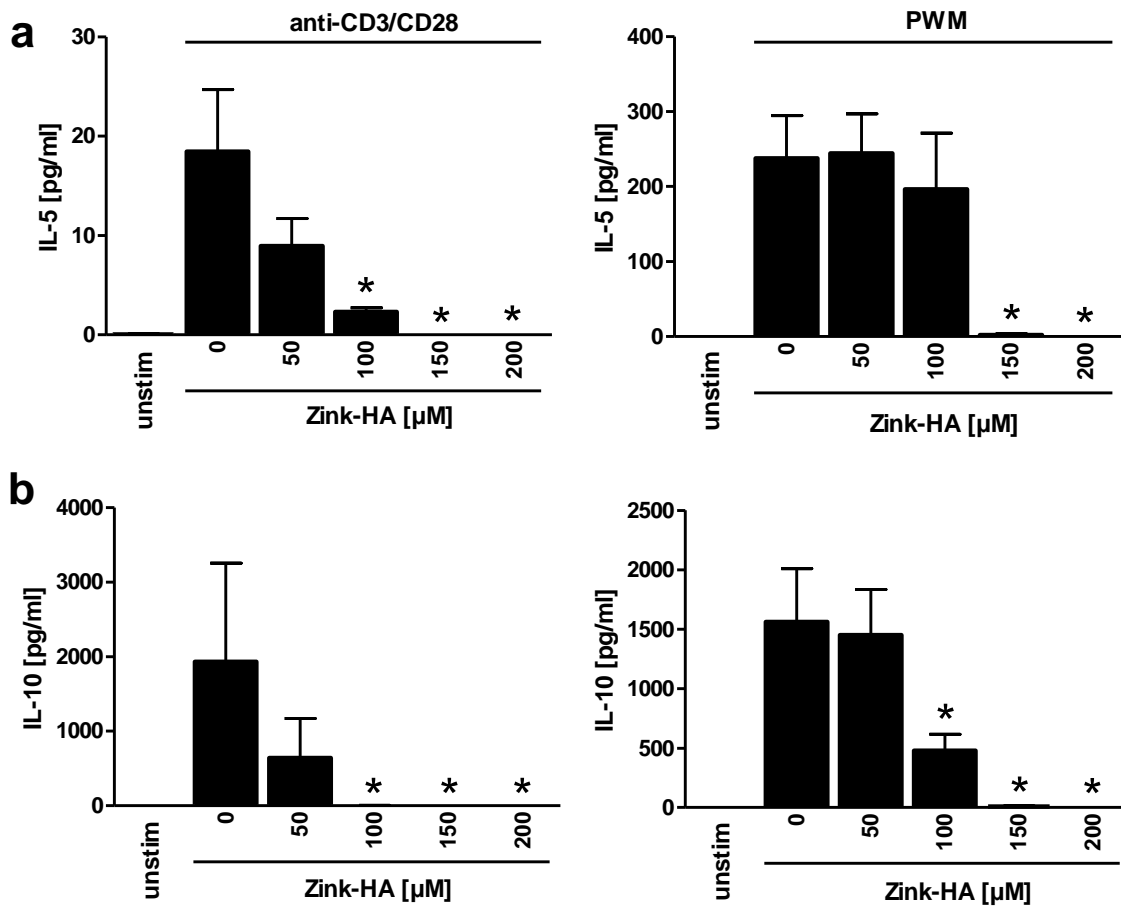


Abbildung 11: Zink-HA hemmt in stimulierten T-Zellen die Produktion von IL-5 und IL-10. Humane T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-Antikörpern (linke Spalte) oder PWM (rechte Spalte) in Gegenwart verschiedener Zink-HA-Konzentrationen kultiviert, die Zellkulturüberstände nach 72 h geerntet und mittels spezifischer ELISA-Systeme die Zytokinkonzentrationen gemessen. Die Produktion von IL-5 (**a**) und IL-10 (**b**) ist dargestellt als Mittelwert + SEM von 4 unabhängigen Experimenten; unstim = Zellkulturen ohne Stimulation; * $p < 0,05$.

4.2 Untersuchungen zur Wirkung von Zink-HA auf die DNA-Synthese und Zytokinproduktion stimulierter Splenozyten der Maus

DNA-Synthese stimulierter Splenozyten von SJL/J-Mäusen

Auf Grundlage der im Abschnitte 4.1 erhobenen Daten sollte in weiteren Experimenten die Wirkung von Zink-HA auf die DNA-Synthese stimulierter Splenozyten untersucht werden. Splenozyten gesunder SJL/J-Mäuse wurden dazu mit PWM oder anti-CD3-Antikörpern stimuliert und in Gegenwart verschiedener Zink-HA-Konzentrationen (0; 25; 50; 100; 150 μ M) kultiviert.

Zum Ausschluss potenzieller zytotoxischer Effekte von Zink-HA auf die murinen Splenozyten erfolgte ebenfalls eine Vitalitätsbestimmung. Splenozyten gesunder SJL-Mäuse wurden dazu mit anti-CD3-Antikörpern oder PWM in Gegenwart verschiedener Zink-HA-Konzentrationen kultiviert. Die Bestimmung der Zell-Vitalität wurde in Parallelkulturen mittels Trypanblau-Färbung nach 4 Stunden (Abb. 12 a) und 24 Stunden (Abb. 12 b) sowie mit Hilfe einer PI-Färbung nach 4 Stunden (Abb. 12 c) durchgeführt.

In dem untersuchten Konzentrationsbereich war die Vitalität der stimulierten Splenozyten in der Trypanblau-Färbung zu beiden Zeitpunkten unbeeinflusst von Zink-HA. Die anti-CD3-Antikörper-stimulierten Zellkulturen wiesen nach 4 Stunden eine maximale Schwankung der Vitalität von 6,3% des Ausgangswertes lebender Zellen in Abwesenheit von Zink-HA ($91,7 \pm 3,0\%$) auf. Nach 24 Stunden variierte diese zwischen rund 1% (50 μ M) und 10% (150 μ M Zink-HA) des Ausgangswertes ($82,5 \pm 10,5\%$). Nach 4-stündiger Inkubation schwankte die Vitalität PWM-stimulierter Splenozyten zwischen 2% (25 μ M) und 10% (150 μ M Zink-HA) des Ausgangswertes ($91 \pm 3,7\%$) bzw. zwischen rund 1% (50 μ M) und 12% (150 μ M Zink-HA) des Ausgangswertes ($84,4 \pm 7,9\%$).

Zur Bestätigung dieser im Trypanblau-Test lichtmikroskopisch erhobenen Daten wurde nachfolgend eine durchflusszytofluorimetrische Vitalitätsmessung mit PI durchgeführt.

Zink-HA hatte in dem untersuchten Konzentrationsbereich keinen Einfluss auf die Vitalität stimulierter Splenozyten nach 4 Stunden. Die maximale Schwankung der Vitalität anti-CD3-stimulierter Splenozyten betrug unter den genannten Versuchsbedingungen 6,9% des Ausgangswertes lebender Zellen in Abwesenheit von Zink-HA ($95,2 \pm 2,8\%$) sowie in PWM-Ansätzen 7,8% des Ausgangswertes ($95,0 \pm 3,0\%$).

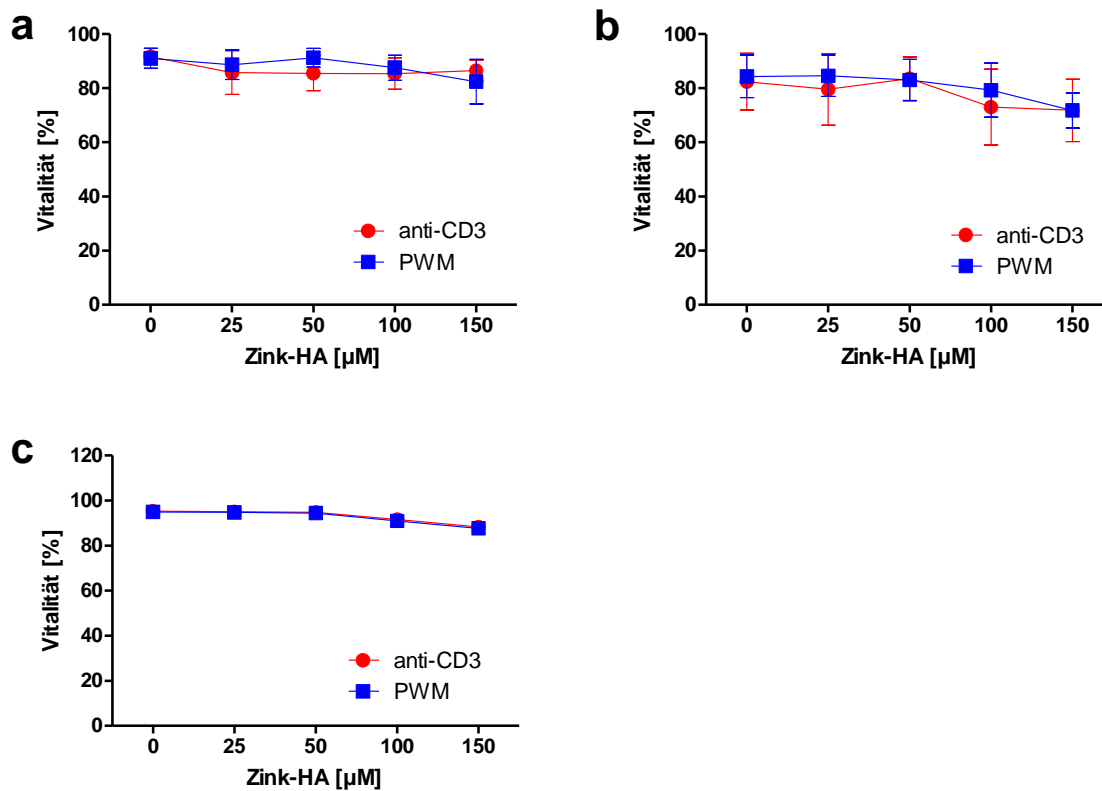


Abbildung 12: Zink-HA beeinflusst nicht die Vitalität stimulierter Splenozyten von SJL/J-Mäusen. Splenozyten wurden mit anti-CD3-Antikörpern oder PWM in Gegenwart verschiedener Zink-HA-Konzentrationen stimuliert. Die Zell-Vitalität wurde nach 4 h (a) und 24 h (b) mittels Trypanblau-Färbung sowie nach 4 h (c) mittels PI-Färbung ermittelt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil \pm SEM lebender Zellen an der Gesamtzellzahl aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten.

Die Bestimmung der DNA-Synthese stimulierter Splenozyten erfolgte durch Messung des Einbaus von ^3H -Thymidin nach einer Kulturzeit von 72 h. Wie in Abbildung 13 ersichtlich ist, hemmt Zink-HA konzentrationsabhängig signifikant die DNA-Synthese stimulierter Splenozyten ($p < 0,05$). In den Experimenten mit PWM-stimulierten Splenozyten betrug die IC_{50} für die Hemmung der DNA-Synthese ca. 40 μM Zink-HA und in anti-CD3-Antikörper-stimulierten Ansätzen ca. 50 μM Zink-HA.

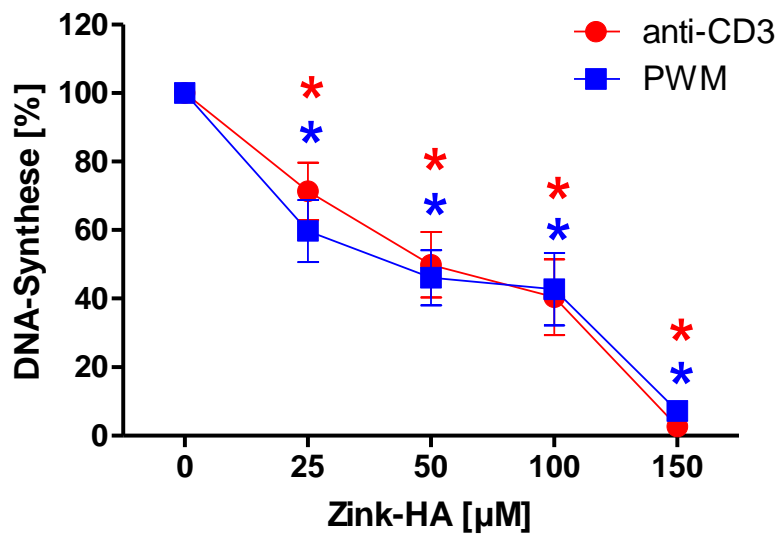


Abbildung 13: Zink-HA hemmt die DNA-Synthese stimulierter Splenozyten von SJL/J-Mäusen. Splenozyten wurden mit PWM oder mit anti-CD3-Antikörpern in Gegenwart verschiedener Zink-HA-Konzentrationen kultiviert. Nach 72 h erfolgte die Bestimmung der DNA-Synthese durch Einbau von ^3H -Thymidin. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Experimenten in Relation zur DNA-Synthese stimulierter Zellen in Abwesenheit von Zink-HA. (anti-CD3: 9720 ± 4552 cpm, PWM: 7331 ± 4087 cpm). * $p < 0,05$

Zytokinproduktion stimulierter Splenozyten von SJL/J-Mäusen

In weiteren Experimenten sollte basierend auf den in Abschnitt 4.1 erhobenen Daten an humanen Pan-T-Zellen die Wirkung von Zink-HA auf die IFN- γ -, TNF- α -, GM-CSF-, IL-5- und IL-10-Produktion stimulierter Splenozyten von SJL/J-Mäusen untersucht werden. Dazu wurden Splenozyten mit PWM stimuliert und mit verschiedenen Zink-HA-Konzentrationen kultiviert, die Zellkulturüberstände nach 72 h geerntet und die Zytokinkonzentrationen mit Hilfe von spezifischen ELISA-Systemen gemessen.

In Abbildung 14 ist die IFN- γ -, TNF- α -, GM-CSF-, IL-5- und IL-10-Produktion stimulierter Splenozyten in An- und Abwesenheit verschiedener Zink-HA-Konzentrationen dargestellt. In Kulturüberständen unstimulierter Zellen waren nur geringe Zytokinkonzentrationen nachweisbar. Zink-HA hemmte auch in diesem Maus-Zellsystem konzentrationsabhängig die Produktion der untersuchten Zytokine. In den Kulturen der PWM-stimulierten Splenozyten inhibierten Zink-HA-Konzentrationen höher als 25 μM (IL-10), 50 μM (IFN- γ) und 100 μM (TNF- α , GM-CSF) die jeweilige Zytokinproduktion signifikant ($p < 0,05$).

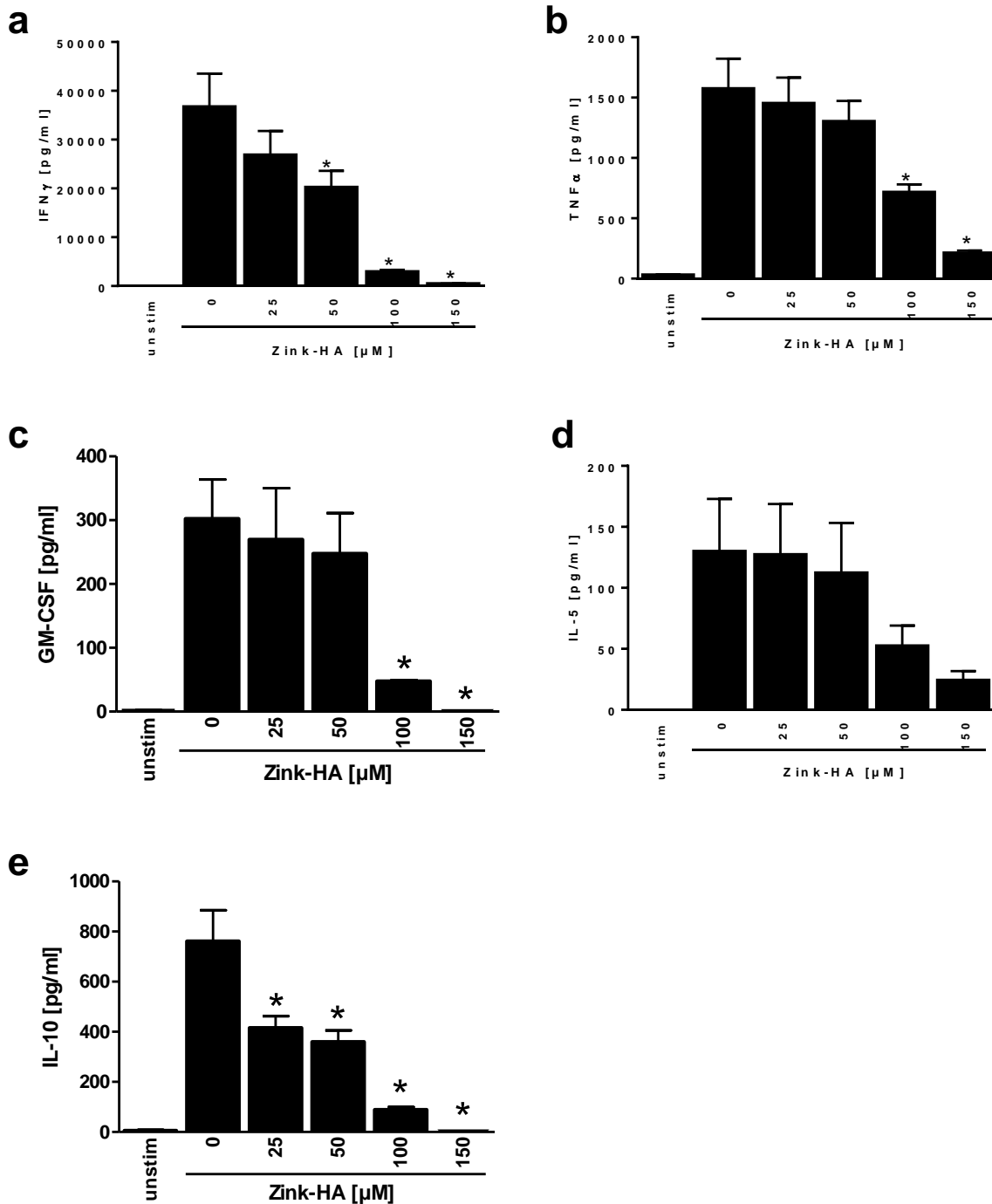


Abbildung 14: Zink-HA hemmt die Produktion von IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-5 und IL-10 in stimulierten Splenozyten von SJL/J-Mäusen. Splenozyten wurden mit PWM in Gegenwart verschiedener Zink-HA-Konzentrationen kultiviert, die Zellkulturüberstände nach 72 h geerntet und die Zytokin-Konzentrationen mittels spezifischer ELISA-Systeme gemessen. Die Produktion von IFN- γ (a), TNF- α (b), GM-CSF (c), IL-5 (d) und IL-10 (e) ist dargestellt als Mittelwert + SEM von 4 unabhängigen Experimenten; unstim = unstimulierte Zellen; * $p < 0,05$.

4.3 Untersuchungen zum klinischen Verlauf der EAE in SJL/J-Mäusen bei peroraler Therapie mit Zink-HA

Neben den *in vitro*-Experimenten wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit *in vivo*-Untersuchungen in einem Tiermodell der MS, der aktiven EAE in SJL/J-Mäusen, durchgeführt. Dabei stand die Frage im Zentrum, ob eine orale Applikation von Zink-HA in diesem Tiermodell therapeutisch wirksam ist. Unsere Arbeitsgruppe hatte bereits in einer früheren Arbeit eine signifikante Reduktion des Schweregrades der aktiven EAE an SJL/J-Mäusen durch therapeutische i.p.-Applikationen von 30 µg Zink-HA/Tag (1,5mg/kg KG) zeigen können [240].

