

# **Magnet Resonanz Tomographie (MRT) von Myeloperoxidase im Mausmodell der Multiplen Sklerose und cerebralen Ischämie**

Bewerbungsschrift um den Kurt Decker Preis 2008  
der deutschen Gesellschaft für Neuroradiologie

**Michael Breckwoldt<sup>1,2</sup>**, Claus Zimmer<sup>1</sup>, John Chen<sup>2</sup>, Ralph  
Weissleder<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Abteilung für Neuroradiologie, Klinikum rechts der Isar, Technische  
Universität München

<sup>2</sup> Center for Molecular Imaging Research (CMIR)  
Harvard Medical School, Massachusetts General Hospital, Boston

# Inhaltsverzeichnis

<b>Präambel</b>	<b>3</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>5</b>
<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>Methoden</b>	<b>10</b>
1.1. Modell der Experimentellen Autoimmunen Encephalomyelitis	10
1.2. Modell der Cerebralen Ischämie	10
1.3. Kontrastmittel und Synthese von MPO-Gadolinium	11
1.4. Magnet Resonanz Tomographie	11
1.5. Histologie und Immunhistochemie	12
1.6. Quantifizierung der Demyelinisierung	12
1.7. Doppelimmunfluoreszenz-Färbungen und Konfokale Mikroskopie	13
1.8. Quantifizierung der Immunhistochemie	13
1.9. Western Blot	13
1.10. MPO Aktivitäts-Assays	14
1.11. Semiquantitative Real Time PCR	14
1.12. Messung der MPO Expression in vitro	15
1.13. Statistische Analysen	15
<b>Ergebnisse: Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis</b>	<b>17</b>
1.1. Die Höhe der MPO Expression korreliert mit dem Erkrankungsstadium	17
1.2. Die MRT mit MPO-Gd stimmt mit immunhistochemischen Befunden überein	18
1.3. MPO wird stark von Makrophagen/Mikroglia exprimiert	20
1.4. MPO-Gd zeigt mehr und kleinere Läsionen als Gd-DTPA	21
1.5. Das Signal durch MPO-Gd korreliert mit dem Grad der Demyelinisierung	23

<b>Ergebnisse: Cerebrale Ischämie</b>	<b>25</b>
1.1.	
Die MRT mit MPO-Gd zeigt ein höheres Signal als Gd-DTPA	25
1.2.	
Die Bildgebung mit MPO-Gd erlaubt die sequentielle Darstellung des Infarkts	26
1.3.	
Erstellung eines zeitlichen Entzündungsprofils mithilfe der MRT	27
1.4.	
Die MPO Expression zeigt ihre höchsten Werte an Tag drei	28
1.5.	
MPO wird sowohl von Makrophagen/Mikroglia wie Neutrophilen exprimiert	29
1.6.	
Quantifizierung der MPO Aktivität in vitro	31
<b>Diskussion</b>	<b>32</b>
<b>Danksagung</b>	<b>36</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>37</b>

## Präambel

Die Visualisierung von spezifischen Parametern der cerebralen Inflammation ist bisher mittels Magnet Resonanz Tomographie (MRT) 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 bekanntlich 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.

Ein Ansatz zur Verbesserung könnte in der MR-tomographischen Darstellung von Myeloperoxidase (MPO) liegen. MPO ist ein Enzym, das bei diversen Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle spielt und von aktivierten Neutrophilen und Makrophagen stark exprimiert wird. In wie weit es für die Bildgebung mit dem neuen funktionellen MR Kontrastmittel MPO-Gd genutzt werden kann, soll im Folgenden untersucht werden.

## 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 (EAE) 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 min nach Applikation des MPO Sensors lässt sich die Entzündungsaktivität durch starke, persistierende Kontrastverstärkung bestätigen. Mittels MRT mit Gd-DTPA lassen sich nach 6 Minuten eher diffuse Hyperintensitäten darstellen, wobei das Kontrastmittel anschließend sukzessive ausgewaschen wird. Areale hoher MR Kontrastverstärkung in der MPO Bildgebung korrelieren gut mit den Regionen mit 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 semi quantitative 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 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.

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 persistierende hohe Kontrastverstärkung bestätigen, während zu dieser Zeit Gd-DTPA bereits annähernd 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 spezifisch *in vivo* zu visualisieren.

## Einleitung

Das Thema der Arbeit ist die „molekulare“ Magnet Resonanz Tomographie von Myeloperoxidase als Entzündungsmarker bei der Experimentellen Autoimmunen Encephalomyelitis als Modell der Multiplen Sklerose (MS) sowie bei cerebraler Ischämie. Entzündliche, demyelinisierende Plaques stehen im Mittelpunkt der MS (primär entzündliche Erkrankung). Während bisher nicht verstanden ist, was die entzündliche Kaskade auslöst, die zur Demyelinisierung führt, so wird doch in letzter Zeit immer klarer, dass mononukleäre Zellen (Makrophagen und Mikroglia) durch die Produktion hochreaktiver Sauerstoffradikale als Effektorzellen ganz wesentlich zur direkten Schädigung von Myelin beitragen <sup>1</sup>.

Auch nach dem hypoxischen Schaden der cerebralen Ischämie kommt es zu einer massiven Rekrutierung von Entzündungszellen (sekundär entzündliche Reaktion), die einerseits den Zell Detritus phagozytieren, andererseits aber auch durch die Produktion von Radikalen zu zusätzlichem „inflammatorischem Schaden“ führen <sup>2</sup>. So zeigen experimentelle Ischämie Modelle, dass durch eine Unterdrückung der inflammatorischen Reaktion nach Schlaganfall (z.B. durch Blockade der Neutrophileninfiltration mit Hilfe eines ICAM Antikörpers <sup>3</sup> oder die Unterdrückung von pro-entzündlichen molekularen Reaktionen<sup>4</sup>) die Infarktgröße signifikant verkleinert werden kann (30 bis 60%). Warum anti-entzündliche Therapiestudien bei der klinischen Schlaganfallbehandlung bisher keinen Erfolg zeigten, ist Thema der aktuellen Diskussion <sup>5</sup>.

MPO spielt im Entzündungsgeschehen eine zentrale Rolle. Es wird von Makrophagen und Neutrophilen beim oxidativen Burst sezerniert. Zuerst wurde seine Rolle bei der Pathogenabwehr beschrieben, bei der Bakterienwände durch freigesetzte Radikale lysiert werden <sup>6</sup>. In den letzten Jahren wurden jedoch auch wichtige Funktionen von MPO bei „sterilen Entzündungsvorgängen“ gefunden<sup>7, 8</sup>, bei denen die angeborene zelluläre Immunabwehr im Mittelpunkt steht. Neben Erkrankungen wie der Arteriosklerose und dem Myokardinfarkt kommt MPO auch

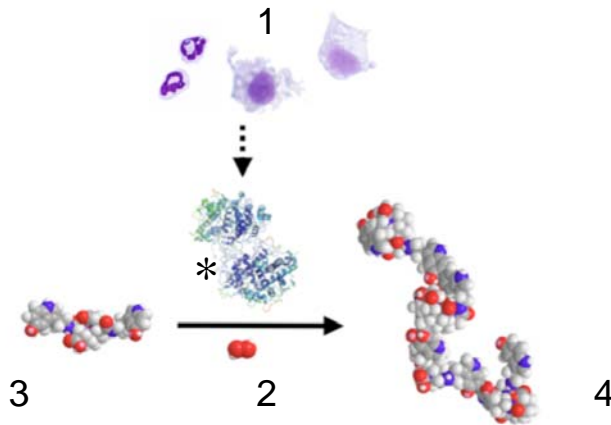
in der akuten wie der chronischen Phase der MS sowie in der subakuten Phase der cerebralen Ischämie eine wichtige Rolle zu <sup>9-11</sup>. Dabei trägt sie zur direkten Schädigung von Nervengewebe durch die Bildung von reaktiven Sauerstoff Radikalen (ROS) wie Hypochlorid (HCl), Superoxid ( $O_2^-$ ) und Stickstoffoxid ( $NO^·$ ) bei, die dann durch Membranperoxidation und direkte DNA-Schädigung zu Apoptose und Nekrose führen können.

Kontrastmittel (KM) für die Magnetresonanz Tomographie stellen eine Möglichkeit dar „pathophysiologische Vorgänge“ auf molekularer und zellulärer Ebene zu visualisieren. Die Anreicherung von Gd-DTPA (Magnavist®) im Hirnparenchym zeigt eine Störung der Blut-Hirnschranke (BHS) an. Eine Beeinträchtigung der BHS ist ein sekundäres Phänomen bei einer Reihe von ZNS-Erkrankungen. Gd-DTPA Bildgebung besitzt somit eine eingeschränkte Spezifität.

Neuere 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 <sup>12, 13</sup>. Auch andere Immuneffektorzellen wie T-Zellen wurden auf diese Weise beladen und deren Migration studiert <sup>14</sup>.

In unseren Studien kam das aktivierbare molekulare Kontrastmittel bis-5HT-DTPA-Gd (MPO-Gd) zum Einsatz MPO-Gd wird von dem Entzündungsenzym Myeloperoxidase (MPO), das von aktivierten Entzündungszellen wie Makrophagen/Mikroglia und Neutrophilen freigesetzt wird, spezifisch gebunden und aktiviert. (Abb.1).





