

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Aus der Abteilung für Neuroradiologie,
Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. C. Zimmer)

Visualisierung des Enzyms Myeloperoxidase
in den Mausmodellen der Multiplen Sklerose
und Cerebralen Ischämie mithilfe der Magnet Resonanz
Tomographie und dem experimentellen Kontrastmittel
bis-5HT-Gd-DTPA

Michael O.R. Breckwoldt

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E.J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. C. Zimmer
2. Priv-Doz.Dr. S. Waldt
3. Univ.-Prof. Dr. Dr. Th. R. Töle

Die Dissertation wurde am 30.09.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 23.11.2011 angenommen.

Diese Arbeit wurde in folgenden Publikationen veröffentlicht:

JW Chen, MO Breckwoldt, E Aikawa, G Chiang, R Weissleder, Myeloperoxidase-targeted imaging of active inflammatory lesions in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain*. 2008 Apr;131(Pt 4):1123-33.

MO Breckwoldt^{*}, JW Chen^{*}, L Stangenberg, E Aikawa, E Rodriguez, S Qiu, M Moskowitz, R Weissleder, Tracking the inflammatory response in stroke *in vivo* by sensing the enzyme Myeloperoxidase, *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Nov 25;105(47):18584-9. ^{*}equally contributed

Diese Arbeit wurde auf folgenden Konferenzen vorgestellt:

Joint Molecular Imaging Conference 2007, Providence, Rhode Island, USA (Poster)

JW Chen, MO Breckwoldt, E Aikawa, G Chiang, R Weissleder, Myeloperoxidase-targeted imaging of active inflammatory lesions in multiple sclerosis

Joint Molecular Imaging Conference 2007, Providence, Rhode Island, USA (Poster)

MO Breckwoldt, JW Chen, L Stangenberg, E Aikawa, JL Figueiredo, S Qiu, M Moskowitz, R Weissleder, Myeloperoxidase Imaging in a Mouse Model of Stroke

93rd Meeting of the Radiological Society of North America 2007, Chicago, USA (Poster)

JW Chen, MO Breckwoldt, E Aikawa, G Chiang, R Weissleder, Myeloperoxidase-targeted imaging of active inflammatory lesions in murine experimental autoimmune encephalomyelitis.

World Molecular Imaging Congress 2008, Nizza, Frankreich (Vortrag)

MO Breckwoldt, JW Chen, L Stangenberg, E Aikawa, E Rodriguez, S Qiu, M Moskowitz, R Weissleder, Tracking the Inflammatory Response in Stroke *in vivo* by Sensing the Enzyme Myeloperoxidase

94th Meeting of the Radiological Society of North America 2008, Chicago, USA (Vortrag)

MO Breckwoldt, JW Chen, L Stangenberg, E Aikawa, E Rodriguez, S Qiu, M Moskowitz, R Weissleder, Imaging inflammation in stroke *in vivo* over time by sensing the enzyme myeloperoxidase

43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neuroradiologie 2008, Saarbrücken (Vortrag)

MO Breckwoldt, JW Chen, L Stangenberg, E Aikawa, E Rodriguez, S Qiu, M Moskowitz, R Weissleder, C Zimmer, Visualisierung der Entzündungsreaktion nach cerebraler Ischämie mithilfe des Myeloperoxidase sensitiven MR-Markern MPO-Gd

43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neuroradiologie 2008, Saarbrücken – Kurt Decker Preis Rede (Vortrag)

MO Breckwoldt, JW Chen, L Stangenberg, E Aikawa, E Rodriguez, S Qiu, M Moskowitz, R Weissleder, C Zimmer, Magnet Resonanz Tomographie von Myeloperoxidase im Mausmodell der cerebralen Ischämie und Multiplen Sklerose

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
I. ABKÜRZUNGEN, SYMBOLE UND ÜBERSETZUNGEN	5
II. EINLEITUNG	6
1. MULTIPLE SKLEROSE	6
2. CEREBRALE ISCHÄMIE	9
3. REAKTIVE SAUERSTOFF SPEZIES	11
4. DAS ENZYM MYELOPEROXIDASE	12
5. MAGNET RESONANZ TOMOGRAPHIE BEI MULTIPLER SKLEROSE	13
6. MAGNET RESONANZ TOMOGRAPHIE BEI CEREBRALER ISCHÄMIE	14
7. KONTRASTMITTEL FÜR DIE MAGNET RESONANZ TOMOGRAPHIE	15
8. DAS EXPERIMENTELLE KONTRASTMITTEL BIS-5HT-Gd-DTPA	17
III. ZIELE DER ARBEIT	18
IV. MATERIAL UND METHODEN	19
1. TIERMODELL DER EXPERIMENTELLEN AUTOIMMUNEN ENCEPHALOMYELITIS	19
2. TIERMODELL DER CEREBRALEN ISCHÄMIE	19
3. KONTRASTMITTEL UND SYNTHESE VON BIS-5HT-DTPA-Gd	20
4. MAGNET RESONANZ TOMOGRAPHIE	20
5. HISTOLOGIE UND IMMUNHISTOCHEMIE	21
6. QUANTIFIZIERUNG DER DEMYELINISIERUNG	22
7. DOPPELIMMUNFLUORESCENZ-FÄRBUNGEN	22
8. QUANTIFIZIERUNG DER IMMUNHISTOCHEMIE	22
9. WESTERN BLOT ANALYSEN	23
10. MPO AKTIVITÄTS-ASSAYS	23
11. REAL TIME POLYMERASE KETTENREAKTION	24
12. MESSUNG DER MPO EXPRESSION IN VITRO	24
13. STATISTISCHE ANALYSEN	25
V. ERGEBNISTEIL 1: EXPERIMENTELLE AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS V-26	
1. DIE HÖHE DER MPO EXPRESSION KORRELIERT MIT DEM ERKRANKUNGSSTADIUM V-26	
2. DIE MRT MIT BIS-5HT-DTPA-Gd STIMMT GUT MIT IMMUNHISTOCHEMISCHEN BEFUNDEN ÜBEREIN	V-27
3. MPO WIRD STARK VON MAKROPHAGEN/MIKROGLIA EXPRIERT	V-29
4. BIS-5HT-DTPA-Gd ZEIGT MEHR UND KLEINERE LÄSIONEN ALS Gd-DTPA	30
5. DAS SIGNAL DURCH BIS-5HT-DTPA-Gd KORRELIERT MIT DEM GRAD DER DEMYELINISIERUNG	32

VI. ERGEBNISTEIL 2: CEREBRALE ISCHÄMIE	VI-35
1. DIE MRT MIT BIS-5HT-DTPA-GD ZEIGT EIN HÖHERES SIGNAL ALS GD-DTPA	VI-35
2. DIE SPEZIFITÄT VON BIS-5HT-DTPA-GD LÄSST SICH MIT MPO KNOCK-OUT MÄUSEN BESTÄTIGEN	VI-37
3. DIE BILDGEBUNG MIT BIS-5HT-DTPA-GD ERLAUBT DIE SEQUENTIELLE DARSTELLUNG DER INFARKTDYNAMIK UND DIE QUANTIFIZIERUNG DER ENTZÜNDUNGSREAKTION	VI-38
4. ERSTELLUNG EINES ZEITLICHEN ENTZÜNDUNGSPROFILS MITHILFE DER MRT	VI-39
5. DIE MPO EXPRESSION ZEIGT IHRE HÖCHSTEN WERTE AN TAG DREI	VI-40
6. MPO WIRD SOWOHL VON MAKROPHAGEN/MIKROGLIA ALS AUCH VON NEUTROPHILEN EXPRIMIERT	42
7. QUANTIFIZIERUNG DER MPO AKTIVITÄT IN VITRO	42
VII. DISKUSSION	
1. DIE PROBLEMSTELLUNG	45
2. EXPERIMENTELLE AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS	46
3. CEREBRALE ISCHÄMIE	47
4. WEITERFÜHRENDE ÜBERLEGUNGEN ZU BIS-5HT-DTPA-GD	48
5. ROLLE DER ENTZÜNDUNG BEI DER EAE UND CEREBRALEN ISCHÄMIE	49
6. FORTSCHRITTE IN WEITEREN BEREICHEN DER „MOLEKULAREN BILDGEBUNG“	50
7. KLINISCHE ÜBERTRAGBARKEIT DER ERGEBNISSE UND TOXIZITÄT	50
8. AUSBLICK	51
VIII. ZUSAMMENFASSUNG	53
IX. DANKSAGUNG	55
X. CURRICULUM VITAE	57
XI. LITERATURVERZEICHNIS	59

I. Abkürzungen, Symbole und Übersetzungen

ADC – Apparent Diffusion Coefficient
BHS – Blut-Hirn Schranke
BDNF – brain derived neurotrophic factor
CIS – clinically isolated syndrome (klinisch isoliertes Syndrom)
CNR – Contrast-to-noise Ratio (Kontrast-zu-Rausch Verhältnis/Wert)
DAPI – 4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
DWI – Diffusion weighted imaging (Diffusions gewichtete Bildgebung)
EAE – Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis
FITC – Fluoreszeinisothiocyanat
GAPDH – Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSH – reduziertes Glutathion
GSSG – oxidiertes Glutathion
HLA – Humanes Leukozyten Antigen
ICAM – Inter-cellular adhesion molecule
KM – Kontrastmittel
LFB – Luxol Fast Blue
MCAo – Middle cerebral artery occlusion (Arteria cerebri media Okklusionsmodell)
MAK – Makrophage
MBP – Myelin basisches Protein
MHC – Main histocompatibility complex
MOG – Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MPO – Myeloperoxidase
MPO-Gd – bis-5-Hydroxytryptamid-Diethylen-triamin-Pentaacetat Gadolinium
MR – Magnet Resonanz
MRT – Magnet Resonanz Tomographie
MS – Multiple Sklerose
NADPH – Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
nCNR – normalised contrast-to-noise ratio (normalisiertes Kontrast-zu-Rausch Verhältnis)
NEU – Neutrophiler Granulozyt
PCR – Polymerase Kettenreaktion
PLP – Proteolipid Protein
PMA – Phorbol 12-Myristat-13-Acetat
PNS – Peripheres Nervensystem
PWI – Perfusion weighted imaging (Perfusions gewichtete Bildgebung)
 R_1 – longitudinale Relaxationszeit
 R^2 – Korrelationskoeffizient
ROS – Reaktive Sauerstoff Spezies
SNR – Signal-zu-Rausch Verhältnis
USPIO – ultra small paramagnetic iron oxide (ultra kleines paramagnetisches Eisenoxid)
T1W – T1 gewichtet
T2W – T2 gewichtet
TMB – Tetramethylbenzidin
ZNS – Zentrales Nervensystem
5-HT-Gd-DTPA – bis-5-Hydroxytryptamid-Diethylen-triamin-Pentaacetat Gadolinium (im weiteren auch als „MPO-Gd“ bezeichnet)

II. Einleitung

1. *Multiple Sklerose*

Die Multiple Sklerose ist mit einer Erkrankungshäufigkeit von 1:800 in Europa die häufigste, zur Behinderung führende neurologische Erkrankung bei jungen Erwachsenen (Frohman et al., 2006; Kieseier and Wiendl, 2006; Noseworthy et al., 2000). Hierbei führt eine Autoimmunreaktion gegen körpereigene Antigene auf Oligodendrozyten zu einer sukzessiven Zerstörung der Myelinscheide, was mit einem schon früh im Krankheitsverlauf zu beobachtenden Verlust von Neuronen und Axonen einhergeht (Hemmer et al., 2002; Schirmer et al., 2009). Der Auslöser der Erkrankung ist bis heute unklar. Assoziationen bestehen sowohl mit verschiedenen genetischen Polymorphismen im MHCII / HLA Komplex (Oksenberg et al., 2008), verschiedenen Virusinfektionen (Sibley et al., 1985) wie auch Umweltfaktoren (Ebers, 2008). Klinisch können unterschiedliche Verläufe beschrieben werden, die allesamt einen chronischen Verlauf zeigen und meist durch eine zunehmende Behinderung gekennzeichnet sind. Ein schubförmiger Verlauf der Erkrankung („Remitting-Relapsing“) wird bei etwa 85% der MS Patienten beschrieben, wobei sich häufig Symptome nur unvollständig zurückbilden und es im Krankheitsverlauf oftmals zu einer sekundären Progression der Erkrankung mit zunehmender Behinderung kommt (sekundär-progressiver Verlauf). In etwa 15% der Fälle steht bereits initial eine progressive Verschlechterung der Erkrankung im Vordergrund (primär-progressiver Verlauf), wobei hier keine Schübe auftreten. Dieser Subtyp der Erkrankung geht mit der höchsten Morbidität und Mortalität einher. Zudem gibt es ein klinisches isoliertes Syndrom (CIS), dass mit der gleichen neurologischen Erstmanifestation einhergeht, bei dem es jedoch bei einem Lebenszeitereignis bleibt und es nicht zu weiteren Schüben kommt. Patienten mit einem CIS entwickeln jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit eine manifeste MS mit weiteren Schüben (etwa 80% in 5 Jahren). Nichtsdestotrotz ist das Stellen der Diagnose „Multiple Sklerose“ erst bei einem zweiten Ereignis möglich (Kriterium der „Zwei-Zeitigkeit“). Auch müssen

zur Diagnosestellung unterschiedliche neurologische Systeme betroffen sein (Kriterium der „Zweiseitigkeit“).

Weiterhin existieren unterschiedliche Unterformen der MS, die mit verschiedenen Erkrankungslokalisationen einhergehen. So sind hier vor allem die Retrobulbärneuritis (Neuritis nervi optici, NNO) sowie die Neuromyelitis optica (NMO) zu nennen (Simon and Kleinschmidt-DeMasters, 2008).

Im Mittelpunkt der „klassischen“ schubförmigen MS stehen chronisch-entzündliche, demyelinisierende Plaques, die primär mit einem axonalen Leitungsblock einhergehen, wodurch sich unter anderem die schnell auftretenden klinischen Symptome erklären lassen, die sich noch komplett zurückbilden können. Die Läsionen treten dabei räumlich dissiminiert in der gesamten weißen Substanz des zentralen Nervensystems auf und stellen sich als demyelinisierte Areale mit Entzündungsinfiltraten dar, wobei es im Verlauf der Erkrankung schon relativ früh zu axonalen Schädigungen und neuronalem Verlust kommt, wodurch die persistierenden, neurologischen Ausfälle zu erklären sind (Bitsch et al., 2000; Trapp et al., 1999). Zudem stellt sich in letzter Zeit heraus, dass Läsionen auch in der grauen Substanz wie im Cortex auftreten können.

Histologisch finden sich in den Läsionen Entzündungszellen in Form von B- und T-Lymphozyten (CD8+, CD4+) wie auch aktivierten Makrophagen und Mikroglia. Neutrophile Granulozyten spielen bei der „klassischen MS“ keine Rolle. Während bisher nicht verstanden ist, was die entzündliche Kaskade auslöst, die zur Demyelinisierung und neuronalen Schädigung führt, so wird doch in letzter Zeit immer klarer, dass mononukleäre Zellen als Effektorzellen (Makrophagen und Mikroglia) direkt oder durch die Produktion hochreaktiver Sauerstoffspezies und die Schaffung eines „entzündlichen Milieus“ zur Schädigung von Myelin und Neuronen beitragen (Benveniste, 1997; Geurts and Barkhof, 2008; Misgeld and Kerschensteiner, 2006).

Entsprechend den möglichen Lokalisationen der Plaques sind auch die klinischen Symptome sehr vielfältig. Diese können sowohl das sensorische,

motorische wie auch das sensible Nervensystem betreffen, wobei auch kognitive Veränderungen bei MS Patienten häufig beschrieben werden. Als Erstmanifestation werden von Patienten häufig Symptome wie Doppelbilder, Schwindel, Gangunsicherheit, motorische Schwäche oder sensible Ausfälle im Sinne eines fokal neurologischen Defizits beklagt. Der individuelle Krankheitsverlauf ist sehr unterschiedlich und schwierig vorherzusagen. Zur Zeit wird intensiv an „Biomarkern“ geforscht die eine individuelle Prognose erlauben (Lutterotti et al., 2007). Zur Diagnostik wird neben der oft typischen klinischen Präsentation des Patienten, die Liquordiagnostik (typisch sind Pleocytose, intrathekale IgG Synthese mit oligoklonalen Banden und Proteinerhöhung), neurophysiologische Untersuchungen (Nervenleitgeschwindigkeit, evozierte Potentiale) sowie die neuroradiologische Magnet Resonanz Bildgebung herangezogen. Therapeutisch steht heute im akuten Schub „immer noch nur“ die unspezifische Immunsuppression mit Cortisonpräparaten im Vordergrund (Hochdosistherapie z.B. mit 1g Solu-Decortin für 3 bis 5 Tage mit anschließendem Ausschleichen des Cortisons). Bringt dies keine substanzielle Besserung der Symptomatik kann auch über eine Plasmapherese oder Immunabsorption nachgedacht werden, um zirkulierende Antikörper aus dem Serum herauszufiltern. Nach Abklingen des Schubes stehen inzwischen für die Verhinderung weiterer Schübe eine ganze Reihe von immunmodulatorischen und immunsuppressiven Substanzen zur Behandlung zur Verfügung (Thrower, 2009). Zu nennen sind hier v.a. die β -Interferone sowie Glatirameracetat. Auch die „neuen Biologicals“ wie Natalizumab (α_4 Integrin-Inhibitor) oder Alemtuzumab (Anti CD52 Antikörper) kommen mehr und mehr zum Einsatz (Hemmer and Hartung, 2007; Vartanian et al., 2004). Diese haben jedoch in selten Fällen gravierende Nebenwirkungen. Insgesamt erhöhen die Therapien nachweislich das schubfreie Intervall sowie die Lebenserwartung, wobei ein früher Therapiebeginn angestrebt wird. Die Heilung der Erkrankung ist bis heute nicht möglich.

Ein murines Tiermodell der MS ist die experimentelle autoimmune Encephalomyelitis (EAE), das am ehesten die schubförmige MS abbildet und bei der durch die Immunisierung mit Oligodendrozytenantigenen wie MOG, PLP oder MBP sowie die Stimulation des Immunsystems mit „Freudschem Adjuvant“ eine MS-ähnliche Erkrankung induziert werden kann, bei der es zu progredienten motorischen Ausfällen sowie vergleichbaren histopathologischen Korrelaten wie bei der MS kommt (Wekerle et al., 1994).

2. Cerebrale Ischämie

Die cerebrale Ischämie ist die dritthäufigste Todesursache in der westlichen Welt und geht mit hoher Morbidität und Mortalität einher. Sie bildet mit 85% der Schlaganfälle den Hauptanteil unter diesen. Intracerebrale und subarachnoidale Blutungen sind dagegen weit seltener. Meist kommt die Ischämie durch lokale Thrombosen auf dem Boden einer Arteriosklerose der großen Gefäße oder durch Embolien aus dem Herzen bei Vorhofflimmern oder von abgesprengten Plaques der Arteria carotis zu Stande, die den Verschluss einer hirnvorsorgenden Arterie verursachen (Dirnagl et al., 1999).

Durch die Minderversorgung mit Sauerstoff und Glukose kommt es zum hypoxischen Schaden und zum Zusammenbruch von ATP-abhängigen zellulären Prozessen im betroffenen arteriellen Versorgungsgebiet, was in erster Linie zum Zelluntergang durch Nekrose führt. Insgesamt kann die Homöostase des Gewebes nicht aufrecht erhalten werden. Dies führt u.a. zum Zusammenbruch von Ionengradienten, worauf ein intrazellulärer Ca^{2+} Anstieg, die Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen, pro-apoptotischen Signalwegen und die Ausschüttung von Glutamat folgen. Dieser exzitatorische Neurotransmitter depolarisiert dauerhaft umliegende Nervenzellen, was zusammen mit dem unregulierten Einstrom von Ionen und extrazellulärer Flüssigkeit zu einem cytoplasmatischen und vasogenen Ödem führt und als „glutamaterge exzitatorische Toxizität“ bezeichnet wird (Hossmann, 2003). Die resultierende Hirnschwellung birgt die Gefahr der akuten Hirnstammeinklemmung in der ersten Woche nach Infarkt. Zudem kann es im

nekrotischen Gewebe mit den ebenfalls betroffenen Gefäßen zu einer sekundären Einblutung kommen, was oft fatale Folgen hat.

Unterschieden werden kann neben dem Infarktkern, die sogenannte „Penumbra“, die zwischen gesundem Gewebe und dem Infarktkern liegt und als gefährdetes Gewebe bezeichnet wird („tissue at risk“). Dieses kann durch rechtzeitige thrombolytische Therapie gerettet werden und geht ansonsten ins Infarktareal mit ein (Hossmann, 2006).