Zur Induktion der EAE wurden weibliche SJL/J-Mäuse mit PLP (139-151)-Peptid in CFA und PTX immunisiert. Die Beurteilung des Krankheitsverlaufes erfolgte täglich über einen Zeitraum von 85 bzw. 101 Tagen nach den in Tabelle 4 sowie Abbildung 6 (Abschnitt 3.2.12) dargelegten Kriterien. Mit Auftreten erster Krankheitssymptome (leichte Parese des Schwanzes: Graduierung 0,5) an Tag 10 oder 11 wurde die orale Therapie mit Zink-HA für die Dauer von 10 Tagen begonnen.

Zur Ermittlung einer geeigneten therapeutischen Dosis wurden in einem ersten Experiment von Tag 12 bis 21 oral 6 µg (0,3 mg/kg KG) (Abb. 15 a), 30 µg (1,5 mg/kg KG) (Abb. 15 b), 60 µg (3,0 mg/kg KG) (Abb. 16 a) bzw. 120 µg (60 mg/kg KG) Zink-HA/Tag (Abb. 16 b) oder PBS als Kontrollmedium verabreicht.

Abbildung 15 bzw. 16 zeigt die mittleren Erkrankungsgrade \pm SEM der Gruppen von jeweils 8 Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Während der ersten akuten Erkrankungsphase von Tag 11 bis 17 setzte sich die aufsteigende Lähmung in allen Gruppen bis zu einem Schweregrad von 2,5 (Parese einer hinteren Extremität) fort. Bei einigen Tieren war dies progredient. In Therapieansätzen mit 30 µg, 60 µg und 120 µg Zink-HA/Tag bildeten sich die Symptome der EAE deutlich schwerer (30 µg/Tag: $1,8 \pm 0,2$; 60 µg/Tag: $1,7 \pm 0,2$; 120 µg/Tag: $1,8 \pm 0,4$) aus im Vergleich zur Kontrollgruppe ($1,0 \pm 0,8$). Eine verabreichte Dosis von 6 µg/Tag ($1,2 \pm 0,1$) zeigt in diesem Zeitraum einen der Kontrollgruppe ähnlichen Krankheitsverlauf. Ab Tag 18 ließ sich ein Abklingen der Symptome der EAE, als schubförmig verlaufende Entzündung des ZNS, beobachten, wobei die Rückbildung bei 6 µg/Tag therapierten Mäusen bis zu einem Minimum von $0,3 \pm 0,2$ (Tag 19) vergleichsweise stärker (Kontrolle: $1,1 \pm 0,3$ (Tag 23)) ausfiel. Im weiteren Verlauf wiesen die Tiere mit Zink-HA-Gaben von 30 µg und 120 µg/Tag eine höhere Krankheitsaktivität sowie ein früheres (Beginn: Tag 36) und stärkeres Rezidiv im Vergleich zur Kontrollgruppe (Beginn:

Tag 42) auf und zeigten ab Tag 50 einen der Kontrolle ähnlichen Krankheitsverlauf bis zum Versuchsende. In der Therapiegruppe, welcher $60 \mu\text{g}$ Zink-HA/Tag verabreicht wurde, verlief die EAE bis Tag 56 ähnlich der Kontrolle und anschließend etwas milder (Tag 57 - 85: $1,4 \pm 0,07$; Kontrolle: $1,9 \pm 0,1$). Eine Therapie mit $6 \mu\text{g}$ Zink-HA/Tag führte im Zeitraum von Tag 42 bis 85 zu einer signifikanten ($p < 0,05$) Reduktion des Schweregrades der EAE, wobei ein deutlich erkennbares Rezidiv ausblieb.

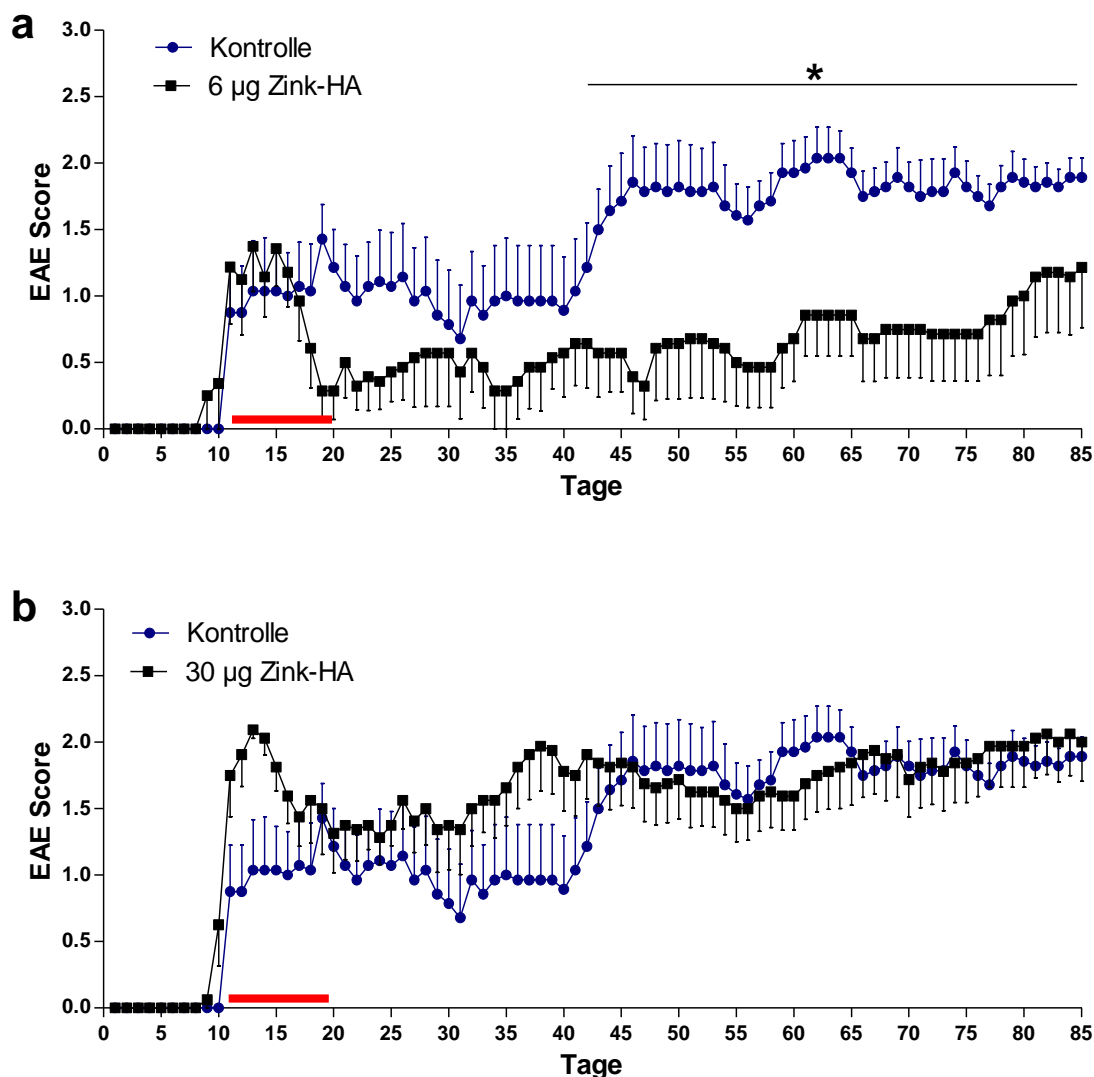


Abbildung 15: Wirkung oraler therapeutischer Zink-HA-Gaben auf den Schweregrad der EAE im 1. Versuch mit $6 \mu\text{g}$ und $30 \mu\text{g}$ Zink-HA/Tag. Weibliche SJL/J-Mäuse wurden mit PLP (139-151) Peptid in CFA und PTX immunisiert und für 85 Tage täglich auf Symptome der Erkrankung untersucht. Am Tag 12 wurde eine 10-tägige orale Therapie mit $6 \mu\text{g}$ (a), $30 \mu\text{g}$ Zink-HA/Tag (b) oder PBS als Kontrollsubstanz begonnen. Der horizontale, rote Balken markiert den Therapiezeitraum. Dargestellt sind die mittleren Erkrankungsgrade \pm SEM der Gruppen a 8 Tiere; * $p < 0,05$.

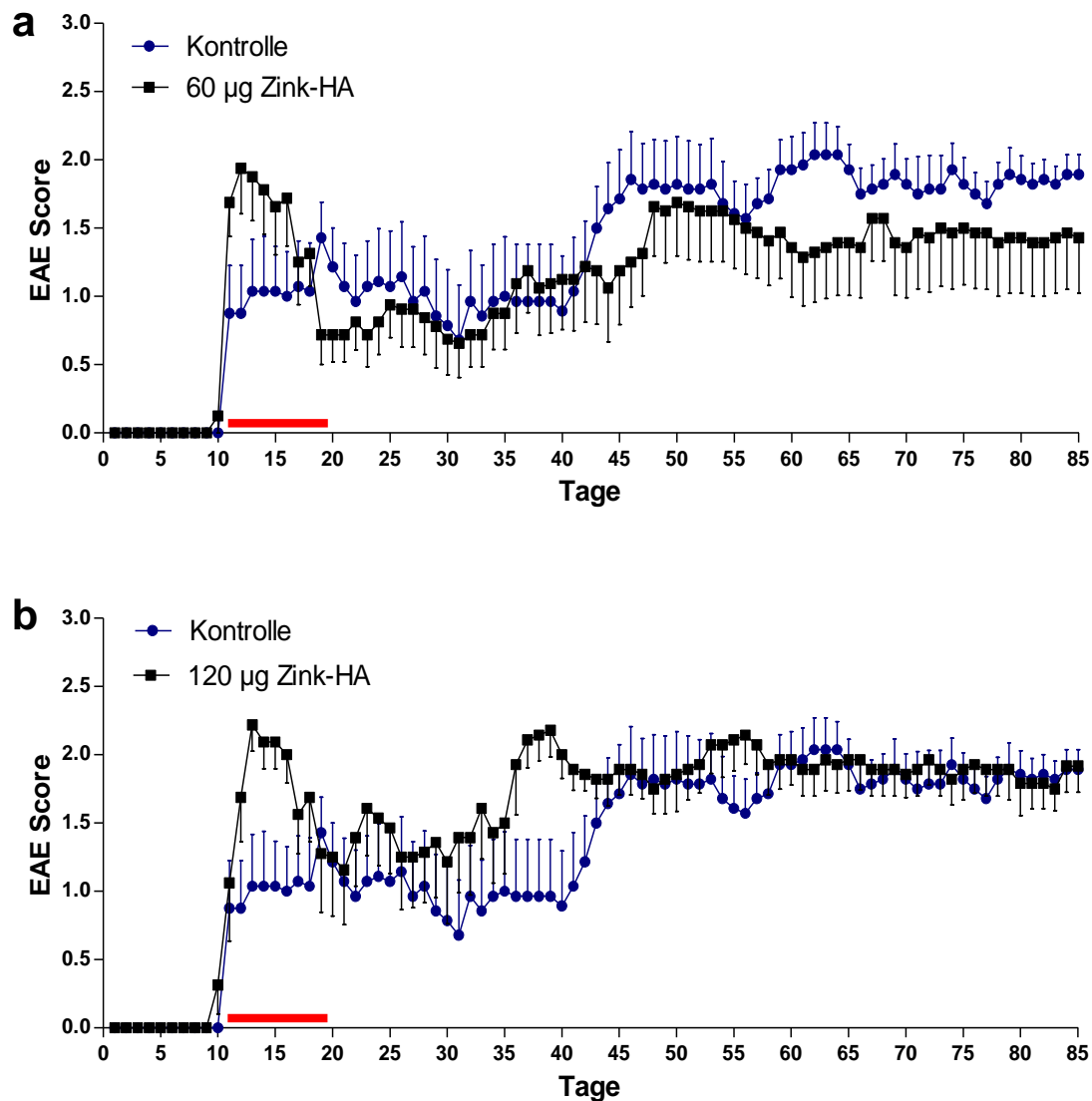


Abbildung 16: Wirkung oraler therapeutischer Zink-HA-Gaben auf den Schweregrad der EAE im 1. Versuch mit 60 µg und 120 µg Zink-HA/Tag. Weibliche SJL/J-Mäuse wurden mit PLP (139-151) Peptid in CFA und PTX immunisiert und für 85 Tage täglich auf Symptome der Erkrankung untersucht. Am Tag 12 wurde eine 10-tägige orale Therapie mit 60 µg (a) bzw. mit 120 µg Zink-HA/Tag (b) oder mit PBS als Kontrollsubstanz begonnen. Der horizontale, rote Balken markiert den Therapiezeitraum. Dargestellt sind die mittleren Erkrankungsgrade \pm SEM der Gruppen a 8 Tiere; * $p < 0,05$.

Zur Bestätigung der therapeutischen Wirksamkeit von 6 µg Zink-HA/Tag sowie zur Dosisoptimierung wurde unter den oben geschilderten Versuchsbedingungen ein weiteres Experiment mit oralen Applikationen von 6 µg (Abb. 17 a) sowie 12 µg Zink-HA/Tag (Abb. 17 b) durchgeführt. Abbildung 17 zeigt die mittleren Erkrankungsgrade \pm SEM der Gruppen von jeweils 8 (Kontrolle; 12 µg/Tag) bzw. 9 Tieren (6 µg/Tag). Während der ersten akuten Erkrankungsphase von Tag 10 bis 18 wiesen beide Therapiegruppen einen der

Kontrolle ähnlichen Krankheitsverlauf auf, der sich jedoch ab Tag 19 (12 µg/Tag-Gruppe: $1,0 \pm 0,25$) bzw. ab Tag 26 (6 µg/Tag-Gruppe: $0,7 \pm 0,3$) in einer gegenüber der Kontrollgruppe milder ausfallenden EAE (Tag 19: $1,3 \pm 0,3$; Tag 26: $1,0 \pm 0,3$) fortsetzt. Die Gabe von 12 µg Zink-HA/Tag führte im Zeitraum von Tag 19 bis Tag 44 zu einer stärkeren Rückbildung der Symptome als die Gabe von 6 µg Zink-HA/Tag. Über den Verlauf der Kurve betrachtet, waren die Medianunterschiede der Kontroll- und der Therapiegruppe zwischen Tag 27 und Tag 43 sowie ab Tag 53 (12 µg/Tag) und ab Tag 45 für die Gabe von 6 µg/Tag signifikant ($p < 0,05$).

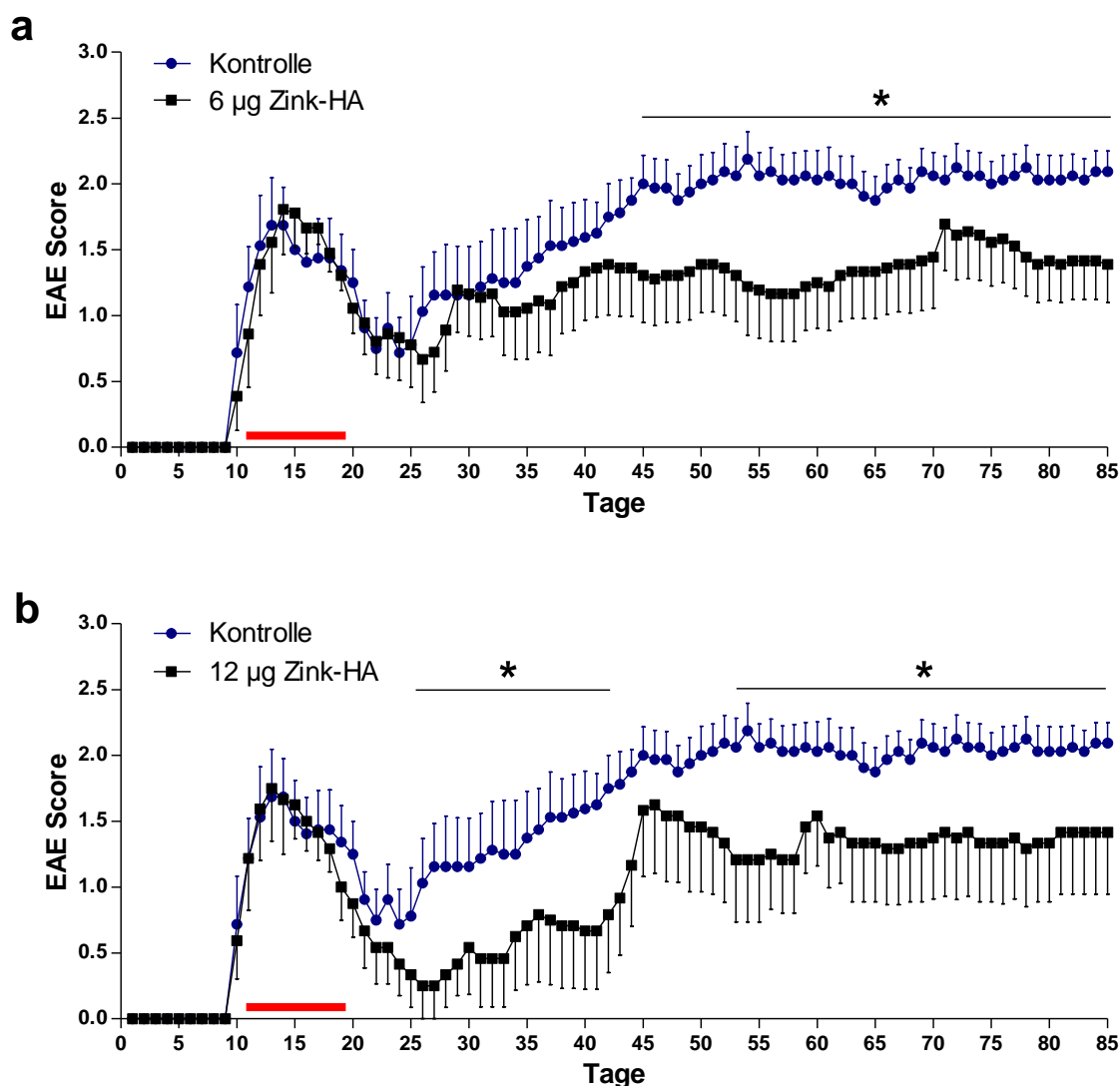


Abbildung 17: Wirkung oraler therapeutischer Zink-HA-Gaben auf den Schweregrad der EAE im 2. Versuch mit 6 µg und 12 µg Zink-HA/Tag. Weibliche SJL/J-Mäuse wurden mit PLP (139-151) Peptid in CFA und PTX immunisiert und für 85 Tage täglich auf Symptome der Erkrankung untersucht. Am Tag 12 wurde eine 10-tägige orale Therapie mit 6 µg (**a**) bzw. 12 µg Zink-HA/Tag (**b**) oder mit PBS als Kontrollsubstanz begonnen. Der horizontale Balken markiert den Therapiezeitraum. Dargestellt sind die mittleren Erkrankungsgrade \pm SEM der Gruppen a 8 (Kontrolle; 12 µg/Tag) bzw. 9 (6 µg/Tag) Tiere; * $p < 0,05$.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass in den durchgeführten Experimenten die 10-tägige Gabe von 12 µg Zink-HA/Tag einen größeren therapeutischen Nutzen auf die Reduktion des Schweregrades der EAE erzielte als die Gabe von 6 µg Zink-HA/Tag.

