

Aus dem Bereich Klinische Medizin  
Fachrichtung Neurologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

# **Die Bedeutung angeborener Immunrezeptoren beim experimentellen Guillain-Barré-Syndrom**

**Dissertation**

*zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes*

**2012**

vorgelegt von

Manuela Gries  
geb. am: 08.07.1980 in Landstuhl

*Meinem Mann*

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>IV</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IX</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>XII</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>XIII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XV</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Epidemiologie, Klinik und Therapie des Guillain-Barré-Syndroms.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Das GBS-Tiermodell: Experimentelle Autoimmune Neuritis.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3. Allgemeine Funktionen des Immunsystems und Entstehung von     Autoimmunität .....</b>	<b>7</b>
<b>1.4. Das angeborene Immunsystem mit Toll-like Rezeptoren und ihre Bedeutung     in der Autoimmunität .....</b>	<b>11</b>
<b>1.5. Das adaptive Immunsystem und seine Bedeutung bei der Autoimmunität.....</b>	<b>16</b>
<b>1.6. Ziele der Arbeit.....</b>	<b>18</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1. Materialien .....</b>	<b>20</b>
2.1.1. Chemikalien mit Bezugsquelle.....	20
2.1.2. Lösungen .....	24
2.1.3. Kits .....	28
2.1.4. Antikörper .....	29
2.1.4.1. Immunhistochemie .....	29
2.1.4.2. Durchflusszytometrie .....	30
2.1.5. Primer für die Quantitative Real-Time PCR .....	32
2.1.6. Geräte, Zubehör und sonstige Hilfsmittel .....	32
2.1.6.1. Geräte .....	32
2.1.6.2. Zubehör und sonstige Hilfsmittel.....	34
2.1.7. Zell-Linien.....	36
2.1.8. Herkunft der Versuchstiere .....	36
<b>2.2. Methoden.....</b>	<b>37</b>
2.2.1. Induktion und Beurteilung der EAN .....	37
2.2.2. Präparation der Versuchstiere .....	38

2.2.3.	Herstellung einer Lymphknoten-Zellsuspension .....	39
2.2.4.	Histologische Untersuchungen.....	39
2.2.4.1.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	41
2.2.4.2.	Luxol-Fast-Blau-Perjodsäure-Schiff-Färbung .....	41
2.2.4.3.	Silberimprägnierung nach Bielschowsky.....	42
2.2.4.4.	Immunhistochemische Färbung .....	43
2.2.4.4.1.	IHC auf Paraffinschnitten.....	44
2.2.4.4.2.	IHC auf Gefrierschnitten.....	45
2.2.5.	Quantitative Real-Time PCR .....	45
2.2.5.1.	RNA-Isolation .....	46
2.2.5.2.	Reverse Transkription .....	47
2.2.5.3.	qRT-PCR-Reaktion .....	48
2.2.6.	Durchflusszytometrie .....	48
2.2.7.	Untersuchungen der Blut-Nerven-Schranke .....	49
2.2.7.1.	Kultivierung der Endothelzellen .....	50
2.2.7.2.	Zelladhäsionsversuche .....	50
2.2.7.3.	Transmigrationsversuche .....	51
2.2.8.	Elektroneurographie .....	52
<b>2.3.</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>53</b>
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>54</b>
<b>3.1.</b>	<b>Immunologische Prozesse während der EAN.....</b>	<b>54</b>
3.1.1.	Klinik und Pathologie während der EAN .....	54
3.1.2.	Antigenpräsentation und T-Zellaktivierung während der EAN.....	60
<b>3.2.</b>	<b>Die Rolle der TLRs bei der EAN .....</b>	<b>64</b>
3.2.1.	Bestimmung des basalen TLR-Expression in Lymphknoten.....	64
3.2.2.	Bestimmung des TLR-Expressionsprofils bei der EAN und dem GBS.....	65
<b>3.3.</b>	<b>Die Rolle von MyD88 und IL-17A bei der EAN.....</b>	<b>73</b>
<b>3.4.</b>	<b>Die Rolle von CD14 bei der EAN .....</b>	<b>76</b>
3.5.1.	Klinik der EAN bei einer CD14-Defizienz .....	78
3.5.2.	Elektrophysiologische Veränderungen während der EAN bei einer CD14-Defizienz .....	80
3.5.3.	Pathologische Veränderungen während der EAN bei einer CD14-Defizienz ...	85
3.5.4.	Pathophysiologische Vorgänge an der BNS während der EAN bei einer CD14-Defizienz .....	91

<b>4.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>95</b>
<b>4.1.</b>	<b>Immunologische Prozesse während der EAN.....</b>	<b>95</b>
	4.1.1. Klinik und Histopathologie .....	95
	4.1.2. Die Rolle der TLRs bei der EAN .....	96
<b>4.2.</b>	<b>Die Bedeutung von CD14 bei der EAN .....</b>	<b>100</b>
	4.2.1. CD14-Expression während der EAN .....	100
	4.2.2. Auswirkung einer CD14-Defizienz auf die EAN .....	101
<b>5.</b>	<b>REFERENZEN.....</b>	<b>104</b>
<b>6.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>116</b>
<b>7.</b>	<b>PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>121</b>
<b>8.</b>	<b>KOOPERATIONEN.....</b>	<b>122</b>
<b>9.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>128</b>
<b>10.</b>	<b>CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>130</b>
<b>11.</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>131</b>

## Abkürzungsverzeichnis

'	Minute
"	Sekunde
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
A.d.	destilliertes Wasser (Aqua dest)
aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
ACE	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AgNO <sub>3</sub>	Silbernitrat
AIDP	akute inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie
AMAN	akute motorische axonale Neuropathie
AMSAN	akute motorische und sensorische axonale Neuropathie
APC	Antigenpräsentierende Zelle (antigen presenting cell)
APC	Allophycocyanin
bEnd3	Hirndothelzell-Linie 3
BNS	Blut-Nerven-Schranke
C57/B6J	Name eines Mausstamms
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	copy DNA
CFA	komplettes Freund'sches Adjuvanz (complete Freund's Adjuvant)
CIDP	chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CR3	Komplementrezeptor 3 (complement receptor 3)
Ct	Schwellenwertzyklus (Threshold cycle)
CTLA-4	Zytotoxisches-T-Lymphozyten-Antigen 4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) oder CD152
d	Tag
DC	Dendritische Zelle (dendritic cell)
DMEM	„Dulbecco's modified Eagle“ Medium
DMF	N,N, Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EAE	Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis
EAN	Experimentelle Autoimmune Neuritis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und weitere
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung
Fas	Apo1, Apoptose-Antigen1
FCS	fetales Kälber-Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	forkhead box P3
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
GD1A	Diasialogangliosid 1A (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor superfamily member 18 -related protein)
GITR	
GM1	Monoasialogangliosid 1
GM2	Monoasialogangliosid 2
GPI	Glykosyl-phosphatidylinositol
GQ1b	Tetrasialosylgangliosid 1b
GT1A	Trisialoganglioside
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase)
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICAM-1	intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1

IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
k	Kilo
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	di-Kaliumhydrogenphosphat
l	Liter
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LFB	Luxol-Fast-Blue
LN	Lymphknoten (lymph node)
LP	Lipoproteine
LPS	Lipopolysaccharid
m	Milli
M	mol/l
mA	Milliampère
Mal	MyD88-adaptor-lik
MAM	Migrationsmedium
MHC	Haupt- Histokompatibilitäts-Kompex (major-histocompatibily complex)
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MS	Multiple Sklerose
ms	Millisekunde
MyD88	Myeloider Differenzierungsfaktor 88 (myeloid differentiation primary response protein 88")
n	Nano
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Natriumdihydrogenphosphat
$\text{NaHCO}_3$	Natriumbicarbonat
$\text{NaN}_3$	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NF- $\kappa$ B	Nuklearer Faktor- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B)
NO	Stickstoffmonoxid
NOD2	Nukleotid-bindende Oligomerisations-Domäne 2

NOS	Stickoxidsynthase
nTregs	natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen
P0	peripheres Myelin P0-Protein
P2	peripheres Myelin P2-Protein
Pam3Cys-SK4	TLR2-Ligand
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (pathogen-associated molecular pattern)
PAS	Periodsäure-Schiff-Färbung
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PerCP	Peridinin-chlorophyll-protein complex
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PNS	peripheres Nervensystem
PRR	Struktur-Erkennungs-Rezeptoren (Pattern Recognition Receptors)
PTX	Pertussis Toxin von <i>Bordetella pertussis</i>
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (Real-Time-PCR)
Silan	(3-Aminopropyl)triethoxysilan
siRNA	Kleine interferierende RNA (small interfering RNA)
SYBR	asymmetrischer Cyanin-Farbstoff
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 0,5%
TCR	T-Zell-Rezeptor (T cell receptor)
TGF $\beta$	Transformations-Wachstumsfaktor $\beta$ (transforming growth factor $\beta$ )
Th1	T-Helfer1-Zellen
Th17	T-Helfer17-Zellen
Th2	T-Helfer2-Zellen
TLR	Toll-like Rezeptor

TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
TRIF	TIR domain containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
UV	Ultraviolett
Wt	Wildtyp

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 : Schematische Darstellung der pathophysiologischen Vorgänge bei der EAN... 6	6
Abbildung 2: TLR-Signalweg (modifiziert nach Akira und Takeda, 2004) .....	13
Abbildung 3: Klinische Scorewerte von EAN (P0/PTX/CFA)- und Kontroll-(PTX/CFA)- Mäusen (C57B6/J) während des EAN-Krankheitsverlaufes.....	55
Abbildung 4: Gewichte von EAN- (P0/PTX/CFA) und Kontroll- (PTX/CFA)-Mäusen (C57B6/J) während des EAN-Krankheitsverlaufes. ....	55
Abbildung 5: Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Nervus ischiadicus von EAN-Mäusen (C57B6/J) während des Krankheitsverlaufes. ....	57
Abbildung 6: Luxol-Fast-Blau-Perjodsäure-Färbung (LFB-PAS) des Nervus ischiadicus von EAN-Mäusen (C57B6/J) während des Krankheitsverlaufes.....	58
Abbildung 7: Silberimprägnierung des Nervus ischiadicus nach Bielschowsky von EAN- Mäusen (C57B6/J) während des Krankheitsverlaufes. ....	59
Abbildung 8: Expression des T-Zellrezeptors (TCR) auf T-Lymphozyten und Expression des MHC-KlasseII-Komplexes in murinen Lymphknotenzellen während des EAN- Krankheitsverlaufes.....	62
Abbildung 9: Expression der ko-stimulatorischen Moleküle, CD80 und CD86, und ihrer entsprechenden Rezeptoren, CD28 und CTLA-4 während des EAN-Krankheitsverlaufes in Maus-Lymphozyten. ....	63
Abbildung 10: Basale Expressionen von TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, TLR9, TLR11, TLR12, CD14 und MyD88 auf T-Lymphozyten und APCs in Lymphknotenzellen von PTX/CFA-Kontroll-Mäusen (C57B6/J).....	65
Abbildung 11: TLR2-Expression auf Protein-Ebene in murinen Lymphknotenzellen während der EAN und auf mRNA-Ebene im Blut von GBS-Patienten in Korrelation zu klinischen Symptomen.....	66
Abbildung 12: TLR6-Expression auf Protein-Ebene in murinen Lymphknotenzellen während der EAN und auf mRNA-Ebene im Blut von GBS-Patienten in Korrelation zu klinischen Symptomen.....	68
Abbildung 13: TLR4-Expression auf Protein-Ebene in murinen Lymphknotenzellen während der EAN und auf mRNA-Ebene im Blut von GBS-Patienten in Korrelation zu klinischen Symptomen.....	69
Abbildung 14: TLR11-Expression auf Protein-Ebene in murinen Lymphknotenzellen während der EAN.....	71