Neben diesem direkten hypoxischen Schaden kommt es zusätzlich zu einer sekundären entzündlichen Reaktion mit der massiven Rekrutierung von Entzündungszellen, die einerseits den Zell Detritus phagozytieren, andererseits aber auch durch die Produktion von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) zu zusätzlichem „inflammatorischem Schaden“ führen (Iadecola and Alexander, 2001; Lo et al., 2005). So zeigen experimentelle murine Ischämie Modelle, dass durch eine Unterdrückung der zellulären, inflammatorischen Reaktion nach Schlaganfall (z.B. durch Blockade der Neutrophileninfiltration mit Hilfe eines ICAM-1 Antikörpers (Kitagawa et al., 1998) oder durch die Unterdrückung von Cytokinen wie Interleukin-1 (Loddick and Rothwell, 1996) oder „pro-entzündlichen molekularen Reaktionen“ (Jiang et al., 2006) die Infarktgröße signifikant verkleinert werden kann (30 bis 60%). Es wird angenommen, dass sich dieser inflammatorische Schaden über mehrere Tage entwickelt, in denen pro- und anti-inflammatorische Signalwege aktiviert werden (Baird and Warach, 1998; Liesz et al., 2009). Insgesamt treten hier also Dynamiken auf, die weit über das 4 ½ - stündige Lyse Fenster hinausgehen (Hacke et al., 2008) und die bisher schlecht verstanden sind und daher klinisch kaum angegangen werden können.

Warum anti-entzündliche Therapiestudien bei der klinischen Schlaganfallbehandlung bisher keinen Erfolg zeigten, ist Thema der aktuellen Diskussion (Endres et al., 2008; Shuaib et al., 2007). Wahrscheinlich liegen die Gründe unter anderem darin, dass die Entzündung „januskopfig“ positive wie negative Effekte hat. Einerseits muss zerstörtes Gewebe abgebaut und reorganisiert werden, andererseits schütten Entzündungszellen pro-inflammatorische Mediatoren aus, die körpereigenes Gewebe schädigen können.

Die Aufgabe wird also in Zukunft sein, die Entzündung vielmehr zu modulieren als diese rein zu unterdrücken. Das „alte“ Konzept der „rein schädlichen Entzündung“ scheint überholt zu sein.

3. *Reaktive Sauerstoff Spezies*

Reaktive Sauerstoff Spezies sind kleine Atome und Moleküle, die in einem großen Netzwerk von ineinander umwandelbaren Molekülen vorliegen und, die allesamt als potente Oxidanzien fungieren. So wird Superoxid (O_2^-) vor allem in Neutrophilen und Makrophagen durch das membranständige Enzym NADPH synthetisiert. O_2^- kann dann weiter zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reagieren, was durch die Superoxiddismutase (SOD) katalysiert wird. H_2O_2 kann weiter durch Myeloperoxidase, Glutathion Peroxidase oder Katalase in H_2O und H^+ umgewandelt und so „unschädlich“ gemacht werden. Aus H_2O_2 kann jedoch auch das hochreaktive Hydroxylradikal (OH^-) sowie Hypochlorid (OCl^-) entstehen, die als wichtige Mediatoren des Radikalschadens angesehen werden. Im pathophysiologischen Kontext können die verschiedenen ROS durch Lipidperoxidation, Membranoxidierung und direkte DNA Interaktion schädigend auf verschiedenste Zelltypen wirken (Abb.1a, (Droge, 2002)). So sind vermehrte ROS Reaktionen mit verschiedensten Erkrankungen wie neoplastischen - (Dreher and Junod, 1996; Klaunig et al., 2008), autoimmunen - (Perricone et al., 2009) und neurodegenerativen Erkrankungen (Rosen et al., 1993; Wallace, 2005) in Verbindung gebracht worden. Auch bei der Multiplen Sklerose und bei der cerebralen Ischämie werden ROS in hohem Maße freigesetzt und scheinen auch hier negative Auswirkungen zu haben. In den letzten Jahren wurde zudem klar, dass ROS neben diesen „ungerichteten“ oxidativen Reaktionen, direkt als Signal-Molekül fungieren können und z.B. chemotaktisch auf Leukozyten wirken (Niethammer et al., 2009) sowie spezifisch Transkriptionsfaktoren modifizieren können und so Einfluss auf die Genregulation haben (D'Autreaux and Toledano, 2007). Möglicherweise kommen den reaktiven Sauerstoff Spezies auf diese Weise eine Doppelrolle zu.

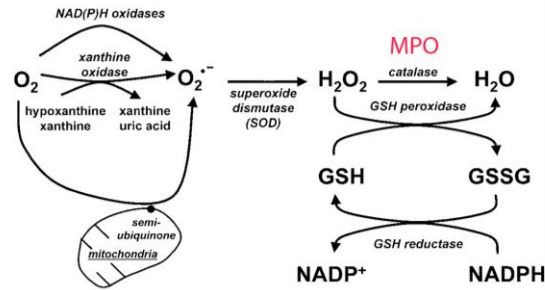


Abb. 1a) Reaktive Sauerstoff Spezies und die Reaktionen des Enzyms Myeloperoxidase

Gezeigt sind die Entstehungswege von ROS und deren Abbau durch die Redoxsysteme der Zelle. Das Enzym NADPH in Makrophagen und Neutrophilen erzeugt Superoxid ($O_2^{\cdot -}$), das in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt wird. Zusätzlich entsteht $O_2^{\cdot -}$ als toxisches Nebenprodukt der Atmungskette in den Mitochondrien, wenn Elektronen direkt auf molekularen Sauerstoff übertragen werden. Myeloperoxidase (MPO) kann neben Katalase und Glutathion (GSH) H_2O_2 oxidieren und wird dabei selbst reduziert. (modifiziert nach Dröge, *Physiol. Rev.*, 2002).

Vieles erscheint jedoch bis heute im Feld der Biologie der reaktiven Sauerstoff Spezies unverstanden oder ist bis heute Spekulation. Insgesamt erscheint ein großes Problem zu sein, dass ROS bisher kaum spezifisch *in vivo* visualisiert werden können und deshalb lange Zeit nur deren Oxidationsprodukte *in vitro* untersucht werden konnten. Erst in den letzten Jahren entstanden erste, meist fluoreszente Sensoren, die eine Detektion von Molekülen wie $O_2^{\cdot -}$ (Wang et al., 2008), H_2O_2 (Belousov et al., 2006) oder des Glutathion Redox Potentials (Gutscher et al., 2008) *in vivo* ermöglichen. Allerdings steht hier die Übertragung in Krankheitsmodelle noch größtenteils aus und die meisten bisher publizierten Ergebnisse entsprechen Zellkulturversuchen. Darüber hinaus gibt es zur Zeit keine MR-Kontrastmittel, die eine direkte Visualisierung von ROS in Versuchstieren ermöglichen würden.

4. Das Enzym Myeloperoxidase

Das Redoxenzym Myeloperoxidase spielt im Entzündungsgeschehen eine zentrale Rolle. Es wird von Makrophagen/Mikroglia und Neutrophilen beim oxidativen Burst sezerniert und stellt insgesamt 1-5% des Gesamtproteins dieser Zellen dar. MPO selbst ist ein Redoxenzym mit einem zentralen Fe^{2+} Atom, das zu Fe^{3+} oxidiert werden kann und in 3 Zuständen vorliegt. Im Grundzustand setzt

es H_2O_2 in H_2O und den reaktiven Metaboliten Hypochlorid (OCl^-) um und wird dabei selbst oxidiert. OCl^- reagiert mit umliegenden Proteinen an deren Tyrosinresten, was nachweislich deren Funktion beeinträchtigt. Im Stadium 1 und 2 kann es dann Phenol und Indol Gruppen radikalieren und geht so in den Ausgangszustand zurück (Abb.1b).

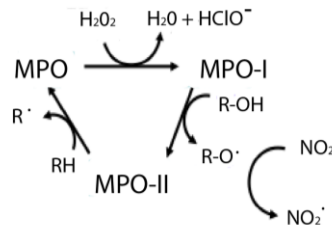


Abb.1b) Der Reaktionszyklus des Enzyms Myeloperoxidase

MPO liegt in einem Redoxzyklus vor. Im Ausgangsstadium oxidiert es H_2O_2 zu H_2O und dem reaktiven Metaboliten Hypochlorid (HOCl) und geht dabei selbst ins Stadium 1 über. Im Stadium 1 und 2 radikalisiert MPO Indol- und Phenolgruppen wie die des Serotonins und kehrt so in den Ausgangszustand zurück (modifiziert nach Lau und Baldus, Pharmacol. Ther., 2006).

Zuerst wurde seine Rolle bei der Pathogenabwehr beschrieben, bei der Bakterienwände durch freigesetzte Radikale lysiert werden (Klebanoff, 1970). In den letzten Jahren wurden jedoch auch wichtige Funktionen von MPO bei „sterilen, nicht bakteriellen Entzündungsvorgängen“ gefunden, bei denen die angeborene zelluläre Immunabwehr im Mittelpunkt steht (Heinecke, 1999; Hoy et al., 2002). MPO kommt auch in der akuten wie der chronischen Phase der MS sowie in der akuten wie subakuten Phase der cerebralen Ischämie eine wichtige Rolle zu (Chataway et al., 1999; Hoy et al., 2003; Nagra et al., 1997). Dabei trägt MPO zur direkten Schädigung von Nervengewebe durch die Bildung von reaktiven Sauerstoff Radikalen wie Hypochlorid (OCl^-), Superoxid (O_2^-) und Stickstoffoxid (NO^-) bei, die dann durch Membranperoxidation und direkte DNA-Schädigung zu Apoptose und Nekrose führen können.

5. Magnet Resonanz Tomographie bei Multipler Sklerose

Die Magnet Resonanz Tomographie hat sich seit ihrer Entwicklung durch Paul Lauterbur und Sir Peter Mansfield in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts zu einer der wichtigsten klinischen Bildgebungsmodalitäten entwickelt (Budinger

and Lauterbur, 1984; Mansfield, 2004). Besonders aufgrund ihres hohen räumlichen Auflösungsvermögens und des guten Weichteilkontrastes wird die MRT für die Darstellung des Gehirns genutzt. Sie besitzt dabei viele Vorteile gegenüber der konventionellen Computertomographie. Insgesamt ist sie aus dem klinischen Alltag nicht mehr wegzudenken und auch zur Diagnostik und zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs der MS kommt der MRT eine überragende Rolle zu (Bakshi et al., 2008). Eine Diagnosestellung ohne Bildgebung ist nach Leitlinien nicht mehr zulässig.

So sind das räumlich- und zeitlich-versetzte Auftreten von Läsionen ein Hauptdiagnosekriterien der modifizierten McDonald Kriterien, die bei MS Diagnostik zum Einsatz kommen (Polman et al., 2005). Typische MS Läsion sind in der T2 gewichteten Bildgebung aufgrund ihres Ödems hyperintens. Sie finden sich vor allem periventrikulär, im Corpus Callosum sowie im Marklager der weißen Substanz. Sie können jedoch im gesamten ZNS sowohl supra- wie infratentoriell sowie im Rückenmark auftreten. Zudem spielt auch die Neurodegeneration der grauen Substanz, die zu einer Hirnatrophie im Verlauf der Erkrankung führt, eine wichtige Rolle.

Ein Entscheidungskriterium, wie aktiv entzündet MS-Läsionen sind, ist, ob diese schrankengestört sind, das heißt, ob diese Kontrastmittel (Gd-DTPA) aufnehmen. Eine solche Aufnahme zeigt sich in der T1 Wichtung nach Kontrastmittelgabe als Hyperintensität.

Zur Verlaufskontrolle von MS-Patienten gehört eine jährliche MRT Untersuchung bei der die Läsionslast bestimmt sowie nach Kontrastmittel anreichernden Herden gesucht wird.

6. Magnet Resonanz Tomographie bei Cerebraler Ischämie

Bei der cerebralen Ischämie erlaubt die MRT die genaue Größen- und Lokisationsdarstellung des Infarktareals. Auch können Einblutungen und ggf. Ursachen der Blutung wesentlich sensitiver erfasst werden als mit der Computertomographie. Gleichzeitig hat sich die Diffusionsbildgebung (DWI)

gemeinsam mit der ergänzenden ADC Sequenz zu einem sehr sensitiven und spezifischen Marker der frühen Ischämie Diagnostik erwiesen. Mit ihr können Diffusionseinschränkungen von Wassermolekülen wie sie bei der Ischämie aufgrund des vasogenen und cytotoxischen Ödems auftreten bereits 30 Minuten nach Infarktbeginn lokalisiert werden und dies somit deutlich früher als mit der Computertomographie (Sa de Camargo and Koroshetz, 2005). Mit der MR Angiographie kann die Hirngefäßdarstellung erfolgen, wodurch die Ursache der Ischämie ggf. direkt diagnostiziert werden kann. Zusätzlich erlauben MR-Perfusionsmessungen (PWI) die Bestimmung von Hirnarealen mit eingeschränkter Blut-Versorgung, die bei bestehenden Gefäßverschluss zusätzlich in das Infarktareal mit eingehen können (Wintermark et al., 2008). In den letzten Jahren hat sich dabei gezeigt, dass das „Mismatch“ zwischen Regionen eingeschränkter Diffusion und Perfusion potentiell rettbar ist und der aus experimentellen Daten bekannten Penumbra entspricht (van Dorsten et al., 1999).

7. Kontrastmittel für die Magnet Resonanz Tomographie

Kontrastmittel für die Magnet Resonanz Tomographie stellen eine Möglichkeit dar pathophysiologische Vorgänge auf molekularer und zellulärer Ebene zu visualisieren. In der klinischen Routinediagnostik kommt hierbei vor allem Gd-DTPA zum Einsatz (Abb.2a). Die Anreicherung von Gd-DTPA (Magnevist®, Schering AG) im Hirnparenchym zeigt eine Störung der Blut-Hirnschranke (BHS) an. Eine Beeinträchtigung der BHS ist ein sekundäres Phänomen bei einer Reihe von ZNS-Erkrankungen.

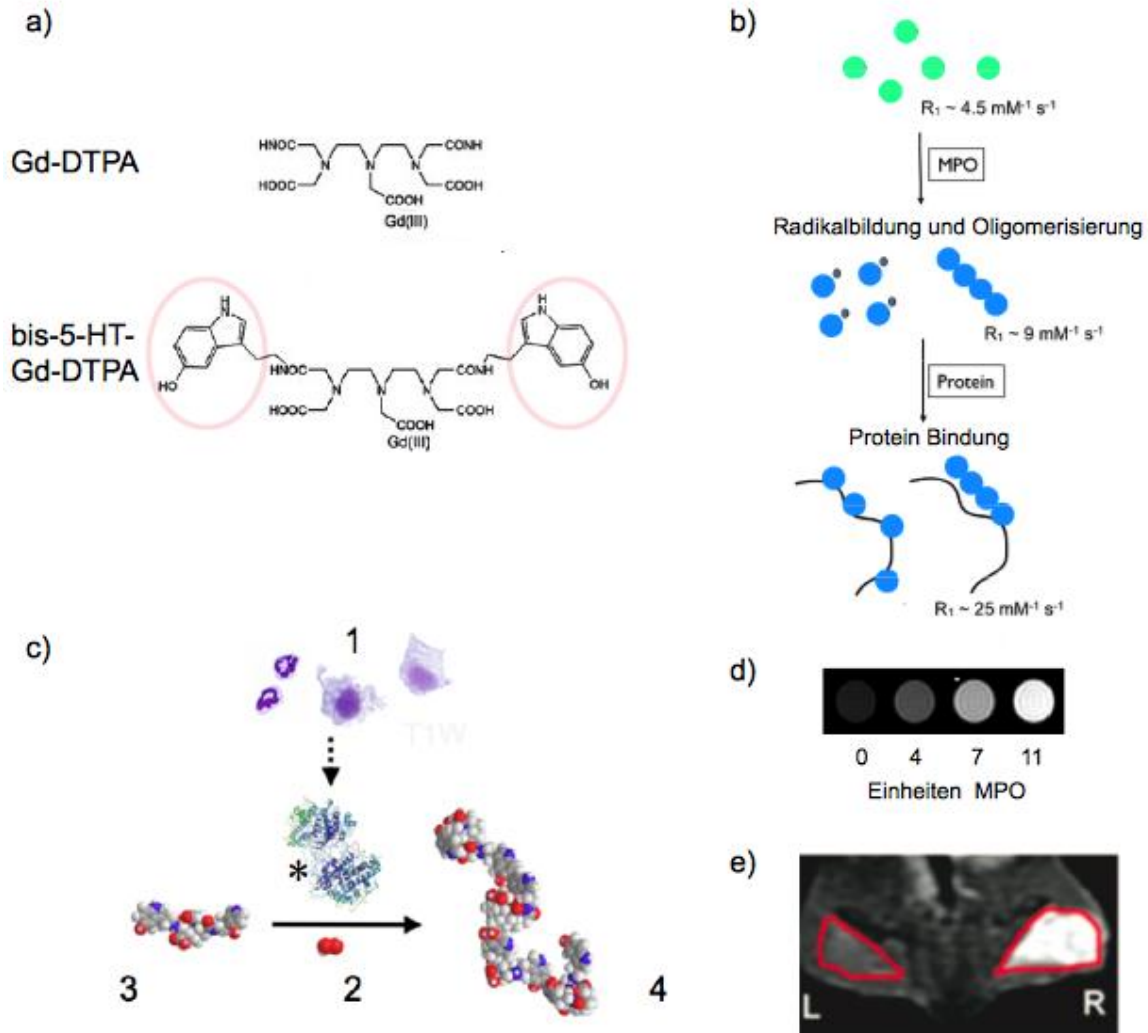


Abb. 2) Struktur und Wirkungsmechanismus von bis-5HT-Gd-DTPA (MPO-Gd)

(a) Die Struktur von Gd-DTPA besteht aus dem Diethylenetriamin-Pentaacetat (DTPA) Rückrat, welches das Gadoliniumion chelatiert. Bis-5-Hydroxy-Tryptamid-DTPA-Gd (MPO-Gd) besitzt zusätzlich 2 Serotoninreste (rot markiert), die an DTPA gebunden sind und das Molekül mit ihren Indol Gruppen spezifisch für Myeloperoxidase machen.

(b) Der Mechanismus der MPO-Gd Aktivierung wird in diesem Schaubild verdeutlicht. MPO-Gd wird durch MPO radikalisiert und kann zu bis zu 5 Untereinheiten oligomerisieren. In diesem Zustand kann es dann an radikalisierte Proteine binden, was zusätzlich die Relaxationszeit (R₁) verkürzt. Insgesamt wird durch die Aktivierung R₁ um das 5-fache verkürzt (modifiziert nach Chen et. al., 2006).

(c) MPO (*) wird von Neutrophilen und Makrophagen/Mikroglia (1) exprimiert. Nach Sekretion in den Extrazellulärraum oxidiert MPO Wasserstoffperoxid (2). Das Enzym kann in Stadium 1 und 2 Indolgruppen direkt als Substrat nutzen wie sie MPO-Gd (3) in seinen zwei Serotonin-Resten besitzt. Durch die Radikalisierung von mehreren Kontrastmittel-Molekülen können diese zu bis zu 5 Untereinheiten oligomerisieren und so die T1 Relaxationszeit verkürzen (4).

(d) Gibt man MPO *in vitro* zu MPO-Gd hinzu, kommt es zu einer Dosis abhängigen Kontrastverstärkung in der T1 gewichteten MR-Bildgebung (modifiziert nach Chen et. al., 2006).

(e) Die T1 gewichtete MR Bildgebung mit MPO-Gd zeigt 2 implantierte Gelkissen in der Flanke einer Maus. Die linke Seite (L) ist mit H₂O gefüllt, die rechte (R) mit MPO. Die enzymatische Aktivierung des Kontrastmittels sorgt für die starke Kontrastverstärkung auf der rechten Seite, während diese auf der linken Seite fehlt (modifiziert nach Chen et. al., 2006).

Bei der MS gelten Kontrastmittel aufnehmende Herde als Areale mit hoher Entzündungsaktivität – allerdings ist diese Korrelation nur sehr eingeschränkt gültig (Inglese et al., 2005). Insgesamt besitzt die Gd-DTPA Bildgebung eine eingeschränkte Sensitivität und Spezifität. Neuere experimentelle MR-Marker sind Eisenoxidnanopartikel (USPIO, VSPIO), die hauptsächlich von Makrophagen phagozytiert werden und so die Infiltration von magnetisch markierten Makrophagen durch eine Verkürzung der transversalen Relaxation in der MRT sichtbar machen (Saleh et al., 2004; Stroh et al., 2006). Auch andere Zelltypen wie Tumor-, Stamm- und T-Zellen wurden auf diese Weise beladen und deren Migration studiert (Focke et al., 2008; Pittet et al., 2006; Zimmer et al., 1995).