Aus diesem Grund erfolgte zur Bestätigung der therapeutischen Wirksamkeit von 12 µg Zink-HA/Tag ein weiteres Experiment unter den gleichen Versuchsbedingungen mit 10 weiblichen SJL/J-Mäusen pro Gruppe. In einem Beobachtungszeitraum von 101 Tagen bewirkte die 10-tägige Gabe von 12 µg Zink-HA/Tag eine signifikante ($p < 0,05$) Reduktion des Schweregrades der EAE ab Tag 51 (Abb. 18).

Der Schweregrad und der Verlauf der EAE variierten in den Kontrollen der 3 Experimente und reflektieren die häufig beobachteten biologischen Schwankungen dieses Tiermodells.

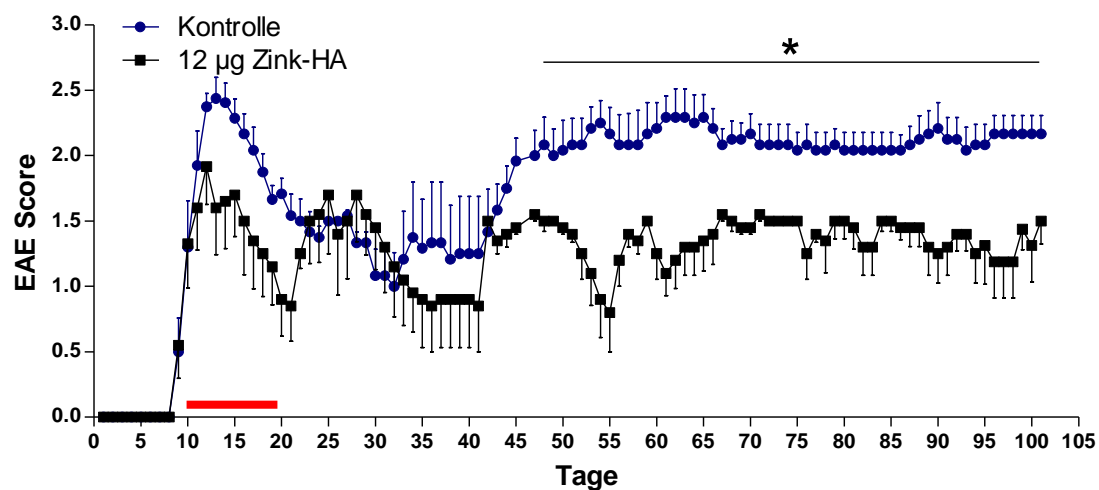


Abbildung 18: Wirkung einer therapeutischen oralen Gabe von Zink-HA auf den Schweregrad der EAE im 3. Versuch mit 12 µg Zink-HA/Tag. Weibliche SJL/J-Mäuse wurden mit PLP (139-151)-Peptid in CFA und PTX immunisiert und für 101 Tage täglich auf Symptome der Erkrankung untersucht. Am Tag 10 wurde eine 10-tägige orale Therapie mit 12 µg Zink-HA/Tag oder mit PBS als Kontrollsubstanz begonnen. Der horizontale Balken markiert den Therapiezeitraum. Dargestellt sind die mittleren Erkrankungsgrade \pm SEM der Gruppen $n = 10$ Tiere; * $p < 0,05$.

4.4 Histopathologische Untersuchungen zur Wirkung von Zink-HA auf das ZNS von EAE-erkrankten SJL/J-Mäusen

Zur Verifizierung der im Tiermodell der EAE erhobenen klinischen Daten wurden anschließend histopathologische Untersuchungen des ZNS von EAE-erkrankten SJL/J-Mäusen durchgeführt. Hierfür wurden pro Versuchsgruppe 5 weibliche SJL/J-Mäuse mit PLP (139-151)-Peptid in CFA und PTX zur Induktion einer EAE immunisiert und täglich auf die Symptome der Erkrankung entsprechend Tabelle 4 und Abbildung 6 (s. Kapitel 3.2.13) untersucht.

Abbildung 19 a zeigt das Endergebnis des EAE-Scores am Tag 21. Von Tag 11 bis 20 wurde die perorale Therapie mit 12 µg Zink-HA/Tag oder PBS als Kontrollsubstanz durchgeführt. Am Tag 21 erfolgte die Exstirpation des Rückenmarkes, welches in 4% Formaldehydlösung fixiert, anschließend in Paraffin eingebettet und geschnitten wurde. Die Präparate wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und die Rate infiltrierender Zellen pro Rückenmark-Querschnitt lichtmikroskopisch analysiert (Abb. 19 b). Abbildung 19 zeigt einen repräsentativen Rückenmarksquerschnitt der Kontrollgruppe (c) sowie der Therapiegruppe (d) am Tag 21 post Immunisierung. Die Pfeile markieren dabei Stellen infiltrierender Zellen im ZNS.

Die histopathologischen Untersuchungen zeigten, dass eine orale Zink-HA-Therapie mit 12 µg Zink-HA/Tag die Anzahl infiltrierender inflammatorischer Zellen im ZNS von EAE-erkrankten SJL/J-Mäusen reduziert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (230 ± 25 infiltrierender Zellen pro Rückenmark-Querschnitt) konnte ein diskreter Rückgang infiltrierender Zellen in der Therapiegruppe (170 ± 23 infiltrierender Zellen pro Rückenmark-Querschnitt) beobachtet werden.

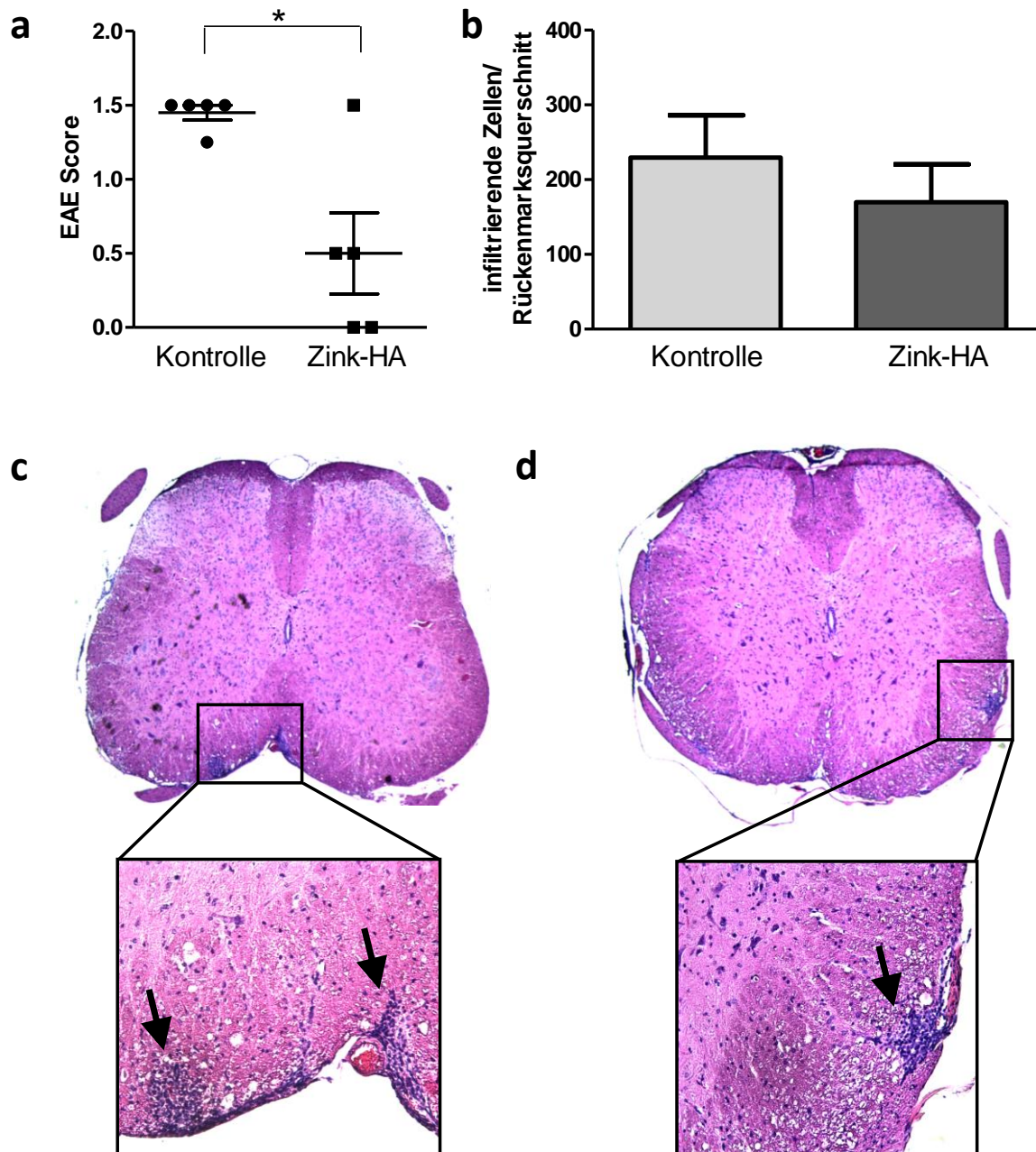


Abbildung 19: Die orale Zink-HA-Therapie reduziert die Anzahl inflammatorischer Zellen im ZNS von EAE-erkrankten SJL/J-Mäusen. Weibliche SJL/J-Mäuse (n = 5 pro Versuchsgruppe) wurden mit PLP (139-151)-Peptid in CFA und PTX immunisiert und von Tag 11 bis 20 mit 12 µg Zink-HA/Tag oder mit PBS als Kontrollsubstanz peroral therapiert. Am Tag 21 erfolgte die Exstirpation des Rückenmarkes, welches in 4% Formaldehydlösung fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet wurde. Die Präparate färbte man mit Hämatoxylin-Eosin. Abgebildet sind **a**) das Endergebnis des EAE-Scores am Tag 21 und **b**) die Analyse der Rate an infiltrierenden Zellen pro Rückenmark-Querschnitt in der HE-Färbung; dargestellt sind Mittelwerte + SEM von 5 unabhängigen Experimenten. Die beiden unteren Abbildungen zeigen einen repräsentativen Rückenmarksquerschnitt der Kontrollgruppe (**c**) sowie der Therapiegruppe (**d**) am Tag 21 post Immunisierung. Die Pfeile markieren Bereiche mit Zellinfiltraten. * p < 0,05

5. Diskussion

Die herausragende Rolle des essentiellen Spurenelementes Zink sowohl für das angeborene als auch für das erworbene Immunsystem ist in der Literatur seit Jahrzehnten gut belegt. Dies beinhaltet dosisabhängige und zelltypbezogene Stimulation oder Suppression von Immunzellen [242, 243] ebenso wie die Regulation intrazellulärer Signalwege [13, 77, 244, 245]. Dabei fungiert Zink u. a. als Neurotransmitter oder als Second Messenger [13, 21, 22]. Auf diese Weise ist jenes Spurenelement an der Zellkommunikation sowie der Proliferation, der Differenzierung und dem Überleben von Immunzellen ebenso wie an deren Funktionsfähigkeit beteiligt.

Besonders gut sind die Auswirkungen eines Zinkmangels auf das Immunsystem untersucht. Das klinische Spektrum reicht hierbei von gehäuft auftretenden sowie prolongierten Infektionen [246] bis hin zu chronisch entzündlichen Prozessen im menschlichen Organismus. Klinische und experimentelle Daten der vergangenen Jahre zeigten einen Zusammenhang zwischen einem Zinkmangel und chronische entzündlichen Erkrankungen, wie bspw. des Darms (M. Chron, Colitis ulcerosa) [247], der Atemwege (Asthma bronchiale) [248], der Gelenke (RA, Spondylarthritis) [249] sowie der Gefäße (Arteriosklerose, Vaskulitis) [250] und der Haut (Acrodermatitis enteropathica) [251] bis hin zu neurodegenerativen Erkrankungen wie dem M. Alzheimer [252]. Therapeutische Zink-Applikationen führten unter diesen Mangelbedingungen zu einer Verbesserung der Immunfunktion [35, 56, 246]. Zahlreiche Arbeiten der letzten Jahre beschreiben Zink als potentiellen Suppressor von Autoimmunphänomenen in Tiermodellen wie der CIA [85, 89, 94], der DSS-induzierten Kolitis [91, 92] oder der EAE [6, 89, 240]. Hinsichtlich der Ursache wird u. a. eine Zink-vermittelte Inhibition der Th17-Zell-Aktivierung durch Beeinflussung der IL-6-induzierten STAT3-Aktivität [6, 7, 89, 93], eine Dysfunktion regulatorischer T-Zellen unter Zinkmangel-Bedingungen [96] als auch eine Imbalance pro- und antiinflammatorischer Zytokine [95, 239, 240, 253, 254] diskutiert. Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass Zink bei T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen wie der EAE, als Tiermodell der MS, involviert sein und möglicherweise einen neuen therapeutischen Ansatzpunkt derartiger Erkrankungen bieten könnte [242, 243, 255]. Bemerkenswert ist ein dosisabhängiger Effekt des Spurenelementes auf das Immunsystem - sowohl zu niedrige als auch zu hohe Plasmalevel des Biometalls führen zu einer reduzierten Funktionsweise des Immunsystems [238, 240, 256–258].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Untersuchungen zur potentiellen Wirksamkeit und zum Wirkmechanismus von Zink-HA, einem zugelassenen Pharmakon mit ausgezeichneter Bioverfügbarkeit, bei T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen wie der MS durchzuführen. Dazu wurden zunächst *in vitro* die DNA-Synthese, die Vitalität und die Zytokinproduktion von Mitogen-stimulierten humanen T-Zellen gesunder Probanden und von murinen Splenozyten unter dem Einfluss von Zink-HA untersucht. Darüber hinaus wurden mit Hilfe der EAE *in vivo*-Experimente durchgeführt, um die Frage zu beantworten, ob orale Applikationen des Arzneimittels Zink-HA in diesem Modell therapeutisch wirksam sind. Zur Verifizierung der im Tiermodell erhobenen klinischen Daten erfolgten anschließend histopathologische Untersuchungen des ZNS von EAE-erkrankten SJL/J-Mäusen.

Zur Analyse potentieller Effekte von Zink-HA auf die T-Zell-Aktivierung wurde zunächst die Wirkung auf die DNA-Synthese stimulierter humaner Pan-T-Zellen und T-Zell-Subpopulationen sowie Milzzellen der Maus untersucht. Zuvor erfolgte eine Vitalitätsbestimmung zum Ausschluss zytotoxischer Effekte von Zink-HA auf die zu analysierenden Zell-Populationen. Die Zellvitalität war sowohl lichtmikroskopisch als auch durchflusszytometrisch unbeeinflusst von Zink-HA in dem untersuchten Konzentrationsbereich von bis zu 200 μM für stimulierte humane T-Zellen und bis zu 150 μM für aktivierte murine Splenozyten. Dies bestätigte die 2012 von unserer Arbeitsgruppe erhobenen Daten mit unbeeinflusster Zellvitalität bis zu 150 μM im humanen und bis zu 100 μM im murinen Zellsystem [240]. Auch Beobachtungen anderer Autoren zeigten keine Auswirkung von 100 μM ZnSO_4 auf die Vitalität stimulierter MNZ oder aktivierter MNZ aus gemischten Lymphozytenkulturen bzw. auf Jurkat-Zellkulturen [13, 259, 260]. Hingegen beschrieben Campo und seine Mitarbeiter eine Reduktion der Zellvitalität auf 33% unter dem Einfluss von 250 μM ZnSO_4 . Minderung der Vitalität wurden auch für 300 μM ZnSO_4 beschrieben [259]. Diese Daten stützten die These, dass extrem hohe Zinkkonzentrationen eine zytotoxische Wirkung aufweisen und sowohl die T-Zell- als auch die Monozyten-Funktion dadurch beeinträchtigt werden könnte [260]. Als Ursache hierfür wurde die Inhibition der IRAK (IL-1 Rezeptor Typ I-assoziierte Proteinkinase) diskutiert, welche die intrazelluläre Signaltransduktion bereits frühzeitig blockiert [74, 261]. Auch die Induktion von Apoptose wurde als potenzieller Mechanismus erwogen [35, 259]. Bozym et al. zeigten indessen, dass hohe Konzentrationen an freien Zinkionen (ca. 100 nmol/L) bereits nach kürzester Zeit zytotoxisch wirken. Somit sei ein relativ prolongierter Prozess von Stunden, wie die Apoptose, als alleiniger Mechanismus der Zytotoxizität fraglich [262]. Hierbei wurde der entscheidende Einfluss freier Zinkionen auf die Zellpopulationen im

Gegensatz zur verabreichten Gesamtdosis betont. In diesem Zusammenhang könnte die Verwendung relativ hoher Konzentrationen von Zink-HA für die *in vitro*-Experimente der vorliegenden Arbeit stehen, während physiologische Zinklevel von Immunzellen im Vergleich dazu im Pico- bzw. im unteren Nanomolar-Bereich liegen. Zudem haben verschiedene Autoren gezeigt, dass die Konzentration an freien Zinkionen durch die im Zellkulturmedium befindlichen Proteine, wie Serumalbumin, signifikant gedämpft werden kann [262–265]. Dementsprechend wäre die Anzahl an freien Zinkionen unter Zellkulturbedingungen deutlich niedriger als die zum Kulturmedium zugefügte Gesamtmenge des Biometalls. Somit stände nur eine kleine Fraktion an Zinkionen zur Zellinteraktion zur Verfügung. Dieser Effekt wurde bereits für verschiedene Zellkulturmedien unabhängig von der verwendeten Zelllinie belegt [13, 262, 263].