**Abb. 1) Wirkungsmechanismus von MPO-Gd**

Myeloperoxidase (\*) wird von Neutrophilen und Makrophagen/Mikroglia (1) exprimiert. Nach Sekretion in den Extrazellulärraum führt es zur Radikalbildung u.a. von Superoxid ( $O_2^-$ ) (2). Das Enzym kann auch Hydroxygruppen (OH) direkt als Substrat nutzen wie sie MPO-Gd (3) in seinen zwei Serotoninresten besitzt. Durch die Radikalisierung von mehreren KM-Molekülen können diese zu bis zu 5 Untereinheiten oligomerisieren und so die T1 Relaxationszeit verkürzen (4).

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 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 längere Nachweisbarkeit. Gd-DTPA wäscht hingegen über die Zeit rasch aus.

Bisher wurde MPO-Gd vor allem *in vitro* etabliert und getestet <sup>15, 16</sup>. Die vorliegende Bewerbungsschrift fasst zwei Arbeiten zusammen, in denen dieser aktivierbare Entzündungsmarker erstmals in zwei relevanten ZNS-Krankheitsmodellen zum Einsatz kommt: bei der Experimentellen Autoimmunen Encephalomyelitis<sup>17</sup> sowie bei der cerebralen Ischämie.<sup>18</sup>

## Methoden

### ***Modell 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 H<sub>2</sub>O und komplettem Freuds Adjuvant (Sigma-Aldrich, MO) gelöst waren, induziert<sup>19</sup>. Dafür wurden 2 mg PLP und 8 mg *M. tuberculosis* in 1 ml H<sub>2</sub>O 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 H<sub>2</sub>O 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

### ***Modell der cerebralen Ischämie***

Die cerebrale Ischämie wurde bei 40 C57 Black 6 Wildtypmäusen (Gewicht: 25 g ± 2.7 g) 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<sup>20</sup>.

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 Wärmeplatte während und nach der Operation konstant

gehalten. Als Kontrollgruppe wurden Tiere genutzt, bei denen die gleiche Operation, jedoch ohne Fadenschluß, durchgeführt wurde (n=6). Alle Narkosen wurden mit Isofluran gemacht. Tiere, die im Verlauf der Experimente eine intracerebrale Blutung entwickelten, wurden aus der Studie ausgeschlossen (n=5).

### ***Kontrastmittel und Synthese von MPO-Gadolinium***

Das MPO sensitive Kontrastmittel MPO-Gd (bis-5-Hydroxytryptamid-Diethylenetriamin-Pentaacetat Gadolinium = bis-5HT-DTPA-Gd) wurde in beiden Studien genutzt. Details der Synthese finden sich im Protokoll von Querol et al. (2006)<sup>16</sup>. Kurz zusammengefasst, wurde für die Synthese DTPA Bisanhydrid 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 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 MRT Beginn über die Schwanzvene injiziert wurden.

### ***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 ( $15.1 \pm 8.5$  h) gescannt, nachdem sichergestellt war, dass das vorige Kontrastmittel ausgewaschen war (Blut Halbwertszeit von MPO-Gd und Gd-DTPA:  $5.4 \pm 0.9$  min). Die Tiere wurden in Gruppen randomisiert und entweder mit Gd-DTPA oder MPO-Gd zuerst gescannt. Wo nicht anders angegeben wurden die Tiere am Maximum der Erkrankung gemessen (Stadium 2 und 3) und nach der MRT für immunhistochemische Korrelationen getötet. Isofluran wurde für die Anästhesie verwendet (0.5-3%).

### ***Histologie und Immunhistochemie***

Nach Abschluss der MRT Experimente wurden die Tiere sofort in tiefer Isoflurannarkose durch zervikale Dislokation getötet, das Gehirn entnommen und dieses in O.C.T (Tissue Tek<sup>®</sup>) schockgefroren. 5  $\mu$ 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.

### ***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.

### ***Doppelimmunfluoreszenz-Färbungen***

Doppelfärbungen für MPO, Makrophagen und Neutrophile wurden mit den oben beschriebenen Erstantikörper durchgeführt und die Sekundärantikörper 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.

### ***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). 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.

### ***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  $\beta$ -Aktin und Glyceraldehyd Dehydrogenase genutzt (1:5000 Kaninchen anti- $\beta$ -Aktin, Abcam, MA, 1:5000 Kaninchen anti-GAPDH, Rockland, PA). Die Visualisierung erfolgte mit Chemiluminescence. 30 $\mu$ g Protein wurde geladen. GAPDH und  $\beta$ -Aktin wurden als Ladungskontrollen verwendet.

### ***MPO Aktivitäts-Assays***

Um die MPO Aktivität im Gewebe zu quantifizieren wurde die Methode nach Klebanoff et al.<sup>21</sup> 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 $\mu$ 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;  $\Delta OD$  = Absorptionsänderung;  $V_t$  = Gesamtvolumen;  $V_s$  = Sample Volumen; E = Extinktionskoeffizient = 26.6 mM;  $\Delta t$  = Zeitänderung

Weiterhin wurde die MPO Aktivität mit dem Tetramethylbenzidin (TMB) Assay bestimmt wie von Marquez und Dunford<sup>22</sup> 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.

### ***Semiquantitative Real Time PCR***

Die RNA wurde aus den infarzierten Hemisphären der Ischämietiere sowie 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).

### ***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) exprimieren können, wurden beide Zellpopulationen nach dem Protokoll von Boxio et al.<sup>23</sup> 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% CO<sub>2</sub> 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<sup>6</sup> Zellen normalisiert.

### ***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 (CNR<sub>60/6</sub>). Dieser „Auswertungsalgorithmus“ bezieht frühe Kontrastverstärkung,

mit ein und setzt sie in ein Verhältnis zur lang anhaltenden Kontrastverstärkung nach 60 Minuten.

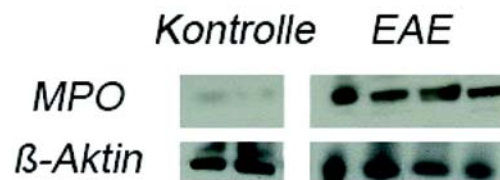
P-Werte  $< 0.05$  wurden als signifikant angesehen und alle Daten mit dem Student t-test verglichen. In den Abbildungen wurde der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Für alle statistischen Berechnungen wurde PRISM 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) verwendet.



# Ergebnisse 1: Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis

## Die Höhe der MPO Expression korreliert mit dem Erkrankungsstadium

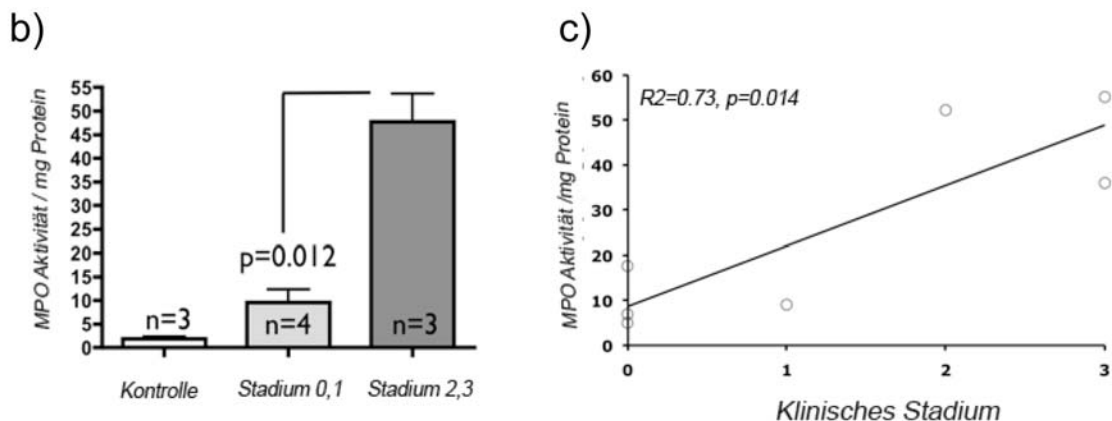
Western Blot Analysen der an EAE erkrankten Tiere zeigen hohe MPO Level im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb.2a).



**Abb. 2a) Western Blot von MPO bei EAE**

Tiere, bei denen EAE induziert wurde, zeigen eine starke MPO Expression im Hirngewebe, wohingegen MPO in der Kontrollgruppe kaum nachgewiesen wird. β-Aktin ist als Ladungskontrolle aufgetragen.

Bei der quantitativen Messung der MPO Aktivität mit dem Guaiacol Assay wird deutlich, dass die MPO Level vom Erkrankungsstadium des Tieres abhängen (Abb.2b/c) und eine gute Korrelation zwischen beiden Faktoren besteht ( $R^2 = 0.73$ ,  $p < 0.014$ ).