8. Das experimentelle Kontrastmittel bis-5HT-Gd-DTPA

In unseren Studien kam das aktivierbare molekulare Kontrastmittel bis-5HT-DTPA-Gd (MPO-Gd) zum Einsatz (Abb.2b). MPO-Gd wird von dem Entzündungsenzym Myeloperoxidase spezifisch gebunden und aktiviert. Die zwei Serotonin Reste des als Monomer vorliegenden Kontrastmittels werden von MPO als Substrat radikalisiert und können zu bis zu fünf Untereinheiten oligomerisieren, was in einer verkürzten longitudinalen Relaxation, also einem hyperintensiven T1 Signal in der MRT resultiert. Zudem können radikalisierte Kontrastmittelmoleküle an Proteine binden, was zu einer weiteren T1 Verkürzung sowie zu einer längeren Verweildauer im Gewebe führt. MPO-Gd stellt dabei eine Modifikation des in der Klinik meist eingesetzten MR-Kontrastmittels Gd-DTPA dar, wobei die angehängten Serotoningruppen das Kontrastmittel spezifisch für Myeloperoxidase machen. Insbesondere tritt bei MPO-Gd im Gegensatz zu Gd-DTPA eine Signalintensivierung über die Zeit durch die Polymerisation mehrerer MPO-Gd Moleküle auf. Zudem besteht durch die Proteinbindung eine verlängerte Nachweisbarkeit im entzündeten Gewebe. Gd-DTPA wäscht hingegen über die Zeit rasch aus.

III. Ziele der Arbeit

Bisher wurde MPO-Gd vor allem *in vitro* etabliert und getestet (Chen et al., 2006; Querol et al., 2006). In der vorliegenden Dissertation kam MPO-Gd erstmals in zwei relevanten neurologischen Krankheitsmodellen zum Einsatz: bei der Experimentellen Autoimmunen Encephalomyelitis als primär entzündlicher Erkrankung (Chen, Breckwoldt et al., 2008) sowie bei der cerebralen Ischämie als sekundär entzündlicher Erkrankung (Breckwoldt*, Chen* et al., 2008).

Bei der EAE war die Arbeitshypothese, das MPO-Gd als „molekularer Sensor“ entzündliche Läsionen sensitiver und spezifischer als Gd-DTPA detektiert und so möglicherweise bereits kleinere Plaques erkannt werden können, die bei der Gd-DTPA Bildgebung verborgen bleiben.

Bei der cerebralen Ischämie war die Ausgangsfrage, ob im Bereich der Penumbra, wie der Literatur nach zu vermuten, eine besonders starke Entzündung vorliegt und diese sensitiv und spezifisch mit MPO-Gd nachgewiesen werden kann. Weiterhin verfolgte ich die Hypothese, dass MPO-Gd die Erstellung eines zeitlichen Entzündungsprofils des Infarktareals *in vivo* erlauben würde.

Zusammengefasst waren die Ziele der Arbeit:

- 1) Die *in vivo* Validierung von MPO-Gd sowie der zuvor erhobenen *in vitro* Ergebnisse in relevanten Krankheitsmodellen
- 2) Der Vergleich mit dem klinischen Goldstandard Gd-DTPA
- 3) Die Visualisierung der entzündlichen Reaktion bei EAE und cerebraler Ischämie im Krankheitsverlauf über die Zeit
- 4) Die Quantifizierung der MPO-Expression *in vivo* und die Korrelation mit zellulären und molekularen *ex vivo* Untersuchungen
- 5) Die Untersuchung der Rolle der MPO im Krankheitsgeschehen und -verlauf

iv. Material und Methoden

1. **Tiermodell der Experimentellen Autoimmunen Encephalomyelitis**

Alle Tierversuche wurden durch das Tierschutzreferat des Massachusetts General Hospital genehmigt. EAE wurde in 35 sechs bis zehn Wochen alten, weiblichen SJL Mäusen (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) durch die Injektion von synthetischem Proteolipid Protein (PLP, Axxora, CA) und *M. tuberculosis* H37Ra (Difco, MI), die in H₂O und komplettem Freuds Adjuvant (Sigma-Aldrich, MO) gelöst waren, induziert (Greer et al., 1996). Dafür wurden 2 mg PLP und 8 mg *M. tuberculosis* in 1 ml H₂O gelöst und mit 1 ml Freuds Adjuvant gemischt. Die Lösung wurde homogenisiert und 100 µl pro Tier injiziert (25 µl in jede Leiste und Axilla). An Tag 0 und 2 wurde ein Boost des Immunsystems durch die intravenöse Gabe von Pertussinogen erreicht. Scheininjektionen mit H₂O wurden in weiteren 5 Tieren durchgeführt und diese als Kontrollen genutzt. Die Tiere erkrankten ab Tag 6 und wurden zwischen Tag 6 und 13 mittels MRT untersucht. Klinische Scores wurden nach folgenden Kriterien vergeben. 0=gesund, 1=Erschlaffung der Schwanzmuskulatur, 2=partielle Lähmung der Hinterbeine, 3=Lähmung der Hinterbeine und partielle Lähmung der Vorderbeine, 4=komplette Lähmung der Hinter- und Vorderbeine, 5=moribund

2. **Tiermodell der cerebralen Ischämie**

Die cerebrale Ischämie wurde bei 40 C57 Black 6 Wildtypmäusen (Gewicht: 25 g ± 2.7 g) und 4 MPO knock-out Tieren (Jackson Laboratories, ME) durch den 30-minütigen Verschluss der rechten mittleren Cerebralarterie mit einem beschichteten Faden durchgeführt (MCAO Modell). Dieser wurde durch einen Schnitt in die ligierte Arteria carotis externa eingebracht und über die Arteria carotis interna bis zum Abgang der mittleren Cerebralarterie vorgeschoben, um diese zu verschließen (Huang et al., 1994).

Über eine Dopplersonde wurde der cerebrale Blutfluss kontinuierlich gemessen und der Faden so positioniert, dass der Blutfluss in der ischämischen Hemisphäre unter 10% des Ausgangsflusses absank. Die Körpertemperatur wurde durch eine Sonde kontinuierlich gemessen und durch eine Wärmeplatte während und nach der Operation konstant gehalten. Als Kontrollgruppe (Sham) wurden Tiere genutzt, bei denen die gleiche Operation, jedoch ohne Fadenverschluß, durchgeführt wurde (n=6). Als Narkosegas kam 0.5 – 1.5% Isofluran zum Einsatz. Tiere, die im Verlauf der Experimente eine intracerebrale Blutung entwickelten, wurden aus der Studie ausgeschlossen (n=5).

3. Kontrastmittel und Synthese von bis-5HT-DTPA-Gd

Das MPO sensitive Kontrastmittel bis-5HT-DTPA-Gd (bis-5-Hydroxytryptamid-Diethylenetriamin-Pentaacetat Gadolinium = im weiteren „MPO-Gd“ genannt) wurde in beiden Studien genutzt. Details der Synthese finden sich im Protokoll von Querol et al. (2006)(Querol et al., 2006). Kurz zusammengefasst, wurde für die Synthese DTPA Bisanhidrid mit Serotonin in Dimethylformamid im Beisein von Triethylamin zur Reaktion gebracht. Das Produkt bis-5HT-DTPA wurde durch Rekristallisation aus Methanol und Aceton isoliert. Die Komplexierung mit Gadolinium wurde mit 1% Zitronensäure durchgeführt und das Produkt mit der Hochdruck-Durchfluss-Chromatographie (HPLC) aufgereinigt. DTPA-Gd (Magnevist®) wurde von Berlex Laboratories (Berlex, NJ) kommerziell erworben. Die Dosis war für beide Kontrastmittel 0.3 mmol/kg, die den Tieren direkt vor Beginn der MRT Untersuchung über die Schwanzvene injiziert wurden.

4. Magnet Resonanz Tomographie

Die Magnet Resonanz Bildgebung (MRT) wurde in einem 4.7 Tesla und 7 Tesla Bruker Pharmascan Gerät mit einer speziellen Maus Kopf Spule durchgeführt (Bruker Biosciences, Billerica, MA). Spin-Echo T1-gewichtete Bilder wurden vor und nach der Gabe des jeweiligen Kontrastmittels aufgenommen (TR = 800ms, TE = 13ms, Sequenzlänge 6 Minuten 57 Sekunden, Matrix Größe 192x192, field

of view 2.5 x 2.5 cm, Schichtdicke 0.7 mm und 16 Schichten). Nach der Kontrastmittelinjektion wurde sequentiell für 60 oder 90 Minuten gescannt (Sequenzzeitpunkte: 6, 15, 30, 45, 60, 75, 90 min nach Kontrastmittelinjektion). Um Unterschiede der Läsionen durch das Fortschreiten der Erkrankung zu minimieren, wurden die Tiere randomisiert und zuerst mit MPO-Gd oder Gd-DTPA gemessen. Bei den Vergleichsstudien zwischen den Kontrastmitteln wurden nur Tiere in die Studie eingeschlossen deren klinisches Stadium sich zwischen den Serien nicht veränderte. Zum Vergleich von MPO Bildgebung und Gd-DTPA wurden die Tiere mit einem Abstand von mindestens 6 Stunden (15.1 ± 8.5 h) gescannt, nachdem sichergestellt war, dass das vorige Kontrastmittel ausgewaschen war (Blut Halbwertszeit von MPO-Gd und Gd-DTPA: 5.4 ± 0.9 min). Die Tiere wurden in Gruppen randomisiert und entweder mit Gd-DTPA oder MPO-Gd zuerst gescannt. Die Tiere wurden am Höhepunkt der Erkrankung gemessen (Stadium 2 und 3) und nach der MRT für immunhistochemische Korrelationen getötet. Isofluran wurde für die Anästhesie verwendet (0.5-3%).

5. *Histologie und Immunhistochemie*

Nach Abschluss der MRT Experimente wurden die Tiere sofort in tiefer Isoflurannarkose durch zervikale Dislokation getötet und das Gehirn entnommen. Dieses wurde in O.C.T (Tissue Tek[®]) eingebettet und in Trockeneis gekühltem Isopentan schockgefroren. 5 μ m Kryostatschnitte wurden für die Immunhistochemie mit Antikörpern gegen Myeloperoxidase (polyklonaler Kaninchen Antikörper; AbCam, MA), Makrophagen/Mikroglia (Mac-3, BD Biosciences, CA) und Neutrophile (Santa Cruz, CA) gefärbt. Avidin–Biotin Peroxidase wurde als Enzym an den Sekundär-Antikörper gekoppelt und als Substrat 3-Amino-9-Äthyl-Carbazol (AEC, Sigma Chemical, MO) zur Visualisierung der Reaktion genutzt. Hämatoxylin & Eosin Färbungen wurden ebenfalls zur Beurteilung der allgemeinen Morphologie angefertigt. Alle immunhistochemischen Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt.

6. Quantifizierung der Demyelinisierung

Luxol Fast Blue (LFB) wurde zur Färbung von Myelin bei den EAE Tieren eingesetzt. 0.1% LFB wurde bei Raumtemperatur auf den Hirnschnitten über Nacht inkubiert. Die Differenzierung erfolgte in Lithium Carbonat und 70% Ethyl Alkohol. Zur Quantifizierung der Demyelinisierung wurden die durch lfb nicht gefärbten Areale ausgemessen und durch die Gesamtfläche der Weißen Substanz dividiert. Die Ausmessung der demyelinisierten Areale erfolgte mit der Software OsiriX.

7. Doppelimmunfluoreszenz-Färbungen

Doppelfärbungen für MPO, Makrophagen und Neutrophile wurden mit den oben beschriebenen Erstantikörper durchgeführt und die Sekundäntikörper an Streptavidin mit Texas Red (MPO) und Streptavidin mit Fluorescein-5-Isocyanat (FITC) (Makrophagen/Neutrophile) (1:100, Amersham, NJ) gekoppelt. Als Mikroskope wurden ein Nikon 80i Mikroskop und ein invertiertes konfokales Axiovert 200M Mikroskop (Carl Zeiss, NY) mit einem LSM Pascal Vario RGB Laser (Arg 458/488/514 nm, HeNe 543 nm, HeNe 633 nm) genutzt.

8. Quantifizierung der Immunhistochemie

Bei der cerebralen Ischämie wurden zur Quantifizierung der Zellinfiltration Makrophagen/Mikroglia, Neutrophile und Myeloperoxidase-Färbungen durch Abzählen der immunreaktiven Zellen in jeweils 5 vorbestimmten Hirnregionen der ischämischen Hemisphäre bei 400-facher Vergrößerung bestimmt (3 Regionen im parietalen Cortex und 2 Regionen in den Basalganglien, n=3 für jeden Zeitpunkt). Der Durchschnitt positiver Zellen wurde für jedes Tier berechnet und das Verhältnis positiver Zellen zur Gesamtzellzahl gebildet, um den Zellverlust durch die Ischämie über die Zeit mit einzubeziehen.

9. *Western Blot Analysen*

Zur Semiquantifizierung von MPO wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Dafür wurde das Hirngewebe homogenisiert und das Gesamtprotein in 1% Cetyltrimethylammonium Bromid (Sigma-Aldrich, MO) in PBS extrahiert. Die Suspension wurde zur Zerstörung der Zellmembranen 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt, anschließend bei 14000 rpm 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand für weitere Experimente genutzt. Die Proteinkonzentration wurde gemessen (Bicinchoninic acid kit, Sigma-Aldrich, MO) und für den Western Blot monoklonale MPO Antikörper (1:1000, Kaninchen anti-MPO, Upstate, CA) und polyklonale Antikörper gegen β -Aktin und Glyceraldehyd Dehydrogenase genutzt (1:5000 Kaninchen anti- β -Aktin, Abcam, MA, 1:5000 Kaninchen anti-GAPDH, Rockland, PA). Die Visualisierung erfolgte mit Chemiluminescence. Pro Well wurden 30 μ g Protein geladen. GAPDH und β -Actin wurden als Ladungskontrollen verwendet.

10. *MPO Aktivitäts-Assays*

Um die MPO Aktivität im Gewebe zu quantifizieren wurde die Methode nach Klebanoff et al. (Klebanoff et al., 1984) eingesetzt. Dabei wird Guaiacol von MPO umgesetzt und die Absorptionsänderung durch das resultierende braune Polymer mit einem UV/vis Spektrometer (Varian Cary 50 Bio UV-Vis spectrometer, CA) bei der Wellenlänge 470nm ausgelesen. Das Gewebe wurde wie für den Western Blot aufbereitet und 40 μ g Protein für den Assay geladen. Die Aktivität wurde wie folgt berechnet:

$$U = (\Delta OD \times V_t \times 4) / (E \times \Delta t \times V_s)$$

U = Aktivität; ΔOD = Absorptionsänderung; V_t = Gesamtvolumen; V_s = Sample Volumen; E = Extinktionskoeffizient = 26.6 mM; Δt = Zeitänderung

Weiterhin wurde die MPO Aktivität mit dem Tetramethylbenzidin (TMB) Assay bestimmt wie von Marquez und Dunford (Marquez and Dunford, 1997) beschrieben. Dabei wird ähnlich dem Guaiacol Assay die MPO Aktivität spektrometrisch mit dem Substrat TMB bei 655 nm quantifiziert. Zur Auswertung

wurde die oben beschriebene Formel verwendet, außer dass der Extinktionskoeffizient für TMB

$E = 3.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ beträgt. Pro Zeitpunkt wurden mindestens drei Tiere verwendet und die Ergebnisse auf 1mg Protein normalisiert.

11. Real Time Polymerase Kettenreaktion

Die RNA wurde aus den infarzierten Hemisphären der Ischämietiere sowie aus Kontrolltieren mit TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) isoliert. Oligo(dT) Primer zur Reversen Transkription der mRNA in cDNA wurden nach den Herstellerangaben genutzt (StrataScript, Stratagene, La Jolla, CA). Für die semiquantitative RT-PCR (qRT-PCR) kam das ABI SDS 7000 System mit ABgene QPCR Rox Mix (Rochester, NY) unter Standardbedingungen zum Einsatz. Es wurden mindestens drei Tiere für jeden Zeitpunkt verwendet, alle Proben drei Mal gemessen und die resultierenden Werte anhand einer Standardkurve mit GAPDH (Applied Biosystems, Foster, CA) als internem Kalibrator normalisiert. Die Primer Sequenzen wurden mit dem Programm PrimerExpress erstellt.

Myeloperoxidase Primer:

TTTGACAGCCTGCACGATGA (vorwärts), GTCCCCTGCCAGAAAACAAG

(Rückwärts), CACCAACCGCTCCGCCCG (Probe).

12. Messung der MPO Expression in vitro

Zur Beantwortung der Frage, wie viel MPO Makrophagen/Monocyten und Neutrophile bei maximaler Aktivierung durch Phorbol 12-Myristat-13-Acetat (PMA) sekretieren können, wurden beide Zellpopulationen nach dem Protokoll von Boxio et al. (Boxio et al., 2004) aus dem Knochenmark gesunder Tiere isoliert (n=6). Dazu wurde das Knochenmark aus beiden Tibiae und Fibulae über einen 75%, 65% und 55%igen Percoll Gradienten aufgereinigt. Die isolierten Makrophagen/Monocyten und Neutrophile wurden 2 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ in 0.5 ml Dulbeccos modifiziertem Eagle Medium (Mediatech, VA) mit oder ohne 1 µl 4 mMol PMA inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und

der Überstand mit dem Guaiacol MPO Aktivitäts-Assay gemessen. Die Ergebnisse wurden auf 10^6 Zellen normalisiert.

13. Statistische Analysen

Kontrast-zu-Rausch-Verhältnisse (CNR) wurden folgendermaßen berechnet:

$$\text{CNR} = (\text{ROI}_{\text{Läsion}} - \text{ROI}_{\text{normales Hirngewebe}}) / \text{Standardabweichung}_{\text{Rauschen}}$$

Für die *in vivo* Quantifizierung der MRT bei cerebraler Ischämie kam neben dem Kontrast-zu-Rausch-Verhältnis eine weitere Form der Quantifizierung zum Einsatz, der so genannte „Aktivierungsgrad“ von MPO-Gd. Dabei wird das Verhältnis von CNR nach 60 Minuten zum CNR nach 6 Minuten gebildet ($\text{CNR}_{60/6}$). Dieser „Auswertungsalgorithmus“ bezieht frühe Kontrastverstärkung, mit ein und setzt sie in ein Verhältnis zur lang anhaltenden Kontrastverstärkung nach 60 Minuten.

P-Werte < 0.05 wurden als signifikant angesehen und alle Daten mit dem Student t-test verglichen. In den Abbildungen wurde der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Für alle statistischen Berechnungen wurde PRISM 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) verwendet.

v. Ergebnisteil 1: Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis

1. Die Höhe der MPO Expression korreliert mit dem Erkrankungsstadium

Western Blot Analysen zeigen eine erhöhte MPO Expression bei den erkrankten Tieren im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, die nur eine geringe MPO Expression aufweisen (Abb.3a). Bei der quantitativen Messung der MPO Aktivität im Hirngewebe mit dem Guaiacol Assay wird deutlich, dass die MPO Expression vom Erkrankungsstadium des Tieres abhängt (Abb.3b/c) und eine starke, positive Korrelation zwischen beiden Faktoren besteht ($R^2 = 0.73$, $p < 0.014$). Im Stadium 0 und 1 der Erkrankung ist die MPO Aktivität ~3-fach erhöht, während sie in den späteren Stadien 2 und 3 um das ~20-fache im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren hochreguliert ist. Es findet sich also umso mehr MPO im Hirngewebe, je kränker die Tiere sind.

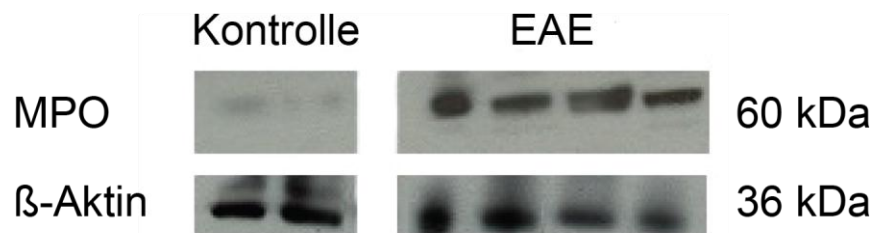


Abb. 3a) Western Blot von MPO bei den an EAE erkrankten Tieren

In den Tieren, bei denen EAE induziert wurde, zeigt sich eine starke MPO-Expression im Hirngewebe, wohingegen MPO in der Kontrollgruppe nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden kann. β-Aktin ist als Ladungskontrolle aufgetragen.

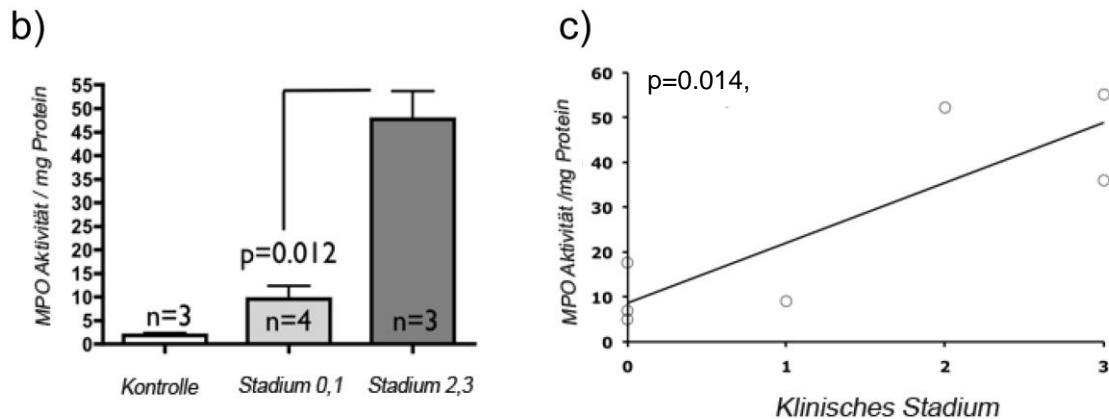


Abb. 3b/c) Quantitative MPO Aktivitäts-Messung mit dem Guaiacol-Assay *in vitro*

(b) MPO wird in den einzelnen Krankheitsstadien unterschiedlich stark exprimiert. Während in der Kontrollgruppe nur sehr wenig MPO im Hirngewebe nachweisbar ist, steigt die MPO Aktivität um das 3-fache bzw. 20-fache in den späteren Stadien der Erkrankung.