Albumin ist im Serum, bedingt durch seine quantitativen (hohe Serumkonzentration) und qualitativen (hohe Zinkaffinität ($KD \sim 0.1 \mu\text{mol/L}$) [266]) Eigenschaften, das Hauptbindungsprotein von Zink [33]. Haase et al. haben gezeigt, dass Zink durch die Zugabe einer physiologischen Menge BSA (50 mg/ml) zu RPMI, einem Serum-freien Zellkulturmedium, seine Zytotoxizität auf murine RAW 264.7-Makrophagen verliert [13]. Aus diesem Grund besteht die Möglichkeit, dass in den vorliegenden *in vitro*-Experimenten ein Teil des zugegebenen Zink-HAs an diverse Komponenten des verwendeten AIM-V Mediums gebunden wurde und damit keinen Einfluss auf die zu untersuchenden Zellpopulationen hatte. AIM-V-Medium ist ein Serum-freies Zellkulturmedium, welches u. a. humanes Serumalbumin als Zusatzstoff enthält [267]. Möglicherweise war die Zellvitalität im angewandten Konzentrationsbereich aufgrund der hohen Zink-Bindekapazität des AIM-V Mediums unbeeinflusst von Zink-HA.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass Zink-HA die DNA-Synthese PWM- oder anti-CD3/CD28-Antikörper stimulierter humaner Pan-T-Zellen sowie deren CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen konzentrationsabhängig hemmte. Diese Wirkung von Zink-HA konnte auch für PWM- oder anti-CD3-Antikörper stimulierten Splenozyten von SJL/J-Mäusen belegt werden. Interessanterweise war der IC₅₀-Wert der DNA-Synthese im murinen System unter beiden Stimulationsbedingungen um ca. die Hälfte niedriger als im humanen System. In PWM-Ansätzen der murinen Splenozyten betrug die IC₅₀ ca. 40 μM , bei humanen Pan-T-Zellen hingegen 125 μM Zink-HA; im anti-CD3-Antikörper-Stimulationssystem ergab sich ein IC₅₀-Wert von ca. 50 μM (murin) bzw. 80 μM (human) Zink-HA. In Anbetracht der Versuchsbedingungen unterschieden sich die Kulturansätze nur durch die Zugabe von 10^{-5} M 2-ME zu den Milzzellen der Maus. β -Mercaptoethanol wird

üblicherweise zur Denaturierung und Reduktion von Proteinen sowie als Zusatz diverser Zellkulturen zur Förderung von Wachstum und Differenzierung genutzt [231]. Möglicherweise führte 2-ME im murinen Zellkultursystem zur Denaturierung von Proteinen des AIM-V Mediums. Damit könnte der Anteil freier und reaktionsfähiger Zinkionen durch den Verlust der Zink-puffernden Eigenschaften der Proteine erhöht werden und zu einer stärkeren Inhibition der DNA-Synthese führen. In der Literatur konnte für Mitogen-stimulierte humane MNZ bereits ein proliferationshemmender Effekt diverser Zinkderivate (ZnCl_2 , ZnO und ZnSO_4) mit einer Dosis größer als $100 \mu\text{M}$ belegt werden [83, 238].

Ein Schlüsselmechanismus bei der Entstehung pathologischer Gewebläsionen im Rahmen von Autoimmunerkrankungen wie der MS ist die Produktion und Freisetzung inflammatorischer Zytokine [4, 254]. Dem Th1-Zytokin $\text{IFN-}\gamma$ sowie den Th17-Zytokinen IL-17A und GM-CSF werden dabei eine entscheidende Rolle zugeschrieben [4, 253, 268]. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung des zugelassenen Therapeutikums Zink-HA auf die Zytokinproduktion humaner T-Zellen zunächst in Form einer Screeningmethode, einem Zytokin-Array, untersucht. Mit diesem Testsystem konnten semiquantitativ die Konzentrationen von 36 verschiedenen Zytokinen, Chemokinen und Akute-Phase-Proteinen in Zellkulturüberständen unstimulierter sowie PWM-stimulierter humaner Pan-T-Zellen analysiert werden, welche über 72 h in An- und Abwesenheit von $150 \mu\text{M}$ Zink-HA kultiviert wurden. Unter den genannten Versuchsbedingungen führte die PWM-Stimulation humaner T-Zellen zu einer starken Produktions- sowie Sekretionssteigerung von Zytokinen wie IL-2, IL-5, GM-CSF, $\text{IFN-}\gamma$ und $\text{TNF-}\alpha$. Zink-HA hemmte signifikant die Synthese jener Zytokine in dem verwendeten Zellsystem. Die Produktion weiterer Zytokine, wie IL-6 oder IL-10, IL-13, IL-17, IL-17E, IL-23 und IL-27 wurde durch PWM ebenfalls stimuliert; eine Inkubation mit $150 \mu\text{M}$ Zink-HA bewirkte in diesen T-Zell-Kulturen eine eindeutige Produktionshemmung der genannten Botenstoffe. Die Array-Daten bestätigen bereits den von unserer Arbeitsgruppe beobachteten suppressiven Effekt verschiedener Zinkderivate (ZnCl_2 , ZnO und ZnSO_4) auf die IL-2-, IL-6- und IL-10-Produktion mitogenstimulierter humaner MNZ [83, 238] sowie auf die IL-2- und IL-17-Synthese PWM-aktivierter humaner T-Zellen [240]. Auch andere Autoren belegten unter Verwendung hoher Zinkkonzentrationen einen hemmenden Effekt des Biometalls auf die Synthese von $\text{IFN-}\gamma$ [81, 239, 260] und $\text{TNF-}\alpha$ [56, 239, 269] mitogenstimulierter MNZ oder aktivierter Jurkat-Zellen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse des Zytokin-Arrays, dass Zink-HA die Synthese verschiedener, für die EAE bzw. MS relevanter Zytokine, wie

beispielsweise Th1- (IL-2, IFN- γ und TNF- α), Th2- (IL-5, IL-13) und Th17- Zytokine (IL-17, GM-CSF) *in vitro* inhibieren kann.

Zur Verifikation der semiquantitativ erhobenen Array-Daten folgten anschließend vertiefende Untersuchungen mittels spezifischer Zytokin-ELISA. Dabei konzentrierte sich die vorliegende Arbeit auf diejenigen Botenstoffe, welche in die Immunpathogenese der EAE bzw. der MS involviert sind [4, 270]. Zunächst konnte gezeigt werden, dass Zink-HA die Produktion von IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-5 und IL-10 in PWM- oder in anti-CD3/CD28-Antikörper stimulierten humanen T-Zellen sowie in PWM-aktivierten Splenozyten der Maus dosisabhängig hemmte. Im Mittel erfolgte eine signifikante Inhibition der Zytokine im humanen System ab 150 μ M Zink-HA, im murinen Modell bereits ab ca. 70 μ M Zink-HA (ausgenommen IL-5). Eine Hypothese zu den differierenden Zinkkonzentrationen zwischen beiden Systemen wurde bereits für den Einfluss von Zink-HA auf die DNA-Synthese dargelegt (siehe oben). In der Literatur wurde ein biphasischer Effekt von Zink auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie IFN- γ , diskutiert [17, 54, 239, 241]. Zum einen zeigten Aydemir und seine Mitarbeiter eine Induktion der IFN- γ -Produktion mitogenstimulierter humaner T-Zellen nach 4-tägiger oraler Substitution von 15 mg ZnSO₄/Tag [82, 241]. Zusätzlich konnte eine vermehrte Expression des Zink-Transporter ZIP8 während der T-Zell-Aktivierung sowie ein Zusammenhang zwischen diesem Transporter und der IFN- γ -Synthese demonstriert werden. Dies führte zur Annahme einer ZIP8-vermittelten Rolle des Spurenelementes bei der T-Zellaktivierung in Folge variierender Zinkkonzentrationen des Zytoplasmas [241]. Auch andere Autoren belegten eine Zink-bedingte Zunahme der IFN- γ -Produktion stimulierter humaner Immunzellen *in vitro* [261, 271–274]. Andererseits beobachtete die Arbeitsgruppe um Hayashi 2008 eine Zink-abhängige Hemmung dieser Zytokinexpression in aktivierten humanen Jurkat-Zellen unter Verwendung von Zinkkonzentrationen ab 50 μ M. Ursächlich wurde von den Autoren eine Down-Regulation des Calcium-unabhängigen PKC-AP-1-Signalweges angenommen [81]. Interessanterweise konnten auch Aydemir et. al. trotz differierender Versuchsbedingungen eine dosisabhängige Inhibition der IFN- γ -Synthese *in vitro* im Sinne eines biphasischen Effektes des Spurenelementes beobachten. Ein Maximum der IFN- γ -Produktion *in vitro* ließ sich unter Zugabe von 3,1 μ M Zink und eine Abnahme derselben durch 25 μ M Zink verzeichnen. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Substitution jenes Spurenelementes im unteren Konzentrationsbereich eine mutmaßlich stimulierende und bei Konzentrationen oberhalb des physiologischen Niveaus eine potenziell inhibierende Wirkung auf die T-Zell-Aktivierung hat, ohne dabei die Zellvitalität zu

beeinflussen [82, 241]. Weitere Studien zur oralen Zinksubstitution belegten diese konzentrationsabhängige Wirkung [239, 255]. Welcher molekulare Mechanismus ursächlich dazu beiträgt, ist bislang unklar. Möglicherweise üben unterschiedliche Plasma-Zinkkonzentrationen durch variierende Zinktransporter einen wechselnden Einfluss auf diverse Signalkaskaden aus [241, 275].

Ein weiterer, in die Immunpathogenese der MS involvierter, proinflammatorischer Botenstoff ist das Th1-Zytokin TNF- α [4]. In humanen Interventionsstudien konnte ebenfalls ein biphasischer Effekt von Zink auf die TNF- α -Konzentration bzw. -Produktion stimulierter MNZ und peripherer Blutzellen angenommen werden [56, 82, 269, 273, 276]. Eine Zinksubstitution von ≥ 45 mg Zink/Tag führte zur Abnahme *ex vivo* generierter TNF- α -Level stimulierter MNZ [56, 269, 276] und ist auf diese Weise konform mit den Daten der vorliegenden Arbeit. Jedoch verweist die Literatur auch auf erhöhte Zytokinkonzentrationen aktivierter MNZ, welche von Spendern mit einer täglichen Einnahme von ≤ 20 mg Zink isoliert wurden [82, 273]. Die dosisabhängige Wirkung von Zink auf die Synthese proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α aber auch IL-1 β , IL-6 und IFN- γ spiegelt vermutlich die Fähigkeit des Spurenelementes wieder, die Aktivität des ubiquitär vorkommenden Transkriptionsfaktors NF- κ B zu stimulieren oder zu inhibieren [239]. Der Signalweg des TNF-Rezeptors ist dabei als Aktivator in den Prozess involviert. Über den I κ B Kinase Komplex (IKK), welcher das NF- κ B-Inhibitionsprotein phosphoryliert und dadurch inaktiviert, führt dieser Signalweg zur Freisetzung und Translokation von NF- κ B in den Nukleus [277]. Kürzlich wurde gezeigt, dass der Zinkimporteur ZIP8 eine Rolle im Inaktivierungsprozess von NF- κ B in Monozyten, Makrophagen und Epithelzellen der Lunge während einer Infektion spielen könnte [278]. *In vitro* bewirkte die Inkubation von HUT-78 (Th0) Zellen mit niedrigen (1 μ M) und mit hohen Zinkkonzentrationen (50 oder 100 μ M) eine Reduktion der NF- κ B-Aktivität und somit des Zellwachstums sowie der Zytokinexpression im Vergleich zu Kulturbedingungen mit einem physiologischen Zinkniveau (15 μ M) [279]. Im Gegensatz dazu konnte unter physiologischen Zinkbedingungen in stimulierten HL-60- und Gefäßendothel-Zellkulturen eine Zunahme der A20-Aktivität, einem NF- κ B-Inhibitor [28, 86] im Vergleich zu Zellkulturen mit 1 μ M Zink gezeigt werden. Diese Ergebnisse suggerieren eine Zelltyp-spezifische Wirkung des Biometalls auf die NF- κ B-Aktivität [28]. Die Verwendung verschiedener Zelltypen in differierenden Studienmodellen unter dem Einfluss diverser Zinkkonzentrationen aber auch die Wirkung von Zusatzstoffen (bspw. Chelatoren) auf den intrazellulären Zinkstatus kommen

als mögliche Ursachen für die widersprüchlichen *in vitro*-Beobachtungen der NF- κ B-Aktivität unter dem Einfluss des Biometalls in Frage.

Neben IL-17 ist der Botenstoff GM-CSF ein wichtiges Effektormolekül der Th17-Population [4, 268, 270]. Unsere Arbeitsgruppe belegte eine dosisabhängige Hemmung von Zink-HA auf die IL-17-Produktion Mitogen-stimulierter humaner T-Zellen sowie aktivierter Splenozyten der Maus [240]. Interessanterweise wurde Zink bereits eine regulierende Rolle in der IL-6/STAT3 Signalkaskade zugeschrieben, welche zur Entwicklung IL-17-produzierender CD4⁺-T-Zellen (Th17-Zellen) führt [89]. Th17-Lymphozyten und deren proinflammatorische Zytokine tragen entscheidend zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen bei [6, 280-282]. Therapeutische Zinkgaben von 50 μ M ZnSO₄ hemmten *in vivo* die Reifung von naiven CD4⁺-T-Zellen zu Th17-Zellen mittels direkter STAT3-Bindung. Dies führte zum Verlust der α -helikalen Struktur und zur Entfaltung von STAT3 mit einhergehender Aktivitätsminderung sowie Hemmung der Phosphorylierung von JAK-Kinasen [89]. Minderung der Th17-Proliferation und eine erniedrigte Serumkonzentration von IL-17A waren die Folge. Wenn Zink eine supprimierende Wirkung auf die Generation der Th17-Population hat, könnte sich dies ebenfalls hemmend auf deren Zytokinproduktion (bspw. IL-17A, IL-17E, GM-CSF) auswirken, was sich in den erhobenen Array- und ELISA-Daten der Arbeit widerspiegeln würde.

Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre belegten den Einfluss von Zink auf die Polarisation naiver T-Lymphozyten in diverse Subpopulationen und zeigten eine verminderte Rate CD4⁺- zu CD8⁺-Zellen sowie eine Th1/Th2-Imbalance unter Zinkmangelbedingungen [49]. Während die Zell-vermittelte Immunantwort durch diese defizitäre Situation gestört zu sein scheint, lässt sich anhand einer unveränderten Th2-Zytokin-Produktion (bspw. IL-4, IL-5 und IL-10) eine geringe Wirkung des Biometalls auf die humorale Immunreaktion vermuten [71, 78, 283, 284]. Im Gegensatz dazu zeigte die Arbeitsgruppe um Prasad im Rahmen einer Zink-Substitutionsstudie eine Abnahme der IL-10-Produktion *ex vivo* generierter MNZ in der Therapiegruppe, welche über 12 Monate täglich 45 mg Zinkgluconat einnahm [56]. Reinhold et al. belegten ebenfalls einen suppressiven Effekt verschiedener Zinkderivate auf die IL-10-Synthese mitogenstimulierter humaner MNZ *in vivo* [83]. Diese Daten bestätigen die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse und lassen eine Zink-vermittelte Wirkung auf die Synthese von Th2-Zytokinen vermuten. In welcher Form Zink dabei Signalkaskaden beeinflusst oder ob diverse Zinktransporter darin involviert sind, ist bislang unklar und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Basierend auf den *in vitro*-erhobenen Ergebnissen besteht die Möglichkeit, dass Zink-HA eine potentielle Therapieoption zur Modifikation T-Zell-vermittelter Autoimmunerkrankungen des ZNS darstellen könnte. In der Vergangenheit wurde von verschiedenen Autoren bereits eine therapeutische Wirkung des Spurenelementes auf einige dieser Autoimmunerkrankungen angenommen [242, 243, 255].

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit fokussierte sich auf orale Zinktherapiestudien im EAE-Modell. Die EAE ist sowohl ein anerkanntes Tiermodell der MS als auch ein allgemeines, tierexperimentelles Beispiel für T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankungen des ZNS, welche durch entzündliche und demyelinisierende Prozesse gekennzeichnet sind [196, 199]. Der Einfluss präventiver Zinkgaben auf die Entstehung und den Verlauf der EAE wurden bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Ein präventiver Effekt von ZnSO₄ bei EAE-erkrankten SJL/J-Mäusen [285] oder von ZnCl₂ bei Lewis Ratten, welche ebenfalls an einer EAE litten [286], konnte nicht gezeigt werden. Kitabayashi et al. dokumentierten hingegen 2010 eine Zink-bedingte Inhibition Th17-Zell-vermittelter Autoimmunerkrankungen, wie die CIA und die EAE [89]. Eine signifikante Reduktion des Schweregrades einer MOG (35-55)-Peptid induzierten aktiven EAE von C57BL/6 Mäusen wurde in Folge eines präventiven Zink-Trinkwasserzusatzes über 2 Monate erzielt. Die aufgenommene Menge des Spurenelementes pro Maus entsprach dabei etwa 29 µM ZnSO₄/Tag. Ursächlich vermuteten die Autoren eine regulierende Funktion von Zink in der IL-6/STAT3-Signalkaskade, welche in der Entwicklung von Th17-Lymphozyten entscheidend involviert sein soll (siehe oben). Einen Einfluss des Spurenelementes auf die Th1-Population und deren Zytokinsynthese konnte diese Arbeitsgruppe unter den genannten Versuchsbedingungen allerdings nicht belegen. Möglicherweise führten die verschiedenen Applikationsprotokolle sowie die differierende Bioverfügbarkeit diverser Zinkpräparate als auch deren angewandte Dosen zu diesen widersprüchlichen Ergebnissen.

Kürzlich beschrieb unsere Arbeitsgruppe eine therapeutische Wirkung i.p.-verabreichter Zink-HA-Konzentrationen auf die schubförmig verlaufende, aktive EAE von SJL/J-Mäusen [240]. Dabei führte eine 10-tägige präventive sowie therapeutische i.p.-Applikation von im Mittel 30 µg Zink-HA/Tag (1,5 mg/kg KG) zu einer signifikanten Reduktion des klinischen Schweregrades der EAE während des ersten Schubes. Die Verwendung niedrigerer Zink-HA-Konzentrationen (6 µg/Tag; 0,3 mg/kg KG) hatte hingegen keinen therapeutischen Effekt, während hohe Dosen des Spurenelementes (120 µg/Tag; 6 mg/kg KG) eine Zunahme des Schweregrad bzw. des Krankheitsverlaufs bewirkten. Auf Grundlage dieser Ergebnisse folgten in der vorliegenden Arbeit Experimente zur Optimierung des therapeutischen

Managements im klinischen Alltag in Form von oralen Zink-HA-Applikationen. Im Rahmen chronischer Erkrankungen wie der MS ist eine risikoarme und anwenderfreundliche Therapieform anzustreben.

Die Behandlung der an einer EAE erkrankten SJL/J-Mäuse begann mit dem Auftreten erster klinischer Symptome für einen Zeitraum von 10 Tagen. In dieser akuten Krankheitsphase sind die entzündlichen Infiltrate des ZNS durch eingewanderte autoreaktive T-Zellen, Makrophagen sowie weitere proinflammatorische Lymphozyten und aktivierte ortsständige Mikrogliazellen gekennzeichnet [287]. Die perorale Therapie mit 6 oder 12 µg Zink-HA/Tag bewirkte eine signifikante Reduktion des Schweregrades der EAE im Verlauf der Krankheitsschübe. Insgesamt konnte festgestellt werden, dass in den durchgeführten Experimenten die 10-tägige Gabe von 12 µg Zink-HA/Tag einen größeren therapeutischen Nutzen erzielte. Diese klinischen Ergebnisse stimmten mit den histopathologischen Analysen der vorliegenden Arbeit überein. Es zeigte sich eine diskrete Reduktion der Anzahl infiltrierender inflammatorischer Zellen im ZNS von EAE-erkrankten SJL/J-Mäusen. Besonders bemerkenswert war, dass höhere Konzentrationen (≥ 30 µg/Tag) des peroral verabreichten Zink-HA keinen therapeutischen Nutzen erzielten, sondern zu einer Progredienz des Krankheitsgeschehens führten. Bislang ist unklar, ob es sich dabei um einen toxischen Effekt des Spurenelementes im höheren Dosisbereich handelte oder ob diese Zinkkonzentrationen die Balance pro- und antiinflammatorischer Effektormechanismen beeinflusste. Interessanterweise führte die orale Therapie mit 30 µg Zink-HA/Tag zu einer Zunahme des Schweregrades der EAE, während die i.p.-Applikation dieser Dosis eine signifikante Reduktion dessen erzielte. Die i.p.-Darreichungsform zählt zu den parenteralen Applikationsvarianten und wird u. a. zur Vermeidung des First-Pass-Effektes der Leber eingesetzt [288]. Möglicherweise lag in jenem First-Pass-Mechanismus jedoch die Ursache dieser widersprüchlichen Ergebnisse. Die Leber stellt das Hauptorgan des Zinkstoffwechsels dar und ist u. a. an der Regulation der für das Immunsystem essentiellen Plasmazinkkonzentration mit beteiligt [33]. Letztlich bleibt jedoch unklar, ob die Daten die häufig beobachteten biologischen Schwankungen dieses Tiermodells reflektierten oder ob die Ursache in der Darreichungsform begründet lag. Für den klinischen Alltag, insbesondere im Rahmen der MS, ist jedoch die erstmalige Beschreibung eines signifikanten therapeutischen Nutzens einer Dosis-bezogenen oralen Zink-HA-Therapie in der EAE von Bedeutung.