Abbildung 15: TLR1-Expression auf Protein-Ebene in murinen Lymphknotenzellen während der EAN.....	72
Abbildung 16: MyD88-Expression auf Protein-Ebene in murinen Lymphknotenzellen während der EAN.....	74
Abbildung 17: IL-17A-Expression auf Protein-Ebene in murinen Lymphknotenzellen während der EAN. IL17A-Protein-Expression auf (A) CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen, (B) CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen und (C) MHCII <sup>+</sup> -Zellen. ** p = ≤ 0,01 .....	75
Abbildung 18: CD14-Immunhistochemie auf Kryoschnitten des Nervus ischiadicus von EAN-Mäusen (C57B6/J) an Tag 13 p.i. ....	76
Abbildung 19: CD14-Expression auf Protein-Ebene in murinen Lymphknotenzellen während der EAN.....	77
Abbildung 20: Durchschnittliche klinische Scorewerte von CD14 <sup>-/-</sup> -Mäusen und C57B6/J-Kontrollmäusen während des EAN-Krankheitsverlaufes. ....	79
Abbildung 21: Gewichtsverlauf von CD14-defizienten und Wildtyp-EAN-(P0/PTX/CFA)-Mäusen (C57B6/J) während des EAN-Krankheitsverlaufes.....	80
Abbildung 22: Neurographische Messungen des Nervus ischiadicus von EAN (P0/PTX/CFA)- und Kontroll (PTX/CFA)-Mäusen (C57B6/J) an d20 p.i. der Erkrankung bei supramaximaler Reizstärke (> 25mA, 200µs). ....	82
Abbildung 23: Neurographische Messungen des Nervus ischiadicus von CD14-defizienten EAN (PO/PTX/CFA)- und Kontroll-(PTX/CFA)-Mäusen an d20 p.i. der Erkrankung bei supramaximaler Reizstärke (> 25mA, 200µs). ....	83
Abbildung 24: F-Wellen-Latenzzeit des Nervus ischiadicus von CD14-defizienten- vs. Wildtyp-(C57B6/J) EAN-Mäusen nach supramaximaler Reizung (0,2ms je Einzelpuls) gemessen mittels Neurographie. ....	84
Abbildung 25: Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Nervus ischiadicus von CD14-defizienten und C57B6/J-Wildtyp-Mäusen während des EAN-Krankheitsverlaufes.....	86
Abbildung 26: Luxol-Fast-Blau-Perjodsäure (LFB-PAS) –Färbung des Nervus ischiadicus von CD14-defizienten und C57B6/J-Wildtyp-Mäusen während des EAN-Krankheitsverlaufes. ....	87
Abbildung 27: Immunhistochemie des Nervus ischiadicus auf Kryoschnitten von CD14-defizienten und Wildtyp-Mäusen (C57B6/J) am Peak der Erkrankung.....	89
Abbildung 28: Immunhistochemie des Nervus ischiadicus auf Kryoschnitten von CD14-defizienten und Wildtyp-Mäusen (C57B6/J) am Peak der Erkrankung.....	90

Abbildung 29: Adhäsionsexperimente mit bEnd3-Zellen und antigenspezifischen T-Zellen von P0-immunisierten (P0/PTX/CFA) und gesunden Wildtyp- und CD14-defizienten Mäusen an d15 p.i. der EAN (n=3)..... 92

Abbildung 30: Mikroskopische Aufnahme Adhäsionsexperimente mit bEnd3-Zellen und antigenspezifischen T-Zellen von P0-immunisierten (P0/PTX/CFA) und gesunden Wildtyp- und CD14-defizienten Mäusen an d15 p.i. der EAN (n=3). ..... 93

Abbildung 31: Transmigrationsexperimente mit bEnd3-Zellen und antigenspezifischen T-Zellen von P0-immunisierten (P0/PTX/CFA) und gesunden Wildtyp- und CD14-defizienten Mäusen an d15 p.i. der EAN (n=3). ..... 94

Abbildung 32: FACS-Analysen der TLR-, MyD88- und IL-17A-Expressionen in Lymphknotenzellen von EAN-Mäusen..... 116

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden. ....	12
Tabelle 2: Entwicklung einer EAN von mit P0aa180-199 immunisierten oder PBS behandelten C57Bl6/J-Mäusen. ....	54
Tabelle 3: Regulation angeborener Immun-Rezeptoren und T-Zellen auf Protein-Ebene während des EAN-Krankheitsverlaufes. ....	61
Tabelle 4: Anzahl TLR-positiver infiltrierter Zellen im Nervus ischiadicus von EAN-Mäusen (C57B6/J) an d20 p.i. der Erkrankung (n=3). ....	70
Tabelle 5: Latenzzeiten und Persistenz von F-Wellen von CD14-defizienten- und Wildtyp-Mäusen mittels Neurographie bei supramaximaler Reizstärke (> 25mA, 200µs). ....	81
Tabelle 6: Latenzzeiten und Persistenz von A-Wellen von CD14-defizienten- und Wildtyp-Mäusen mittels Neurographie bei supramaximaler Reizstärke (> 25mA, 200µs). ....	85
Tabelle 7: Anzahl adhärierter antigenspezifischer T-Zellen an mit TNFα (24h, 100u) stimulierte bEnd3-Zellen an d15 p.i. der EAN. ....	92
Tabelle 8: Anzahl migrierter antigenspezifischer T-Zellen durch einen mit TNFα (24h, 100u) stimulierten bEnd3-Rasen an d15 p.i. der EAN. ....	94
Tabelle 9: Prozentuale Anteile der in die Antigenpräsentation involvierten Moleküle auf T-Zellen und APCs während dem EAN-Verlauf. ....	117
Tabelle 10: Prozentuale Anteile der TLR-, CD14 und MyD88-Basalexpression von T-Zellen und APCs in Lymphknoten von C57B6/J-Mäusen. ....	118
Tabelle 11: Prozentuale Anteile von TLRs, MyD88 und IL-17A von T-Zellen und APCs während des EAN-Verlaufes. ....	119
Tabelle 12: Relative Änderung (Fold change) der Gen-Expression von TLRs und MyD88 normalisiert zur GAPDH-Expression im Blut von GBS-Patienten. ....	120

## Zusammenfassung

Das Guillain-Barré-Syndrom (GBS) ist eine autoimmun-vermittelte Polyradikuloneuritis, die durch autoreaktive Leukozyteninfiltration in das periphere Nervensystem (PNS) und anschließender Neuroinflammation, Demyelinisierung und axonaler Schädigung charakterisiert ist (Kieseier et al., 2004). Die Erkrankung wird durch synergistische Interaktionen zwischen zellulären und humoralen Immunantworten gegenüber Antigenen im PNS verursacht. Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind die Hauptrezeptoren der angeborenen Immunität und regulieren darüber hinaus auch die adaptive Immunität. Mittels des Adapterproteins MyD88 (Myeloider Differenzierungsfaktor 88) aktivieren sie Dendritische Zellen zu Antigenpräsentierenden Zellen (APCs), fördern T-Zellantworten und tragen zur T-Zelldifferenzierung bei (Liu et al., 2010; Kulkarni et al., 2011). TLRs werden bei einer Vielzahl von autoimmunen Erkrankungen exprimiert und regulieren zusammen mit T-Helfer17- und regulatorischen T-Zellen die Autoimmunität (Weaver et al., 2007; Steinman, 2008). Welche Rolle TLRs bei GBS und der EAN spielen, ist bislang nur unvollständig geklärt.