(c) Weiterhin findet sich eine positive Korrelation zwischen der MPO-Aktivität und dem Erkrankungsstadium ($R^2=0.73$, $p=0.014$).

2. Die Magnet Resonanz Tomographie mit MPO-Gd stimmt gut mit immunhistochemischen Befunden überein

Die Bildgebung mit MPO-Gd zeigt multiple entzündliche Plaques vor allem im Cerebellum und Mittelhirn. Zusätzlich lassen sich auch einzelne Läsionen im Kortex nachweisen. Die Läsionen erscheinen bereits deutlich 6 Minuten nach Kontrastmittelgabe als hyperintense Kontrastmittel-aufnehmende Herde im Hirnparenchym und treten nach 60 Minuten durch die persistierende Kontrastverstärkung von MPO-Gd noch klarer hervor. In den entsprechenden Hirnschnitten finden sich immunhistochemische Korrelate in Form von demyelinisierten Plaques, in denen die Myelin Anfärbung durch die Luxol Fast Blue Färbung fehlt und die massiv von Makrophagen/Mikroglia infiltriert werden. Zudem ist Myeloperoxidase im entzündeten Areal fokal stark exprimiert. Exemplarisch ist ein Tier mit starken hyperintensiven Arealen im Cerebellum und Mittelhirn gezeigt (Abb.4a), das an Tag 7 nach EAE Induktion gescannt wurde. Ein anderes Tier, das klinisch noch keine Symptome zeigte, weist eine stark entzündete, solitäre Läsion im Cerebellum auf (Abb.4b). Bei einem weiteren Tier fanden sich neben einer massiven cerebellären Kontrastmittelaufnahme diffuse kortikale Läsionen, die sich immunhistochemisch bestätigen ließen (Abb.4c).

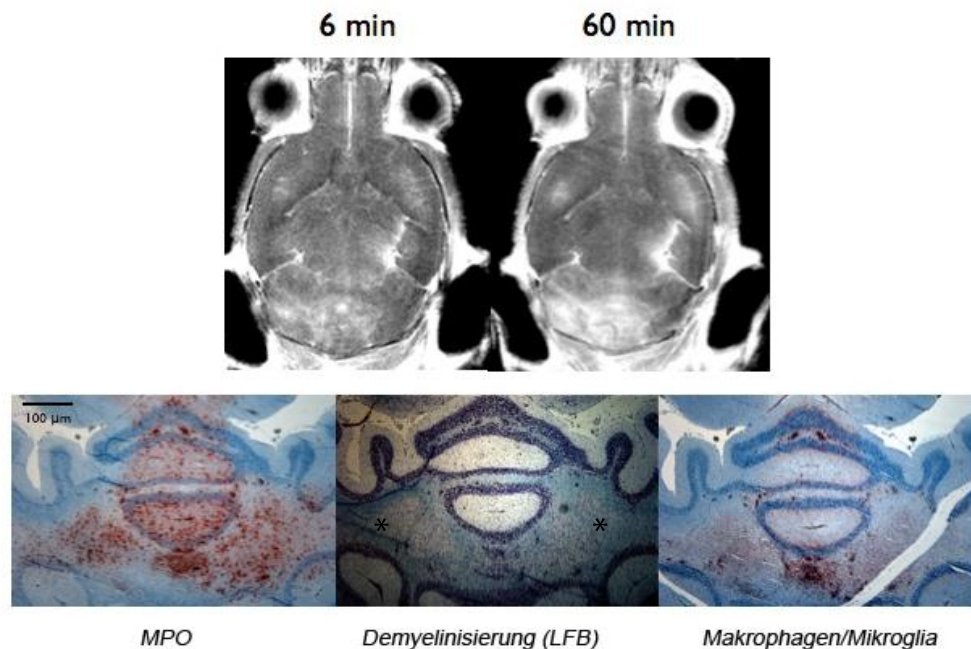


Abb. 4a) Die MPO Bildung korreliert gut mit den immunhistochemischen Befunden

6 Minuten nach MPO-Gd Gabe zeigen sich in der T1 gewichteten MRT diffuse Läsionen im Cerebellum und Mittelhirn. Die persistierende Kontrastverstärkung nach 60 Minuten weist auf eine starke MPO Expression in diesem Gebiet hin, die mit der Immunhistochemie bestätigt wird. MPO und Makrophagen/Mikroglia finden sich weit verstreut vor allem in der weißen Substanz des Cerebellums. Diese Region imponiert auch durch eine starke Demyelinisierung in der Luxol Fast Blue Färbung (LFB), was durch die fehlende blaue Myelinscheidenfärbung in der weißen Substanz angezeigt wird (*).

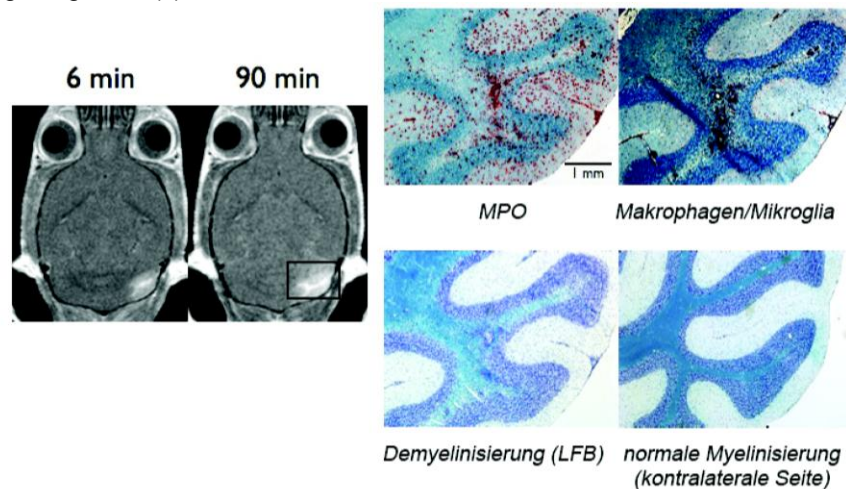


Abb. 4b) Mit der MRT lassen sich klinisch stumme Läsionen nachweisen

Dieses Tier wurde an Tag 6 nach EAE Induktion mittels der MRT untersucht, wobei es zu diesem Zeitpunkt noch keine klinischen Symptome aufwies (EAE Stadium 0). Dennoch zeigt sich in der T1 gewichteten MRT mit MPO-Gd eine große, solitäre Läsion im linken Cerebellum, die eine hohe, persistierende Kontrastverstärkung über 90 Minuten aufweist, was eine hohe Entzündungsaktivität anzeigt. Auf den korrespondierenden histologischen Schnitten findet sich eine starke MPO Expression sowie viele Makrophagen/Mikroglia. Die Luxol Fast Blue Färbung zeigt eine diskrete Demyelinisierung der weißen Substanz, während die kontralaterale Seite ohne pathologischen Befund ist.

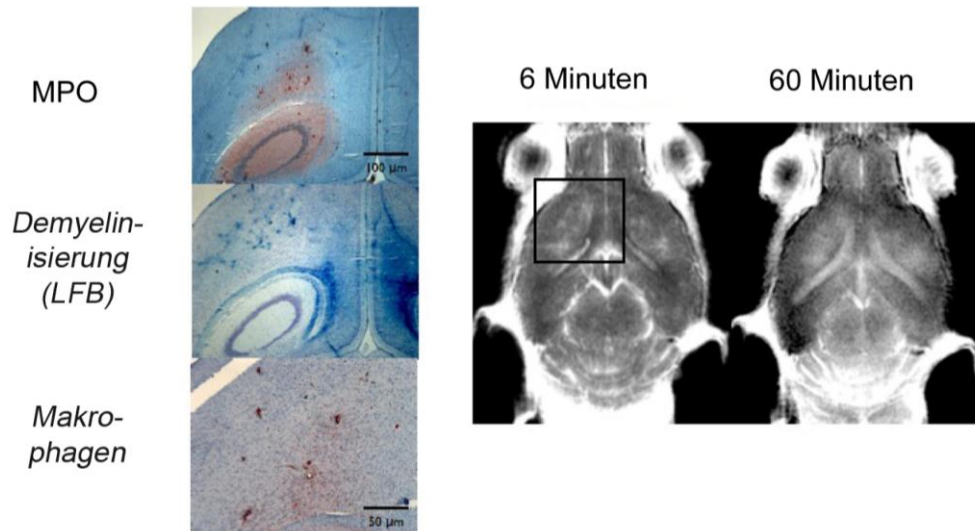


Abb. 4c) Auch im Kortex und subkortikalen Marklager finden sich Läsionen

In diesem Tier zeigen sich in der Magnet Resonanz Tomographie mit MPO-Gd neben einem starken cerebellären Enhancement, diffuse Plaques im kortikalen und subkortikalen Bereich, die sich immunhistochemisch durch großflächige Myeloperoxidase-positive Areale und eine entsprechende Demyelinisierung in der Luxol Fast blue Färbung bestätigen lassen.

3. MPO wird stark von Makrophagen/Mikroglia exprimiert

In der konfokalen Doppelfluoreszenz Mikroskopie mit Antikörpern gegen MPO und Makrophagen/Mikroglia zeigt sich, dass die gesamte nachweisbare MPO-Expression aus Makrophagen/Mikroglia stammt, da jede MPO positive Zelle auch durch den Makrophagen Marker Mac-3 angefärbt wird. Zusätzlich sind weitere Makrophagen/Mikroglia nachweisbar, die keine MPO exprimieren (Abb.5a). Insgesamt finden sich vor allem perivaskuläre Infiltrate in der weißen Substanz des Cerebellums und Mittelhirn. Bei höherer Auflösung lässt sich auch die extrazelluläre Lokalisation von MPO erkennen. Ein großer Teil der MPO befindet sich in Makrophagen. Die sekretierte MPO diffundiert dann ins Interstitium, wo sie ihre oxidierende Wirkung entfaltet (Abb.5b). Zusätzlich gibt es auch im Kortex MPO-exprimierende Makrophagen/Mikroglia. In den gesunden Kontrolltieren sowie in nicht entzündlich veränderten Arealen der EAE Tiere finden sich weder MPO-positive Zellen noch Makrophagen.

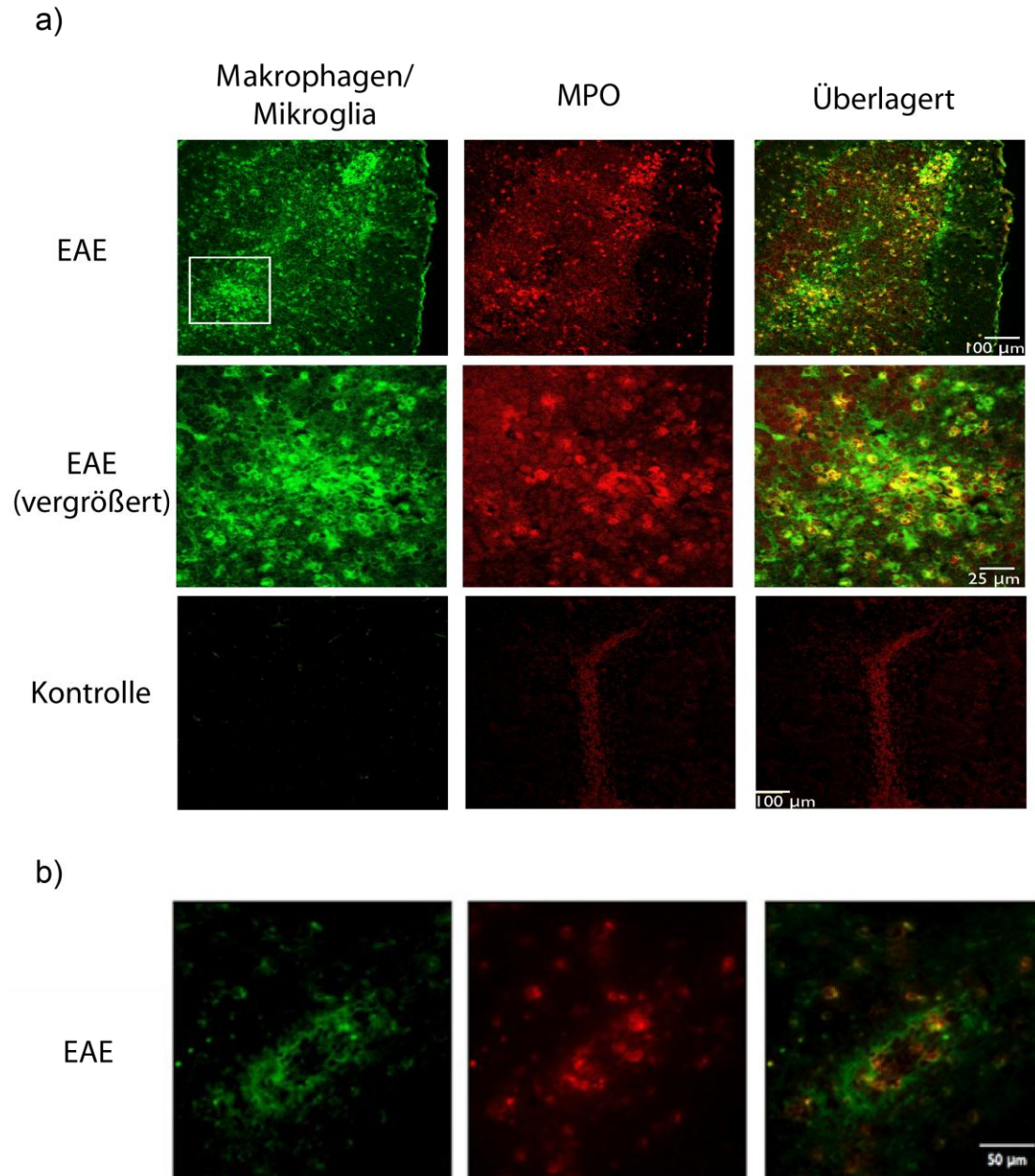


Abb. 5) Makrophagen/Mikroglia sind die alleinige Quelle von MPO

(a) Doppelfluoreszenz-Färbungen für Makrophagen/Mikroglia und MPO zeigen in der konfokalen Mikroskopie, dass MPO ausschließlich von Makrophagen/Mikroglia exprimiert wird. Es finden sich vor allem perivaskuläre Infiltrate in der weißen Substanz des Cerebellums. MPO-positive Makrophagen sind jedoch auch vereinzelt in der grauen Substanz des cerebellären Cortex zu finden. Als Kontrolle ist eine Region ohne entzündliche Aktivität im kontralateralen Cerebellum der selben Maus gezeigt.

(b) In höheren Vergrößerungen ist zu erkennen wie Makrophagen das Gefäßbett verlassen und ins Interstitium einwandern. Zudem lässt sich die extrazelluläre Lokalisation der MPO darstellen.

4. *bis-5HT-DTPA-Gd zeigt mehr und kleinere Läsionen als Gd-DTPA*

In einem nächsten Schritt wurde die Bildgebung mit MPO-Gd und Gd-DTPA im selben Tier direkt miteinander verglichen. Dazu wurden die Tiere in 2 Gruppen randomisiert und in einem Abstand von etwa 6 Stunden entweder zuerst mit Gd-DTPA oder MPO-Gd gescannt (Abb.6a).

Bei der T1 gewichteten MR-Bildgebung mit den beiden Kontrastmitteln finden sich mit MPO-Gd 6 Minuten nach Kontrastmittelgabe etwa doppelt so viele Läsionen wie mit Gd-DTPA. MPO-Gd zeigt zudem bereits durchschnittlich 50% kleinere Läsionen an (Abb. 6c). Auch sind mit MPO-Gd Läsionen klarer voneinander abgrenzbar und gehen nicht so diffus in einander über wie bei der Gd-DTPA Bildgebung. Es lassen sich also mit MPO-Gd Plaques visualisieren, die in der konventionellen Gd-DTPA Bildgebung nicht sichtbar werden. 60 und 90 Minuten nach Kontrastmittelinjektion zeigt sich die verlängerte Pharmakokinetik von MPO-Gd, wodurch sich die Entzündungsaktivität der Läsionen durch eine hohe persistierende Kontrastverstärkung validieren lässt, während Gd-DTPA zu diesen Zeitpunkten schon weitgehend ausgewaschen ist.

Die Quantifizierung der beiden Kontrastmittel über die Zeit macht deutlich, dass MPO-Gd bereits am Anfang ein ~20% stärkeres Signal liefert, was über die Zeit unverändert hoch bleibt, während Gd-DTPA ausgewaschen wird und nach 60 Minuten nur noch 40% der Signalstärke von MPO-Gd zeigt (Abb.6b, $p < 0.001$).

Betrachtet man mit immunhistochemischen Methoden Läsionen, die durch MPO-Gd, nicht aber durch Gd-DTPA visualisiert werden, zeigt sich in diesen Regionen eine starke fokale MPO Expression, was für die Spezifität von MPO-Gd und den entzündlichen Charakter der Läsionen spricht. Mit Gd-DTPA lassen sich diese Läsionen nicht darstellen (Abb.6d).

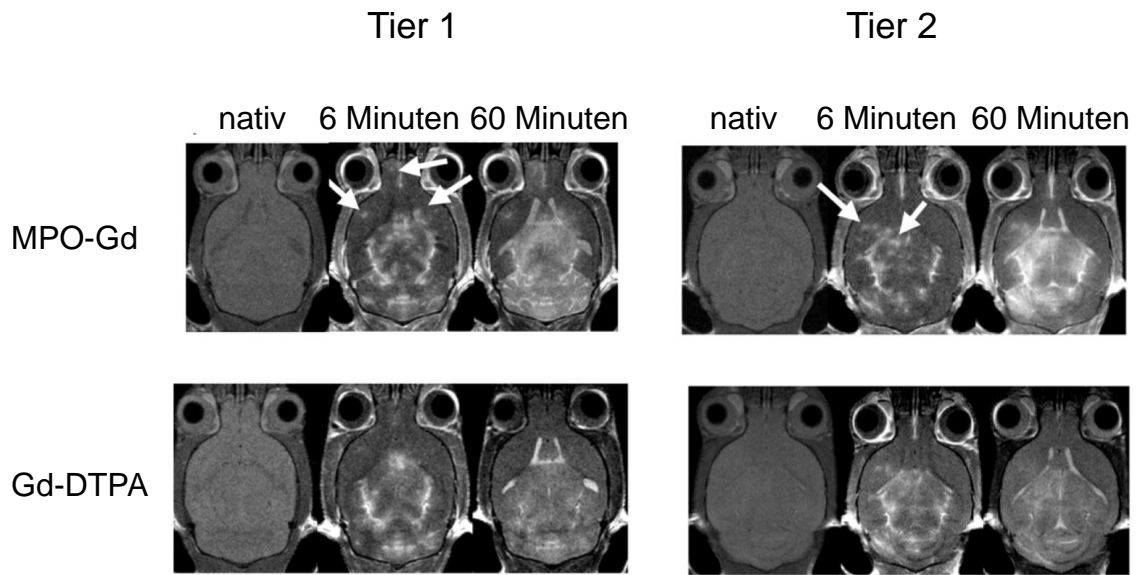
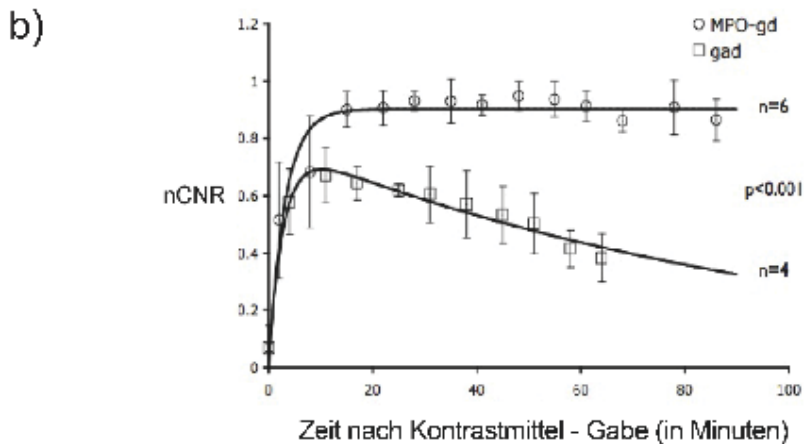


Abb. 6a) MR-Aufnahmen mit MPO-Gd im Vergleich zu Gd-DTPA in der selben Maus

In der oberen Reihe ist die MRT mit MPO-Gd zu sehen, unten die entsprechenden Aufnahmen des selben Tieres mit Gd-DTPA. In der nativen T1 Aufnahme sind keine Läsionen erkennbar. Nach Kontrastmittelgabe zeigen sich multiple Herde vor allem im Cerebellum und Mittelhirn, aber auch im Kortex. Nach 6 Minuten sind die einzelnen Plaques mit MPO-Gd gut abgrenzbar, während Gd-DTPA diffusere Hyperintensitäten aufweist. Nach 60 Minuten ist Gd-DTPA großteils ausgewaschen, während MPO-Gd am Ort der Entzündung eine persistierend, hohe Kontrastverstärkung zeigt. Die Pfeile weisen auf Läsionen hin, die mit MPO-Gd dargestellt werden können, jedoch nicht oder allenfalls angedeutet mit Gd-DTPA.