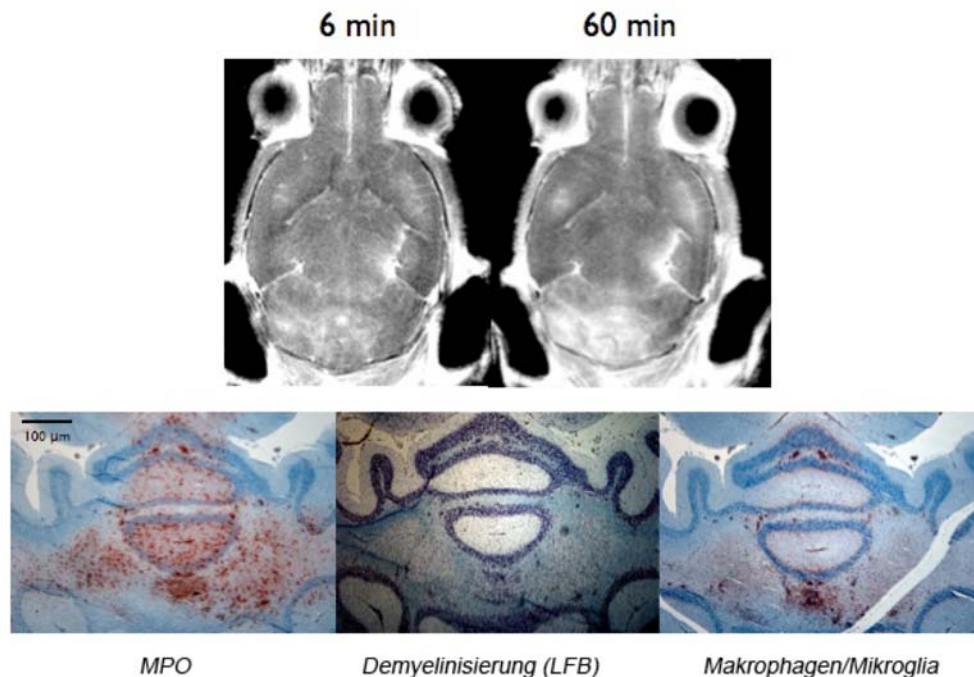


**Abb. 2b/c) Quantitative MPO Aktivitäts-Messung mit dem Guaiacol Assay**

MPO wird in den einzelnen Krankheitsstadien unterschiedlich stark exprimiert. Während in der Kontrollgruppe nur sehr wenig MPO gefunden wird, steigt die MPO Aktivität um ein vielfaches in den späteren Stadien an (b). Es findet sich eine gute Korrelation zwischen MPO Aktivität und Erkrankungsstadium (c) ( $R^2 = 0.73$ ,  $p = 0.014$ ).

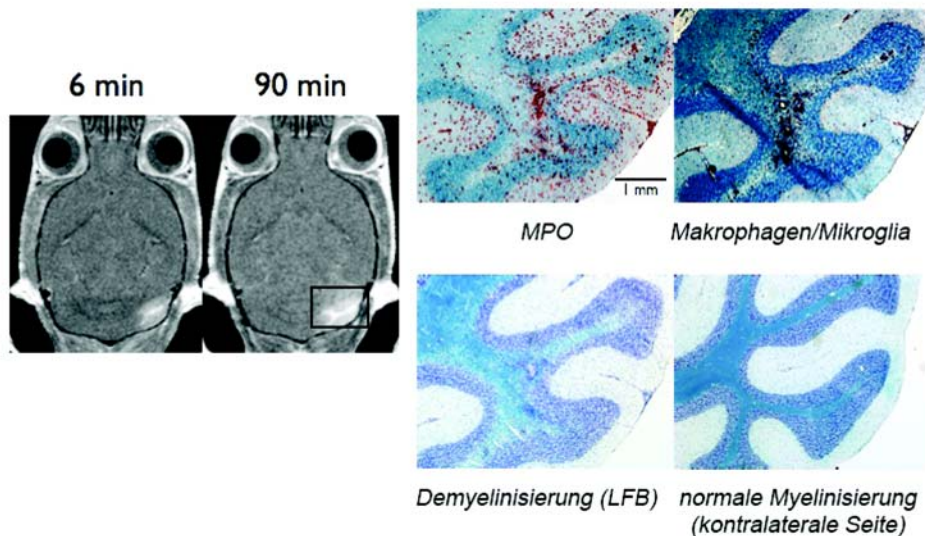
### ***Die MRT mit MPO-Gd stimmt gut mit immunhistochemischen Befunden überein***

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 6 Minuten nach Kontrastmittelgabe als hyperintense kontrastmittelaufnehmende Herde deutlich 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 demyelinisierenden Plaques, in denen die Myelin Anfärbung durch die Luxol Fast Blue Färbung fehlt und die massiv von Makrophagen 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.3a), das an Tag 7 nach EAE Induktion gescannt wurde.

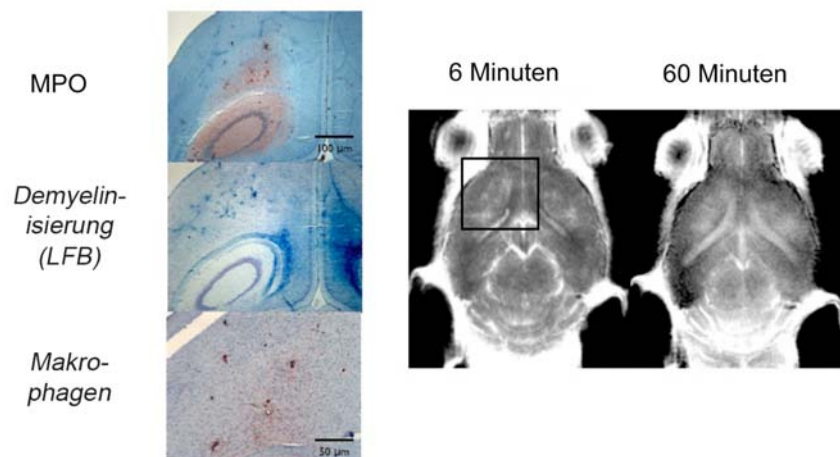


**Abb. 3a) Die MPO Bildgebung korreliert gut mit den immunhistochemischen Analysen**  
6 Minuten nach MPO-Gd Gabe zeigen sich in der T1 gewichteten MRT diffuse Läsionen im Cerebellum und Mittelhirn. Die persistierende Kontrastverstärkung nach 60 Minuten weist auf eine starke Entzündung in diesem Gebiet hin, die mit der Immunhistochemie bestätigt wird. MPO und Makrophagen finden sich weit verstreut im Cerebellum. Diese Region imponiert auch durch starke Demyelinisierung in der Luxol Fast Blue Färbung.

Ein anderes Tier, das klinisch noch keine Symptome zeigte, weist eine stark entzündete, solitäre Läsion im Cerebellum auf (Abb.3b). Bei einem weiteren Tier fanden sich neben einer massiven cerebellären Kontrastmittelaufnahme diffuse kortikale Läsionen, die sich immunhistochemisch bestätigen ließen (Abb.3c).



**Abb. 3b)** Es zeigt sich in der MRT mit MPO-Gd eine solitäre Läsion im linken Cerebellum. Die entsprechenden Schnitte weisen eine starke MPO Expression auf sowie viele Makrophagen/Mikroglia. Die Luxol Fast Blue Färbung zeigt eine diskrete Demyelinisierung in diesem Bereich, während die kontralaterale Seite ohne pathologischen Befund ist.

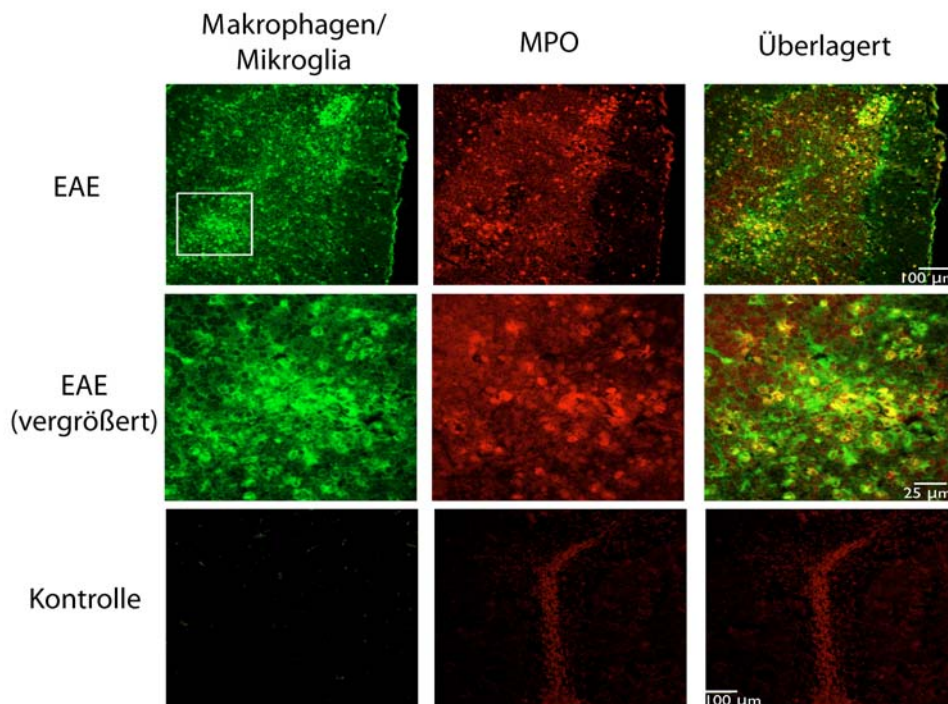


**Abb. 3c) Auch kortikale Läsionen finden sich in diesem EAE Modell**

In diesem Tier zeigen sich in der MRT mit MPO-Gd neben einer starken cerebellären Entzündung diffuse Plaques im Kortex, die sich immunhistochemisch durch großflächige MPO positive Areale und eine entsprechende Demyelinisierung bestätigen.