Zur näheren Charakterisierung der TLR-Funktion bei GBS wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Aspekte der Erkrankung mit Hilfe eines repräsentativen Maus-Tiermodells, der Experimentellen Autoimmunen Neuritis (EAN), untersucht. Die EAN wurde durch aktive Immunisierung mit dem peripheren Myelinpeptid P0, in Kombination mit komplettem Freund'schen Adjuvanz und *Bordetella pertussis* Toxin in männlichen C57/B16/J Mäusen induziert.

In den Ergebnissen zeigten sich bereits vor klinischer Manifestation zunehmende Leukozyteninfiltrationen und Demyelinisierungen des Nervus ischiadicus, wobei beide Parameter im weiteren Erkrankungsverlauf mit dem Schweregrad der klinischen Symptome in Korrelation standen. Die Effizienz der EAN-Induktion wurde durch Untersuchungen der Kostimulation bzw. der Antigenpräsentation nachgewiesen. Es konnten zeitabhängige sowie signifikant veränderte Expressionsraten der kostimulatorischen Moleküle CD28, CTLA-4, CD80 und CD86 sowie von MHCII und des TCR detektiert werden.

Das TLR-Expressionsprofil während der EAN zeigte, insbesondere für TLR2, TLR6 und TLR11 sowohl in der Induktions- als auch in der Aktivierungsphase, signifikant verstärkte Expressionen auf T-Zellen, während auf Antigenpräsentierenden Zellen erhöhte Level an TLR4, TLR6 und CD14 in der klinischen Phase identifiziert werden konnten. Die MyD88-Expression zeigte, unabhängig des Zellursprungs, erhöhte Werte. Damit übereinstimmend

konnten in Blutproben von GBS-Patienten gesteigerte Gen-Expressionen von TLR2, TLR4 sowie TLR6, in negativer Korrelation mit den klinischen Symptomen, festgestellt werden. Darüber hinaus wurde eine verstärkte Expression des krankheitsfördernden Zytokins Interleukin-(IL) 17A in der Induktionsphase der EAN detektiert.

Interessanterweise wurden die pathologischen Merkmale der EAN durch eine Defizienz des Lipopolysaccharid (LPS)-Rezeptors CD14 verstärkt. Eine EAN in CD14<sup>-/-</sup> Mäusen führte nicht nur zu einem früheren Ausbruch der Erkrankung und einer Verstärkung der klinischen Symptome, sondern äußerte sich im Vergleich zu Wildtyp-EAN-Mäusen außerdem in vermehrter Infiltration, und Demyelinisierung. Des Weiteren zeigten elektrophysiologische Messungen der peripheren Nerven von CD14-defizienten EAN-Mäuse im Vergleich zu Wildtypen sowohl stark signifikant verlängerte F-Wellen-Latenzzeiten als auch erhöhte Ausfallfrequenzen. Bei *in vitro* Untersuchungen der kritischen pathophysiologischen Schritte konnte nach adäquater Immunisierung zwar eine signifikant verstärkte Adhäsion und Transmigration der antigenspezifischen T-Zellen an bzw. durch das Endothel vergleichend mit den jeweiligen Kontrollen beobachtet werden, jedoch konnte kein CD14-abhängiger Effekt detektiert werden. Insgesamt weisen die Ergebnisse auf eine modulierende und protektive Rolle von CD14 bei der EAN hin.

Zusammenfassend deutet diese erste longitudinale Analyse auf eine Beteiligung der TLRs, zusammen mit dem Adapterprotein MyD88 und dem LPS-Rezeptor CD14 sowie IL-17A in der Pathogenese der EAN bzw. GBS hin und liefert Argumente für weiterführende Studien, um ihre explizite Rolle aufzuklären.

## Abstract

Guillain-Barré syndrome (GBS) is an autoimmune mediated polyradiculoneuritis, characterized by autoreactive leukocyte infiltration into the peripheral nervous system (PNS) with subsequent neuroinflammation, demyelination and axonal damage (Kieseier et al., 2004). The disease is caused by synergistic interactions between cellular and humoral immune responses to antigens in the PNS. Toll-like receptors (TLRs) are the key players in innate immunity and also regulate adaptive immunity. By means of the adaptor protein MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88) they can activate dendritic cells to antigen presenting cells (APCs), promote T cell responses and contribute to T cell differentiation (Liu et al., 2010; Kulkarni et al., 2011). TLRs are expressed in a variety of autoimmune disorders and, together with T helper 17 and regulatory T cells, regulate autoimmunity. However, the role played by TLRs in GBS and its animal model experimental autoimmune neuritis (EAN), remains unknown.

In order to characterize TLR function in GBS, distinct aspects of the disease were examined in the present study with the help of the representative model EAN. EAN was actively induced in male C57B/6J mice by immunization with peripheral myelin P0 peptide in combination with complete Freund's adjuvant (CFA) and *Bordetella pertussis* toxin.

The results showed, even before clinical manifestation, increased leukocyte infiltration and demyelination of the sciatic nerve, both parameters also correlating with severity of clinical symptoms during the disease course. Efficiency of EAN induction was demonstrated by co-stimulation and antigen presentation studies. Significantly altered levels of co-stimulatory molecules CD28, CTLA-4, CD80 and CD86 as well as MHCII and TCR were also detected in a time-dependent manner.

TLR expression profile during EAN showed, in particular for TLR2, TLR6 and TLR11 in the induction and activation phase, significantly increased expressions on T cells, while on APCs elevated levels of TLR4, TLR6 and CD14 were identified in the clinical phase. Independent from its cellular source, MyD88 expression showed increased values. Consistently with this, increased gene expressions of TLR2, TLR4 and TLR6 were detected in blood samples from GBS patients, negatively correlated with clinical symptoms. Moreover, an enhanced expression of the disease promoting cytokine interleukin-(IL)17A was detected.