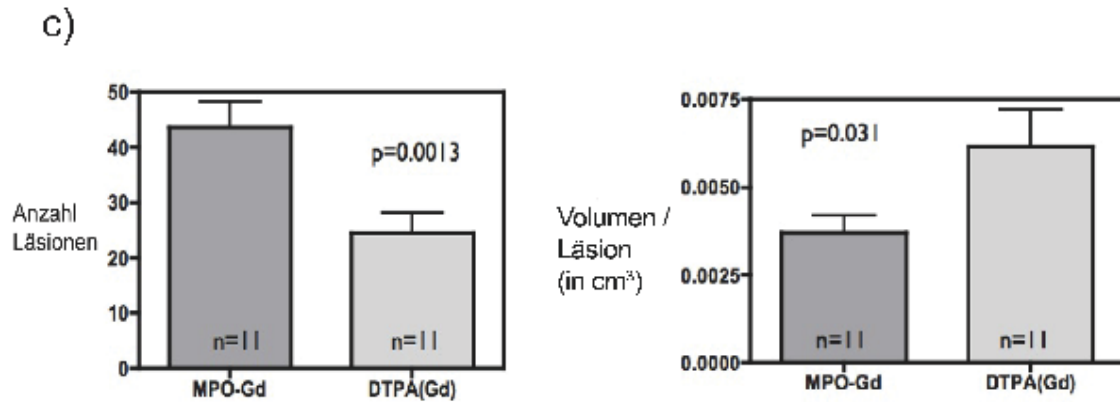


Abb. 6b/c) MPO-Gd stellt mehr und kleinere Läsionen dar als Gd-DTPA

(b) MPO-Gd erreicht schon 6 Minuten nach Kontrastmittelgabe höhere Signalintensitäten als Gd-DTPA. Über die Zeit wäscht Gd-DTPA rasch aus und besitzt nach 60 Minuten nur noch 40% der Signalintensität von MPO-Gd, welches selbst eine lang anhaltende Kontrastverstärkung zeigt.

(c) In der Quantifizierung der MR Bildgebung wird deutlich, dass MPO-Gd signifikant mehr Läsionen darstellt als Gd-DTPA. Außerdem detektiert MPO-Gd durchschnittlich bereits halb so große Läsionen wie Gd-DTPA.

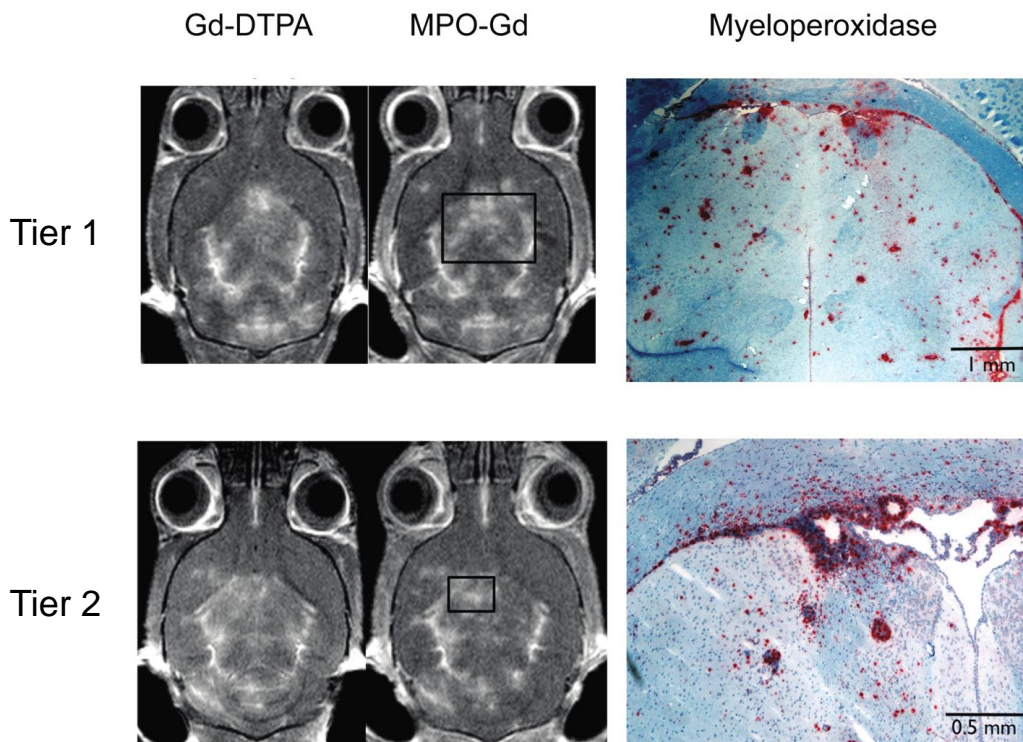


Abb. 6d) Die MPO-Gd Bildgebung zeigt die MPO Aktivität spezifisch an und ist sensitiver als Gd-DTPA

Gezeigt sind 2 repräsentative Tiere, die zum Vergleich der Kontrastmittel in einem Abstand von 6 Stunden mit MPO-Gd und Gd-DTPA gescannt wurden. Läsionen, die mit MPO-Gd visualisiert werden (Box), nicht jedoch (oder weniger deutlich) mit Gd-DTPA, korrelieren in der immunhistochemischen Färbung mit vielen diffus verteilten, MPO-positiven Zellen. Dies spricht dafür, dass die erkannten Plaques keine falsch positiven Hyperintensitäten darstellen, sondern MPO-Gd tatsächlich sensitiver beim Aufdecken von entzündlichen Läsionen ist als Gd-DTPA.

5. Das Signal durch bis-5HT-DTPA-Gd korreliert mit dem Grad der Demyelinisierung

Eine weitere Kernfrage bei der MR-Bildgebung von EAE Plaques ist, inwieweit diese mit der entscheidenden pathophysiologischen Veränderung, der axonalen Demyelinisierung korreliert. Dazu wurden die Kontrastmittel anreichernden Läsionen in ihrer Stärke quantifiziert und mit dem Grad der Demyelinisierung, angezeigt durch die Luxol Fast Blue Färbung, verglichen. Dabei zeigte sich, dass die MRT mit MPO-Gd besser den Demyelinisierungsgrad ($R^2 = 0.73$, $p=0.002$) erfasste als Gd-DTPA ($R^2 = 0.65$, $p=0.098$, Abb.7).

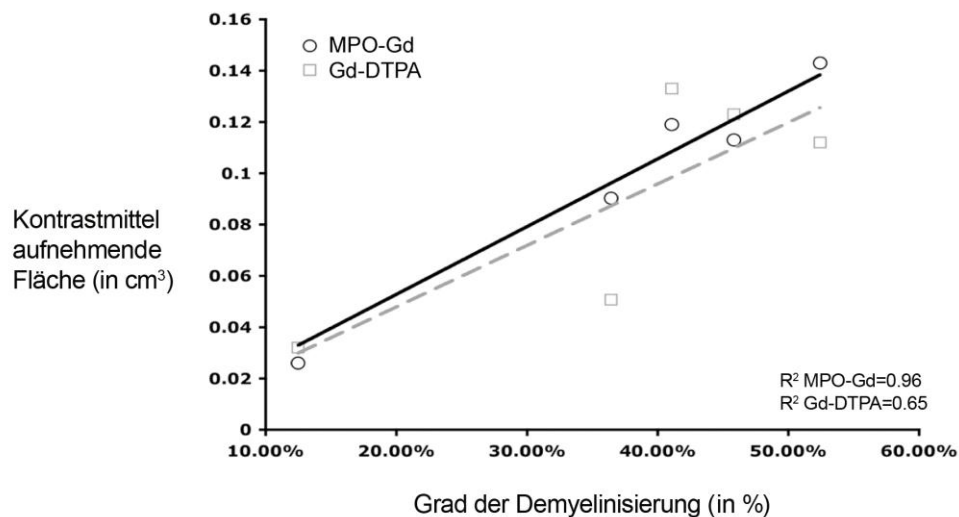


Abb. 7) Die MRT mit MPO-Gd korreliert gut mit dem Demyelinisierungsgrad

Die MPO Bildgebung korreliert besser mit dem histologischen Grad der Demyelinisierung, quantifiziert mit der Luxol Fast Blue Färbung, als Gd-DTPA (MPO-Gd: $R^2=0.96$, $p=0.002$; Gd-DTPA: $R^2=0.65$, $p=0.098$). Hierfür wurden die Kontrastmittel verstärkten MR-Aufnahmen und die korrespondierenden histologischen Schnitte quantifiziert und in Beziehung gesetzt.

vi. Ergebnisteil 2: Cerebrale Ischämie

1. *Die MRT mit bis-5HT-DTPA-Gd zeigt ein höheres Signal als Gd-DTPA*

Im Modell der cerebralen Ischämie liefert MPO-Gd vor allem in den späten Sequenzen 60 und 90 Minuten nach Kontrastmittelgabe höhere Kontrast-zu-Rausch Verhältnisse als Gd-DTPA. In nativen T1 gewichteten Bildern ist das Infarktareal nicht eindeutig abzugrenzen. Exemplarisch sind MR-Aufnahmen gezeigt, die im selben Tier, um 6 Stunden versetzt, mit den beiden Kontrastmitteln durchgeführt wurden (Abb.8a).

Quantifiziert man die Signalstärken der Kontrastmittel in einer Serie von Tieren (n=3) im zeitlichen Verlauf, so zeigt sich, dass sich die Kontrast-zu-Rausch Verhältnisse anfangs ähneln und MPO-Gd erst im zeitlichen Verlauf signifikant hyperintensiver wird als Gd-DTPA. MPO-Gd verbleibt länger im infarzierten Areal und liefert 60 Minuten nach Kontrastmittelgabe ein signifikant stärkeres Signal ($p=0.013$). Nach 90 Minuten ist das Signal von Gd-DTPA nur noch 65% so hyperintensiv wie das von MPO-Gd ($p=0.001$, Abb.8b), da Gd-DTPA nach 45 Minuten sukzessive ausgewaschen wird, während MPO-Gd im aktivierten Zustand im Gewebe verbleibt. Auch der Aktivierungsgrad der beiden Kontrastmittel zeigt deutliche Unterschiede, wobei MPO-Gd an beiden Zeitpunkten 60min / 6min sowie 90min / 6min eine signifikant höhere Aktivierung zeigt ($p=0.036$ und $p=0.012$, Abb.8b). Interessanterweise unterscheidet sich der Aktivierungsgrad auch stark interindividuell und erscheint abhängig von der Infarktgröße. Möglicherweise wird in größeren Infarkten MPO wesentlich stärker exprimiert als in kleineren Insulten (Abb.8c).

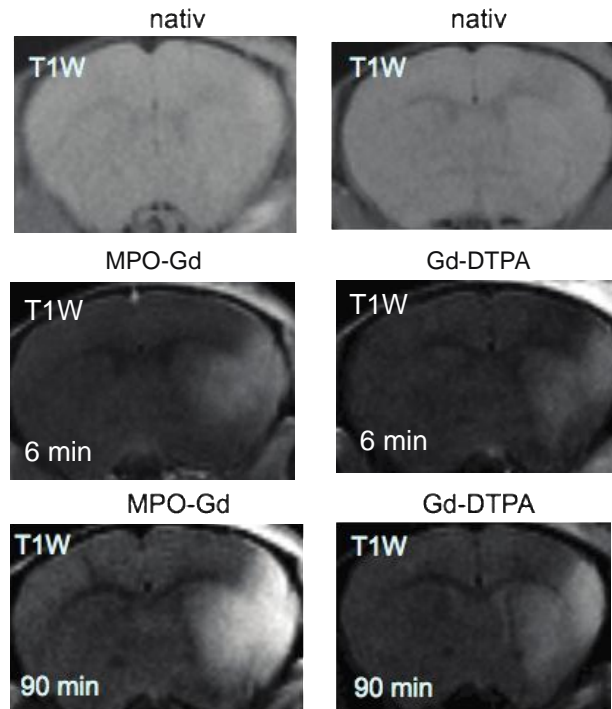


Abb. 8a) Vergleich von MPO-Gd und Gd-DTPA bei der cerebralen Ischämie im selben Tier

In der nativen T1 gewichteten MRT lässt sich der Infarkt nicht eindeutig abgrenzen. 6 Minuten nach Kontrastmittelgabe zeigen beide Kontrastmittel eine ähnliche Höhe der Kontrastverstärkung. Die Ischämie stellt sich als hyperintenses Areal in den Basalganglien und im Kortex dar. Nach 90 Minuten besitzt MPO-Gd wesentlich höhere Signalintensitäten als Gd-DTPA. Die MR-Aufnahmen wurden im selben Tier um 6 Stunden versetzt durchgeführt, um die Eigenschaften der beiden Kontrastmittel möglichst gut miteinander vergleichen zu können.

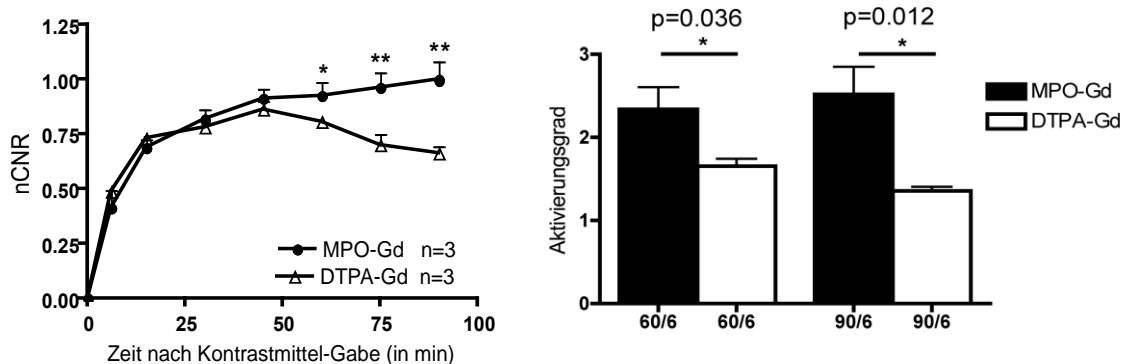


Abb. 8b) MPO-Gd zeigt nach 60 Minuten signifikant mehr Signal als Gd-DTPA

(b) Die Signalintensitäten von Gd-DTPA und MPO-Gd in der MRT-Quantifizierung verlaufen anfangs sehr ähnlich. Erst 60 Minuten nach Kontrastmittelgabe unterscheiden sie sich signifikant voneinander ($p < 0.05$). Nach 90 Minuten bleibt vom Signal von Gd-DTPA noch 65% der MPO-Gd Kontrastverstärkung ($p < 0.001$).

Der Aktivierungsgrad, also die Kontrastverstärkung in den späten Sequenzen im Vergleich zu den frühen Sequenzen (90min/6min), ist von MPO-Gd ebenfalls signifikant größer als von Gd-DTPA ($p = 0.036$ und $p = 0.012$).

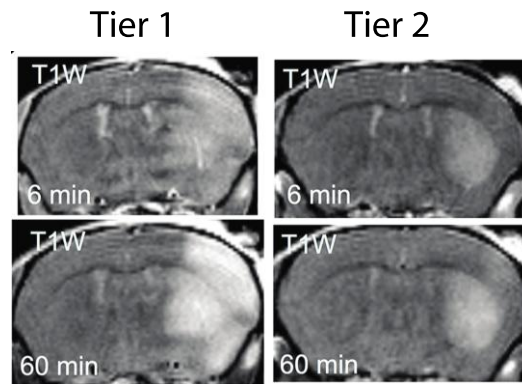


Abb. 8c) Die Aktivierung von MPO-Gd schwankt interindividuell stark

Die MR-Bildgebung mit MPO-Gd zeigt starke interindividuelle Unterschiede im Aktivierungsgrad. In den gezeigten Tieren ist die Kontrastverstärkung 6 Minuten nach Kontrastmittelgabe sehr ähnlich. Nach 60 Minuten hingegen wird deutlich, dass die CNR-Werte und folglich auch die Aktivierung von MPO-Gd in Tier 1 wesentlich höher ist als in Tier 2. Hier fand sich der Trend, dass die Aktivierung in großen Infarkten höher war als in kleineren, was darauf schließen lässt, dass in größeren Infarkten mehr MPO exprimiert wird.

2. Die Spezifität von bis-5HT-DTPA-Gd lässt sich mit MPO knock-out Mäusen bestätigen

Zur Bestimmung der Spezifität von MPO-Gd wurden homozygote MPO knock-out ($MPO^{-/-}$) Tiere genutzt, bei denen analog zu den Wildtyp Tieren cerebrale Ischämien induziert wurden. $MPO^{-/-}$ Tiere exprimieren durch die Einbringung eines Stopcodons in die Keimbahn kein funktionelles MPO-Protein, zeigen jedoch keine phänotypischen Auffälligkeiten im Vergleich zu C57 Wildtyp Mäusen. In der MPO-Gd Bildgebung unterscheiden sich die $MPO^{-/-}$ Tiere von den Wildtyp Mäusen jedoch signifikant. So ist der Aktivierungsgrad 60min / 6min von MPO-Gd sowohl an Tag 3 und 7 signifikant geringer in $MPO^{-/-}$ Tieren im Vergleich zu den Wildtyp Tieren ($p < 0.05$). Zwar besteht eine Kontrastverstärkung im Infarktgebiet, doch ist diese allein auf die Blut-Hirn Schranken Störung zurückzuführen. Die CNR Werte sind in den knockout Tieren dabei bei 6 und 60 Minuten annähernd gleich, da MPO-Gd nicht aktiviert werden kann (Abb.8d). Zudem ist der Aktivierungsgrad von MPO-Gd und Gd-DTPA in $MPO^{-/-}$ Tieren nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 8e). Somit lässt sich die Spezifität von MPO-Gd bestätigen, das nur in Anwesenheit von MPO aktiviert werden kann. Fehlt diese enzymatische Aktivierung sind die Kontrastmitteleigenschaften von MPO-Gd annähernd gleich denen von Gd-DTPA.

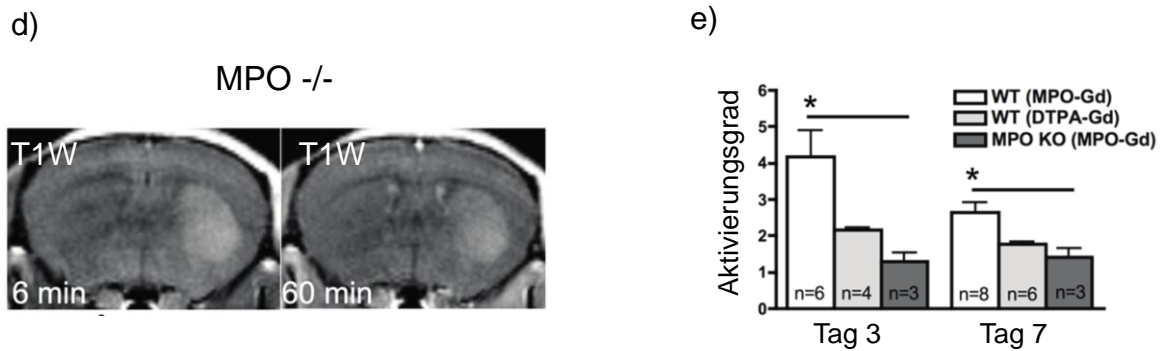


Abb. 8d/e) Mit MPO knock-out Mäusen lässt sich die Spezifität von MPO-Gd bestätigen

(d) Die T1-gewichtete MR-Bildgebung mit MPO-Gd in knockout Tieren ($MPO^{-/-}$), die kein funktionelles MPO Protein besitzen, zeigt eine sehr ähnliche Kontrastverstärkung bei 6 und 60 Minuten, da keine Aktivierung des Kontrastmittels erfolgt. Das hyperintense Signal in den Basalganglien resultiert allein aus der Blut-Hirn Schranken Störung.

(e) Der Aktivierungsgrad von MPO-Gd in $MPO^{-/-}$ und Gd-DTPA in Wildtyp Tieren unterscheidet sich folglich nicht signifikant ($p > 0.05$). Zudem ist der Aktivierungsgrad signifikant geringer als der von MPO-Gd in Wildtyp Tieren. Dies ist sowohl an Tag 3 wie an Tag 7 der Fall.