### ***MPO wird stark von Makrophagen/Mikroglia exprimiert***

In der konfokalen Doppelfluoreszenz Mikroskopie mit Antikörpern gegen MPO und Makrophagen 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 Mac positive Zellen nachweisbar, die keine MPO exprimieren (Abb. 4). Insgesamt sind vor allem perivaskuläre Bereiche entzündet, wobei auch der Kortex von MPO-exprimierenden Makrophagen infiltriert ist.

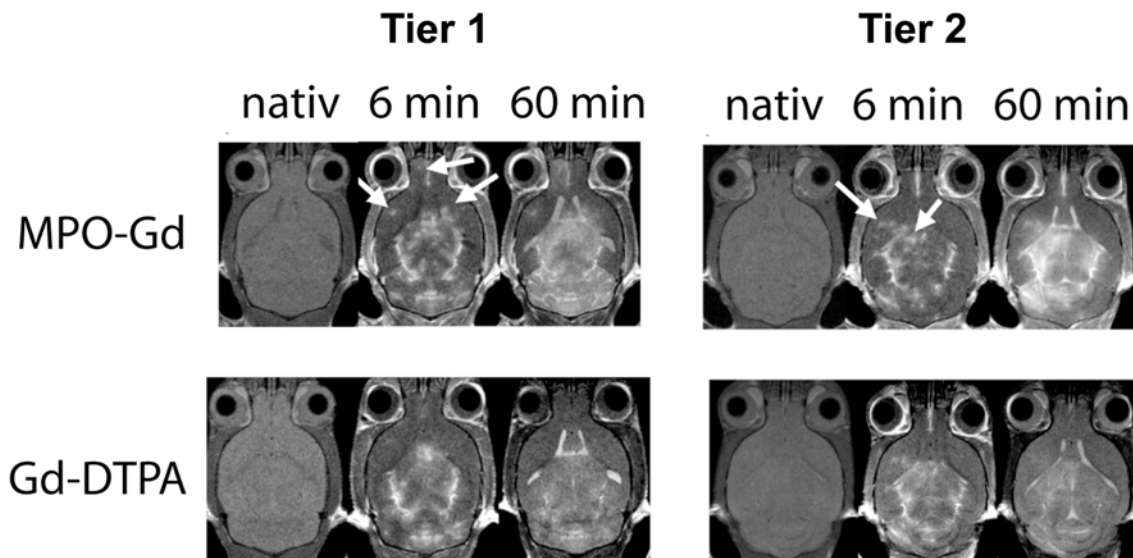


#### **Abb. 4) Makrophagen/Mikroglia sind die alleinige Quelle von MPO**

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 der selben Maus im kontralateralen Cerebellum gezeigt.

### **MPO-Gd zeigt mehr und kleinere Läsionen als Gd-DTPA**

Bei der vergleichenden Bildgebung von EAE Plaques mit den unterschiedlichen Kontrastmitteln im selben Tier findet sich, dass im ersten Bild 6 Minuten nach Kontrastmittelgabe deutlich mehr und kleinere Läsionen von MPO-Gd dargestellt werden als von Gd-DTPA. Auch zeigt MPO-Gd eine klarere Abgrenzbarkeit von Läsionen. 60 und 90 Minuten nach Kontrastmittelinjektion, zeigt sich die verlängerte Pharmakokinetik von MPO-Gd, wodurch sich die Entzündungsaktivität der Läsionen validieren lässt, während Gd-DTPA zu diesen Zeitpunkten schon weitestgehend ausgewaschen ist (Abb.5a).



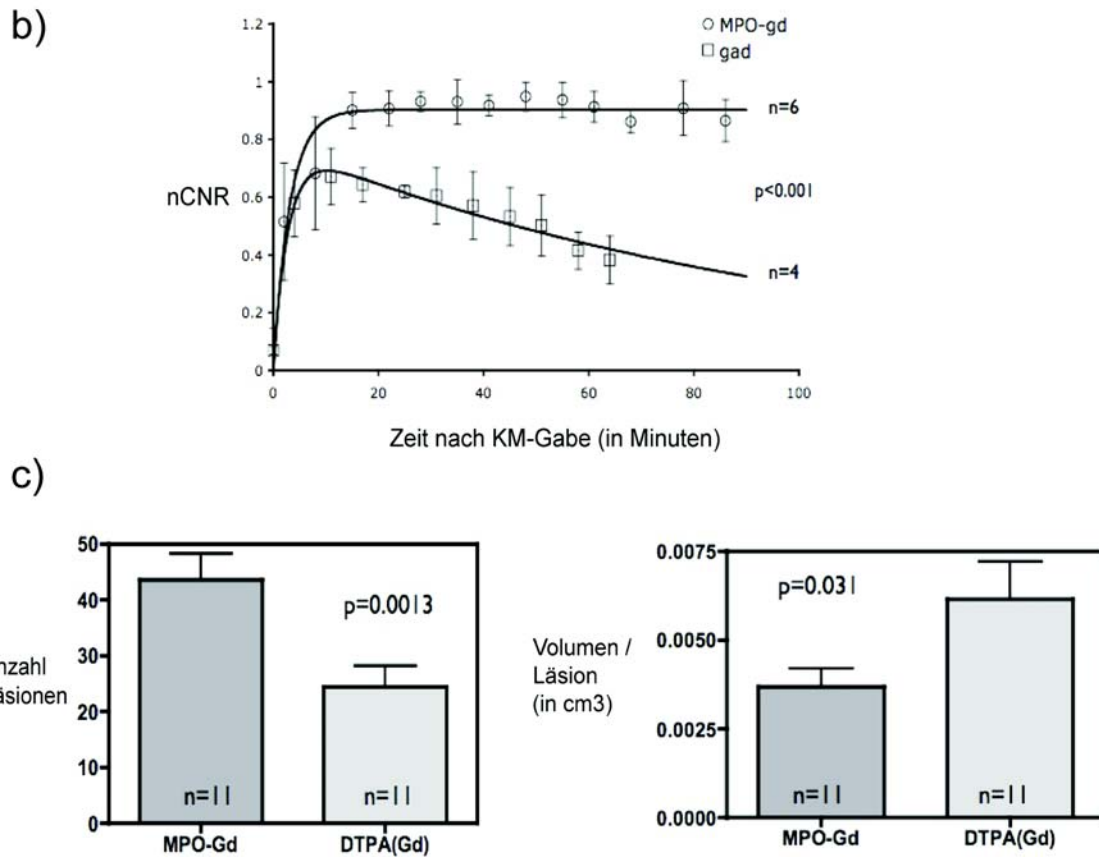
#### **Abb. 5a) MRT mit MPO-Gd im Vergleich zu Gd-DTPA in der gleichen Maus**

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 gut abgrenzbar. Nach 60 Minuten ist Gd-DTPA großteils ausgewaschen, während MPO-Gd am Ort der Entzündung eine persistierende, hohe Kontrastverstärkung zeigt. Die Pfeile weisen auf Läsionen hin die mit MPO-Gd dargestellt werden, nicht aber durch Gd-DTPA.

Die Quantifizierung der beiden Kontrastmittel über die Zeit macht deutlich, dass MPO-Gd bereits am Anfang ein stärkeres Signal ergibt, was über die Zeit unverändert hoch bleibt, während Gd-DTPA ausgewaschen wird und nach 60



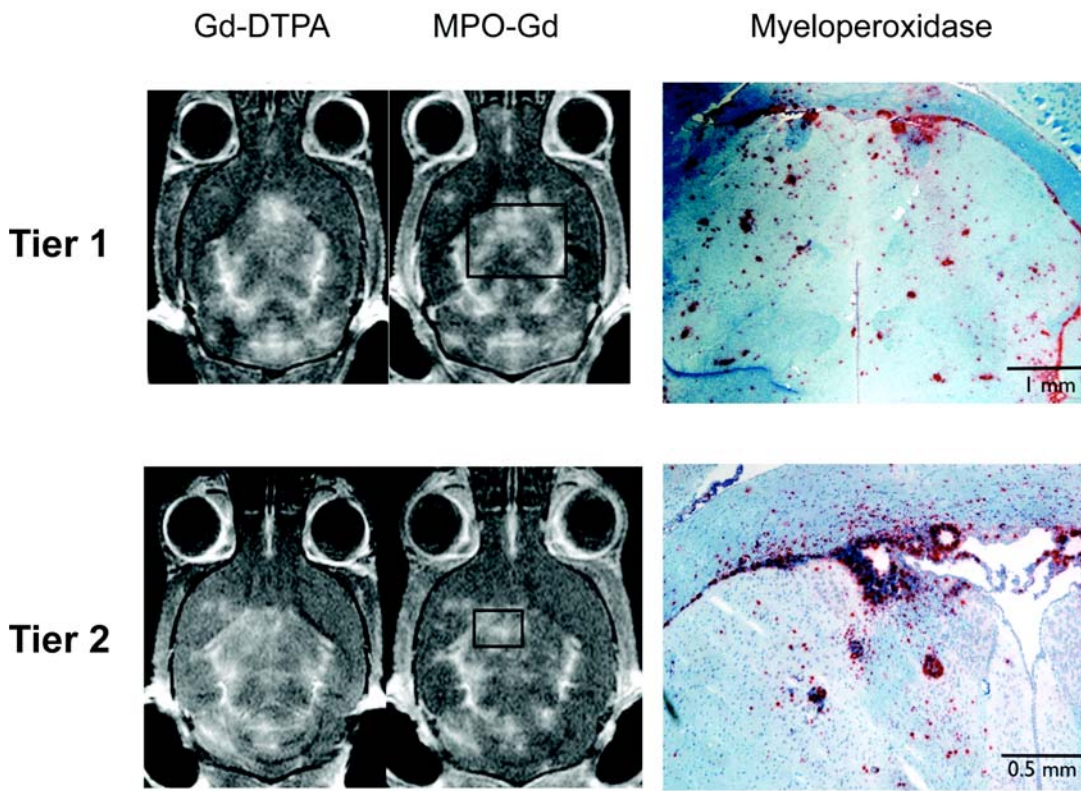
Minuten nur noch 40% der Stärke von MPO-Gd zeigt (Abb.5b,  $p < 0.001$ ). Auch zeigt sich der MPO-Gd signifikant mehr und kleinere Läsionen visualisiert als Gd-DTPA (Abb.5c,  $p = 0.001$ ).