Interestingly, pathological features of EAN were enhanced by a deficiency of the lipopolysaccharide (LPS) receptor CD14. EAN in CD14<sup>-/-</sup> mice not only resulted in an earlier onset and exacerbation of disease, but mice also had enhanced infiltration and demyelination.

Moreover, electrophysiological measurements of peripheral nerves of CD14-deficient mice showed significantly prolonged f wave latencies as well as increased failure rates when compared to wildtypes. Through *in vitro* investigations of critical pathophysiological steps after immunization, significantly enhanced adhesion and transmigration of antigen-specific T cells to and through endothelium, respectively, could indeed be observed when compared to corresponding controls, however, no CD14-dependent effect was detected. Collectively, these results indicate a modulating and protective role for CD14 in EAN.

In summary, this first longitudinal analysis indicates an involvement of TLRs together with MyD88 and the LPS receptor CD14 as well as IL-17A in the pathogenesis of EAN and GBS and provides rationale for further studies in order to elucidate their exact function.

# 1. Einleitung

## 1.1. Epidemiologie, Klinik und Therapie des Guillain-Barré-Syndroms

Das Guillain-Barré-Syndrom (GBS) ist eine akute inflammatorische autoimmun-vermittelte polyneuropathische Lähmung der Extremitäten mit diffusen distalen Sensibilitätsstörungen. Die ersten Beschreibungen des GBS stammen von Landry aus dem Jahre 1859 (Landry, 1859). Eine nähere Charakterisierung sowie die Namensgebung erfolgten im Jahre 1916 nach Guillain, Barré und Strohl (Guillain et al., 1916). Sie zeigten erstmals, dass es sich um eine entzündliche Erkrankung der Nervenwurzeln handelt. Heute weiß man, dass es sich bei GBS um eine autoimmun vermittelte Polyradikuloneuritis handelt, die durch autoreaktive Leukozyteninfiltration in das periphere Nervensystem (PNS) und anschließender Neuroinflammation, Demyelinisierung und axonaler Schädigung charakterisiert ist (Kieseier et al., 2004). Die jährliche Inzidenz des GBS liegt bei 1-2 pro 100.000 Einwohner ohne deutliche Alters- und Geschlechtspräferenz (Alter, 1990; Hughes et al., 2005; Lehmann et al., 2007).

Klinisch können zu Beginn leichte Sensibilitätsstörungen der Hände und Füße beobachtet werden, die sich zu einer aufsteigenden Lähmung der Extremitäten fortsetzen (Ropper, 1992). Weiterführend können die Hirnnerven, insbesondere der N. facialis mit Lähmungen der Gesichts-, Mund- und Schlundmuskulatur, betroffen sein. Bei schweren Verläufen kann es neben einer Tetraplegie auch zu einer Beeinträchtigung der respiratorischen Muskulatur mit Beatmungspflicht kommen (Ropper, 1992). Bei etwa zwei Dritteln der Patienten treten autonome Dysfunktionen mit Tachy-/Bradykardie und anderen komplexen Herzrhythmusstörungen, Blutdruckschwankungen sowie Störungen der Blasen- und Darmfunktion auf (Flachenecker et al., 1997a; Flachenecker et al., 1997b).

Neben klinischen Charakteristika und Liquordiagnostik werden Nervenleitgeschwindigkeitsmessungen als wichtige diagnostische Tests herangezogen. Die Elektrodiagnostik zeigt oft unregelmäßige Demyelinisierungen, die durch verzögerte motorische Latenzen, Leitungsblock, verlangsamte motorische Leitgeschwindigkeiten, sowie abnormalen F-Wellen gekennzeichnet sind (Gordon et al., 2001). F-Wellen sind das Ergebnis einer supramaximalen elektrischen Reizung eines peripheren Nervs. Es handelt sich um eine indirekte Reizantwort durch retrograde Erregung der Vorderhornzellen, die bei GBS-Patienten entweder mit verzögerten Latenzzeiten eintreten oder gar komplett ausfallen (Gordon et al., 2001).

Der Krankheitsverlauf ist typischerweise monophasisch, wobei das Plateau etwa drei bis vier Wochen nach Ausbruch erreicht ist. Es folgt eine Erholungsphase von einigen Wochen bis Monaten (Asbury et al., 1990; Hughes et al., 1992). Die funktionelle Rehabilitation erfolgt meist viel langsamer als die anfänglich schnell einsetzende Schädigung. Obwohl GBS eine im Großen und Ganzen gute Prognose zeigt, beträgt die Letalität 5-10% und etwa 20-30% der Patienten sind auch noch nach einem Jahr als behindert einzustufen (Hughes et al., 2005).

Aufgrund klinischer, elektrophysiologischer und pathologischer Merkmale wurde GBS während der letzten Jahre in verschiedene Subtypen unterteilt (Hughes, 1995; Van der Meche et al., 2001; Kieseier et al., 2004):

(1) Die klassische Form des GBS ist nicht schwer zu diagnostizieren und zeigt normalerweise oben genannte Symptome. Es handelt sich um eine akute inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie (AIDP) und kommt am häufigsten in Europa und Nordamerika vor.

(2) In China und Japan hingegen trifft man am häufigsten auf einen rein motorisch axonalen Typ, die sogenannte akute motorische axonale Neuropathie (AMAN), wobei hauptsächlich Kinder und Jugendliche während sommerlichen Epidemien betroffen sind.

(3) Kommt es darüber hinaus zu sensorischen Beeinträchtigungen spricht man von einer akuten motorischen und sensorischen axonalen Neuropathie (AMSAN). Letztere zeigt einen schwereren Verlauf und eine schlechtere Prognose als die AMAN und ist nicht leicht von einer schwer verlaufenden AIDP zu differenzieren (Feasby, 1994).

(4) Eine weitere Variante des GBS ist das Miller Fisher Syndrom, welches durch Ataxie, Areflexie und Ophthalmoplegie charakterisiert ist (Willison et al., 1999).

Ferner existiert eine chronische Form, die als eine chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie (CIDP) erworbene Neuropathie mit progressivem oder schubförmigem Verlauf beschrieben wird. CIDP entwickelt sich, im Gegensatz zum klassischen GBS, über einen Zeitraum von mehreren Monaten, d.h. die Betroffenen spüren sehr langsam und schleichend eine zunehmende Schwäche. Da Patienten unter anderem aber auf Immunsuppressiva ansprechen, geht man auch hier von einer Autoimmun-Erkrankung aus (Kieseier et al., 2004).