Im Hinblick auf die MS könnten die beiden Spurenelemente Zink und Kupfer in die Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankung involviert sein. Epidemiologische Studien zeigten eine niedrige Prävalenz der MS in Küstenregionen [289] mit reichhaltigem Fischangebot, was

Grüngreiff et al. als ausgezeichneten Zinklieferanten beschrieben [31]. Des Weiteren führten Zink- bzw. Kupferdefizite bei einigen Tierarten zu einer Hypomyelinisierung des ZNS [290-292]. Johnson postulierte, dass die erhöhte MS-Prävalenz beim weiblichen Geschlecht u. a. in der Menstruations-bedingten Zunahme des Kupferplasmaspiegels liegen könnte. Dieser Überschuss würde wiederum in einer verminderten Resorptionsrate von Zink resultieren [293]. Niedrige Plasma-Zinkkonzentrationen könnten laut Autor schließlich zu einer Dysfunktion der Kupfer-/Zink-Superoxiddismutase und folglich zu einer größeren Anzahl freier Radikale führen.

Zur Höhe der Plasma- oder Serumkonzentration jenes Spurenelementes finden sich in der Literatur widersprüchliche Daten. Einerseits berichteten verschiedene Autoren über erniedrigte Serum- [119] oder Plasma-Zinkkonzentrationen [116, 117] von MS-Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe. Andererseits wies die Arbeitsgruppe von Dore-Duffy bei 68 Patienten mit MS im Vergleich leicht erhöhte Plasmaspiegel des Biometalls nach [294]. Kürzlich berichteten Ghazavi et al. hingegen in einer Fall-Kontroll-Studie mit 60 iranischen MS-Patienten über signifikant erniedrigte Serum-Zinkkonzentrationen sowie erhöhte Serumlevel an Kupfer. Die dazugehörige Kontrollgruppe mit gleicher Alters- und Geschlechtsverteilung bestand aus 60 freiwilligen gesunden Personen von vergleichbarer sozioökonomischer und geographischer Herkunft [118]. Des Weiteren wurden von dieser Arbeitsgruppe signifikant niedrigere Zinkspiegel im Serum von Patienten mit einer sekundär progredienten MS im Vergleich zu denjenigen mit einer schubförmig remittierenden Variante der MS beschrieben, was einen Einfluss des Biometalls auf die Progredienz der Erkrankung vermuten lässt. In diesem Zusammenhang zeigte unsere Arbeitsgruppe eine signifikante Reduktion der Plasma-Zinkkonzentration von EAE-erkrankten SJL/J-Mäusen am Tag 21 nach der Immunisierung im Vergleich zum Plasma-Zinkspiegel gesunder Versuchstiere [295].

Insgesamt deuten die vorliegenden Daten in Zusammenschau mit der aktuellen Fachliteratur darauf hin, dass eine klinische Anwendung erprobter und zugelassener Zinkpräparate, wie Zink-HA, bei MS-Erkrankten mit nachweislich erniedrigten Serum-Zinkkonzentrationen von Nutzen sein könnte. Eine Hochdosis- und/oder eine Langzeittherapie des Spurenelementes sollte dabei stets unter regelmäßiger Kontrolle des Serum-Zinkspiegels erfolgen, da nicht nur Immunsuppression sondern auch Eisen- oder Kupfermangel sowie Anämie und Wachstumsretardierung zu potentiellen Therapiefolgen gehören können [257, 296, 297].

Abbildung 20 stellt den hypothetischen Zusammenhang zwischen einem laborchemisch ermittelten Zinkmangel und dessen Auswirkungen auf die Immunhomöostase des Körpers dar

im Sinne einer verminderten Immunfunktion sowie einer überschießenden T-Zell-Immunität. Dies kann einerseits zu einem sekundären Immundefekt oder andererseits zu diversen T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen führen. In klinischen und tierexperimentellen Studien bewirkte eine kontrollierte Zinksubstitution unter Zinkmangelbedingungen eine Normalisierung der Zinkhomöostase des Körpers und der immunologischen Parameter. Ebenso führt eine immunsuppressive Therapie mit Hilfe des Spurenelementes zur Reduktion der klinischen Symptomatik von Autoimmunphänomenen.

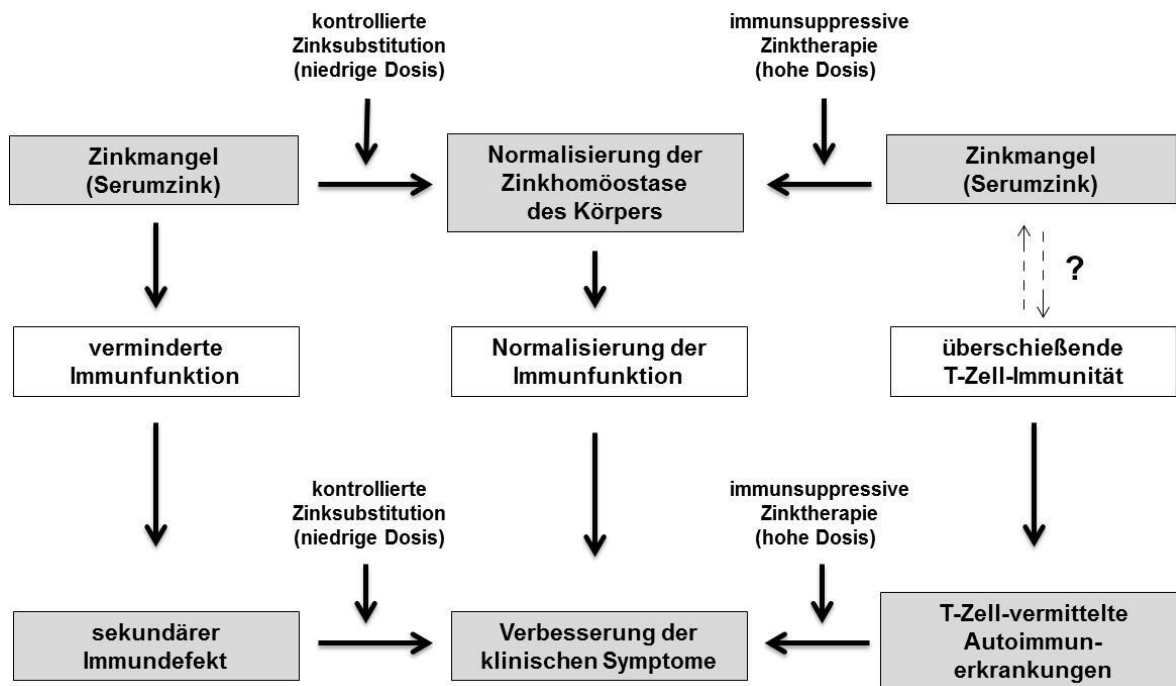


Abbildung 20: Zusammenhang zwischen dem „Zinkstatus“ und der Immunhomöostase des Körpers. Hypothetische Darstellung der Beziehung eines Zinkmangels und eines sekundären Immundefekt mit kontrollierter Zinksubstitution sowie T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen mit vorhandenem Zinkdefizit und kontrollierter, immunsuppressiver Zink-Therapie [90].

Neben der allgemeinen Wirksamkeit und Verträglichkeit des Spurenelementes bei T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen wie der MS sollten daher auch Untersuchungen zur Dosisoptimierung der Serum-Zinkkonzentration Bestandteil zukünftiger klinischer Studien sein. Die Aussagekraft der Analyse des Serum- bzw. Plasma-Zinkspiegels wird derzeit als nicht optimal eingeschätzt [298, 299]. Aus diesem Grund sind weitere Betrachtungen nötig, um standardisierte Aussagen zum „Zinkstatus“ einer Person treffen zu können.

Da regulatorische T-Lymphozyten oder Th9-Zellen ebenfalls in die Immunpathogenese der EAE involviert sein sollen [4], sind außerdem weitere *in vitro*-Analysen zum Einfluss von

Zink auf T-Zell-Subpopulationen und deren Zytokinproduktion denkbar. Auch sollten verifizierende und vertiefende Untersuchungen zur Wirkung von Zink auf die Th2-Population und jener Zytokinsynthese angestrebt werden. Weiterhin gilt es zu prüfen, ob die suppressive Wirkung jenes Spurenelementes auf T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankungen im therapeutischen Bereich auf die Induktion von Apoptose zurückzuführen ist. In der Literatur wurde Zink eine regulatorische Rolle im Apoptose-Prozess bereits zugeschrieben [35, 259]. Campo et al. zeigten eine stärkere Reduktion der IFN- γ -Synthese in Folge einer Präinkubation von MNZ mit Zink [260]. Die Auswirkung einer Präinkubation mit diesem Biometall auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine sollte in weiteren Experimenten analysiert werden. Gleiches gilt für den Einfluss von Zink auf ruhende Zellen, da bislang stets mitogenstimulierte Zellkulturen als Versuchsgrundlage dienten. An Hand der vorliegenden histopathologischen Daten gilt es, in Zukunft mittels spezifischer Färbetechniken zu prüfen, welche Zellpopulationen im ZNS durch die Wirkung von Zink beeinflusst werden. Auch Restimulationsversuche zur Analyse eines potenziellen Wirkungsmechanismus des Biometalls wären für Folgestudien denkbar.

Schließlich tragen die Ergebnisse dieser Arbeit einen weiteren Schritt zur Aufklärung der Rolle von Zink-HA in T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen wie der EAE bei und eröffnen möglicherweise neue therapeutische Ansatzpunkte.

6. Zusammenfassung

Klinische und experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass enge Wechselwirkungen zwischen dem essentiellen Spurenelement Zink und dem Immunsystem existieren. Zink beeinflusst die zellulären und humoralen Komponenten des angeborenen sowie des erworbenen Immunsystems. Sowohl ein Zinkmangel als auch ein Überschuss dieses Biometalls können zu einer schweren Dysfunktion des Immunsystems führen. Dies unterstreicht die Bedeutung eines alimentären physiologischen Zinkspiegels für die Erhaltung der Immunhomöostase.

Arbeiten der letzten Jahre belegen darüber hinaus immunsuppressive Wirkungen von Zinkverbindungen in T-Zell-vermittelten autoimmunen Tiermodellen, wie der Kollagen-induzierten Arthritis, der DSS-induzierten Kolitis oder der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einem anerkannten Modell der Multiplen Sklerose.

Unsere Arbeitsgruppe untersuchte in Vorarbeiten die Wirkung von Zink-Hydrogenaspartat (Zink-HA, Unizink 50), einem zugelassenen Arzneimittel mit sehr guter Bioverfügbarkeit, und konnte nachweisen, dass präventive sowie therapeutische intraperitoneale Applikationen dieses Präparates signifikant den klinischen Verlauf und den Schweregrad einer schubförmig remittierenden, aktiven EAE von SJL/J-Mäusen hemmen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, fortführende *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Zink-HA und zur möglichen oralen Wirksamkeit dieses Therapeutikums im EAE-Modell durchzuführen.

Im Rahmen der Arbeit konnte gezeigt werden, dass Zink-HA die Proliferation (DNA-Synthese) sowie die Produktion der Zytokine IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-10 und IL-5 von anti-CD3/CD28-Antikörper- oder Pokeweed-Mitogen-stimulierten humanen T-Zellen und murinen Splenozyten dosisabhängig inhibierte. Die Vitalität der jeweiligen Zellsysteme war in den verwendeten Konzentrationsbereichen unbeeinflusst von Zink-HA.

Daneben sollte im Rahmen der Arbeit die Wirksamkeit einer 10-tägigen oralen, therapeutischen Zink-HA-Applikation im Tiermodell der aktiven EAE an SJL/J-Mäusen geprüft werden. Es wurde nachgewiesen, dass eine perorale Therapie in der Akutphase der Erkrankung mit 6 μ g bzw. 12 μ g Zink-HA/Tag (0,3 bzw. 0,6 mg/kg Körpergewicht) eine signifikante Reduktion des Schweregrades der EAE im Verlauf der Krankheitsschübe für mehr als 60 Tage nach Therapieende bewirkte. Dabei ließ sich mit einer 10-tägigen Gabe von 12 μ g Zink-HA/Tag der größte therapeutische Nutzen erzielen. Darüber hinaus wurde

beobachtet, dass höhere Konzentrationen des peroral verabreichten Zink-Präparates ($\geq 30 \mu\text{g}$ Zink-HA/Tag (1,5 mg/kg Körpergewicht)) keine therapeutische Wirkung hatten, sondern zu einer Progredienz des Krankheitsgeschehens führten.

Histopathologische Analysen des Rückenmarks erkrankter Tiere nach 10-tägiger oraler Behandlung mit $12 \mu\text{g}$ Zink-HA/Tag zeigten eine reduzierte Anzahl infiltrierender inflammatorischer Zellen und bestätigten somit die klinischen Befunde.

Die Ergebnisse der Arbeit verdeutlichen das regulatorische Potential von Zink-HA bei T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen. In zukünftigen klinischen Studien sollte bei diesen Erkrankungen der mögliche Einsatz einer kontrollierten immunsuppressiven Zinktherapie geprüft werden.

7. Literaturverzeichnis

1. Murphy K.M., Travers P., Walport M.: Janeway Immunologie. Janeway Immunologie (2014)
2. Erkan D., Levine S.R.: Neurologic involvement in systemic autoimmune diseases. Elsevier, Amsterdam, Oxford 2004
3. Rink L., Kruse A., Haase H.: Immunologie für Einsteiger. Immunologie für Einsteiger (2012)
4. Petermann F., Korn T.: Cytokines and effector T cell subsets causing autoimmune CNS disease. FEBS Lett. 585 3747-3757 (2011)
5. Afzali B., Lombardi G., Lechler R.I., Lord G.M.: The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. Clin. Exp. Immunol. 148 32-46 (2007)
6. Bettelli E., Oukka M., Kuchroo V.K.: T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. Nat. Immunol. 8 345-350 (2007)
7. Ogura H., Murakami M., Okuyama Y., Tsuruoka M. et al.: Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction. Immunity 29 628-636 (2008)
8. Raulin J.: Chemical studies on vegetation. Ann. Sci. Nat.93-99 (1869)
9. Prasad A.S., MIALE A., FARID Z., SANDSTEAD H.H., SCHULERT A.R.: Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism, and hypogonadism. J. Lab. Clin. Med. 61 537-549 (1963)
10. Prasad A.S.: Discovery of human zinc deficiency: 50 years later. J Trace Elem Med Biol 26 66-69 (2012)
11. Vallee B.L., Falchuk K.H.: The biochemical basis of zinc physiology. Physiol. Rev. 73 79-118 (1993)
12. Beyersmann D., Haase H.: Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. Biometals 14 331-341 (2001)
13. Haase H., Rink L.: Zinc signals and immune function. Biofactors 40 27-40 (2014)
14. Haase H., Rink L.: Multiple impacts of zinc on immune function. Metallomics 6 1175-1180 (2014)
15. MOCHEGANI E., Muzzioli M., Giacconi R.: Zinc, metallothioneins, immune responses, survival and ageing. Biogerontology 1 133-143 (2000)
16. RINK L., Gabriel P.: Zinc and the immune system. Proc Nutr Soc 59 541-552 (2000)
17. Auld D.S.: Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. Biometals 14 271-313 (2001)
18. Haase H., Rink L.: Functional significance of zinc-related signaling pathways in immune cells. Annu. Rev. Nutr. 29 133-152 (2009)
19. Chasapis C.T., Loutsidou A.C., Spiliopoulou C.A., Stefanidou M.E.: Zinc and human health: an update. Arch. Toxicol. 86 521-534 (2012)
20. Haase H., Maret W.: Fluctuations of cellular, available zinc modulate insulin signaling via inhibition of protein tyrosine phosphatases. J Trace Elem Med Biol 19 37-42 (2005)
21. Fukada T., Yamasaki S., Nishida K., Murakami M., Hirano T.: Zinc homeostasis and signaling in health and diseases. J Biol Inorg Chem 16 1123-1134 (2011)
22. Yamasaki S., Sakata-Sogawa K., Hasegawa A., Suzuki T. et al.: Zinc is a novel intracellular second messenger. The Journal of Cell Biology 177 637-645 (2007)
23. Eide D.J.: The oxidative stress of zinc deficiency. Metallomics 3 1124-1129 (2011)

24. Vahrenkamp H.: Why does nature use zinc--a personal view. *Dalton Trans* 4751-4759 (2007)
25. Mackenzie G.G., Zago M.P., Erlejman A.G., Aimo L. et al.: alpha-Lipoic acid and N-acetyl cysteine prevent zinc deficiency-induced activation of NF-kappaB and AP-1 transcription factors in human neuroblastoma IMR-32 cells. *Free Radic. Res.* 40 75-84 (2006)
26. Maret W.: Zinc coordination environments in proteins as redox sensors and signal transducers. *Antioxid. Redox Signal.* 8 1419-1441 (2006)
27. Prasad A.S.: Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 12 646-652 (2009)
28. Prasad A.S., Bao B., Beck F.W.J., Sarkar F.H.: Zinc-suppressed inflammatory cytokines by induction of A20-mediated inhibition of nuclear factor-κB. *Nutrition* 27 816-823 (2011)
29. Calesnick B., Dinan A.M.: Zinc deficiency and zinc toxicity. *Am Fam Physician* 37 267-270 (1988)
30. Stefanidou M., Maravelias C., Dona A., Spiliopoulou C.: Zinc: a multipurpose trace element. *Arch. Toxicol.* 80 1-9 (2006)
31. Grüngreiff K, Reinhold D (Hrsg): Zink. Bedeutung in der ärztlichen Praxis. Hartmann, Heßdorf-Klebheim 2008
32. Ibs K.-H., Rink L.: Zinc-altered immune function. *J. Nutr.* 133 1452S-6S (2003)
33. Rink L.: Zinc in human health. IOS Press, Amsterdam 2011
34. Liuzzi J.P., Cousins R.J.: Mammalian zinc transporters. *Annu. Rev. Nutr.* 24 151-172 (2004)
35. Bonaventura P., Benedetti G., Albarède F., Miossec P.: Zinc and its role in immunity and inflammation. *Autoimmun Rev* (2014)
36. Huang L., Tepasamorndech S.: The SLC30 family of zinc transporters - a review of current understanding of their biological and pathophysiological roles. *Mol. Aspects Med.* 34 548-560 (2013)
37. Maret W., Krezel A.: Cellular zinc and redox buffering capacity of metallothionein/thionein in health and disease. *Mol. Med.* 13 371-375 (2007)
38. Hirano T., Murakami M., Fukada T., Nishida K. et al.: Roles of zinc and zinc signaling in immunity: zinc as an intracellular signaling molecule. *Adv. Immunol.* 97 149-176 (2008)
39. Haase H., Ober-Blöbaum J.L., Engelhardt G., Hebel S. et al.: Zinc signals are essential for lipopolysaccharide-induced signal transduction in monocytes. *J. Immunol.* 181 6491-6502 (2008)
40. Wessells K.R., Brown K.H.: Estimating the global prevalence of zinc deficiency: results based on zinc availability in national food supplies and the prevalence of stunting. *PLoS ONE* 7 e50568 (2012)
41. Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. Neuer Umschau Buchverlag, Neustadt an der Weinstraße 2013
42. Cousins R.J.: Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol. Rev.* 65 238-309 (1985)
43. Lee H.H., Prasad A.S., Brewer G.J., Owyang C.: Zinc absorption in human small intestine. *Am. J. Physiol.* 256 G87-91 (1989)
44. Lönnerdal B.: Dietary factors influencing zinc absorption. *J. Nutr.* 130 1378S-83S (2000)
45. Prasad A.S.: Discovery of human zinc deficiency: its impact on human health and disease. *Adv Nutr* 4 176-190 (2013)
46. Scott B.J., Bradwell A.R.: Identification of the serum binding proteins for iron, zinc, cadmium, nickel, and calcium. *Clin. Chem.* 29 629-633 (1983)