**Abb. 5b/c) Quantifizierung von MPO-Gd und Gd-DTPA**

MPO-Gd erreicht schon nach 6 Minuten 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 (b). MPO-Gd stellt kleinere und mehr Läsionen dar als Gd-DTPA (c).

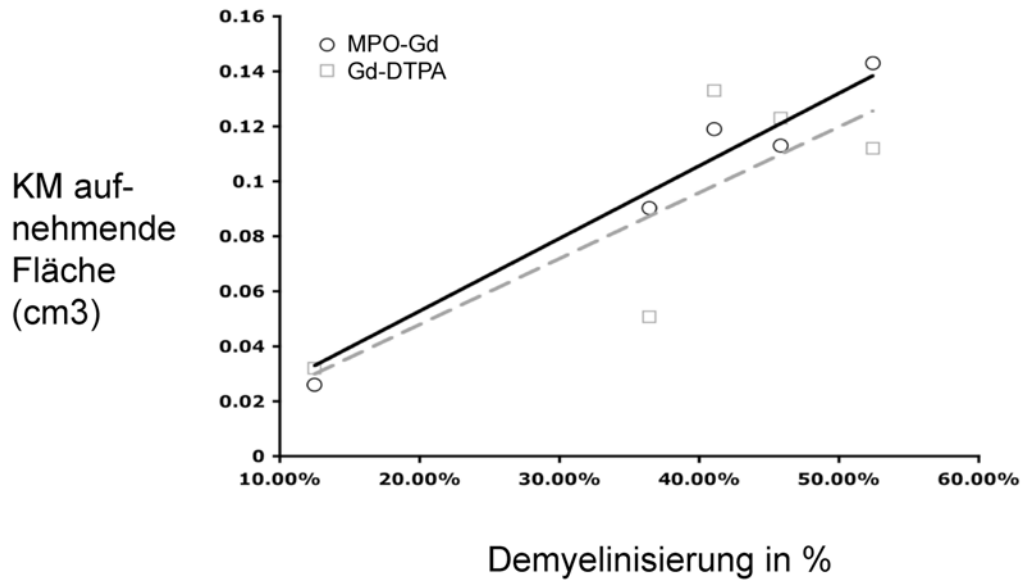
Betrachtet man mit immunhistochemischen Methoden Läsionen, die durch MPO-Gd, nicht aber durch Gd-DTPA visualisiert werden, zeigt sich in diesen Regionen eine starke MPO Expression, was für die Spezifität von MPO-Gd und den entzündlichen Charakter der Läsionen spricht. Dies ist mit Gd-DTPA nicht darstellbar (Abb.5d).



**Abb. 5d)** 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 durch MPO-Gd, nicht aber durch Gd-DTPA erkannt werden (Box), korrelieren in der immunhistochemischen Färbung mit vielen diffus verteilten MPO-positiven Zellen. Dies spricht dafür, dass die erkannten Plaques keine falsch positiven Hyperintensitäten sind, sondern MPO-Gd sensitiver beim Aufdecken von entzündlichen Plaques ist als Gd-DTPA.

### ***Das Signal durch MPO-Gd korreliert mit dem Grad der Demyelinisierung***

Eine weitere Kernfrage bei der MRT 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.6).



**Abb. 6) Die MRT mit MPO-Gd korreliert stark mit der Demyelinisierung**

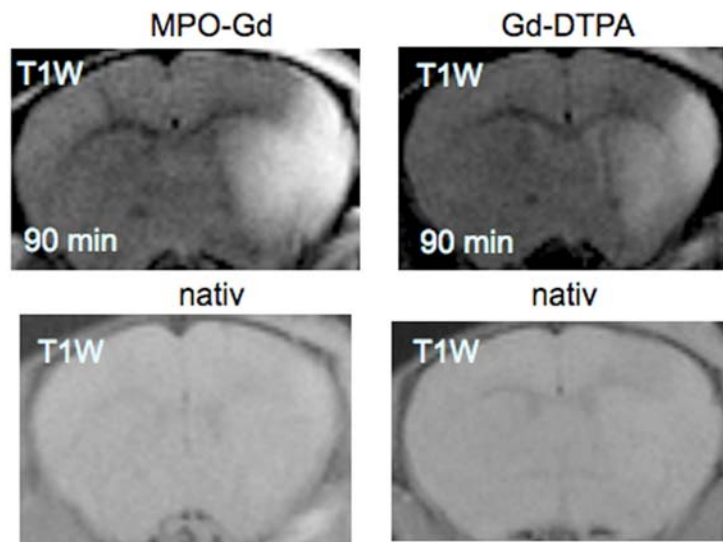
Die MPO Bildgebung korreliert besser mit dem histologischen Grad der Demyelinisierung (Luxol Fast Blue) als Gd-DTPA (MPO-Gd:  $R^2=0.96$ ,  $p=0.002$ ; Gd-DTPA:  $R^2=0.65$ ,  $p=0.098$ ). Hierfür wurden die MRT Aufnahmen und die korrespondierenden histologischen Schnitte quantifiziert und verglichen.



## Ergebnisse 2: Cerebrale Ischämie

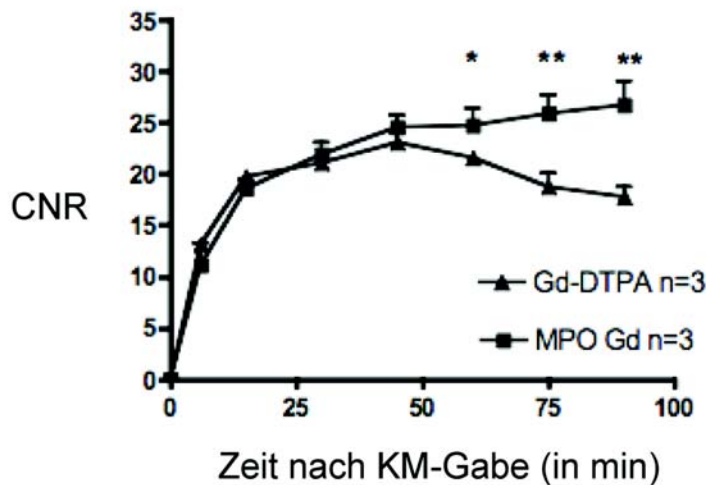
### ***Die MRT mit MPO-Gd zeigt ein höheres Signal als Gd-DTPA***

Im Modell der cerebralen Ischämie liefert MPO-Gd vor allem in den späten Sequenzen 60 Minuten nach Kontrastmittelgabe höhere Signal-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 6 Stunden versetzt mit den beiden Kontrastmitteln durchgeführt wurden (Abb.7a).



**Abb. 7a)** MPO-Gd zeigt höhere Signalintensitäten nach 90 Minuten in der gleichen Maus als Gd-DTPA. Die Ischämie stellt sich als hyperintenses Areal in den Basalganglien und im Kortex dar. In der nativen T1 gewichteten MRT lässt sich der Infarkt nicht abgrenzen.