3. Die Bildgebung mit bis-5HT-DTPA-Gd erlaubt die sequentielle Darstellung der Infarktdynamik und die Quantifizierung der Entzündungsreaktion

Mithilfe von Apparent Diffusion Coefficient- und T2 gewichteten Sequenzen lässt sich das ischämische Areal gut lokalisieren. Die Infarkte sind in den meisten Tieren auf die Basalganglien beschränkt, während sie in ca. 30% der Tiere auch den Kortex betreffen. Die MRT mit MPO-Gd erlaubt die Visualisierung des Infarktgebiets im gleichen Tier sequentiell über den gesamten Untersuchungszeitraum von drei Wochen. Dabei lässt sich das infarzierte Areal nach Kontrastmittelgabe gut abgrenzen, wobei beide Kontrastmittel in die gesamte Läsion diffundieren. Eine Abgrenzung zwischen Penumbra und Infarktkern ist nicht möglich. Die Kontrastmittelverstärkung erscheint homogen im Infarkt mit einer klaren Grenze zum gesunden Parenchym. In zwei repräsentativen Tieren lässt sich die Ischämie deutlich darstellen (Abb.9a/b).

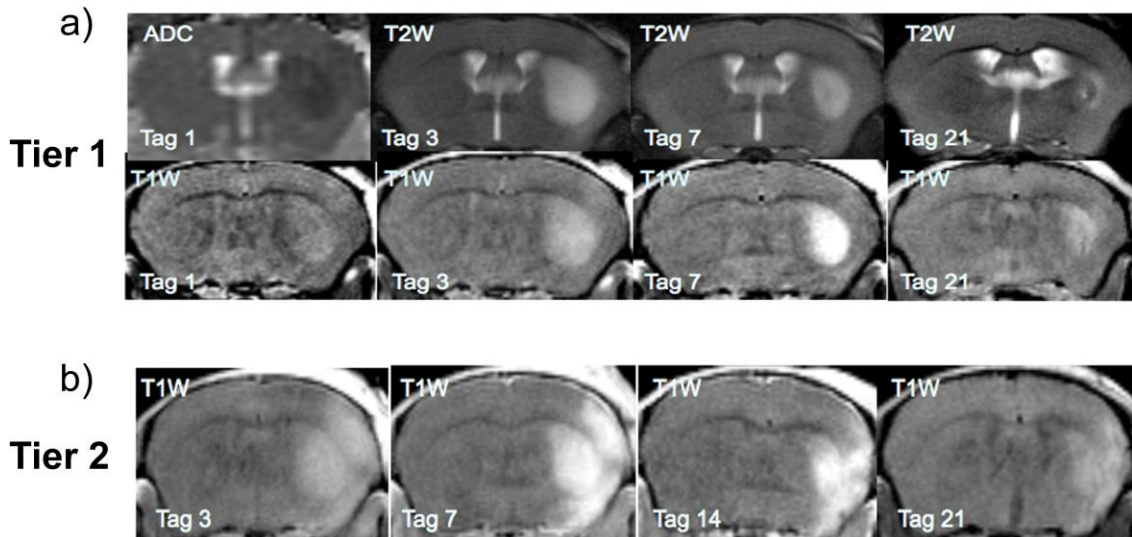


Abb. 9a/b) MPO-Gd Bildgebung über 3 Wochen nach Infarkt

Gezeigt sind 2 repräsentative Tiere, die über drei Wochen mit MPO-Gd gescannt wurden. In der oberen Reihe sind zur Infarktlokalisierung die entsprechenden ADC sowie T2 Sequenzen aufgeführt. In den beiden unteren Reihen befinden sich die T1-gewichtete MPO-Gd Bildgebung. Hier zeigt sich, dass auch drei Wochen nach Infarkt immer noch starke Hyperintensitäten im Infarktareal vorliegen. Alle Kontrastmittelaufnahmen sind 60 Minuten nach Kontrastmittelinjektion entstanden.

4. Erstellung eines zeitlichen Entzündungsprofils mithilfe der MRT

Die Quantifizierung der absoluten Kontrast-zu-Rausch Verhältnisse zeigt zu unterschiedlichen Zeitpunkten an Tag 1,3,7,14 und 21 nach Infarktinduktion zuerst eine Zunahme der Signalintensität mit den höchsten Signalen zwischen Tag 7 und 14, gefolgt von einem Abfall des Signals, wobei erhöhte Kontrastverstärkungen bis Tag 21 nachweisbar sind ($p < 0.05$ für den gesamten Untersuchungszeitraum im Vergleich zur Kontrollgruppe).

Der Aktivierungsgrad von MPO-Gd (CNR_{60min}/CNR_{6min}) als zweites Maß der MR-Quantifizierung zeigt jedoch ein divergentes Bild. Hier liegt die höchste Signalintensität bereits an Tag drei vor, mit einem im Anschluss ebenfalls abfallenden Verlauf (Abb.9c).

In vitro Quantifizierungen von MPO im infarzierten Gewebe wurden durchgeführt, um die Frage zu klären, welcher MRT Auswertungsalgorithmus die MPO Expression besser widerspiegelt.

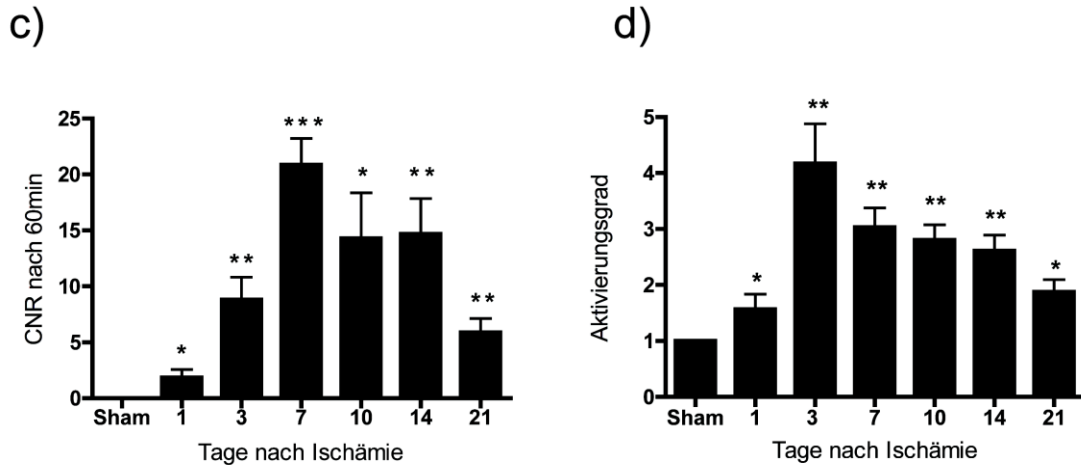


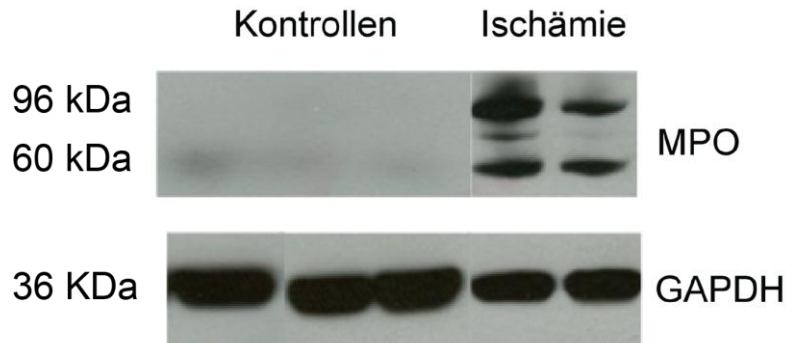
Abb. 9c/d) Die Quantifizierungen der MPO-Gd Bildung zeigen unterschiedliche Ergebnisse

(c) Die Kontrast-zu-Rausch-Werte nach 60 Minuten haben ihr Maximum an Tag 7. (d) Dies unterscheidet sich vom Aktivierungsgrad (60/6 Minuten), der an Tag drei seinen höchsten Punkt erreicht. Dieser Unterschied kommt vermutlich durch die starke Blut-Hirn-Schranken Störung zustande, die durch die Ischämie ausgelöst wird.

5. Die MPO Expression zeigt ihre höchsten Werte an Tag drei

Erhöhte MPO Level wurden im Western Blot nur bei ischämischen Tieren, nicht jedoch in der Schein operierten Kontrollgruppe nachgewiesen (Abb.10a). In weiteren Quantifizierungsschritten wurde die MPO Aktivität im Hirngewebe mit dem Tetramethylbenzidin (TMB) Assay bestimmt. Hierbei lag die höchste MPO Aktivität mit einer 3-fachen Hochregulation an Tag drei ($p < 0.05$) vor. Auch fand sich eine gute Korrelation mit dem MRT Aktivierungsgrad ($R^2 = 0.85$, Abb.10b), wohingegen die Korrelation mit den absoluten Kontrast-zu-Rausch Verhältnissen schlechter war ($R^2 = 0.65$). Diese Ergebnisse wurden anschließend durch die semi-quantitative real-time PCR bestätigt. Auch hier lagen die höchsten MPO mRNA Level an Tag drei (2.7-fache Hochregulation, $p < 0.05$). Die Korrelation mit dem Aktivierungsgrad war hier ebenfalls besser als mit dem absoluten CNR Level ($R^2 = 0.93$ versus $R^2 = 0.52$, Abb.10c). Diese *in vitro* Ergebnisse sprechen

dafür, dass der MR-Aktivierungsgrad ein besseres Maß für die MPO Expression ist als die Kontrast-zu-Rausch Werte.



Abb, 10a) In der Ischämiegruppe sind hohe Expressionslevel von MPO im Western Blot nachweisbar

MPO wird stark in den ischämischen Hemisphären exprimiert, während nur eine sehr geringe Expression in der Kontrollgruppe vorliegt. Der MPO Antikörper bindet sowohl an das glykosilierte Vorläuferprotein von MPO (obere Bande, 96 kDa) sowie an die schwere Kette von MPO (untere Bande, 60 kDa). Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, 36 kDa) wurde als Ladungskontrolle verwendet.

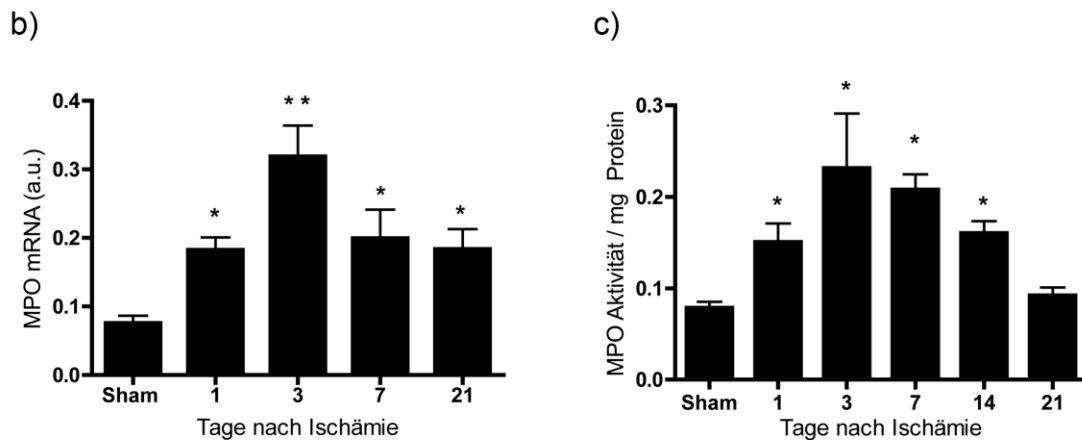


Abb. 10b/c) Die *in vitro* Expressionsprofile von MPO entsprechen dem Verlauf des MR-Aktivierungsgrad von MPO-Gd

Der MPO Aktivitäts-Assay mit TMB (**b**) und der MPO mRNA Verlauf in der semiquantitativen Real Time PCR (**c**) zeigen ein ähnliches Profil. Die höchsten MPO Expressionsraten sind in den ischämischen Hemisphären an Tag drei nach Infarkt mit einer ~3-fachen Hochregulation im Vergleich zur Kontrollgruppe zu finden ($p < 0.05$). Die Korrelation mit dem MR-Aktivierungsgrad_{60min/6min} ist sehr gut ($R^2 = 0.85$ und $R^2 = 0.93$), während sie mit den absoluten Kontrast-zu-Rausch Werten schlechter ist ($R^2 = 0.65$ und $R^2 = 0.52$). Die Korrelation zwischen qRT-PCR und MPO Aktivitäts-Assay ist ebenfalls stark ($R^2 = 0.83$).

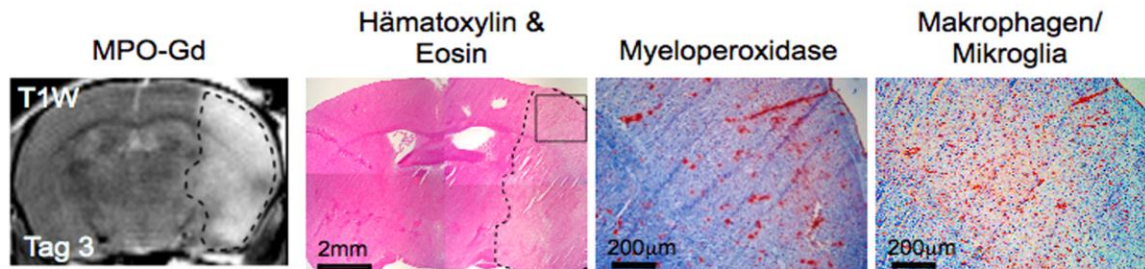
5. MPO wird sowohl von Makrophagen/Mikroglia als auch von Neutrophilen exprimiert

Die Korrelation mit der Histologie zeigt eine gute Übereinstimmung von MRT und der Färbung mit Hämatoxylin und Eosin, in der das Infarktgebiet als blasses Areal erscheint (Abb.11a). In der Immunhistochemie ist an Tag drei eine hohe MPO Expression im gesamten infarzierten Areal nachzuweisen. Eine Abgrenzung von „entzündeter“ Penumbra und hypoxisch-nekrotischem Kerngebiet ist, ähnlich wie in der MRT, auch hier nicht möglich. Makrophagen/Mikroglia sind in hoher Zahl in der gesamten Läsion zu finden (Abb.11a). In der kontralateralen, nicht ischämischen Hemisphäre finden sich weder MPO positive Zellen noch Makrophagen oder Neutrophile. Untersucht man mit Doppelfluoreszenzfärbungen die Herkunft der MPO Expression, finden sich sowohl Makrophagen/Mikroglia wie auch Neutrophile als MPO positiv (Abb.11b). Dabei sind erstere in größerer Zahl und über den gesamten Untersuchungszeitraum vorhanden, während Neutrophile nur in geringerer Anzahl in den frühen Infarktstadien von Tag eins bis drei gefunden werden. Dies wird in der Quantifizierung der Zellinfiltration deutlich (Abb.11c). Auch hier wurden an Tag drei die größte Zahl an MPO positiven Zellen gefunden.

6. Quantifizierung der MPO Aktivität *in vitro*

Um näheres über die MPO Expressionskapazität von aktivierten Neutrophilen und Makrophagen herauszufinden, wurden die, aus dem Knochenmark gesunder Tiere isolierten Zellen, *in vitro* mit PMA aktiviert und im Anschluss die MPO Aktivität im Überstand gemessen. Dabei zeigte sich, dass beide Zellpopulationen nach ihrer Aktivierung etwa die 10-fache MPO Menge sekretieren wie im nicht aktivierten Zustand ($p=0.043$ für Neutrophile und $p=0.048$ für Makrophagen). Dabei unterscheiden sich Makrophagen und Neutrophile jedoch nicht signifikant in der Gesamtmenge ihrer MPO Expression (Abb.11d).

a)



b)

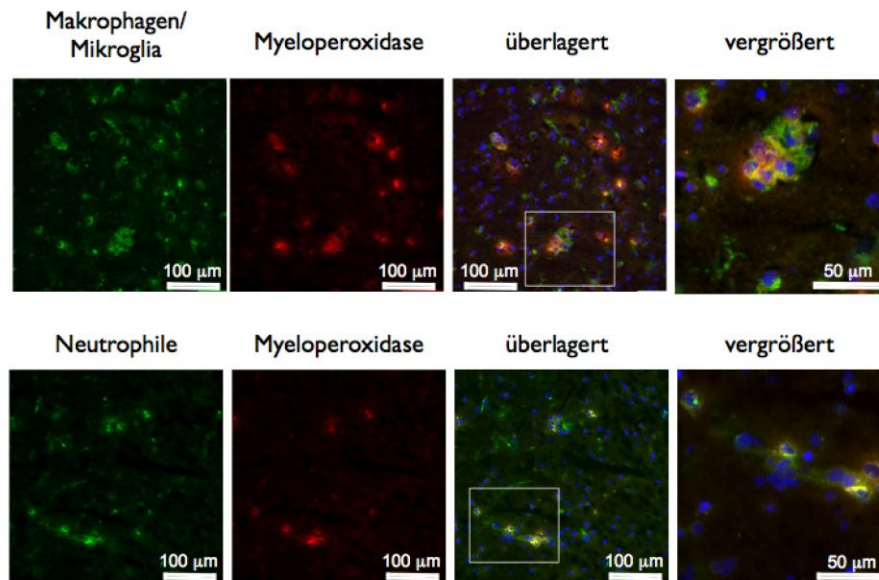


Abb.11) Makrophagen/Mikroglia und Neutrophile exprimieren MPO

(a) Die histologische Färbung mit Hämatoxylin und Eosin, in dem das ischämische Areal blass erscheint, stimmt gut mit der T1 gewichteten MRT mit MPO-Gd überein. MPO positive Zellen und Makrophagen/Mikroglia sind an Tag drei in der entsprechenden Region in großer Zahl vorhanden.

(b) Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen drei Tage nach Infarktinduktion für MPO (texas red - rot), Makrophagen/Mikroglia (fitc - grün) und Neutrophile (fitc - grün) zeigen, dass sowohl Makrophagen/Mikroglia wie auch Neutrophile zur MPO Expression beitragen. Beide Zellpopulationen sind zum großen Teil positiv für MPO. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) gegengefärbt.

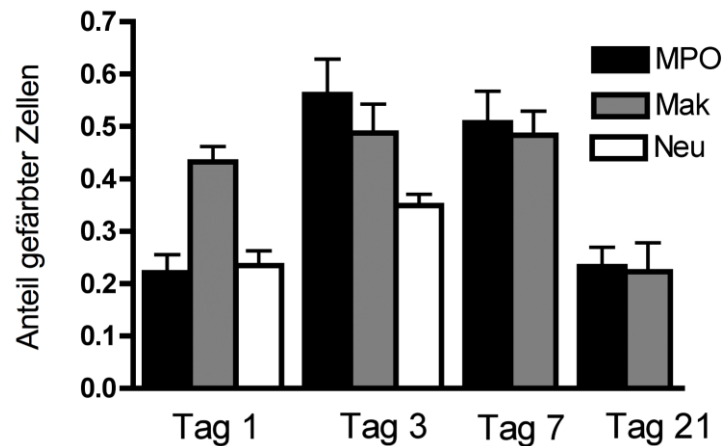


Abb. 11c) Die Zellinfiltration von Makrophagen/Mikroglia und Neutrophilen ist an Tag 3 am höchsten

Die Quantifizierung der Immunhistochemie zeigt den zeitlichen Verlauf der Zellinfiltration. Neutrophile und Makrophagen/Mikroglia sind an Tag drei in größter Zahl vorhanden. Auch MPO ist zu diesem Zeitpunkt am höchsten exprimiert. Makrophagen/Mikroglia sind über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen nachzuweisen. Neutrophile sind hingegen nur von Tag 1 bis 3 in der Läsion zu finden. Die Quantifizierung erfolgte in 5 zuvor definierten hoch-aufgelösten Feldern (2 in den Basalganglien, 3 im parietalen Cortex, n=3).

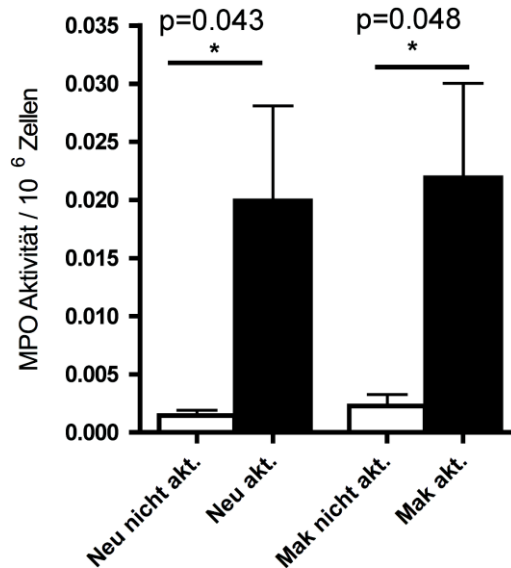


Abb. 11d) Quantifizierung der MPO Sekretion von Neutrophilen und Makrophagen *in vitro*

Die naiven Makrophagen und Neutrophilen, die aus dem Knochenmark isoliert wurden, sekretieren nach Stimulation mit Phorbol 12-Myristat-13-Acetat (PMA) die ca. 10-fache MPO Menge im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen. Die Aktivität wurde im Überstand mit dem Guaiacol Assay gemessen und das Ergebnis auf 10⁶Zellen normiert.

vii. Diskussion

1. Die Problemstellung

Die Visualisierung von spezifischen Parametern der cerebralen Inflammation ist bisher mittels Magnet Resonanz Tomographie nicht möglich. Wenngleich Entzündungsprozesse im Gehirn in der Regel mit MR-tomographisch darstellbaren Wasser- und Diffusionsverschiebungen einher gehen, so bildet die MRT damit nur sekundäre Phänomene ab. Ähnliches gilt für die im Rahmen einer Entzündung häufig beeinträchtigte Störung der Blut-Hirnschranke, die über die Gabe von Gd-DTPA mittels MRT erfasst werden kann.