47. McCance R.A., Widdowson E.M.: The absorption and excretion of zinc. *Biochem. J.* 36 692-696 (1942)
48. Halsted J.A., Smith J.C.: Plasma-zinc in health and disease. *Lancet* 1 322-324 (1970)
49. Prasad A.S.: Zinc in growth and development and spectrum of human zinc deficiency. *J Am Coll Nutr* 7 377-384 (1988)
50. Mahajan S.K.: Zinc in kidney disease. *J Am Coll Nutr* 8 296-304 (1989)
51. Guilbert J.J.: The world health report 2002 - reducing risks, promoting healthy life. *Educ Health (Abingdon)* 16 230 (2003)
52. Yakoob M.Y., Theodoratou E., Jabeen A., Imdad A. et al.: Preventive zinc supplementation in developing countries: impact on mortality and morbidity due to diarrhea, pneumonia and malaria. *BMC Public Health* 11 Suppl 3 S23 (2011)
53. Plum L.M., Rink L., Haase H.: The essential toxin: impact of zinc on human health. *Int J Environ Res Public Health* 7 1342-1365 (2010)
54. Haase H., Rink L.: Signal transduction in monocytes: the role of zinc ions. *Biometals* 20 579-585 (2007)
55. Prasad A.S.: Zinc: mechanisms of host defense. *J. Nutr.* 137 1345-1349 (2007)
56. Prasad A.S., Beck F.W.J., Bao B., Fitzgerald J.T. et al.: Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. *Am. J. Clin. Nutr.* 85 837-844 (2007)
57. Ackland M.L., Michalczyk A.: Zinc deficiency and its inherited disorders -a review. *Genes Nutr* 1 41-49 (2006)
58. Andrews G.K.: Regulation and function of Zip4, the acrodermatitis enteropathica gene. *Biochem. Soc. Trans.* 36 1242-1246 (2008)
59. Wellinghausen N., RINK L.: The significance of zinc for leukocyte biology. *J. Leukoc. Biol.* 64 571-577 (1998)
60. Neldner K.H., Hambidge K.M.: Zinc therapy of acrodermatitis enteropathica. *N. Engl. J. Med.* 292 879-882 (1975)
61. Shankar A.H., Prasad A.S.: Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am. J. Clin. Nutr.* 68 447S-463S (1998)
62. Hujanen E.S., Seppä S.T., Virtanen K.: Polymorphonuclear leukocyte chemotaxis induced by zinc, copper and nickel in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 1245 145-152 (1995)
63. Hasegawa H., Suzuki K., Nakaji S., Sugawara K.: Effects of zinc on the reactive oxygen species generating capacity of human neutrophils and on the serum opsonic activity in vitro. *Luminescence* 15 321-327 (2000)
64. DeCoursey T.E., Morgan D., Cherny V.V.: The voltage dependence of NADPH oxidase reveals why phagocytes need proton channels. *Nature* 422 531-534 (2003)
65. Sheikh A., Shamsuzzaman S., Ahmad S.M., Nasrin D. et al.: Zinc influences innate immune responses in children with enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced diarrhea. *J. Nutr.* 140 1049-1056 (2010)
66. Hasan R., Rink L., Haase H.: Zinc signals in neutrophil granulocytes are required for the formation of neutrophil extracellular traps. *Innate Immun* 19 253-264 (2013)
67. Chavakis T., May A.E., Preissner K.T., Kanse S.M.: Molecular mechanisms of zinc-dependent leukocyte adhesion involving the urokinase receptor and beta2-integrins. *Blood* 93 2976-2983 (1999)

68. Kojima C., Kawakami A., Takei T., Nitta K., Yoshida M.: Angiotensin-converting enzyme inhibitor attenuates monocyte adhesion to vascular endothelium through modulation of intracellular zinc. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 323 855-860 (2007)
69. Rajagopalan S., Winter C.C., Wagtmann N., Long E.O.: The Ig-related killer cell inhibitory receptor binds zinc and requires zinc for recognition of HLA-C on target cells. *J. Immunol.* 155 4143-4146 (1995)
70. Rajagopalan S., Long E.O.: Zinc bound to the killer cell-inhibitory receptor modulates the negative signal in human NK cells. *J. Immunol.* 161 1299-1305 (1998)
71. Prasad A.S.: Effects of zinc deficiency on Th1 and Th2 cytokine shifts. *J. Infect. Dis.* 182 Suppl 1 S62-8 (2000)
72. Kawamura T., Ogawa Y., Nakamura Y., Nakamizo S. et al.: Severe dermatitis with loss of epidermal Langerhans cells in human and mouse zinc deficiency. *J. Clin. Invest.* 122 722-732 (2012)
73. Fraker P.J., King L.E.: Reprogramming of the immune system during zinc deficiency. *Annu. Rev. Nutr.* 24 277-298 (2004)
74. Hönscheid A., Rink L., Haase H.: T-lymphocytes: a target for stimulatory and inhibitory effects of zinc ions. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 9 132-144 (2009)
75. Prasad A.S., Meftah S., Abdallah J., Kaplan J. et al.: Serum thymulin in human zinc deficiency. *J. Clin. Invest.* 82 1202-1210 (1988)
76. King L.E., Frentzel J.W., Mann J.J., Fraker P.J.: Chronic zinc deficiency in mice disrupted T cell lymphopoiesis and erythropoiesis while B cell lymphopoiesis and myelopoiesis were maintained. *J Am Coll Nutr* 24 494-502 (2005)
77. Kaltenberg J., Plum L.M., Ober-Blöbaum J.L., Hönscheid A. et al.: Zinc signals promote IL-2-dependent proliferation of T cells. *Eur. J. Immunol.* 40 1496-1503 (2010)
78. Beck F.W., Prasad A.S., Kaplan J., Fitzgerald J.T., Brewer G.J.: Changes in cytokine production and T cell subpopulations in experimentally induced zinc-deficient humans. *Am. J. Physiol.* 272 E1002-7 (1997)
79. Prasad A.S.: Zinc and immunity. *Mol. Cell. Biochem.* 188 63-69 (1998)
80. Hoft D.F., Schnapp A.R., Eickhoff C.S., Roodman S.T.: Involvement of CD4(+) Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 68 197-204 (2000)
81. Hayashi K., Ishizuka S., Yokoyama C., Hatae T.: Attenuation of interferon-gamma mRNA expression in activated Jurkat T cells by exogenous zinc via down-regulation of the calcium-independent PKC-AP-1 signaling pathway. *Life Sci.* 83 6-11 (2008)
82. Aydemir T.B., Blanchard R.K., Cousins R.J.: Zinc supplementation of young men alters metallothionein, zinc transporter, and cytokine gene expression in leukocyte populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 1699-1704 (2006)
83. Reinhold D., Ansorge S., Grüngreiff K.: Zinc regulates DNA synthesis and IL-2, IL-6 and IL-10 production of PWM-stimulated PBMC and normalizes the periphery cytokine concentration in chronic liver disease. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* 19-27 (1997)
84. Bülow V. von, Dubben S., Engelhardt G., Hebel S. et al.: Zinc-dependent suppression of TNF-alpha production is mediated by protein kinase A-induced inhibition of Raf-1, I kappa B kinase beta, and NF-kappa B. *J. Immunol.* 179 4180-4186 (2007)
85. Bülow V. von, Rink L., Haase H.: Zinc-mediated inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterase activity and expression suppresses TNF-alpha and IL-1 beta production in monocytes by elevation of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *J. Immunol.* 175 4697-4705 (2005)

86. Lee E.G., Boone D.L., Chai S., Libby S.L. et al.: Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* 289 2350-2354 (2000)
87. Bettelli E., Korn T., Kuchroo V.K.: Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr. Opin. Immunol.* 19 652-657 (2007)
88. Korn T., Oukka M., Kuchroo V., Bettelli E.: Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin. Immunol.* 19 362-371 (2007)
89. Kitabayashi C., Fukada T., Kanamoto M., Ohashi W. et al.: Zinc suppresses Th17 development via inhibition of STAT3 activation. *International Immunology* 22 375-386 (2010)
90. Schubert C., Guttek K., Reinhold A., Grüngreif K., Reinhold D.: Der Einfluss des Spurenelements Zink auf das Immunsystem. *LaboratoriumsMedizin - Journal of Laboratory Medicine* in press (2015)
91. Ohkawara T., Takeda H., Kato K., Miyashita K. et al.: Polaprezinc (N-(3-aminopropionyl)-L-histidinato zinc) ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Scand. J. Gastroenterol.* 40 1321-1327 (2005)
92. Tran C.D., Ball J.M., Sundar S., Coyle P., Howarth G.S.: The role of zinc and metallothionein in the dextran sulfate sodium-induced colitis mouse model. *Dig. Dis. Sci.* 52 2113-2121 (2007)
93. Iwakura Y., Ishigame H.: The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J. Clin. Invest.* 116 1218-1222 (2006)
94. Hirota K., Hashimoto M., Yoshitomi H., Tanaka S. et al.: T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17+ Th cells that cause autoimmune arthritis. *J. Exp. Med.* 204 41-47 (2007)
95. Hwang E.S.: Transcriptional regulation of T helper 17 cell differentiation. *Yonsei Med. J.* 51 484-491 (2010)
96. Wuest T.Y., Willette-Brown J., Durum S.K., Hurwitz A.A.: The influence of IL-2 family cytokines on activation and function of naturally occurring regulatory T cells. *J. Leukoc. Biol.* 84 973-980 (2008)
97. Milanino R., Frigo A., Bambara L.M., Marrella M. et al.: Copper and zinc status in rheumatoid arthritis: studies of plasma, erythrocytes, and urine, and their relationship to disease activity markers and pharmacological treatment. *Clin. Exp. Rheumatol.* 11 271-281 (1993)
98. Zoli A., Altomonte L., Caricchio R., Galossi A. et al.: Serum zinc and copper in active rheumatoid arthritis: correlation with interleukin 1 beta and tumour necrosis factor alpha. *Clin. Rheumatol.* 17 378-382 (1998)
99. Önal S., Nazıroğlu M., Çolak M., Bulut V., Flores-Arce M.F.: Effects of different medical treatments on serum copper, selenium and zinc levels in patients with rheumatoid arthritis. *BTER* 142 447-455 (2011)
100. Afridi H.I., Kazi T.G., Kazi N., Shah F.: Evaluation of status of zinc, copper, and iron levels in biological samples of normal and arthritis patients in age groups 46-60 and 61-75 years. *Clin. Lab.* 58 705-717 (2012)
101. Afridi H.I., Kazi T.G., Kazi N., Talpur F.N. et al.: Evaluation of status of arsenic, cadmium, lead and zinc levels in biological samples of normal and arthritis patients of age groups (46 - 60) and (61 - 75) years. *Clin. Lab.* 59 143-153 (2013)
102. Yazar M., Sarban S., Kocyigit A., Isikan U.E.: Synovial fluid and plasma selenium, copper, zinc, and iron concentrations in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *BTER* 106 123-132 (2005)
103. Jones P.E., Peters T.J.: Oral zinc supplements in non-responsive coeliac syndrome: effect on jejunal morphology, enterocyte production, and brush border disaccharidase activities. *Gut* 22 194-198 (1981)

104. Henker J., Gabsch H.C.: Serumzinkspiegel bei Kindern mit Zöliakie. *Helv Paediatr Acta* 40 47-53 (1985)
105. Singhal N., Alam S., Sherwani R., Musarrat J.: Serum zinc levels in celiac disease. *Indian Pediatr* 45 319-321 (2008)
106. Högberg L., Danielsson L., Jarleman S., Sundqvist T., Stenhammar L.: Serum zinc in small children with coeliac disease. *Acta Paediatr.* 98 343-345 (2009)
107. Taylor C.G.: Zinc, the pancreas, and diabetes: insights from rodent studies and future directions. *Biomaterials* 18 305-312 (2005)
108. Jansen J., Rosenkranz E., Overbeck S., Warmuth S. et al.: Disturbed zinc homeostasis in diabetic patients by in vitro and in vivo analysis of insulinomimetic activity of zinc. *J. Nutr. Biochem.* 23 1458-1466 (2012)
109. Yilmaz A., Sari R.A., Gundogdu M., Kose N., Dag E.: Trace elements and some extracellular antioxidant proteins levels in serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Rheumatol.* 24 331-335 (2005)
110. Sahebari M., Abrishami-Moghaddam M., Moezzi A., Ghayour-Mobarhan M. et al.: Association between serum trace element concentrations and the disease activity of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 23 793-801 (2014)
111. Pereira T.C., Saron M.L.G., Carvalho W.A. de, Vilela M.M. et al.: Research on zinc blood levels and nutritional status in adolescents with autoimmune hepatitis. *Arq Gastroenterol* 48 62-65 (2011)
112. Goode H.F., Kelleher J., Walker B.E.: Relation between zinc status and hepatic functional reserve in patients with liver disease. *Gut* 31 694-697 (1990)
113. Himoto T., Yoneyama H., Kurokuchi K., Inukai M. et al.: Contribution of zinc deficiency to insulin resistance in patients with primary biliary cirrhosis. *BTER* 144 133-142 (2011)
114. Sogawa K., Yamada T., Suzuki Y., Masaki T. et al.: Elevation of ceruloplasmin activity involved in changes of hepatic metal concentration in primary biliary cirrhosis. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 84 367-370 (1994)
115. Yazdanpanah M.J., Ghayour-Mobarhan M., Taji A., Javidi Z. et al.: Serum zinc and copper status in Iranian patients with pemphigus vulgaris. *Int. J. Dermatol.* 50 1343-1346 (2011)
116. Wong E.K., Enomoto H., Leopold I.H., Fleischer E.B. et al.: Plasma zinc levels in multiple sclerosis. *Metab Pediatr Ophthalmol* 4 3-8 (1980)
117. Williams C.M., Lines C.M., McKay E.C.: Iron and zinc status in multiple sclerosis patients with pressure sores. *Eur J Clin Nutr* 42 321-328 (1988)
118. Ghazavi A., Kianbakht S., Ghasami K., Mosayebi G.: High copper and low zinc serum levels in Iranian patients with multiple sclerosis: a case control study. *Clin. Lab.* 58 161-164 (2012)
119. Palm R., Hallmans G.: Zinc and copper in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 45 691-698 (1982)
120. Wiendl H., Kieseier B.C.: Multiple Sklerose. Klinik, Diagnostik und Therapie. Kohlhammer, Stuttgart 2010
121. Banwell B., Ghezzi A., Bar-Or A., Mikaeloff Y., Tardieu M.: Multiple sclerosis in children: clinical diagnosis, therapeutic strategies, and future directions. *Lancet Neurol* 6 887-902 (2007)
122. Inaloo S., Haghbin S.: Multiple sclerosis in children. *Iran J Child Neurol* 7 1-10 (2013)
123. Hein T., Hopfenmüller W.: Hochrechnung der Zahl an Multiple Sklerose erkrankten Patienten in Deutschland. *Nervenarzt* 71 288-294 (2000)

124. Höer A., Schiffhorst G., Zimmermann A., Fischaleck J. et al.: Multiple sclerosis in Germany: data analysis of administrative prevalence and healthcare delivery in the statutory health system. *BMC Health Serv Res* 14 381 (2014)
125. Cree B.A.C.: Multiple sclerosis genetics. *Handb Clin Neurol* 122 193-209 (2014)
126. Ebers G.C., Sadovnick A.D., Risch N.J.: A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature* 377 150-151 (1995)
127. Willer C.J., Dyment D.A., Risch N.J., Sadovnick A.D., Ebers G.C.: Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 12877-12882 (2003)
128. Lewis G.W.: Ethnic factors in multiple sclerosis: a review and critique of the epidemiological literature. *Int J Epidemiol* 17 14-20 (1988)
129. Lauer K.: Multiple sclerosis frequency in Israel's diverse populations. *Neurology* 68 311; author reply 311 (2007)
130. Langer-Gould A., Brara S.M., Beaber B.E., Zhang J.L.: Incidence of multiple sclerosis in multiple racial and ethnic groups. *Neurology* 80 1734-1739 (2013)
131. Oksenberg J.R., Baranzini S.E., Sawcer S., Hauser S.L.: The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nat. Rev. Genet.* 9 516-526 (2008)
132. Lincoln M.R., Montpetit A., Cader M.Z., Saarela J. et al.: A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis. *Nat. Genet.* 37 1108-1112 (2005)
133. Disanto G., Hall C., Lucas R., Ponsonby A.-L. et al.: Assessing interactions between HLA-DRB1*15 and infectious mononucleosis on the risk of multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 19 1355-1358 (2013)
134. Banwell B., Bar-Or A., Arnold D.L., Sadovnick D. et al.: Clinical, environmental, and genetic determinants of multiple sclerosis in children with acute demyelination: a prospective national cohort study. *Lancet Neurol* 10 436-445 (2011)
135. Ascherio A.: Environmental factors in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother* 13 3-9 (2013)
136. Deluca H.F., Cantorna M.T.: Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J.* 15 2579-2585 (2001)
137. Marques C.D.L., Dantas A.T., Fragoso T.S., Duarte A.L.B.P.: The importance of vitamin D levels in autoimmune diseases. *Rev Bras Reumatol* 50 67-80 (2010)
138. Broccolo F., Fusetti L., Ceccherini-Nelli L.: Possible role of human herpesvirus 6 as a trigger of autoimmune disease. *ScientificWorldJournal* 2013 867389 (2013)
139. Wuest S.C., Mexhitaj I., Chai N.R., Romm E. et al.: A complex role of herpes viruses in the disease process of multiple sclerosis. *PLoS ONE* 9 e105434 (2014)
140. Wagner H.J., Hennig H., Jabs W.J., Siekhaus A. et al.: Altered prevalence and reactivity of anti-Epstein-Barr virus antibodies in patients with multiple sclerosis. *Viral Immunol.* 13 497-502 (2000)
141. Levin L.I., Munger K.L., Rubertone M.V., Peck C.A. et al.: Temporal relationship between elevation of Epstein-Barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *JAMA* 293 2496-2500 (2005)
142. Almohmeed Y.H., Avenell A., Aucott L., Vickers M.A.: Systematic review and meta-analysis of the sero-epidemiological association between Epstein Barr virus and multiple sclerosis. *PLoS ONE* 8 e61110 (2013)
143. Hawkes C.H.: Smoking is a risk factor for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Mult. Scler.* 13 610-615 (2007)