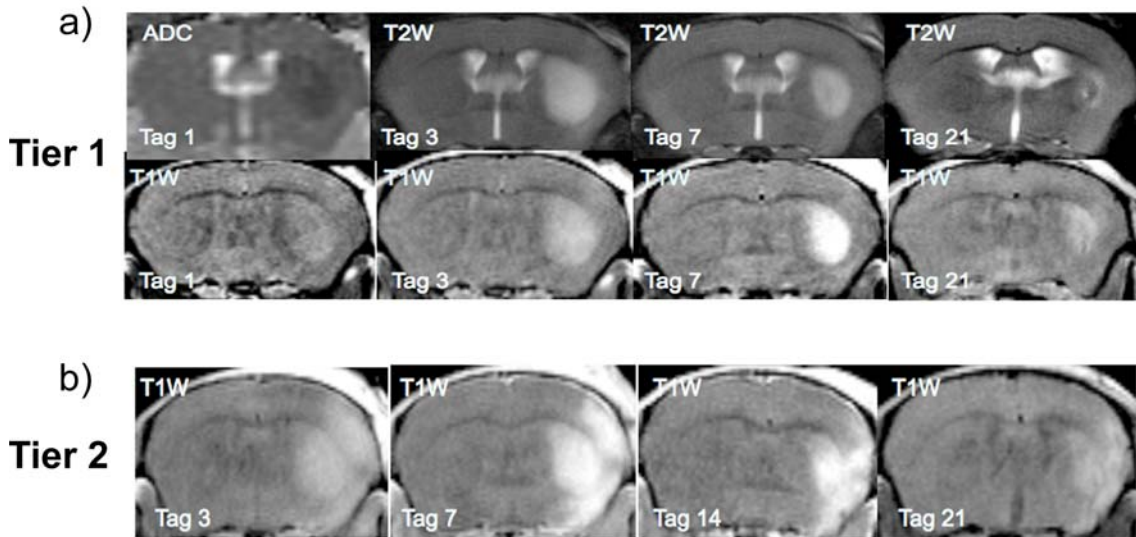
Quantifiziert man die Signalstärken der Kontrastmittel in einer Serie von Tieren (n=3) im zeitlichen Verlauf, zeigt sich, dass sich die Signal-zu-Rausch Verhältnisse anfangs ähneln und sich erst im zeitlichen Verlauf der Vorteil von MPO-Gd zeigt. So verbleibt MPO-Gd länger im infarzierten Areal und liefert 60 Minuten nach Kontrastmittelgabe ein signifikant stärkeres Signal ( $p=0.013$ ). Nach 90 Minuten ist das Signal von Gd-DTPA nur noch 65% so hyperintens wie das von MPO-Gd ( $p=0.001$ , Abb.7b).



**Abb. 7b)** 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 ( $p < 0.05$ ). Nach 90 Minuten bleibt vom Signal von Gd-DTPA noch 65% der MPO-Gd Kontrastverstärkung ( $p < 0.001$ ).

### ***Die Bildgebung mit MPO-Gd erlaubt die sequentielle Darstellung des Infarkts***

Mithilfe von Apparent Diffusion Coefficient (ADC) und T2 gewichteten Sequenzen lässt sich das ischämische Areal gut lokalisieren. 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.8a/b), wobei die Ausdehnung die Basalganglien sowie teilweise auch den Kortex mit einschließt.

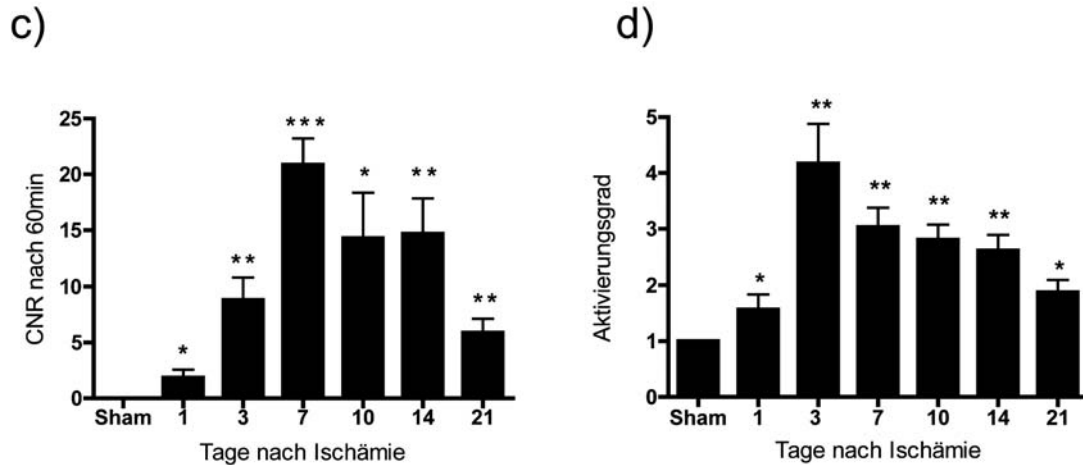


**Abb. 8a/b)** Gezeigt sind 2 repräsentative Tiere, die über drei Wochen hinweg mit dem MPO Sensor gescannt wurden. In der oberen Reihe sind zum Vergleich die entsprechenden ADC sowie T2 Sequenzen aufgeführt. Auch nach drei Wochen sind noch starke Hyperintensitäten im Infarktareal zu erkennen. Alle Kontrastmittelaufnahmen sind 60 Minuten nach Kontrastmittelinjektion entstanden.

### ***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.8c).

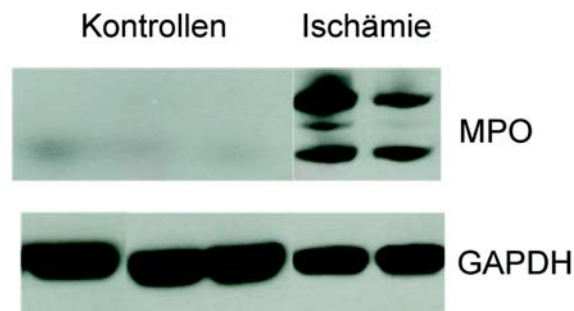
*In vitro* Tests wurden durchgeführt, um die Frage zu klären, welcher MRT Auswertungsalgorithmus die MPO Expression besser widerspiegelt.



**Abb. 8c/d)** Die Quantifizierung der Kontrastmittel MRT mit MPO-Gd zeigen unterschiedliche Ergebnisse. Die Kontrast-zu-Rausch Verhältnisse haben ihr Maximum an Tag 7 (c), während der Aktivierungsgrad an Tag drei seinen höchsten Punkt erreicht (d).

**Die MPO Expression zeigt ihre höchsten Werte an Tag drei**

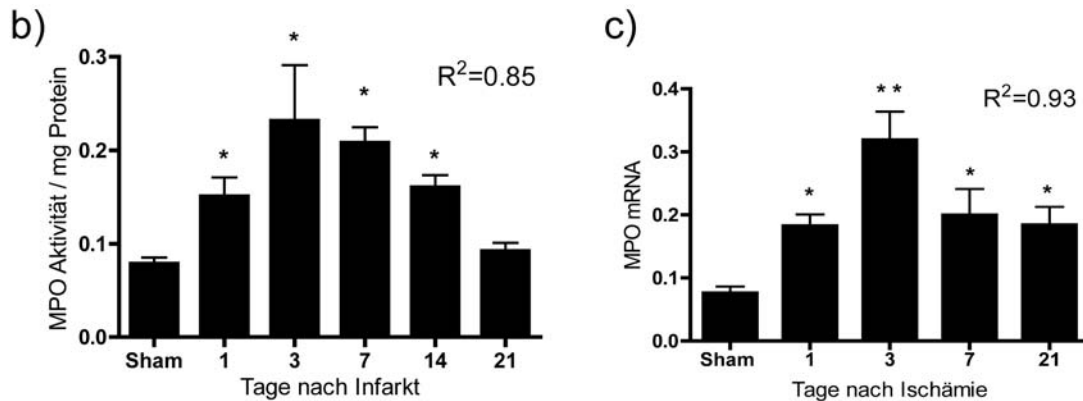
In weiteren *in vitro* Versuchen zur Validierung der MRT Ergebnisse wurden signifikante MPO Level durch Western Blot nur bei ischämischen Tieren, nicht jedoch in der Kontrollgruppe nachgewiesen (Abb.9a).



**Abb, 9a)** MPO wird stark in den ischämischen Hemisphären exprimiert, während keine Expression in der Kontrollgruppe vorliegt. Der MPO Antikörper bindet sowohl an das glykosilierte Vorläuferprotein (obere Bande) sowie an die schwere Kette von MPO (untere Bande). GAPDH dient als Ladungskontrolle.

In weiteren Quantifizierungsschritten wurde die MPO Aktivität mit dem TMB-Assay bestimmt. Hierbei lag die höchste MPO Expression mit einer 3-fachen Hochregulation an Tag drei ( $p < 0.05$ ) vor. Auch fand sich eine gute Korrelation mit dem MRT MPO Aktivierungsgrad ( $R^2 = 0.85$ , Abb.9b), wohingegen die Korrelation mit den absoluten Kontrast-zu-Rausch Verhältnissen schlechter war

( $R^2 = 0.65$ ). Diese Ergebnisse wurden anschließend durch eine semiquantitative 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.9c).



**Abb. 9b/c) Die *in vitro* Expressionsprofile von MPO entsprechen dem Verlauf des MRT Aktivierungsgrad**

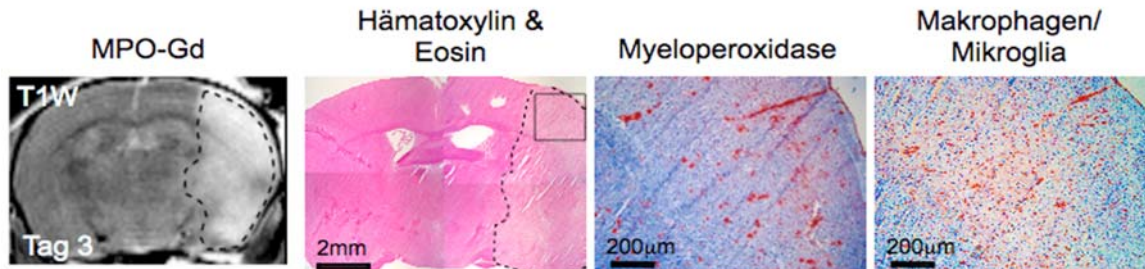
Der MPO Aktivitäts-Assay mit TMB und der MPO mRNA Verlauf zeigen ein ähnliches Profil. Die höchsten Expressionsraten sind an Tag drei zu finden ( $p < 0.05$ ). Die Korrelation mit dem MRT Aktivierungsgrad ist sehr gut ( $R^2=0.85$  und  $R^2=0.93$ ) während sie mit den absoluten Kontrast-zu-Rausch-Verhältnissen schlechter ist ( $R^2=0.65$  und  $R^2=0.52$ ).