Sowohl für eine genauere Diagnostik als auch für die Entwicklung und das Monitoring von neuen Therapien ist eine spezifischere Darstellung von Entzündungsparametern unerlässlich, welche über die bisherigen Möglichkeiten hinausreichen muss. Dies gilt umso mehr, da man heute weiß, dass Entzündungsreaktionen auch bei primär nicht entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. der cerebralen Ischämie, eine wichtige Rolle spielen.

Die vorliegende Promotionsarbeit trägt dieser Problematik Rechnung. Zum Einsatz kommt der neue Magnet Resonanz Marker 5-HT-Gd-DTPA (MPO-Gd), der indirekt über eine T1 Verkürzung die Aktivität des Entzündungsenzyms Myeloperoxidase nachweist. Somit wird die Darstellung von krankheitsrelevanten, molekularen Vorgängen, namentlich der Aktivität von MPO, möglich. In den durchgeführten Studien wird die Sensitivität und Spezifität dieses experimentellen Kontrastmittels zum ersten Mal in den Krankheitsmodellen der Experimentellen Autoimmunen Encephalomyelitis sowie der cerebralen Ischämie untersucht und diese mit Gd-DTPA direkt verglichen. In beiden Erkrankungsmodellen ist dabei der Sensor dem bisherigen unselektiven klinischen Goldstandard Gd-DTPA sowohl was die Sensitivität wie auch was die Spezifität betrifft, deutlich überlegen.

2. Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis

Bei der EAE können mehr und kleinere Läsionen in den frühen Sequenzen nach Kontrastmittelgabe visualisiert werden, was auf eine höhere Sensitivität von MPO-Gd im Vergleich zu Gd-DTPA schließen lässt. Mit MPO-Gd zeigen sich nicht nur etwa doppelt so viele Läsionen wie mit Gd-DTPA. Auch sind diese klarer von einander abgrenzbar und gehen nicht so diffus ineinander über. Der Grund hierfür liegt darin, dass nach der Aktivierung von MPO-Gd und der Bindung an Proteine der Sensor am Ort der Entzündung verbleibt, während Gd-DTPA relativ frei im Gewebe diffundieren kann.

In den späten Sequenzen 60 und 90 Minuten nach Kontrastmittelgabe lässt sich dann die Entzündung durch hohe, persistierende Kontrastverstärkung von MPO-Gd bestätigen. Gd-DTPA ist in diesen späten Sequenzen bereits wieder größtenteils ausgewaschen. Diese verlängerte Darstellbarkeit von MPO-Gd beruht auf der Aktivierung durch MPO. Schließlich sind die Blut-Halbwertszeiten der beiden Kontrastmittel ohne Aktivierung annähernd gleich (5.4 Minuten \pm 0.9). Auch zeigen die Untersuchungen mit MPO knock-out Mäusen, dass MPO-Gd ohne Aktivierung schnell wieder ausgewaschen wird. In diesem Zusammenhang sollten weitere Studien den Zeitraum herauszufinden in dem Gd-DTPA bereits komplett ausgewaschen ist, während das MPO-Gd Signal durch die Oligomerisierung und Proteinbindung weiter detektierbar ist. Zu diesem Zeitpunkt könnte dann das „reine Entzündungssignal“ gemessen werden, ohne dass dieses vom Signal der Blut-Hirnschranken Störung überlagert wäre. Dieser Zeitpunkt liegt mutmaßlich etwa 3 bis 4 Stunden nach Kontrastmittelgabe. Schließlich konnte nach 6 Stunden keines der beiden Kontrastmittel mehr MR-tomographisch nachgewiesen werden.

Während beide Kontrastmittel im nicht aktivierten Zustand eine Relaxivität von $4.5 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei 1.5 Tesla besitzen, steigt die Relaxivität von MPO-Gd durch die MPO Aktivierung und Proteinbindung stark an. Wie Gd-DTPA kann auch MPO-Gd nur durch eine geöffnete Blut-Hirnschranke diffundieren. Allerdings reichen kleinste Schrankenstörungen aus, damit MPO-Gd nach Aktivierung ein erkennbares Signal liefern kann, während Gd-DTPA nicht darstellbar ist. So ist

zu verstehen, dass kleine EAE Läsionen mit geringer BHS Störung nur mit dem MPO Sensor visualisierbar sind.

Im Gegensatz zu Gd-DTPA, welches ein unspezifischer Marker der Schrankenstörung ist, zeigt MPO-Gd die Entzündungsaktivität in der Läsion anhand des Markerenzym Myeloperoxidase direkt an. So könnte eine frühere Diagnosestellung und damit ein früherer Therapiebeginn möglich werden, was nachweislich mit einer geringeren Morbidität und Mortalität bei der MS einhergeht (Jacobs et al., 2000).

Eine wichtige Fragestellung in der klinischen Praxis ist die Beurteilung der Aktivität von MS-Plaques. Mithilfe des MPO Sensors sollte in weiteren Untersuchungen der chronischen Phase der EAE untersucht werden, inwieweit die Unterscheidung von aktiven und nicht aktiven Läsionen mit der MRT möglich ist. Denkbar wären z.B. Läsionen, die noch eine BHS Beeinträchtigung aufweisen, jedoch nur noch geringe inflammatorische Aktivität besitzen. Auch wurden in letzter Zeit mehr und mehr unterschiedliche Arten von MS-Plaques beschrieben, die unterschiedliche histologische Merkmale aufweisen (Nessler et al., 2007). Eine nähere Charakterisierung der entsprechenden Läsionen und ihrer Entzündungsaktivität mit MPO-Gd wäre sicherlich interessant.

3. Cerebrale Ischämie

Bei der cerebralen Ischämie sind die Regionen der Kontrastverstärkung durch die beiden Kontrastmittel sehr ähnlich. Auch sind die Signalintensitäten in den frühen Sequenzen annähernd gleich. Erst 60 und 90 Minuten nach Kontrastmittelgabe liefert MPO-Gd signifikant höhere Kontrast-zu-Rausch Werte als Gd-DTPA. Bei der *in vivo* Quantifizierung der MPO Expression mit der MRT erwies sich der Aktivierungsgrad ($CNR_{60/6}$) als genauerer Parameter als die absoluten Kontrast-zu-Rausch Werte. So korreliert der Aktivierungsgrad deutlich besser mit den *in vitro* Quantifizierungen der MPO anhand der semiquantitativen RT-PCR und dem MPO Aktivitäts-Assay. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in der starken Blut-Hirnschrankenstörung, welche durch die Hypoxie bedingte Nekrose entsteht. So können beide Kontrastmittel 6 Minuten nach

Kontrastmittelgabe ungehindert in das Hirnparenchym diffundieren und die longitudinale Relaxation verkürzen. Die Aktivierung von MPO-Gd geht dabei im unspezifischen Signal der absoluten Kontrast-zu-Rausch Verhältnisse unter. Hinzu kommt, dass das MPO Expressionsniveau bei der cerebralen Ischämie mit ihrer sekundär entzündlichen Reaktion von vorneherein weit niedriger ist als bei der EAE. Dadurch tritt erst nach 60 Minuten, wenn das unspezifische BHS Störungssignal ausgewaschen ist, das länger anhaltende, spezifische MPO Signal hervor. Deshalb wurde der MPO-Gd Aktivierungsgrad als Parameter eingeführt, um für die frühe, unspezifische Kontrastverstärkung zu korrigieren. Auf diese Weise erlaubt der Aktivierungsgrad mit MPO als Markerenzym die Erstellung eines zeitlichen Entzündungsprofils und die Quantifizierung der MPO Aktivität *in vivo*. Diese Informationen waren zuvor nur *ex vivo* Untersuchungen zugänglich. Ein wichtiger Baustein der Ischämie Untersuchungen war die Nutzung von MPO knock-out Mäusen und die damit mögliche Validierung der Spezifität von MPO-Gd. Schließlich konnte gezeigt werden, dass die enzymatische Aktivität von MPO tatsächlich notwendig ist, um die Kontrastverstärkung von MPO-Gd herbeizuführen und sich MPO-Gd bei fehlender Aktivierung genauso verhält wie das nicht aktivierbare Gd-DTPA. Dies bedeutet auch, dass MPO-Gd nicht für die Entzündungsbildgebung bei Erkrankungen genutzt werden kann, bei denen MPO nicht exprimiert wird.

4. Weiterführende Überlegungen zu bis-5HT-DTPA-Gd

Weitere Arbeiten bezüglich der genaueren Charakterisierung von Sensitivität und Spezifität des Sensors sind auch in anderen Krankheitsmodellen vielversprechend. So konnte in einem Myokardinfarktmodell der Maus mit MPO knock-out Tieren ebenfalls gezeigt werden, dass sich MPO-Gd im nicht aktivierten Zustand in seinen Kontrastmitteleigenschaften und seiner Pharmakokinetik genauso wie Gd-DTPA verhält. Auch war mit MPO-Gd die Unterscheidung von homo- und heterozygoten MPO knock-out Tieren *in vivo* möglich (Nahrendorf et al., 2008).

In den Versuchsreihen wurde durchgängig mit einer Dosis von 0.3 mmol/kg für beide Kontrastmittel gearbeitet, was der dreifachen klinischen Dosis entspricht. Der Grund dafür ist, dass die enzymatische Aktivität der murinen MPO nur etwa 10% der menschlichen MPO Aktivität beträgt (Rausch and Moore, 1975). Es kann also vermutet werden, dass die Bildgebung mit MPO-Gd beim Menschen wesentlich höhere Kontrast-zu-Rausch Werte ergeben würde.

5. Rolle der Entzündung bei der EAE und cerebralen Ischämie

Sowohl bei der MS/EAE wie bei der cerebralen Ischämie wird über die Rolle der Entzündung kontrovers diskutiert. So konnte bei der EAE gezeigt werden, dass Entzündungszellen nicht nur „Schaden anrichten“, sondern auch neurotrophe Faktoren wie den brain derived neurotrophic factor (BDNF) sezernieren und so die Regeneration von Nervenzellen fördern (Hohlfeld et al., 2007; Hohlfeld et al., 2006; Kerschensteiner et al., 1999). Bei der cerebralen Ischämie ist das Abräumen von Zelldetritus durch Phagozyten sicherlich ein wichtiger Prozess der Reorganisation nach dem Insult. Gleichzeitig kann die Entzündungsreaktion sekundären Schaden hervorrufen. Auch hier besitzt die Inflammation also zwei Seiten.

In unseren Untersuchungen zeigten immunhistochemische Doppelfärbungen, dass nicht alle Makrophagen/Mikroglia MPO positiv sind. Dies legt die Vermutung nahe, dass hier verschiedene Makrophagen/Mikroglia Subpopulationen nebeneinander bestehen, die eine unterschiedliche entzündliche Aktivität kennzeichnet, wie sie auch in der Literatur beschrieben ist (M1 und M2 Makrophagen, Gordon, 2003). Solche Subpopulationen mit unterschiedlicher Funktion und entzündlicher Aktivität sind in letzter Zeit in verschiedenen Krankheitsmodellen identifiziert worden (Nahrendorf et al., 2007). MPO hingegen scheint sehr spezifisch für die angeborene Immunantwort zu sein und wurde bei der EAE ausschließlich von Makrophagen/Mikroglia sekretiert und bei der cerebralen Ischämie zusätzlich in den frühen Stadien an Tag 1 und 3 von Neutrophilen Granulozyten.

6. Fortschritte in weiteren Bereichen der „molekularen Bildgebung“

MPO kann also als Markerenzym von Makrophagen/Mikroglia und Neutrophilen aufgefasst werden und damit für Entzündungsvorgänge per se, da bei fast jeder inflammatorischen Reaktion im Körper zumindest eine der beiden Zellpopulationen beteiligt ist (Faith et al., 2008). Eisenoxidnanopartikel (USPIO, VSPIO, SPIO) wurden für die MRT sowohl bei cerebraler Ischämie als auch bei EAE eingesetzt (Dousset et al., 1999; Kleinschnitz et al., 2003; Linker et al., 2006; Petry et al., 2007). Dabei werden die Partikel systemisch injiziert und von zirkulierenden Monozyten/Makrophagen aufgenommen oder alternativ Phagozyten *in vitro* mit Eisenpartikeln beladen und anschließend i.v. appliziert. Im Rahmen der cerebralen Schädigung wandern dann die beladenen Zellen ins Gehirn ein und können dort mit T2* gewichteten Sequenzen dargestellt werden. Inwieweit MPO-Gd und Eisenoxidnanopartikel komplementäre Informationen liefern, ist unklar und sollte in zukünftigen Studien untersucht werden. Möglicherweise ist mit einer kombinierten Bildgebung mit Eisenoxiden und MPO-Gd die Differenzierung unterschiedlicher Makrophagen/Mikroglia Populationen möglich.

Ein weiteres Einsatzgebiet des MPO Kontrastmittels sind nuklearmedizinische Anwendungen, da das Gadolinium Ion durch radioaktives Indium (^{111}In) oder Kupfer (^{64}Cu) ersetzt werden kann. So wird aus MPO-Gd ein nuklearmedizinischer Tracer, der in der Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) und Positron Emission Tomography (PET) eingesetzt werden kann, was mit einer erhöhten Sensitivität im Vergleich zur MRT einhergeht (Querol Sans et al., 2005).

7. Klinische Übertragbarkeit der Ergebnisse und Toxizität von MPO-Gd

Mittelfristig besitzt MPO-Gd zudem großes Potential für die klinische Einführung. So wurden für die MPO-Gd Bildgebung ausschließlich klinische Standard Sequenzen verwendet, was die Überführung in die klinische Anwendung

erleichtert. Neben den oben genannten Gebieten wird auch intensiv an weiteren Fragestellungen geforscht. So ist bekannt, dass Entzündungsprozesse und damit auch MPO in hohem Maße bei Arteriosklerose, Vaskulitis sowie bei Tumorerkrankungen eine Rolle spielen. Erste Toxizitätsstudien an Mäusen, denen die 5-fache normalerweise applizierte Dosis injiziert wurde, zeigten keine toxischen Effekte. Auch in der Zellkultur führte die 10-fache Dosis von MPO-Gd nicht zu einer Wachstumsverzögerung oder gar zu Apoptose (Rodriguez et al.). Es konnte zudem gezeigt werden, dass MPO-Gd nicht von Phagozyten aufgenommen wird und somit keine DNA schädigende Wirkung besitzen sollte – die Aktivierung von MPO-Gd erfolgt also rein extrazellulär durch die sezernierte MPO. Unerwünschte toxische Wirkungen von MPO-Gd sind auch unwahrscheinlich, bedenkt man die geringe Modifikation durch die beiden Serotonin Reste im Vergleich zu Gd-DTPA. Unverstanden ist jedoch bisher die Proteinbindung, die MPO-Gd nach seiner Aktivierung eingeht und die zu der starken Relaxivitätsverkürzung führt (Chen et al., 2006). Durch die Radikalisierung seiner Serotoningruppen kann die Bindung an andere radikalisierte Serotoninreste der extrazellulären Matrix erfolgen. 6 Stunden nach Kontrastmittelgabe konnte keine Kontrastverstärkung mehr nachgewiesen werden – zu diesem Zeitpunkt ist MPO-Gd folglich wieder ausgewaschen. Unklar ist jedoch, wie die eingegangene Bindung von MPO-Gd wieder gelöst wird und, ob es gegebenenfalls zu einer funktionellen Beeinträchtigung seiner Bindungspartner kommt.

8. Ausblick

Einerseits ist also durch die MPO-Gd Bildgebung ein besseres Verständnis der Pathophysiologie auf Ebene der Grundlagenforschung möglich. Andererseits kann dank höherer Sensitivität und Spezifität eine frühere und genauere Diagnostik sowie die Überwachung von Therapieerfolgen *in vivo* erfolgen. Ein erstes kürzlich publiziertes Beispiel für „Therapiemonitoring“ ist die Testung der Wirkung von Atorvastatin im heilenden Myokardinfarkt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Magnet Resonanz Tomographie mit MPO-Gd sensitiv genug ist,

um anti-inflammatorische Behandlungserfolge *in vivo* zu verfolgen (Nahrendorf et al., 2008).

Die Hoffnung besteht also in Zukunft mit diesen und ähnlichen Kontrastmitteln eine funktionelle, molekulare Bildgebung zur Verbesserung von Diagnostik und Therapie in der Klinik zur Verfügung zu haben.

VIII. Zusammenfassung

Ziel der vorgelegten Arbeit ist die Beantwortung der Frage, inwieweit sich primäre und sekundäre Entzündungsprozesse in den zwei verschiedenen Krankheitsmodellen der Experimentellen Autoimmunen Encephalomyelitis und cerebralen Ischämie durch die spezifische Visualisierung des Markerenzym Myeloperoxidase *in vivo* darstellen lassen.

Die molekulare Magnet Resonanz Tomographie mit dem MPO sensitiven Kontrastmittel bis-5HT-DTPA-Gd erlaubt die Darstellung von mehr und kleineren entzündlichen Läsionen als Gd-DTPA im Modell der EAE in den frühen Sequenzen 6 Minuten nach Kontrastmittelgabe. In den späten Sequenzen 60 und 90 Minuten nach Applikation des MPO Sensors lässt sich die Entzündungsaktivität durch starke, persistierende Kontrastverstärkung bestätigen. Mittels MRT mit Gd-DTPA finden sich nach 6 Minuten eher diffuse Hyperintensitäten, wobei das Kontrastmittel anschließend sukzessive ausgewaschen wird. Areale hoher MR Kontrastverstärkung in der MPO Bildgebung korrelieren gut mit den Regionen starker MPO Expression in der Immunhistochemie. In Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen lässt sich mittels konfokaler Mikroskopie zeigen, dass MPO ausschließlich von Makrophagen/Mikroglia exprimiert wird und vor allem die weiße Substanz des Cerebellums und Mittelhirns betrifft. Darüber hinaus korreliert die Stärke der Kontrastverstärkung sowie die MPO Expression mit dem klinischen Stadium der Erkrankung und dem Grad der Demyelinisierung. Die *in vivo* MPO Bildgebung liefert somit ein indirektes Maß der Demyelinisierung, dem entscheidenden pathophysiologischen Prozess der MS/EAE.

Bei der cerebralen Ischämie kann eine erhöhte MPO Expression *in vivo* über den gesamten Versuchszeitraum von drei Wochen nachgewiesen werden. Dabei war die höchste MPO Expression an Tag drei zu finden, was *in vitro* durch semiquantitative Real Time PCR sowie MPO Aktivitäts-Assays validiert wurde. Im Zeitverlauf der Zellinfiltration sind Makrophagen an Tag drei in größter Zahl

vorhanden und bleiben lang anhaltend über drei Wochen in der Läsion, während Neutrophile Granulozyten von Tag eins bis drei gefunden werden. Dies erklärt den Peak der MPO Expression an Tag drei, da hier sowohl massiv Makrophagen wie Neutrophile im Ischämiegebiet vorhanden sind. In abschließenden Studien mit MPO knock-out Tieren konnte die Spezifität von MPO-Gd nachgewiesen werden. So lässt sich bei diesen aufgrund der fehlenden Aktivierung des MPO Markers keine verlängerte Kontrastverstärkung im Infarktareal nachweisen. Vielmehr verhält sich MPO-Gd in diesen Tieren genauso wie das nicht aktivierbare Gd-DTPA.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass sich MPO-Gd und Gd-DTPA verstärkte MR-Bildgebung deutlich voneinander unterscheiden. Bei der EAE können mit MPO-Gd signifikant mehr und kleinere Plaques im Vergleich zu dem herkömmlichen Gd-DTPA visualisiert werden. Auch lässt sich nach 60 Minuten die Entzündungsaktivität einzelner Läsionen durch hohe, persistierende Kontrastverstärkung bestätigen, während zu dieser Zeit Gd-DTPA bereits größtenteils ausgewaschen ist.