144. Manouchehrinia A., Tench C.R., Maxted J., Bibani R.H. et al.: Tobacco smoking and disability progression in multiple sclerosis: United Kingdom cohort study. *Brain* 136 2298-2304 (2013)
145. Aminzadeh K.K., Etminan M.: Dental amalgam and multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Public Health Dent* 67 64-66 (2007)
146. Høglund R.A., Maghazachi A.A.: Multiple sclerosis and the role of immune cells. *World J Exp Med* 4 27-37 (2014)
147. Ortler S., Leder C., Mittelbronn M., Zozulya A.L. et al.: B7-H1 restricts neuroantigen-specific T cell responses and confines inflammatory CNS damage: implications for the lesion pathogenesis of multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* 38 1734-1744 (2008)
148. Fujinami R.S., Oldstone M.B.: Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 230 1043-1045 (1985)
149. Wucherpfennig K.W., Strominger J.L.: Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 80 695-705 (1995)
150. Wucherpfennig K.W.: Structural basis of molecular mimicry. *J. Autoimmun.* 16 293-302 (2001)
151. Goebels N., Hofstetter H., Schmidt S., Brunner C. et al.: Repertoire dynamics of autoreactive T cells in multiple sclerosis patients and healthy subjects: epitope spreading versus clonal persistence. *Brain* 123 Pt 3 508-518 (2000)
152. Costantino C.M., Baecher-Allan C.M., Hafler D.A.: Human regulatory T cells and autoimmunity. *Eur. J. Immunol.* 38 921-924 (2008)
153. Haas J., Fritzsching B., Trübswetter P., Korporal M. et al.: Prevalence of newly generated naive regulatory T cells (Treg) is critical for Treg suppressive function and determines Treg dysfunction in multiple sclerosis. *J. Immunol.* 179 1322-1330 (2007)
154. Frisullo G., Nociti V., Iorio R., Patanella A.K. et al.: Regulatory T cells fail to suppress CD4⁺-bet⁺ T cells in relapsing multiple sclerosis patients. *Immunology* 127 418-428 (2009)
155. Buc M.: Role of regulatory T cells in pathogenesis and biological therapy of multiple sclerosis. *Mediators Inflamm.* 2013 963748 (2013)
156. Sakaguchi S.: Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* 6 345-352 (2005)
157. Tzartos J.S., Friese M.A., Craner M.J., Palace J. et al.: Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am. J. Pathol.* 172 146-155 (2008)
158. Rostami A., Ciric B.: Role of Th17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination. *J. Neurol. Sci.* 333 76-87 (2013)
159. Duke R.C.: Self recognition by T cells. I. Bystander killing of target cells bearing syngeneic MHC antigens. *J. Exp. Med.* 170 59-71 (1989)
160. Fujinami R.S., Herrath M.G. von, Christen U., Whitton J.L.: Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 19 80-94 (2006)
161. Shimizu F., Kanda T.: [Disruption of blood-brain barrier in multiple sclerosis and neuromyelitis optica]. *Nippon Rinsho* 72 1949-1954 (2014)
162. Kent S.J., Karlik S.J., Cannon C., Hines D.K. et al.: A monoclonal antibody to alpha 4 integrin suppresses and reverses active experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 58 1-10 (1995)
163. Engelhardt B., Ransohoff R.M.: The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends in Immunology* 26 485-495 (2005)

164. Plumb J., McQuaid S., Mirakhur M., Kirk J.: Abnormal endothelial tight junctions in active lesions and normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 12 154-169 (2002)
165. Hu W., Metselaar J., Ben L.-H., Cravens P.D. et al.: PEG minocycline-liposomes ameliorate CNS autoimmune disease. *PLoS ONE* 4 e4151 (2009)
166. Babbe H., Roers A., Waisman A., Lassmann H. et al.: Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.* 192 393-404 (2000)
167. Amedei A., Prisco D., D'Elia M.M.: Multiple sclerosis: the role of cytokines in pathogenesis and in therapies. *Int J Mol Sci* 13 13438-13460 (2012)
168. Brosnan C.F., Cannella B., Battistini L., Raine C.S.: Cytokine localization in multiple sclerosis lesions: correlation with adhesion molecule expression and reactive nitrogen species. *Neurology* 45 S16-21 (1995)
169. Sinha S., Itani F.R., Karandikar N.J.: Immune regulation of multiple sclerosis by CD8+ T cells. *Immunol. Res.* 59 254-265 (2014)
170. Sarchielli P., Orlacchio A., Vicinanza F., Pelliccioli G.P. et al.: Cytokine secretion and nitric oxide production by mononuclear cells of patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 80 76-86 (1997)
171. Redford E.J., Kapoor R., Smith K.J.: Nitric oxide donors reversibly block axonal conduction: demyelinated axons are especially susceptible. *Brain* 120 (Pt 12) 2149-2157 (1997)
172. Ciccarelli O., Barkhof F., Bodini B., Stefano N. de et al.: Pathogenesis of multiple sclerosis: insights from molecular and metabolic imaging. *Lancet Neurol* 13 807-822 (2014)
173. Disanto G., Morahan J.M., Barnett M.H., Giovannoni G., Ramagopalan S.V.: The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology* 78 823-832 (2012)
174. Stern J.N.H., Yaari G., Vander Heiden J.A., Church G. et al.: B cells populating the multiple sclerosis brain mature in the draining cervical lymph nodes. *Sci Transl Med* 6 248ra107 (2014)
175. Oh S., Cudrici C., Ito T., Rus H.: B-cells and humoral immunity in multiple sclerosis. Implications for therapy. *Immunol. Res.* 40 224-234 (2008)
176. Noseworthy J.H.: Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature* 399 A40-7 (1999)
177. Hohlfeld R., Kerschensteiner M., Stadelmann C., Lassmann H., Wekerle H.: The neuroprotective effect of inflammation: implications for the therapy of multiple sclerosis. *Neurol. Sci.* 27 Suppl 1 S1-7 (2006)
178. Kerschensteiner M., Gallmeier E., Behrens L., Leal V.V. et al.: Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J. Exp. Med.* 189 865-870 (1999)
179. Stadelmann C., Kerschensteiner M., Misgeld T., Brück W. et al.: BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells? *Brain* 125 75-85 (2002)
180. Caggiula M., Batocchi A.P., Frisullo G., Angelucci F. et al.: Neurotrophic factors and clinical recovery in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Scand. J. Immunol.* 62 176-182 (2005)
181. Sarchielli P., Zaffaroni M., Floridi A., Greco L. et al.: Production of brain-derived neurotrophic factor by mononuclear cells of patients with multiple sclerosis treated with glatiramer acetate, interferon-beta 1a, and high doses of immunoglobulins. *Mult. Scler.* 13 313-331 (2007)
182. Sendtner M., Kreutzberg G.W., Thoenen H.: Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature* 345 440-441 (1990)

183. Dutta R., McDonough J., Chang A., Swamy L. et al.: Activation of the ciliary neurotrophic factor (CNTF) signalling pathway in cortical neurons of multiple sclerosis patients. *Brain* 130 2566-2576 (2007)
184. Milo R., Miller A.: Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 13 518-524 (2014)
185. Seze J. de, Debouverie M., Waucquier N., Steinmetz G. et al.: Primary progressive multiple sclerosis: a comparative study of the diagnostic criteria. *Mult. Scler.* 13 622-625 (2007)
186. Montalban X., Sastre-Garriga J., Filippi M., Khaleeli Z. et al.: Primary progressive multiple sclerosis diagnostic criteria: a reappraisal. *Mult. Scler.* 15 1459-1465 (2009)
187. Rao S.M., Leo G.J., Bernardin L., Unverzagt F.: Cognitive dysfunction in multiple sclerosis.: I. Frequency, patterns, and prediction. *Neurology* 41 685-691 (1991)
188. Yaldizli Ö., Penner I.-K., Frontzek K., Naegelin Y. et al.: The relationship between total and regional corpus callosum atrophy, cognitive impairment and fatigue in multiple sclerosis patients. *Mult. Scler.* 20 356-364 (2014)
189. Ghaffar O., Feinstein A.: The neuropsychiatry of multiple sclerosis: a review of recent developments. *Curr Opin Psychiatry* 20 278-285 (2007)
190. Brenner P., Alexanderson K., Björkenstam C., Hillert J. et al.: Psychiatric diagnoses, medication and risk for disability pension in multiple sclerosis patients; a population-based register study. *PLoS ONE* 9 e104165 (2014)
191. Sidhom Y., Ben Djebara M., Hizem Y., Abdelkefi I. et al.: Bipolar disorder and multiple sclerosis: a case series. *Behav Neurol* 2014 536503 (2014)
192. Confavreux C., Vukusic S., Adeleine P.: Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain* 126 770-782 (2003)
193. Miller D.H., Filippi M., Fazekas F., Frederiksen J.L. et al.: Role of magnetic resonance imaging within diagnostic criteria for multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 56 273-278 (2004)
194. Tomioka R., Matsui M.: [Multiple sclerosis: diagnosis, clinical course and differential diagnosis]. *Nippon Rinsho* 72 1957-1963 (2014)
195. Diener H.-C.: *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie.* Thieme, Stuttgart, New York, NY 2012
196. Constantinescu C.S., Farooqi N., O'Brien K., Gran B.: Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br. J. Pharmacol.* 164 1079-1106 (2011)
197. Robinson A.P., Harp C.T., Noronha A., Miller S.D.: The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handb Clin Neurol* 122 173-189 (2014)
198. McCarthy D.P., Richards M.H., Miller S.D.: Mouse models of multiple sclerosis: experimental autoimmune encephalomyelitis and Theiler's virus-induced demyelinating disease. *Methods Mol. Biol.* 900 381-401 (2012)
199. Rangachari M., Kuchroo V.K.: Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology. *J. Autoimmun.* 45 31-39 (2013)
200. Hofstetter H.H., Ibrahim S.M., Koczan D., Kruse N. et al.: Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell. Immunol.* 237 123-130 (2005)
201. Komiyama Y., Nakae S., Matsuki T., Nambu A. et al.: IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 177 566-573 (2006)
202. Bettelli E.: Building different mouse models for human MS. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1103 11-18 (2007)

- 203.Okuda Y., Sakoda S., Bernard C.C., Fujimura H. et al.: IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein. *International Immunology* 10 703-708 (1998)
- 204.Samoilova E.B., Horton J.L., Hilliard B., Liu T.S., Chen Y.: IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J. Immunol.* 161 6480-6486 (1998)
- 205.Langrish C.L., Chen Y., Blumenschein W.M., Mattson J. et al.: IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 201 233-240 (2005)
- 206.Korn T., Bettelli E., Gao W., Awasthi A. et al.: IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448 484-487 (2007)
- 207.Zhou L., Ivanov I.I., Spolski R., Min R. et al.: IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat. Immunol.* 8 967-974 (2007)
- 208.Lutton J.D., Winston R., Rodman T.C.: Multiple sclerosis: etiological mechanisms and future directions. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 229 12-20 (2004)
- 209.McFarland H.F., Martin R.: Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat. Immunol.* 8 913-919 (2007)
- 210.Marusic S., Miyashiro J.S., Douhan J., Konz R.F. et al.: Local delivery of granulocyte macrophage colony-stimulating factor by retrovirally transduced antigen-specific T cells leads to severe, chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Neurosci. Lett.* 332 185-189 (2002)
- 211.Sonderegger I., Iezzi G., Maier R., Schmitz N. et al.: GM-CSF mediates autoimmunity by enhancing IL-6-dependent Th17 cell development and survival. *J. Exp. Med.* 205 2281-2294 (2008)
- 212.Kebir H., Kreymborg K., Ifergan I., Dodelet-Devillers A. et al.: Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 13 1173-1175 (2007)
- 213.Kreymborg K., Etzensperger R., Dumoutier L., Haak S. et al.: IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 179 8098-8104 (2007)
- 214.Jäger A., Dardalhon V., Sobel R.A., Bettelli E., Kuchroo V.K.: Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J. Immunol.* 183 7169-7177 (2009)
- 215.Zhou Y., Sonobe Y., Akahori T., Jin S. et al.: IL-9 promotes Th17 cell migration into the central nervous system via CC chemokine ligand-20 produced by astrocytes. *J. Immunol.* 186 4415-4421 (2011)
- 216.Elyaman W., Bradshaw E.M., Uyttenhove C., Dardalhon V. et al.: IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 12885-12890 (2009)
- 217.Brennan M., Gaur A., Pahuja A., Lusic A.J., Reynolds W.F.: Mice lacking myeloperoxidase are more susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 112 97-105 (2001)
- 218.Seder R.A., Paul W.E.: Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 12 635-673 (1994)
- 219.Degliantoni G., Murphy M., Kobayashi M., Francis M.K. et al.: Natural killer (NK) cell-derived hematopoietic colony-inhibiting activity and NK cytotoxic factor. Relationship with tumor necrosis factor and synergism with immune interferon. *J. Exp. Med.* 162 1512-1530 (1985)

220. Schreiber R.D., Hicks L.J., Celada A., Buchmeier N.A., Gray P.W.: Monoclonal antibodies to murine gamma-interferon which differentially modulate macrophage activation and antiviral activity. *J. Immunol.* 134 1609-1618 (1985)
221. Sheehan K.C., Pinckard J.K., Arthur C.D., Dehner L.P. et al.: Monoclonal antibodies specific for murine p55 and p75 tumor necrosis factor receptors: identification of a novel in vivo role for p75. *J. Exp. Med.* 181 607-617 (1995)
222. Allende M.L., Dreier J.L., Mandala S., Proia R.L.: Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration. *J. Biol. Chem.* 279 15396-15401 (2004)
223. Tremblay M.L., Giguère V.: Phosphatases at the heart of FoxO metabolic control. *Cell Metab.* 7 101-103 (2008)
224. Finlay D., Cantrell D.: Phosphoinositide 3-kinase and the mammalian target of rapamycin pathways control T cell migration. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1183 149-157 (2010)
225. Kohm A.P., Carpentier P.A., Anger H.A., Miller S.D.: Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 169 4712-4716 (2002)
226. McGeachy M.J., Stephens L.A., Anderson S.M.: Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J. Immunol.* 175 3025-3032 (2005)
227. Nurieva R., Yang X.O., Martinez G., Zhang Y. et al.: Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448 480-483 (2007)
228. Refaeli Y., van Parijs L., Alexander S.I., Abbas A.K.: Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 196 999-1005 (2002)
229. Chu C.Q., Wittmer S., Dalton D.K.: Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 192 123-128 (2000)
230. Böyum A.: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 97 7 (1968)
231. *Der Experimentator: Immunologie.* Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2014
232. *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie.* Karger, Basel 2007
233. Tuohy V.K., Lu Z., Sobel R.A., Laursen R.A., Lees M.B.: Identification of an encephalitogenic determinant of myelin proteolipid protein for SJL mice. *J. Immunol.* 142 1523-1527 (1989)
234. McRae B.L., Kennedy M.K., Tan L.-J., Dal Canto M.C. et al.: Induction of active and adoptive relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) using an encephalitogenic epitope of proteolipid protein. *J. Neuroimmunol.* 38 229-240 (1992)
235. Hofstetter H.H., Shive C.L., Forsthuber T.G.: Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. *J. Immunol.* 169 117-125 (2002)
236. Fleming K.K., Bovaird J.A., Mosier M.C., Emerson M.R. et al.: Statistical analysis of data from studies on experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 170 71-84 (2005)
237. Held L., Rufibach K., Seifert B.: *Medizinische Statistik. Konzepte, Methoden, Anwendungen.* Pearson Studium, München 2013
238. Reinhold D., Ansorge S., Grüngreiff K.: Immunobiology of zinc and zinc therapy. *Immunology Today* 20 102-103 (1999)

239. Foster M., Samman S.: Zinc and regulation of inflammatory cytokines: implications for cardiometabolic disease. *Nutrients* 4 676-694 (2012)
240. Stoye D., Schubert C., Goihl A., Guttek K. et al.: Zinc aspartate suppresses T cell activation in vitro and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice. *Biometals* 25 529-539 (2012)
241. Aydemir T.B., Liuzzi J.P., McClellan S., Cousins R.J.: Zinc transporter ZIP8 (SLC39A8) and zinc influence IFN- expression in activated human T cells. *J. Leukoc. Biol.* 86 337-348 (2009)
242. Wellinghausen N., Kirchner H., Rink L.: The immunobiology of zinc. *Immunology Today* 18 519-521 (1997)
243. Rink L., Haase H.: Zinc homeostasis and immunity. *Trends in Immunology* 28 1-4 (2007)
244. Yu M., Lee W.-W., Tomar D., Pryshchep S. et al.: Regulation of T cell receptor signaling by activation-induced zinc influx. *Journal of Experimental Medicine* 208 775-785 (2011)
245. VARIN A., LARBI A., DEDOUSSIS G., KANONI S. et al.: In vitro and in vivo effects of zinc on cytokine signalling in human T cells. *Experimental Gerontology* 43 472-482 (2008)
246. Evans G.W.: Zinc and its deficiency diseases. *Clin Physiol Biochem* 4 94-98 (1986)
247. Ranaldi G., Ferruzza S., Canali R., Leoni G. et al.: Intracellular zinc is required for intestinal cell survival signals triggered by the inflammatory cytokine TNF α . *J. Nutr. Biochem.* 24 967-976 (2013)
248. Devirgiliis C., Zalewski P.D., Perozzi G., Murgia C.: Zinc fluxes and zinc transporter genes in chronic diseases. *Mutat. Res.* 622 84-93 (2007)
249. Goggs R., Vaughan-Thomas A., Clegg P.D., Carter S.D. et al.: Nutraceutical therapies for degenerative joint diseases: a critical review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45 145-164 (2005)
250. Allen-Redpath K., Ou O., Beattie J.H., Kwun I.-S. et al.: Marginal dietary zinc deficiency in vivo induces vascular smooth muscle cell apoptosis in large arteries. *Cardiovasc. Res.* 99 525-534 (2013)
251. Kim J.E., Yoo S.R., Jeong M.G., Ko J.Y., Ro Y.S.: Hair zinc levels and the efficacy of oral zinc supplementation in patients with atopic dermatitis. *Acta Derm. Venereol.* 94 558-562 (2014)
252. Loeff M., Stillfried N. von, Walach H.: Zinc diet and Alzheimer's disease: a systematic review. *Nutr Neurosci* 15 2-12 (2012)
253. El-Behi M., Ciric B., Dai H., Yan Y. et al.: The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat. Immunol.* 12 568-575 (2011)
254. Hauser S.L., Chan J.R., Oksenberg J.R.: Multiple sclerosis: Prospects and promise. *Ann. Neurol.* 74 317-327 (2013)
255. Faber C., Gabriel P., Ibs K.-H., RINK L.: Zinc in pharmacological doses suppresses allogeneic reaction without affecting the antigenic response. *Bone Marrow Transplant.* 33 1241-1246 (2004)
256. Chandra R.K.: Excessive intake of zinc impairs immune responses. *JAMA* 252 1443-1446 (1984)
257. Porter K.G., McMaster D., Elmes M.E., Love A.H.: Anaemia and low serum-copper during zinc therapy. *Lancet* 2 774 (1977)
258. Patterson W.P., Winkelmann M., Perry M.C.: Zinc-induced copper deficiency: megamineral sideroblastic anemia. *Ann. Intern. Med.* 103 385-386 (1985)
259. Chang K.-L., Hung T.-C., Hsieh B.-S., Chen Y.-H. et al.: Zinc at pharmacologic concentrations affects cytokine expression and induces apoptosis of human peripheral blood mononuclear cells. *Nutrition* 22 465-474 (2006)
260. Rink L., Campo C.A., Wellinghausen N., Faber C., Fischer A.: Zinc Inhibits the Mixed Lymphocyte Culture. *BTER* 79 15-22 (2001)