Trotz moderner Medizin beschränken sich die effektiven Therapiemöglichkeiten bis heute auf die Durchführung einer Plasmapherese oder die Gabe von Immunglobulinen. Eine Plasmapherese führt im eigentlichen Sinn zur Entfernung der pathogenen Antikörper aus dem Blut. Die intravenöse Verabreichung von Immunglobulinen führt u.a. zu anti-idiotypischen Antikörpereffekten, zur Neutralisation von Komplement-Bestandteilen und Viren, zur

Hemmung der Produktion von Immunglobulinen, zur Rezeptorblockade, zur Erhöhung von Suppressorzellen sowie zur Inhibierung der Produktion von Zytokinen und der Proliferation von T-Lymphozyten (Thornton et al., 1994; Basta et al., 1996; Buchwald et al., 2002; Bayry et al., 2003a; Bayry et al., 2003b).

Insgesamt ist eine Behandlung mit Immunglobulinen einfacher zu handhaben, jedoch mit höheren Kosten verbunden. Bezüglich der Effektivität sind beide Methoden gleich einzustufen.

Man nimmt an, dass GBS durch eine fehlgerichtete Immunantwort gegen infektiöse Erreger verursacht wird, die sich irrtümlich durch so genanntes „Molekulares Mimikry“ zur Induktion einer Autoimmunantwort gegen eigenes peripheres Nervengewebe als Folge einer Kreuzreaktion beiträgt (Yuki et al., 2005). Vor Krankheitsausbruch treten bei etwa 60% der Patienten einige Tage bis Wochen zuvor Infektionen des oberen respiratorischen oder intestinalen Traktes, meist mit *Campylobacter jejuni* auf (Yuki et al., 1993; Blaser, 1997); in seltenen Fällen ist auch *Mycoplasma* nachweisbar. Es wurden z.B. Lipopolysaccharid-Komponenten von *C. jejuni*, die Homologien zu humanen Gangliosiden zeigen, als solche kreuzreagierende Epitope beschrieben. Neben IgG-, IgM- und IgA-Antikörpern, die gegen die Ganglioside GM1, GM2, GD1A, GT1A und GQ1b gerichtet sind, wurden außerdem Antikörper gegen Myelin-Bestandteile in GBS-Seren nachgewiesen (Gabriel et al., 2000). Hierbei sind vor allem das Periphere Myelin Protein-22, P2 und P0 als Hauptanteile des Myelins zu nennen und können folglich ebenfalls als potentielle Autoantigene angesehen werden (Hartung et al., 2001).

## **1.2. Das GBS-Tiermodell: Experimentelle Autoimmune Neuritis**

Die Experimentelle Autoimmune Neuritis (EAN) wurde erstmals im Jahre 1955 von Waksman und Adams bei Kaninchen induziert und als eine paralytische Erkrankung des peripheren Nervensystems beschrieben (Waksman et al., 1955). In vielen klinischen, elektrophysiologischen und histologischen Aspekten ähnelt die EAN dem humanen GBS, im Speziellen der AIDP-Subtyp, und stellt somit ein geeignetes Tiermodell dar. Neben Kaninchen kann die EAN auch in Ratten, Mäusen, Affen oder Schafen induziert werden (Waksman et al., 1955; Gold et al., 1999; Zou et al., 2000). Die Immunisierung erfolgt entweder aktiv durch Injektionen der peripheren Myelin-Komponenten P2 oder P0, das dominant vorherrschende Protein im PNS, und/oder derer neuritogenen Peptide zusammen

mit komplettem Adjuvanz oder passiv über adoptiven Transfer von P2 oder P0 und/oder Peptid-spezifischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (Gold et al., 2000; Maurer et al., 2002). Zur Erzielung neuritogener und immunogener Eigenschaften des P0-Proteins wird dieses post-translational diacyliert. Dies geschieht über eine kovalente Bindung von Palmitin-Fettsäure an einen Cysteinrest (Bizzozero et al., 1994). Besonders thiopalmitoylierte Proteine, wie beispielsweise Myelin assoziierte Glykoproteine, wurden bereits als wirkungsvolle Autoantigene in einer Vielzahl von T-Zell-vermittelten autoimmunen Krankheiten beschrieben (Pedraza et al., 1990).

Die klinischen Symptome werden anhand eines klinischen Scoresystems nach Zou et al. ermittelt (Zou et al., 2000). Aufgrund der sehr wenigen und auch verfügbaren Informationen über GBS bzw. der EAN, kann zur näheren Charakterisierung und zum besseren Verständnis die EAE (Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis; Tiermodell der Multiplen Sklerose (MS)) herangezogen werden, die enorme pathologische und pathophysiologische Ähnlichkeiten zur EAN aufweist.

Histologisch ist die EAN durch mononukleäre Zellinfiltrate in den Nervus ischiadicus gekennzeichnet, wobei insbesondere die Wurzeln und die distalen Segmente der Nerven betroffen sind. Neben Makrophagen, die dominant vorherrschende Zellpopulation im erkrankten Gewebe, sind außerdem T-Zellen, Komplementfaktoren sowie Autoantikörper an der Pathogenese beteiligt (Gold et al., 1999; Kieseier et al., 2004).

Makrophagen spielen eine Schlüsselrolle als Antigenpräsentierende Zellen indem sie MHC-I, MHC-II, kostimulatorische Moleküle und intrazelluläre Adhäsionsmoleküle exprimieren. Das pro-inflammatorische Zytokin Interferon (IFN)  $\gamma$  kann diese Expression auch erhöhen (Schmidt et al., 1992). Des Weiteren sezernieren Makrophagen pro-inflammatorische Zytokine, wie z.B. IL-1, IL-6, IL-12 und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)  $\alpha$ , die im weiteren Verlauf die T-Zell-Aktivierung fördern und die Inflammation induzieren (Kiefer et al., 2001). Als Folge entstehen multifokale Demyelinisierungen entlang der Axone oder Läsionen, vornehmlich in der Nähe von Venolen. Die Makrophagen zerstören also die Myelinhülle in ihrer Funktion und sind in der Lage sowohl zerstörtes als auch intaktes Myelin zu phagozytieren. In der End-Phase der Erkrankung tragen Makrophagen auch zur Reparatur des Nervengewebes bei, indem sie anti-inflammatorische Zytokine, wie IL-10 oder TGF $\beta$ , ausscheiden, sowohl die Apoptose von T-Zellen und als auch die Proliferation von Schwann-Zellen und Remyelinisierung induzieren. Demzufolge spielen Makrophagen eine duale Rolle bei der EAN (Kiefer et al., 2001; Kieseier et al., 2004). Werden die Makrophagen

experimentell eliminiert, können weder klinische, elektrophysiologische noch histologische Symptome der EAN beobachtet werden. Diese Hemmung der Ausbildung einer EAN weist auf die elementare Rolle der Makrophagen sowohl bei der Induktion- als auch der Effektorphase der Krankheit hin (Craggs et al., 1984).