Bei der cerebralen Ischämie kann mit dem MPO Marker ein dynamisches Entzündungsprofil über die Zeit erstellt werden. MPO-Gd-verstärkte MR-Bildgebung erscheint somit vielversprechend, sowohl primäre als auch sekundäre Entzündungsprozesse bei verschiedenen ZNS-Erkrankungen *in vivo* sensitiv und spezifisch visualisieren zu können.

ix. Danksagung

Vom Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München danke ich Prof. Claus Zimmer, Abteilung für Neuroradiologie, für seine Unterstützung des USA Aufenthaltes, die Übernahme der Betreuung sowie die Hilfe beim Schreiben der Arbeit. Zudem danke ich Ihm für die Ermöglichung der Kongressbesuche und die Unterstützung der Bewerbung um den Kurt-Decker Preis. Weiterhin danke ich aus der Abteilung PD Dr. Thomas Liebig für die kontinuierliche Unterstützung und die Anleitung vor allem zu Beginn der Promotionszeit.

Der experimentelle Teil dieser Arbeit ist am Center for Molecular Imaging Research (CMIR), Harvard Medical School, Massachusetts General Hospital entstanden. Aus diesem Institut danke ich insbesondere Prof. John Chen für die exzellente Betreuung, seine kontinuierliche Unterstützung, seine Begeisterungsfähigkeit und die Überlassung des Themas. Prof. Ralph Weissleder bin ich zu Dank verpflichtet für die Aufnahme am CMIR und die Bereitstellung der Infrastruktur und der Forschungsmaterialien. Weiterhin danke ich aus der Arbeitsgruppe Drs. Lars Stangenberg, Elisenda Rodriguez, Jose Figueiredo und Elena Aikawa für deren technische Unterstützung der Versuche und die vielfältige Diskussion der Projekte.

Zudem danke ich den Kooperationspartnern Prof. Michael Moskowitz sowie Dr. Shumei Qiu, Stroke and Neurovascular Regulation Laboratory, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, für die Hilfe bei der Durchführung der Ischämie Operationen.

Für die finanzielle und ideelle Unterstützung bin ich dem Böhlinger Ingelheim Fonds (MD-Stipendium), der Studienstiftung des deutschen Volkes (Auslandsförderung), der Stiftung Familie Klee (Förderpreis für Medizintechnik), der Deutschen Gesellschaft für Neuroradiologie (Kurt-Decker Preis) und Richard Montague, A.B., (Harvard Club München) zu Dank verpflichtet.

Danken möchte ich auch Dipl. Biol. Theodor Cole für seinen Enthusiasmus und seine Begeisterungsfähigkeit – ohne ihn wäre ich vielleicht nicht auf „die verrückte Idee“ gekommen, mich an den besten amerikanischen Universitäten zu bewerben.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, Dipl. Psych. Helmut Müller-Breckwoldt und Dipl. Psych. Regina Breckwoldt, meinem Bruder Johannes Breckwoldt sowie meiner langjährigen Freundin Laura Michel für die kontinuierliche Unterstützung und Begleitung meines Weges. Ohne sie wäre die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Sie wissen gar nicht, was ich ihnen zu verdanken habe und ich widme ihnen diese Arbeit unter dem Titel „Per aspera ad astra“.

X.

Curriculum Vitae**Angaben zur Person**

Name: Michael Oliver Reinhard Breckwoldt
Adresse: Eisenacher Straße 10
80804 München
Geburtsdatum: 6. August 1983
Geburtsort: Heidelberg

Universität

- 10/2005 – 6/2010 Klinisches Studium der Medizin an der TU München und Ablegung des 2. Staatsexamens mit der Note gut
- 2/2009 – 1/2010 Praktisches Jahr der Medizin an den Universitäten von Tasmanien und Sydney (Chirurgie), New York und Oxford (Innere Medizin) sowie an der Technischen Universität München (Neurologie)
- seit 8/2008 Doktorand (Dr. rer. nat.) im PhD Programm „Medical Life-Science and Technology“, Institut für Klinische Neuroimmunologie, LMU München und Institut für Neurowissenschaften, TU München
Thema: „*In vivo* Darstellung des oxidativen Stresses und dessen Rolle bei der entzündlichen Axonschädigung im Tiermodell der Multiplen Sklerose“
Betreuer: Profs. Martin Kerschensteiner, Thomas Misgeld,
- 9/2006 – 9/2007 Forschungsaufenthalt im Rahmen der medizinischen Promotion am Center for Molecular Imaging Research, Harvard Medical School, Massachusetts General Hospital, Betreuer: Profs. Ralph Weissleder, John Chen
- 4/2006 – 11/2008 Doktorand (Dr. med), Abteilung für Neuroradiologie, TU München
Thema: „Magnet Resonanz Tomographie von Myeloperoxidase im Mausmodell der Multiplen Sklerose und Cerebralen Ischämie.“
Betreuer: Prof. Claus Zimmer
- 4/2005 – 8/2006 Studium der Philosophie M.A. an der LMU München als Doppelstudium und Ablegung der Zwischenprüfung in Philosophie (Note 1,7)
- 10/2003 – 09/2005 Vorklinisches Studium der Medizin an der LMU/TU München und Ablegung des 1. Staatsexamens („Physikum“) mit der Note sehr gut (1.5)
-

Schule

- 07/2003 Abitur mit den Leistungskursen Französisch und Geschichte am Englischen Institut Heidelberg (Durchschnitt 1,4)
- 8/2000 – 11/2000 Austauschschüler in Minniapolis, Minnesota USA
- 8/1990 – 7/2003 Besuch der Grundschule und des Gymnasiums Neckargemünd sowie des Gymnasiums Englisches Institut Heidelberg

Preise

- 9/2010 Gertrud Reemtsma Promovendenpreis für neurologische Grundlagenforschung
- 10/2008 Kurt-Decker Preis der deutschen Gesellschaft für Neuroradiologie
- 7/2008 Travel Award für den „World Congress of Molecular Imaging“, Nizza
- 9/2007 Travel Award für die Konferenz der Society of Molecular Imaging, Providence, USA
- 6/2007 Förderpreis für Medizintechnik der Klee Stiftung
- 7/2003 Franz-Schnabel Medaille für hervorragende Leistungen im Fach Geschichte
Apollinaire Preis für hervorragende Leistungen im Fach Französisch
- 4/2003 1. Preis im Mathematik Team Wettbewerb der Universität Heidelberg

Stipendien

- 8/2008 – 2/2009 PhD Doktorandenstipendium des Graduiertenkollegs “Signalverarbeitung im Gehirn”
- 9/2006 – 9/2007 MD Doktorandenstipendium des Böhlinger Ingelheim Fonds
- 2/2005 – 5/2010 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
- 10/2003 – 5/2010 Stipendiat bei “e-fellows.net”
- 07/01 – 07/03 Teilnehmer im Heidelberger Life-Science Lab, einem Schülerlabor der Helmholtzgemeinschaft zur außerschulischen, naturwissenschaftlichen Begabtenförderung am Deutschen Krebsforschungszentrum; Teilnahme an den Arbeitsgemeinschaften Biochemie und Neurobiologie mit mehreren Praktika (EMBL, DKFZ, MPI, UC Berkeley) sowie Besuch von verschiedenen Seminaren und Konferenzen im In- und Ausland (Brüssel, Prag)

xi. Literaturverzeichnis

- Baird AE, Warach S. Magnetic resonance imaging of acute stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18: 583-609.
- Bakshi R, Thompson AJ, Rocca MA, Pelletier D, Dousset V, Barkhof F, Inglese M, Guttman CR, Horsfield MA. MRI in multiple sclerosis: current status and future prospects. *Lancet Neurol* 2008; 7: 615-25.
- Belousov VV, Fradkov AF, Lukyanov KA, Staroverov DB, Shakhbazov KS, Terskikh AV, Lukyanov S. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods* 2006; 3: 281-6.
- Benveniste EN. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med* 1997; 75: 165-73.
- Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Bruck W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 2000; 123 (Pt 6): 1174-83.
- Boxio R, Bossenmeyer-Pourie C, Steinckwich N, Dournon C, Nusse O. Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 604-11.
- Breckwoldt MO, Chen JW, Stangenberg L, Aikawa E, Rodriguez E, Qiu S, Moskowitz MA, Weissleder R. Tracking the inflammatory response in stroke in vivo by sensing the enzyme myeloperoxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 18584-9.
- Budinger TF, Lauterbur PC. Nuclear magnetic resonance technology for medical studies. *Science* 1984; 226: 288-98.
- Chataway J, Sawcer S, Feakes R, Corradu F, Broadley S, Jones HB, Clayton D, Gray J, Goodfellow PN, Compston A. A screen of candidates from peaks of linkage: evidence for the involvement of myeloperoxidase in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1999; 98: 208-13.
- Chen JW, Breckwoldt MO, Aikawa E, Chiang G, Weissleder R. Myeloperoxidase-targeted imaging of active inflammatory lesions in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 2008; 131: 1123-33.
- Chen JW, Querol Sans M, Bogdanov A, Jr., Weissleder R. Imaging of myeloperoxidase in mice by using novel amplifiable paramagnetic substrates. *Radiology* 2006; 240: 473-81.
- D'Autreaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 813-24.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999; 22: 391-7.
- Dousset V, Ballarino L, Delalande C, Coussemacq M, Canioni P, Petry KG, Caille JM. Comparison of ultrasmall particles of iron oxide (USPIO)-enhanced T2-weighted, conventional T2-weighted, and gadolinium-enhanced T1-weighted MR images in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *AJNR Am J Neuroradiol* 1999; 20: 223-7.

- Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 30-8.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.
- Ebers GC. Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2008; 7: 268-77.
- Endres M, Engelhardt B, Koistinaho J, Lindvall O, Meairs S, Mohr JP, Planas A, Rothwell N, Schwaninger M, Schwab ME, Vivien D, Wieloch T, Dirnagl U. Improving outcome after stroke: overcoming the translational roadblock. *Cerebrovasc Dis* 2008; 25: 268-78.
- Faith M, Sukumaran A, Pulimood AB, Jacob M. How reliable an indicator of inflammation is myeloperoxidase activity? *Clin Chim Acta* 2008.
- Focke A, Schwarz S, Foerschler A, Scheibe J, Milosevic J, Zimmer C, Schwarz J. Labeling of human neural precursor cells using ferromagnetic nanoparticles. *Magn Reson Med* 2008; 60: 1321-8.
- Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 2006; 354: 942-55.
- Geurts JJ, Barkhof F. Grey matter pathology in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2008; 7: 841-51.
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 23-35.
- Greer JM, Sobel RA, Sette A, Southwood S, Lees MB, Kuchroo VK. Immunogenic and encephalitogenic epitope clusters of myelin proteolipid protein. *J Immunol* 1996; 156: 371-9.
- Gutscher M, Pauleau AL, Marty L, Brach T, Wabnitz GH, Samstag Y, Meyer AJ, Dick TP. Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nat Methods* 2008; 5: 553-9.
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Davalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D; ECASS Investigators. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2008; 359: 1317-29.
- Heinecke JW. Mechanisms of oxidative damage by myeloperoxidase in atherosclerosis and other inflammatory disorders. *J Lab Clin Med* 1999; 133: 321-5.
- Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3: 291-301.
- Hemmer B, Hartung HP. Toward the development of rational therapies in multiple sclerosis: what is on the horizon? *Ann Neurol* 2007; 62: 314-26.
- Hohlfeld R, Kerschensteiner M, Meinl E. Dual role of inflammation in CNS disease. *Neurology* 2007; 68: S58-63; discussion S91-6.
- Hohlfeld R, Kerschensteiner M, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H. The neuroprotective effect of inflammation: implications for the therapy of multiple sclerosis. *Neurol Sci* 2006; 27 Suppl 1: S1-7.
- Hossmann KA. [Glutamate hypothesis of stroke]. *Fortschr Neurol Psychiatr* 2003; 71 Suppl 1: S10-5.

- Hossmann KA. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol Neurobiol* 2006; 26: 1057-83.
- Hoy A, Leininger-Muller B, Kutter D, Siest G, Visvikis S. Growing significance of myeloperoxidase in non-infectious diseases. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 2-8.
- Hoy A, Leininger-Muller B, Poirier O, Siest G, Gautier M, Elbaz A, Amarenco F, Visvikis S. Myeloperoxidase polymorphisms in brain infarction. Association with infarct size and functional outcome. *Atherosclerosis* 2003; 167: 223-30.
- Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 1994; 265: 1883-5.
- Iadecola C, Alexander M. Cerebral ischemia and inflammation. *Curr Opin Neurol* 2001; 14: 89-94.
- Inglese M, Benedetti B, Filippi M. The relation between MRI measures of inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2005; 233: 15-9.
- Jacobs LD, Beck RW, Simon JH, Kinkel RP, Brownschidle CM, Murray TJ, Simonian NA, Slasor PJ, Sandrock AW. Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group. *N Engl J Med* 2000; 343: 898-904.
- Jiang ZG, Lu XC, Nelson V, Yang X, Pan W, Chen RW, Lebowitz MS, Almassian B, Tortella FC, Brady RO, Ghanbari HA. A multifunctional cytoprotective agent that reduces neurodegeneration after ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 1581-6.
- Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle RL, Bartke I, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H, Hohlfeld R. 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* 1999; 189: 865-70.
- Kieseier BC, Wiendl H. Multiple sclerosis: advances, excitements, disenchantments. *Lancet Neurol* 2006; 5: 2-3.
- Kitagawa K, Matsumoto M, Mabuchi T, Yagita Y, Ohtsuki T, Hori M, Yanagihara T. Deficiency of intercellular adhesion molecule 1 attenuates microcirculatory disturbance and infarction size in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18: 1336-45.
- Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 2008; 38: 96-109.
- Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. *Science* 1970; 169: 1095-7.
- Klebanoff SJ, Waltersdorff AM, Rosen H. Antimicrobial activity of myeloperoxidase. *Methods Enzymol* 1984; 105: 399-403.
- Kleinschnitz C, Bendszus M, Frank M, Solymosi L, Toyka KV, Stoll G. In vivo monitoring of macrophage infiltration in experimental ischemic brain

- lesions by magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23: 1356-61.
- Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, Doerr H, Sommer C, Rivest S, Giese T, Veltkamp R. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med* 2009; 15: 192-9.
- Linker RA, Kroner A, Horn T, Gold R, Maurer M, Bendszus M. Iron particle-enhanced visualization of inflammatory central nervous system lesions by high resolution: preliminary data in an animal model. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006; 27: 1225-9.
- Lo EH, Moskowitz MA, Jacobs TP. Exciting, radical, suicidal: how brain cells die after stroke. *Stroke* 2005; 36: 189-92.
- Loddick SA, Rothwell NJ. Neuroprotective effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in focal cerebral ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16: 932-40.
- Lutterotti A, Berger T, Reindl M. Biological markers for multiple sclerosis. *Curr Med Chem* 2007; 14: 1956-65.
- Mansfield P. Snapshot magnetic resonance imaging (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 2004; 43: 5456-64.
- Marquez LA, Dunford HB. Mechanism of the oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine by myeloperoxidase determined by transient- and steady-state kinetics. *Biochemistry* 1997; 36: 9349-55.
- Misgeld T, Kerschensteiner M. In vivo imaging of the diseased nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 449-63.
- Nagra RM, Becher B, Tourtellotte WW, Antel JP, Gold D, Paladino T, Smith RA, Nelson JR, Reynolds WF. Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1997; 78: 97-107.
- Nahrendorf M, Sosnovik D, Chen JW, Panizzi P, Figueiredo JL, Aikawa E, Libby P, Swirski FK, Weissleder R. Activatable magnetic resonance imaging agent reports myeloperoxidase activity in healing infarcts and noninvasively detects the antiinflammatory effects of atorvastatin on ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2008; 117: 1153-60.
- Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 2007; 204: 3037-47.
- Nessler S, Boretius S, Stadelmann C, Bittner A, Merkler D, Hartung HP, Michaelis T, Brück W, Frahm J, Sommer N, Hemmer B. Early MRI changes in a mouse model of multiple sclerosis are predictive of severe inflammatory tissue damage. *Brain* 2007; 130: 2186-98.
- Niethammer P, Grabher C, Look AT, Mitchison TJ. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* 2009; 459: 996-9.
- Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000; 343: 938-52.

- Oksenberg JR, Baranzini SE, Sawcer S, Hauser SL. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nat Rev Genet* 2008; 9: 516-26.
- Olerup O, Hillert J. HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* 1991; 38: 1-15.
- Perricone C, De Carolis C, Perricone R. Glutathione: a key player in autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2009; 8: 697-701.
- Petry KG, Boiziau C, Dousset V, Brochet B. Magnetic resonance imaging of human brain macrophage infiltration. *Neurotherapeutics* 2007; 4: 434-42.
- Pittet MJ, Swirski FK, Reynolds F, Josephson L, Weissleder R. Labeling of immune cells for in vivo imaging using magnetofluorescent nanoparticles. *Nat Protoc* 2006; 1: 73-9.
- Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 2005; 58: 840-6.
- Querol M, Chen JW, Bogdanov AA, Jr. A paramagnetic contrast agent with myeloperoxidase-sensing properties. *Org Biomol Chem* 2006; 4: 1887-95.
- Querol Sans M, Chen JW, Weissleder R, Bogdanov AA, Jr. Myeloperoxidase activity imaging using (67)Ga labeled substrate. *Mol Imaging Biol* 2005; 7: 403-10.
- Rausch PG, Moore TG. Granule enzymes of polymorphonuclear neutrophils: A phylogenetic comparison. *Blood* 1975; 46: 913-9.
- Rodriguez E, Nilges M, Weissleder R, Chen JW. Activatable magnetic resonance imaging agents for myeloperoxidase sensing: mechanism of activation, stability, and toxicity. *J Am Chem Soc*; 132: 168-77.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, Rahmani Z, Krizus A, McKenna-Yasek D, Cayabyab A, Gaston SM, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Herzfeldt B, van den Bergh R, Hung WY, Bird, T Deng G, Mulder DW, Smyth C, Laing NG, Soriano E, Pericak-Vance MA, Haines, J, Rouleau GA, Gusella JS, Horvitz HR, Brown RH. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993; 362: 59-62.
- Sa de Camargo EC, Koroshetz WJ. Neuroimaging of ischemia and infarction. *NeuroRx* 2005; 2: 265-76.
- Saleh A, Schroeter M, Jonkmanns C, Hartung HP, Modder U, Jander S. In vivo MRI of brain inflammation in human ischaemic stroke. *Brain* 2004; 127: 1670-7.
- Schirmer L, Albert M, Buss A, Schulz-Schaeffer WJ, Antel JP, Bruck W, Stadelmann C. Substantial early, but nonprogressive neuronal loss in multiple sclerosis (MS) spinal cord. *Ann Neurol* 2009; 66: 698-704.
- Shuaib A, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, Diener HC, Ashwood T, Wasiewski WW, Emeribe U; SAINT II Trial Investigators. NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2007; 357: 562-71.

- Sibley WA, Bamford CR, Clark K. Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* 1985; 1: 1313-5.
- Simon JH, Kleinschmidt-DeMasters BK. Variants of multiple sclerosis. *Neuroimaging Clin N Am* 2008; 18: 703-16, xi.
- Stroh A, Zimmer C, Werner N, Gertz K, Weir K, Kronenberg G, Steinbrink J, Mueller S, Sieland K, Dirnagl U, Nickenig G, Endres M. Tracking of systemically administered mononuclear cells in the ischemic brain by high-field magnetic resonance imaging. *Neuroimage* 2006; 33: 886-97.
- Thrower BW. Relapse management in multiple sclerosis. *Neurologist* 2009; 15: 1-5.
- Trapp BD, Ransohoff R, Rudick R. Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Curr Opin Neurol* 1999; 12: 295-302.
- van Dorsten FA, Hata R, Maeda K, Franke C, Eis M, Hossmann KA, Hoehn M. Diffusion- and perfusion-weighted MR imaging of transient focal cerebral ischaemia in mice. *NMR Biomed* 1999; 12: 525-34.
- Vartanian TK, Zamvil SS, Fox E, Sorensen PS. Neutralizing antibodies to disease-modifying agents in the treatment of multiple sclerosis. *Neurology* 2004; 63: S42-9.
- Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 2005; 39: 359-407.
- Wang W, Fang H, Groom L, Cheng A, Zhang W, Liu J, Wang X, Li K, Han P, Zheng M, Yin J, Wang W, Mattson MP, Kao JP, Lakatta EG, Sheu SS, Ouyang K, Chen J, Dirksen RT, Cheng H. Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell* 2008; 134: 279-90.
- Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J, Lassmann H, Linington C. Animal models. *Ann Neurol* 1994; 36 Suppl: S47-53.
- Wintermark M, Albers GW, Alexandrov AV, Alger JR, Bammer R, Baron JC, Davis S, Demaerschalk BM, Derdeyn CP, Donnan GA, Eastwood JD, Fiebach JB, Fisher M, Furie KL, Goldmakher GV, Hacke W, Kidwell CS, Kloska SP, Köhrmann M, Koroshetz W, Lee TY, Lees KR, Lev MH, Liebeskind DS, Ostergaard L, Powers WJ, Provenzale J, Schellinger P, Silbergleit R, Sorensen AG, Wardlaw J, Wu O, Warach S. Acute stroke imaging research roadmap. *Stroke* 2008; 39: 1621-8.
- Zimmer C, Weissleder R, Poss K, Bogdanova A, Wright SC, Jr., Enochs WS. MR imaging of phagocytosis in experimental gliomas. *Radiology* 1995; 197: 533-8.