***MPO wird sowohl von Makrophagen/Mikroglia wie Neutrophilen exprimiert***

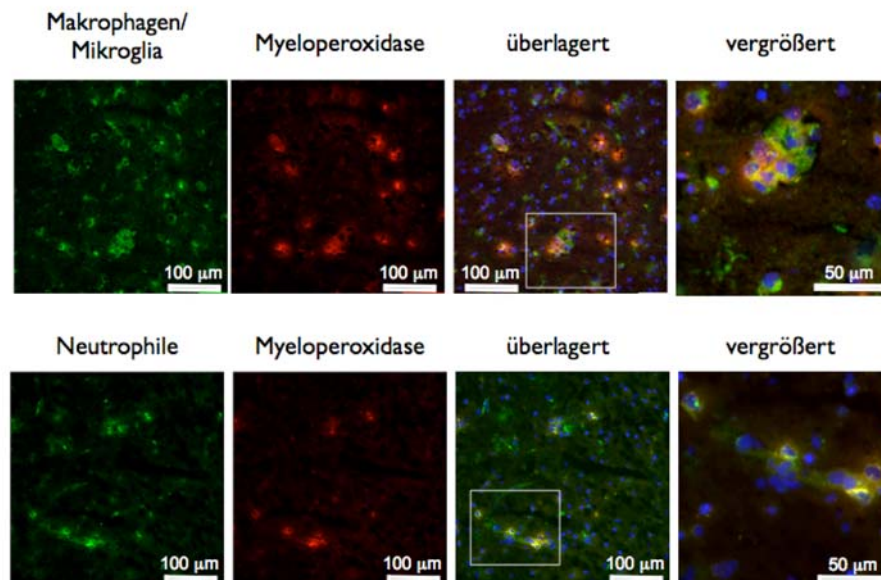
Die Korrelation mit der Histologie zeigt eine gute Übereinstimmung von MRT und der Färbung mit Hämatoxylin & Eosin, in der das Infarktgebiet als blasse Region erscheint (Abb.10a). In der Immunhistochemie zeigt sich an Tag drei eine hohe MPO Expression im gesamten infarzierten Areal. Eine Abgrenzung von „entzündeter“ Penumbra und hypoxischem Kerngebiet ist nicht möglich. Makrophagen/Mikroglia sind in hohem Maße in der Läsion zu finden (Abb.10a). In der kontralateralen, nicht ischämischen Hemisphäre finden sich weder MPO positive Zellen noch Makrophagen oder Neutrophile (nicht gezeigt).

Untersucht man mit Doppelfluoreszenzfärbungen die Herkunft der MPO Expression, finden sich sowohl Makrophagen/Mikroglia wie auch Neutrophile als MPO positiv (Abb.10b).

a)



b)



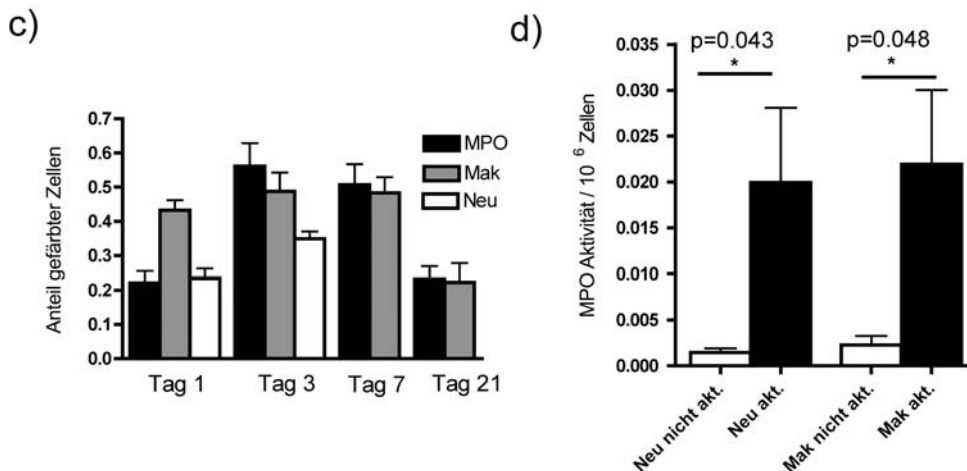
**Abb.10a)** Die histologische Färbung mit Hämatoxylin und Eosin, in dem das ischämische Areal blass erscheint, stimmt gut mit der T1 gewichteten MRT mit MPO-Gd Aufnahme überein. MPO positive Zellen und Makrophagen/Mikroglia sind an Tag drei in der entsprechenden Region in großer Zahl vorhanden.

**Abb. 10b)** Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen drei Tage nach Infarktinduktion für MPO (texas red), Makrophagen/Mikroglia (fitc) und Neutrophile (fitc) zeigen, dass sowohl Makrophagen/Mikroglia wie auch Neutrophile zur MPO Expression beitragen. Beide Zellpopulationen sind zum großen Teil positiv für MPO gefärbt. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) gegengefärbt.

In der Quantifizierung der Zellinfiltration wird deutlich, dass Makrophagen/Mikroglia in größerer Zahl und über den gesamten Untersuchungszeitraum vorhanden, während Neutrophile nur in geringerer Anzahl in den frühen Stadien von Tag eins bis drei gefunden werden. Auch finden sich an Tag drei die größte Zahl an MPO positiven Zellen und ein dem MR Aktivierungsgrad vergleichbares MPO Expressionsprofil (Abb.10c).

### **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 als im nicht aktivierten Zustand ( $p=0.043$  für Neutrophile und  $p=0.048$  für Makrophagen). Dabei unterscheiden sich Makrophagen und Neutrophile jedoch nicht in der quantitativen Kapazität ihrer MPO Expression (Abb.10d).



**Abb. 10c)** Die Quantifizierung der Immunhistochemie zeigt den Zeitverlauf der Zellinfiltration. Neutrophile und Makrophagen/Mikroglia sind an Tag drei in größter Zahl und über den gesamten Untersuchungszeitraum vorhanden. Neutrophile sind nur von Tag 1 bis 3 zu finden.

### **Abb. 10d) MPO Sekretion von Neutrophilen und Makrophagen *in vitro***

Die naiven Makrophagen und Neutrophile, die aus dem Knochenmark isoliert wurden, exprimieren nach Stimulation mit PMA die ca. 10-fache MPO Menge im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen. Die Aktivität wurde mit dem Guaiacol Assay gemessen und das Ergebnis auf  $10^6$ Zellen normiert.



## Diskussion

Diese Arbeiten zeigen den Einsatz des neuen MPO Sensors 5-HT-Gd-DTPA bei Experimenteller Autoimmuner Encephalomyelitis sowie cerebraler Ischämie.

In beiden Erkrankungsmodellen ist der Sensor dem bisherigen unselektiven Goldstandard Gd-DTPA deutlich überlegen. Bei EAE können mehr und kleinere Läsionen visualisiert werden, was auf eine höhere Sensitivität von MPO-Gd im Vergleich zu Gd-DTPA schließen lässt. 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 kleinste EAE Läsionen nur mit dem MPO Sensor zu visualisieren sind.

Im Gegensatz zu Gd-DTPA, das ein unspezifischer Marker der Schrankenstörung ist, zeigt MPO-Gd die Entzündungsaktivität in der Läsion anhand des Markerenzym Myeloperoxidase direkt an. So wird eine frühere Diagnosestellung und damit ein früherer Therapiebeginn möglich, was Morbidität und Mortalität bei der MS verringert.

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. Vorstellbar ist hier auch der Einsatz von MPO Knockout Tieren als „Negativkontrolle“, um genauere Aussagen zur Spezifität von MPO-Gd treffen zu können. Erste Arbeiten bezüglich der genaueren Charakterisierung von Sensitivität und Spezifität des Sensors sind vielversprechend. So konnte in einem Myokardinfarktmodell der Maus mit MPO Knockout Tieren gezeigt werden, dass sich MPO-Gd im nicht aktiviertem Zustand in seinen Kontrastmitteleigenschaften und seiner Pharmakokinetik genauso wie Gd-DTPA



verhält. Auch war mit MPO-Gd die Unterscheidung von homo- und heterozygoten MPO Knockout Tieren möglich<sup>24</sup>.

Bei der cerebralen Ischämie liefert MPO-Gd in den späten Sequenzen, 60 und 90 Minuten nach Kontrastmittelgabe, höhere Kontrast-zu-Rausch-Verhältnisse 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 CNR Werte. So korreliert dieser deutlich besser mit den *in vitro* Quantifizierungen der MPO anhand der qRT-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 die MPO Expressionslevel bei der Ischämie von vorneherein weit niedriger sind als bei der EAE. Dadurch tritt erst nach 60 Minuten, wenn das unspezifische Signal ausgewaschen ist, das länger anhaltende, spezifische MPO Signal hervor. Deshalb wurde der MPO-Gd Aktivierungsgrad als Parameter eingeführt, um für das frühe, unspezifische Signal zu korrigieren. Auf diese Weise erlaubt der Aktivierungsgrad mit MPO als Markerenzym die Erstellung eines zeitlichen Entzündungsprofils.