In murinen EAN-Modellen konnten neben Makrophagen auch CD4<sup>+</sup>-Zellen als entscheidende Mediatoren der autoimmunen Inflammation identifiziert werden. Dennoch können T-Zell-defiziente Mäuse eine EAN entwickeln, jedoch mit signifikant reduzierter Schwere der Erkrankung (Zhu et al., 1999; Brunn et al., 2008). Dass T-Lymphozyten eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Erkrankung spielen, konnte auch durch den adoptiven Transfer der EAN auf naive Lewis-Ratten mit Lymphknotenzellen von aktiv immunisierten Tieren gezeigt werden (Lington et al., 1984; Heining et al., 1986).

Der ausschlaggebende pathophysiologische Schritt der inflammatorischen Demyelinisierung ist die frühe Invasion von Leukozyten in das PNS (Abb. 1).

Nach erfolgter Immunisierung mit Myelin-Antigenen, komplettem Freund'schem Adjuvanz (CFA =complete Freund's adjuvant; beinhaltet inaktives *Mycobacterium tuberculosis*) und Pertussis Toxin (PTX), werden DCs in den Lymphknoten durch TLRs als Antwort auf das CFA aktiviert (von Meyenn et al., 2006; Imanishi et al., 2007). Die aktivierten DCs fungieren fortan als APCs, indem sie das Antigen bzw. das applizierte Myelin den naiven T-Zellen präsentieren (Liu et al., 2010). Die in der Peripherie aktivierten, nun autoreaktiven T-Zellen, erkennen die spezifischen Autoantigene über ihren TCR, präsentiert durch MHCII- Moleküle sowie kostimulatorischer Signale auf der Zelloberfläche der APCs. Beim Menschen kann eine vorangegangene Infektion diesen Mechanismus durch molekulare Mimikry auslösen. Ferner können die autoreaktiven T-Zellen B-Zellen zur Produktion von entsprechenden Autoantikörpern anregen (Kieseier et al., 2004)

Durch die Entzündungsreaktion sezernieren die DCs Zytokine, v.a TNF $\alpha$ , welches die Endothelzellen der Blutgefäße zur vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen (P-Selektin, Selektin-E) stimuliert (Engelhardt, 2008). Die Bewegung der aktivierten T-Zellen im Blutstrom wird durch die Präsenz der Adhäsionsmoleküle verlangsamt, sodass sie an der Endothel-Oberfläche entlang rollen (Rolling). Eine stärkere Adhäsion an das Endothel wird durch das intrazelluläre Zelladhäsionsmolekül ICAM-1 (intracellular cell adhesion molecule1) vermittelt, welches an das Integrin LFA-1 (Lymphocyte function-associated

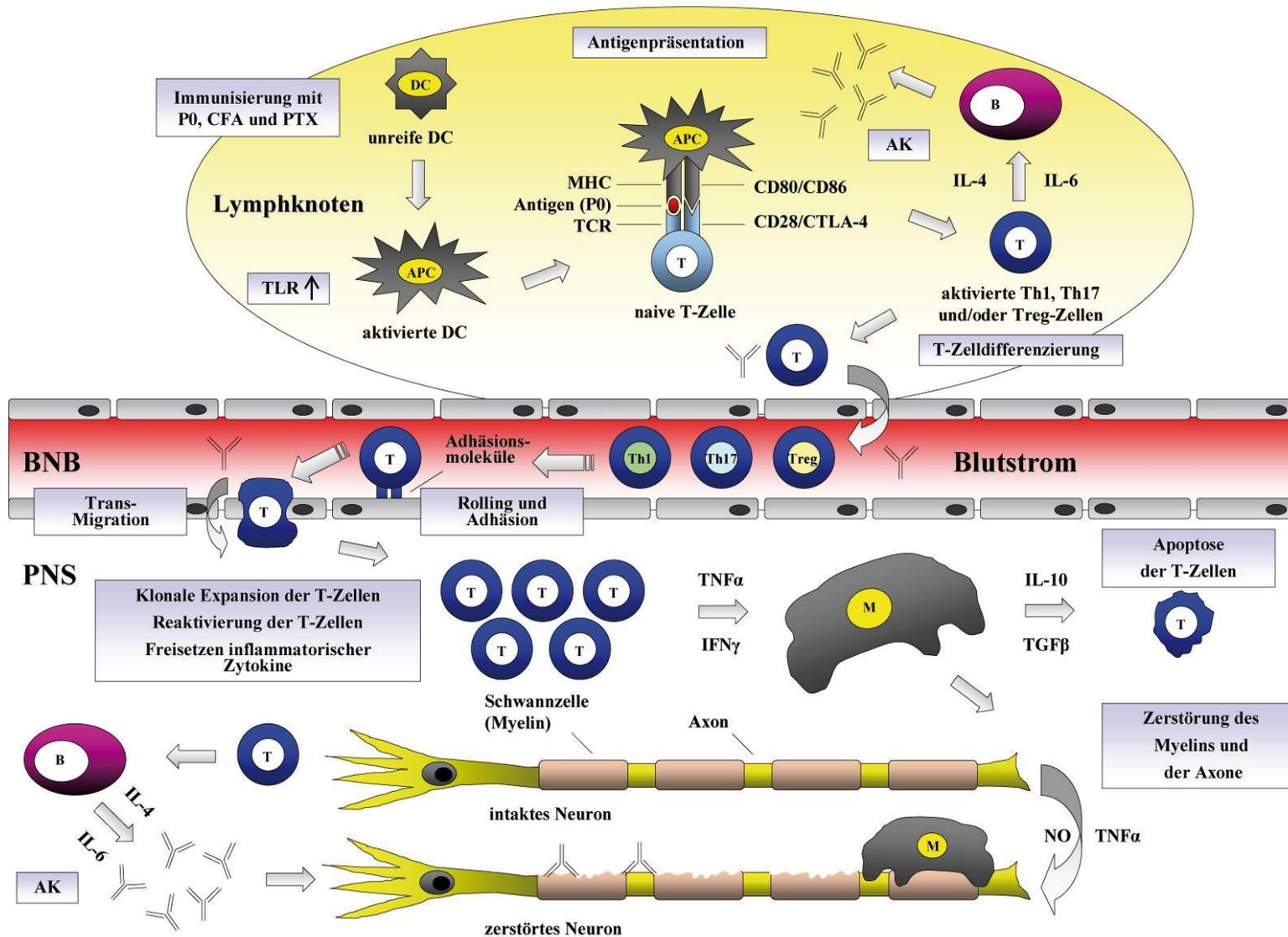


Abbildung 1 : Schematische Darstellung der pathophysiologischen Vorgänge bei der EAN