261. Wellinghausen N., Martin M., Rink L.: Zinc inhibits interleukin-1-dependent T cell stimulation. *Eur. J. Immunol.* 27 2529-2535 (1997)
262. Bozym R.A., Chimienti F., Giblin L.J., Gross G.W. et al.: Free zinc ions outside a narrow concentration range are toxic to a variety of cells in vitro. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 235 741-750 (2010)
263. Plum L.M., Brieger A., Engelhardt G., Hebel S. et al.: PTEN-inhibition by zinc ions augments interleukin-2-mediated Akt phosphorylation. *Metallomics* 6 1277 (2014)
264. Hönscheid A., Dubben S., Rink L., Haase H.: Zinc differentially regulates mitogen-activated protein kinases in human T cells. *J. Nutr. Biochem.* 23 18-26 (2012)
265. Haase H., Hebel S., Engelhardt G., Rink L.: Flow cytometric measurement of labile zinc in peripheral blood mononuclear cells. *Anal. Biochem.* 352 222-230 (2006)
266. Masuoka J., Saltman P.: Zinc(II) and copper(II) binding to serum albumin. A comparative study of dog, bovine, and human albumin. *J. Biol. Chem.* 269 25557-25561 (1994)
267. [Der Titel "#100" kann nicht dargestellt werden – Die Vorlage "Literaturverzeichnis - Internetdokument - (Standardvorlage)" beinhaltet nur Felder, welche bei diesem Titel leer sind.]
268. Codarri L., Gyölvézi G., Tosevski V., Hesske L. et al.: ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat. Immunol.* 12 560-567 (2011)
269. Bao B., Prasad A.S., Beck F.W.J., Snell D. et al.: Zinc supplementation decreases oxidative stress, incidence of infection, and generation of inflammatory cytokines in sickle cell disease patients. *Transl Res* 152 67-80 (2008)
270. Rodgers J.M., Miller S.D.: Cytokine control of inflammation and repair in the pathology of multiple sclerosis. *Yale J Biol Med* 85 447-468 (2012)
271. Metz C.H.D., Schröder A.K., Overbeck S., Kahmann L. et al.: T-helper type 1 cytokine release is enhanced by in vitro zinc supplementation due to increased natural killer cells. *Nutrition* 23 157-163 (2007)
272. Poleganov M.A., Pfeilschifter J., Mühl H.: Expanding extracellular zinc beyond levels reflecting the albumin-bound plasma zinc pool potentiates the capability of IL-1 β , IL-18, and IL-12 to Act as IFN- γ -inducing factors on PBMC. *J. Interferon Cytokine Res.* 27 997-1001 (2007)
273. Kahmann L., Uciechowski P., Warmuth S., Plümäkers B. et al.: Zinc supplementation in the elderly reduces spontaneous inflammatory cytokine release and restores T cell functions. *Rejuvenation Res* 11 227-237 (2008)
274. Sandstead H.H., Prasad A.S., Penland J.G., Beck F.W.J. et al.: Zinc deficiency in Mexican American children: influence of zinc and other micronutrients on T cells, cytokines, and antiinflammatory plasma proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* 88 1067-1073 (2008)
275. Lang C., Murgia C., Leong M., Tan L.-W. et al.: Anti-inflammatory effects of zinc and alterations in zinc transporter mRNA in mouse models of allergic inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 292 L577-84 (2007)
276. Prasad A.S., Bao B., Beck F.W.J., Kucuk O., Sarkar F.H.: Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radic. Biol. Med.* 37 1182-1190 (2004)
277. Verstrepen L., Bekaert T., Chau T.-L., Tavernier J. et al.: TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF- κ B: variations on a common theme. *Cell. Mol. Life Sci.* 65 2964-2978 (2008)
278. Liu M.-J., Bao S., Gálvez-Peralta M., Pyle C.J. et al.: ZIP8 regulates host defense through zinc-mediated inhibition of NF- κ B. *Cell Rep* 3 386-400 (2013)
279. Bao B., Prasad A., Beck F.W.J., Suneja A., Sarkar F.: Toxic effect of zinc on NF- κ B, IL-2, IL-2 receptor alpha, and TNF- α in HUT-78 (Th(0)) cells. *Toxicol. Lett.* 166 222-228 (2006)

280. Weaver C.T., Harrington L.E., Mangan P.R., Gavrieli M., Murphy K.M.: Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties. *Immunity* 24 677-688 (2006)
281. Steinman L.: A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 13 139-145 (2007)
282. Weaver C.T., Hatton R.D., Mangan P.R., Harrington L.E.: IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages. *Annu. Rev. Immunol.* 25 821-852 (2007)
283. Cakman I., Rohwer J., Schütz R.M., Kirchner H., RINK L.: Dysregulation between TH1 and TH2 T cell subpopulations in the elderly. *Mech. Ageing Dev.* 87 197-209 (1996)
284. Dardenne M.: Zinc and immune function. *Eur J Clin Nutr* 56 Suppl 3 S20-3 (2002)
285. Schiffer R.B., Herndon R.M., Eskin T.: Effects of altered dietary trace metals upon experimental allergic encephalomyelitis. *Neurotoxicology* 11 443-450 (1990)
286. Penkowa M., Hidalgo J.: Metallothionein I+II expression and their role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* 32 247-263 (2000)
287. Lucchinetti C., Brück W., Parisi J., Scheithauer B. et al.: Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol.* 47 707-717 (2000)
288. Mutschler Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie ; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie. WVG, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 2008
289. SWANK R.L., LERSTAD O., STRØM A., BACKER J.: Multiple sclerosis in rural Norway its geographic and occupational incidence in relation to nutrition. *N. Engl. J. Med.* 246 722-728 (1952)
290. MILLER J.K., MILLER W.J.: Experimental zinc deficiency and recovery of calves. *J. Nutr.* 76 467-474 (1962)
291. Prohaska J.R., Luecke R.W., Jasinski R.: Effect of zinc deficiency from day 18 of gestation and/or during lactation on the development of some rat brain enzymes. *J. Nutr.* 104 1525-1531 (1974)
292. Prohaska J.R., Wells W.W.: Copper deficiency in the developing rat brain: a possible model for Menkes' steely-hair disease. *J. Neurochem.* 23 91-98 (1974)
293. Johnson S.: The possible role of gradual accumulation of copper, cadmium, lead and iron and gradual depletion of zinc, magnesium, selenium, vitamins B2, B6, D, and E and essential fatty acids in multiple sclerosis. *Med. Hypotheses* 55 239-241 (2000)
294. Dore-Duffy P., Catalanotto F., Donaldson J.O., Ostrom K.M., Testa M.A.: Zinc in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 14 450-454 (1983)
295. Schubert C., Guttek K., Grüngreiff K., Thielitz A. et al.: Oral zinc aspartate treats experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biometals* 27 1249-1262 (2014)
296. Prasad A.S., Brewer G.J., Schoemaker E.B., Rabbani P.: Hypocupremia induced by zinc therapy in adults. *JAMA* 240 2166-2168 (1978)
297. Fosmire G.J.: Zinc toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 51 225-227 (1990)
298. Lowe N.M., Fekete K., Decsi T.: Methods of assessment of zinc status in humans: a systematic review. *Am. J. Clin. Nutr.* 89 2040S-2051S (2009)
299. Thomas L.: Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt am Main 2012

8. Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit wird nie das Werk einer einzelnen Person sein, deshalb ist es jetzt an der Zeit, all jene zu würdigen, die durch ihre Unterstützung die Entstehung meiner Dissertation ermöglicht haben.

Zu besonderem Dank bin ich meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. D. Reinhold verpflichtet. Neben der Überlassung des interessanten und spannenden Themas danke ich ihm herzlichst für sein einzigartiges Engagement, für seine stets fortwährende und überaus freundliche Unterstützung sowie seinen unerschöpflichen Fundus an thematischen und wissenschaftlichen Hinweisen. Diese außergewöhnliche Art der Zusammenarbeit wird mir zeitlebens in Erinnerung bleiben.

Ich möchte mich außerdem bei Herrn Prof. Dr. B. Schraven für die Möglichkeit, an seinem Institut zu promovieren, bedanken. Ein großes Dankeschön geht auch an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Instituts für Molekulare und Klinische Immunologie. Die freundliche und zuvorkommende Arbeitsatmosphäre waren stets bemerkenswert. Für die technische Assistenz bei der Erstellung histopathologischer Präparate möchte ich Frau M. Lotzing unter der Leitung von Frau PD A. Thielitz herzlichst danken.

Drei weiteren Menschen bin zu tiefst dankbar. Eine davon ist meine Freundin und zu unserer Arbeitsgruppe gehörende MTA Frau Karina Guttek. Ohne ihre grundlegende methodische Einführung und Unterstützung wäre diese Arbeit nicht denkbar gewesen. Vielen Dank für gemeinsames Lachen und Freuen in Hoch-, aber auch fürs Ermutigen in Tiefphasen. Danke für unzählige fruchtbare Diskussionen um „Zink und Co“ sowie für die immense Hilfestellung in allen Labor- und Lebenslagen. Eine weitere Person ist meine Mutter Frau Susanne Schubert, welche mich in jeder Hinsicht unterstützte und mir fürsorglich den Rücken frei hielt. Ihr „moralischer Beistand“ zu dieser Arbeit war unglaublich. Nicht minder aufreibend war die vergangene Zeit für meinen Lebensgefährten Herrn Christopher Thost. Danke für das geduldige Ertragen aller Sorgen und Wünsche, ebenso für die unbeschreibliche Hilfestellung beim Formatieren und Erstellen von Abbildungen.

Mein abschließender Dank gilt meiner restlichen Familie, meinen Kommilitonen und Freunden für die wohlzunende Unterstützung und die zahlreichen Ermutigungen.

9. Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Untersuchungen zur Wirkung von Zink-Hydrogenaspartat auf die T-Zell-Aktivierung *in vitro* und zum therapeutischen Potenzial einer oralen Applikation dieses Arzneimittels in der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis als Tiermodell der Multiplen Sklerose

im Institut für Molekulare und Klinische Immunologie

mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. med. D. Reinhold

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, 25.02.2015

Claudia Schubert

10. Curriculum vitae

Persönliches

Claudia Schubert

Holzhäuser Straße 12a

D-09337 Callenberg

Tel.: +49.176.30622336

E-Mail: claudia.schubert@st.ovgu.de

geboren am 26.08.1989 in Zwickau

ledig, keine Kinder

Schulbildung

1996-1999	Besuch der August-Bebel-Grundschule, Steinpleis
1999-2000	Besuch der Geschwister-Scholl-Grundschule, Königswalde
2000-2003	Besuch des Alexander-von-Humboldt Gymnasiums, Werdau
2003-2008	Besuch des Julius-Motteler Gymnasiums, Crimmitschau Abschluss: Abitur

Studium

10/2008	Beginn des Studiums der Humanmedizin Medizinische Fakultät Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
09/2010	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

- 09/2011 Aufnahme des Promotionsthemas: „Untersuchungen zur Wirkung von Zink-Hydrogenaspartat auf die T-Zell-Aktivierung *in vitro* und zum therapeutischen Potenzial einer oralen Applikation dieses Arzneimittels in der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis als Tiermodell der Multiplen Sklerose.“
bei Prof. Dr. med. D. Reinhold, Institut für Molekulare und Klinische Immunologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
- 08/2013 - 1. Tertial des Praktischen Jahres, Innere Medizin,
10/2013 GZO AG Spital Wetzikon, Züricher Oberland, Schweiz
- 10/2013 - 1. Tertial des Praktischen Jahres, Innere Medizin,
12/2013 Universitätsklinikum Magdeburg, Kardiologie
- 12/2013 - 2. Tertial des Praktischen Jahres, Chirurgie,
03/2014 Harzklinikum Dorothea von Erxleben, Wernigerode
- 03/2014 - 3. Tertial des Praktischen Jahres, Wahlfach Dermatologie
07/2014 und Venerologie, Universitätsklinikum Magdeburg
- 11/2014 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 12/2014 Approbation zur Ärztin

Klinische Ausbildung

- seit 03/2015 Assistenzärztin für Innere Medizin
Rudolf Virchow Klinikum Glauchau
unter Leitung von Herrn Dr. med. U. Beyreuther

Magdeburg, den 25.02.2105

11. Liste der Veröffentlichungen

- (1) Diana Stoye, **Claudia Schubert**, Alexander Goihl, Karina Guttek, Annegret Reinhold, Stefan Brocke, Kurt Grüngreiff, Dirk Reinhold:
Zinc aspartate suppresses T cell activation *in vitro* and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice. *Biometals* 25:529–539. (2012)

- (2) **Claudia Schubert**, Karina Guttek, Kurt Grüngreiff, Anja Thielitz, Frank Bühling, Annegret Reinhold, Stefan Brocke, Dirk Reinhold:
Oral zinc aspartate treats experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biometals* 27:1246-1262. (2014)

- (3) **Claudia Schubert**, Karina Guttek, Annegret Reinhold, Kurt Grüngreiff, Dirk Reinhold:
Der Einfluss des Spurenelements Zink auf das Immunsystem.
LaboratoriumsMedizin-Journal of Laboratory Medicine 22: in press. (2015)

12. Anhang

12.1 Übersicht der Zytokine und Chemokine des Zytokin-Arrays

Tabelle 6: Übersicht über die Zytokine und Chemokine des Zytokin-Arrays.

Zytokin	Produzierende Zellen	Funktion
IL-2	T-Zellen	T-Zellproliferation
IL-4	T-Zellen, Mastzellen, Eosinophile	B-Zellaktivierung, IgE-Isotypwechsel, induziert Differenzierung zu Th2-Zellen
IL-5	T-Zellen, Mastzellen	Wachstum, Differenzierung u. Überleben v. Eosinophilen
IL-6	T-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen	Wachstum u. Differenzierung v. T- u. B-Zellen, Fieber, Akute-Phase-Protein
IL-10	T-Zellen, Makrophagen	Immunsupprimierend, induziert u. a. Treg
IL-13	T-Zellen	B-Zellwachstum u. –Differenzierung, inhibiert Th1-Zellen
IL-16	T-Zellen, Mastzellen, Eosinophile	chemotaktisch auf CD4 ⁺ T-Zellen, Monozyten u. Eosinophile, anti-apoptotisch auf IL-2-stimulierte T-Zellen
IL-17	Th17-Zellen	induziert Rekrutierung v. Neutrophilen
IL-25 (IL-17E)	Th17-Zellen	induziert Th2-Zytokine u. Eosinophile
CD 40 L	T-Zellen, Mastzellen	B-Zellaktivierung, Isotypwechsel
GM-CSF (Granulocyte macrophage colony – stimulating factor)	Makrophagen, T-Zellen	stimuliert Entwicklung u. Differenzierung v. myelomonozytischen Zellen u. DC
IFN-γ (Interferon γ)	T-Zellen, NK-Zellen	aktiviert Makrophagen, supprimiert Th2-Zellen
IL-1α	Makrophagen, Epithelzellen	Aktivierung v. T-Zellen u. Makrophagen, Fieber
IL-1β	s. IL-1 α	s. IL-1 α
IL-1 ra	s. IL-1 α	s. IL-1 α
IL-12 p70	Makrophagen, dendritische Zellen	aktiviert NK-Zellen, induziert CD4 ⁺ T-Differenzierung zu Th1-Zellen
IL-23	Dendritische Zellen	induziert Memory-T-Zellen, verstärkt IFN- γ -Produktion
IL-32	NK-, T-Zellen, Epithelzellen	proinflammatorisch durch Induktion v. IL-1 β u. IL-6, induziert Entwicklung v. Monozyten zu Makrophagen
G-CSF (Granulocyte-colony Stimulating Factor)	Fibroblasten, Monozyten	stimuliert Entwicklung u. Differenzierung v. Neutrophilen
MIF (Macrophage migrations inhibitory factor)	Makrophagen Monozyten	hemmt Makrophagenbewegung, steigert deren Adhäsion, Phagozytose; proinflammatorisch
S TREM-1 (Soluble Triggering receptor expressed on myeloid cells)	Myeloide Zellen Monozyten Makrophagen	proinflammatorisch über Stimulation von TNF- α , TLR-2 und -4; Hypoxie-Marker
TNF-α (Tumor necrosis factor α)	Makrophagen, NK-Zellen, T-Zellen	Inflammtion, Endothelaktivierung
Komplementfaktor 5α	Hepatozyten	Anaphylatoxin, Chemokin, aktiviert Makrophagen und Neutrophile
Serpin E1	Endothelzellen	inhibiert tPA (tissue Plasminogen activator)
sICAM-1 (Soluble intercellular adhesion molecule 1)	T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Endothelzellen	Adhäsionsmolekül, bindet an CD11a/CD18 und CD11b/CD18

Chemokin	Alternativer Name	Zielzellen
CCL 1	I-309	Neutrophile, T-Zellen
CCL 2	MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1)	T-Zellen, Monozyten, Basophile
CCL 3	MIP-1 α (Macrophage inflammatory protein-1 α)	Monozyten, Makrophagen, T-Zellen (Th1>Th2), DC, NK-Zellen, Knochenmarkszellen
CCL 4	MIP-1 α	Monozyten, Makrophagen, T-Zellen (Th1>Th2), NK-Zellen, Basophile, DC, Knochenmarkszellen
CCL 5	RANTES (Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted)	Monozyten, Makrophagen, T- (Memory T-Zellen>Th1>Th2), NK-Zellen, DC, Eosinophile
CXCL 1	GRO α	Neutrophile
CXCL 8	IL-8	Neutrophile, Basophile, T-Zellen
CXCL 10	IP-10 (interferon gamma-induced protein-10)	aktivierte T-Zellen (Th1>Th2)
CXCL 11	I-TAC (interferon inducible T-cell alpha chemoattractant)	aktivierte T-Zellen (Th1>Th2)
CXCL 12	SDF-1 (stromal cell-derived factor 1), MGSA (Melanoma growth stimulating activity alpha)	CD34 ⁺ Knochenmarkszellen, Lymphozyten-Vorläufer, T-Zellen, B-Zellen, Plasmazellen, DC

Im oberen Abschnitt der Tabelle sind die jeweiligen Zytokine des Zytokin-Arrays, deren wichtigste produzierende Zellen und Hauptfunktionen dargestellt (Th = T-Helferzellen, DC = Dendritic Cell (Dendritische Zellen)). Der untere Abschnitt zeigt diverse Chemokine des Arrays mit entsprechendem Wirkungsort (Zielzellen).