In beiden Versuchsreihen wurde mit einer Dosis von 0.3 mmol/kg für beide Kontrastmittel gearbeitet, was der dreifachen klinischen Dosis entspricht. Grund dafür ist, dass Maus MPO nur etwa 10% der menschlichen MPO Aktivität besitzt<sup>25</sup>. Es kann also vermutet werden, dass die Bildgebung mit MPO-Gd im Menschen wesentlich höhere Kontrast-zu-Rausch-Verhältnisse ergeben würde.

In den immunhistochemischen Doppelfärbungen zeigte sich, 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<sup>26</sup>. MPO wurde wiederum bei der EAE ausschließlich von Makrophagen/Mikroglia sekretiert und bei der Cerebralen Ischämie zusätzlich von Neutrophilen.

MPO kann also als Markerenzym von Makrophagen/Mikroglia und Neutrophilen aufgefasst werden und damit für Entzündungsvorgänge per se, da bei fast jeglicher inflammatorischen Reaktion im Körper zumindest eine der beiden Zellpopulationen vertreten ist<sup>27</sup>. Eisenoxidnanopartikel (USPIO, VSPIO) wurden für die MRT sowohl bei Cerebraler Ischämie wie auch EAE eingesetzt<sup>28-31</sup>. Dabei werden die Partikel systemisch injiziert und von zirkulierenden Monozyten/Makrophagen aufgenommen. Im Rahmen der cerebralen Schädigung wandern die 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.

Einerseits ist durch die MPO-Gd MRT ein besseres Verständnis der Pathophysiologie auf Ebene der Grundlagenforschung möglich. Andererseits kann dank sensitiverer Methoden eine frühere und genauere Diagnostik sowie die Überwachung von Therapieerfolgen *in vivo* erfolgen. Ein erstes kürzlich publiziertes Beispiel ist die Testung der Wirkung von Atorvastatin im heilenden Myokardinfarkt. Dabei konnte gezeigt werden, dass MPO-Gd sensitiv genug ist, um anti-inflammatorische Behandlungserfolge *in vivo* zu verfolgen<sup>24</sup>.

Ein weiteres Einsatzgebiet des Kontrastmittels sind nuklearmedizinische Anwendungen, da das Gadolinium Ion durch radioaktives Indium (<sup>111</sup>In) oder Kupfer (<sup>64</sup>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<sup>32</sup>.

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 bei weiteren Fragestellungen erforscht. So ist bekannt, dass Entzündungsprozesse und damit auch MPO in hohem Maße bei Arteriosklerose, Vaskulitiden sowie Tumorerkrankungen eine Rolle spielen. Erste Toxizitätsstudien an Mäusen, denen die 5-fache normalerweise verwendete Dosis injiziert wurde, zeigten keine toxischen Effekte. Unerwünschte toxische Wirkungen von MPO-Gd sind auch unwahrscheinlich, bedenkt man die minimale Modifikation durch die beiden Serotonin Reste im Vergleich zu Gd-DTPA.

Die Hoffnung besteht in Zukunft mit diesen und ähnlichen endogen aktivierbaren Kontrastmitteln Diagnostik und Therapie verschiedenster entzündlicher Erkrankungen zu verbessern.

## **Danksagung**

Wir danken den Kooperationspartnern Prof. Michael Moskowitz sowie Dr. Shumei Qiu, Stroke and Neurovascular Regulation Laboratory, MGH für die Hilfe bei der Durchführung der Ischämie Operationen.

Aus der eigenen Arbeitsgruppe danken wir Drs. Lars Stangenberg, Elisenda Rodriguez, Jose Figueiredo und Elena Aikawa für deren technische Unterstützung der Versuche.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem Böhlinger Ingelheim Fonds und der Studienstiftung des deutschen Volkes.

## Literaturverzeichnis

1. Benveniste, E.N. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med* **75**, 165-73 (1997).
2. Lo, E.H., Moskowitz, M.A. & Jacobs, T.P. Exciting, radical, suicidal: how brain cells die after stroke. *Stroke* **36**, 189-92 (2005).
3. Kitagawa, K. et al. Deficiency of intercellular adhesion molecule 1 attenuates microcirculatory disturbance and infarction size in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**, 1336-45 (1998).
4. Jiang, Z.G. et al. A multifunctional cytoprotective agent that reduces neurodegeneration after ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1581-6 (2006).
5. Endres, M. et al. Improving outcome after stroke: overcoming the translational roadblock. *Cerebrovasc Dis* **25**, 268-78 (2008).
6. Klebanoff, S.J. Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. *Science* **169**, 1095-7 (1970).
7. Heinecke, J.W. Mechanisms of oxidative damage by myeloperoxidase in atherosclerosis and other inflammatory disorders. *J Lab Clin Med* **133**, 321-5 (1999).
8. Hoy, A., Leininger-Muller, B., Kutter, D., Siest, G. & Visvikis, S. Growing significance of myeloperoxidase in non-infectious diseases. *Clin Chem Lab Med* **40**, 2-8 (2002).
9. Chataway, J. et al. A screen of candidates from peaks of linkage: evidence for the involvement of myeloperoxidase in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **98**, 208-13 (1999).
10. Nagra, R.M. et al. Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **78**, 97-107 (1997).
11. Hoy, A. et al. Myeloperoxidase polymorphisms in brain infarction. Association with infarct size and functional outcome. *Atherosclerosis* **167**, 223-30 (2003).
12. Stroh, A. et al. Tracking of systemically administered mononuclear cells in the ischemic brain by high-field magnetic resonance imaging. *Neuroimage* **33**, 886-97 (2006).
13. Saleh, A. et al. In vivo MRI of brain inflammation in human ischaemic stroke. *Brain* **127**, 1670-7 (2004).
14. Pittet, M.J., Swirski, F.K., Reynolds, F., Josephson, L. & Weissleder, R. Labeling of immune cells for in vivo imaging using magnetofluorescent nanoparticles. *Nat Protoc* **1**, 73-9 (2006).
15. Chen, J.W., Querol Sans, M., Bogdanov, A., Jr. & Weissleder, R. Imaging of myeloperoxidase in mice by using novel amplifiable paramagnetic substrates. *Radiology* **240**, 473-81 (2006).
16. Querol, M., Chen, J.W. & Bogdanov, A.A., Jr. A paramagnetic contrast agent with myeloperoxidase-sensing properties. *Org Biomol Chem* **4**, 1887-95 (2006).

17. Chen, J.W., Breckwoldt, M.O., Aikawa, E., Chiang, G. & Weissleder, R. Myeloperoxidase-targeted imaging of active inflammatory lesions in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* **131**, 1123-33 (2008).
18. Breckwoldt MO, C.J., Stangenberg L, Aikawa E, Rodriguez E, Qiu S, Moskowitz M, Weissleder R. . Tracking the Inflammatory Response in Stroke in vivo by Sensing the Enzyme Myeloperoxidase. . (under review).
19. Greer, J.M. et al. Immunogenic and encephalitogenic epitope clusters of myelin proteolipid protein. *J Immunol* **156**, 371-9 (1996).
20. Huang, Z. et al. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* **265**, 1883-5 (1994).
21. Klebanoff, S.J., Waltersdorff, A.M. & Rosen, H. Antimicrobial activity of myeloperoxidase. *Methods Enzymol* **105**, 399-403 (1984).
22. Marquez, L.A. & Dunford, H.B. Mechanism of the oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine by myeloperoxidase determined by transient- and steady-state kinetics. *Biochemistry* **36**, 9349-55 (1997).
23. Boxio, R., Bossenmeyer-Pourie, C., Steinckwich, N., Dournon, C. & Nusse, O. Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils. *J Leukoc Biol* **75**, 604-11 (2004).
24. Nahrendorf, M. et al. Activatable magnetic resonance imaging agent reports myeloperoxidase activity in healing infarcts and noninvasively detects the antiinflammatory effects of atorvastatin on ischemia-reperfusion injury. *Circulation* **117**, 1153-60 (2008).
25. Rausch, P.G. & Moore, T.G. Granule enzymes of polymorphonuclear neutrophils: A phylogenetic comparison. *Blood* **46**, 913-9 (1975).
26. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* **3**, 23-35 (2003).
27. Faith, M., Sukumaran, A., Pulimood, A.B. & Jacob, M. How reliable an indicator of inflammation is myeloperoxidase activity? *Clin Chim Acta* (2008).
28. Dousset, V. et al. 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* **20**, 223-7 (1999).
29. Kleinschnitz, C. et al. In vivo monitoring of macrophage infiltration in experimental ischemic brain lesions by magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* **23**, 1356-61 (2003).
30. Linker, R.A. et al. Iron particle-enhanced visualization of inflammatory central nervous system lesions by high resolution: preliminary data in an animal model. *AJNR Am J Neuroradiol* **27**, 1225-9 (2006).
31. Petry, K.G., Boiziau, C., Dousset, V. & Brochet, B. Magnetic resonance imaging of human brain macrophage infiltration. *Neurotherapeutics* **4**, 434-42 (2007).
32. Querol Sans, M., Chen, J.W., Weissleder, R. & Bogdanov, A.A., Jr. Myeloperoxidase activity imaging using (67)Ga labeled substrate. *Mol Imaging Biol* **7**, 403-10 (2005).