antigen 1) und den Komplementrezeptor 3 (CR3= complement receptor 3) auf der T-Zelloberfläche bindet und die Bewegung stoppt. Dies ermöglicht es den aktivierten Myelin-spezifischen T- Lymphozyten mithilfe von Chemokinen und Matrix Metalloproteinasen durch die Blut-Nerven-Schranke (BNS) zu migrieren bzw. sie zu überqueren (Diapedese) (Kieseier et al., 1998; Archelos et al., 1999; Kieseier et al., 2000). Es kommt zum Zusammenbruch der BNS; eine Rekrutierung weiterer anderer inflammatorischer Zellen in das PNS wird ermöglicht. Im peripheren Nervensystem angekommen, werden die T-Zellen dort durch lokale APCs reaktiviert.

Die T-Zellen expandieren, sezernieren inflammatorische Zytokine und rekrutieren andere Immunzellen zum Infektionsherd. Darüber hinaus aktivieren die T-Zellen Makrophagen, so dass letztere vermehrt phagozytieren und pro-inflammatorische Zytokine, wie TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  sowie toxische Mediatoren, wie beispielsweise Stickoxide (NO), produzieren. Autoantikörper, die lokal von B-Zellen produziert werden oder solche, die die BNS passiert haben, tragen zur Demyelinisierung und dem axonalen Schaden bei. Die Autoantikörper vermitteln die Demyelinisierung durch Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität. Sie können funktionell relevante Epitope der Nervenleitgeschwindigkeit blockieren und das Komplementsystem aktivieren. Die Entzündungskaskade wird teilweise durch Makrophagen beendet, die den programmierten Zelltod, die Apoptose, von T-Zellen fördern und anti-inflammatorische Zytokine, wie IL-10 und TGF $\beta$  freisetzen (Kieseier et al., 1998; Archelos et al., 1999; Kieseier et al., 2000; Kiefer et al., 2001; Kieseier et al., 2004).

### **1.3. Allgemeine Funktionen des Immunsystems und Entstehung von Autoimmunität**

Die Aufgabe des Immunsystems besteht darin, den Körper vor fremden invadierenden Pathogenen zu schützen und wirtseigene Zellen zu tolerieren (Selbsttoleranz), aber auch entartete körpereigene Zellen auszugliedern. Es gibt 2 Typen der Immunabwehr: das angeborene Immunsystem und die erworbene Immunität.

Die initiale Pathogenerkennung erfolgt zunächst unspezifisch über das angeborene Immunsystem. Dabei sind eine Vielzahl an Komponenten beteiligt, einschließlich der Aktivierung des Komplementsystems, der Phagozytose von Mikroben, der Freisetzung von direkten antimikrobiellen Mediatoren und der Produktion von Zytokinen sowie Chemokinen, die kollektiv gegen die Infektion ankämpfen (Geijtenbeek et al., 2009). Das breite Spektrum invadierender Mikroorganismen bewirkt die Aktivierung von sogenannten

Strukturerkennungsrezeptoren, auch bekannt als Pattern Recognition Receptors (PRRs). Die Besonderheit dieser Rezeptoren des angeborenen Immunsystems ist die Erkennung von Struktureinheiten auf der Oberfläche, und nicht wie bei der erworbenen Immunität die Erkennung von spezifischen Mikroorganismen (Janeway, 1989). In einer Vielzahl von Wirten wurden mehrere sogenannte PRRs dargestellt, beispielsweise die bereits 1985 beschriebenen Toll-Proteine in *Drosophila melanogaster* (Anderson et al., 1985) oder die auf der Zelloberfläche lokalisierten Toll-like-Rezeptoren (TLRs) in *Caenorhabditis elegans* (Bowie, 2008; Ivashkiv, 2008). Weiterführende Studien im Bereich des angeborenen Immunsystems führten im Jahre 1997 zur Entdeckung der ersten Säuger-TLRs (Medzhitov et al., 1997; Medzhitov et al., 1998).

Dennoch erfordert die Komplexität der Pathogene variable Abwehrmechanismen. Hierzu trägt unter anderem die erworbene Immunität bei. Die Besonderheit dieser adaptiven Immunantwort zeichnet sich vor allem durch eine sehr hohe Spezifität, eine enorme Diversität, das Vorkommen von Gedächtniszellen sowie der Diskriminierung zwischen Eigen- und Fremd aus. Deswegen setzt sich das adaptive Immunsystem aus einer Vielzahl unterschiedlicher Komponenten zusammen, die im Zusammenspiel mit unterschiedlichen Abwehrstrategien die Bekämpfung von Krankheitserregern gewährleisten.

B- und T-Lymphozyten gehören dem adaptiven Immunsystems an, stammen von gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark ab (Kondo et al., 1997) und entwickeln sich anschließend in den primären lymphatischen Organen: dem Knochenmark (B-Lymphozyten) und dem Thymus (T-Lymphozyten). Zur kollektiven Erkennung von (fast) jeder molekularen Struktur besitzt jede Zelle eine Vielzahl an Rezeptoren mit eigener Spezifität. Obwohl die B- und T-Zellen strukturell ähnliche Rezeptoren aufweisen, erkennen sie Antigene auf unterschiedliche Weise. B-Zellen erkennen intaktes Antigen über ihren BCR (BCR= *B cell receptor*), d.h. ohne Präsentation durch ein spezialisiertes Molekül. Sie internalisieren das Antigen über ihren BCR, können es prozessieren und den Peptiden des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes (MHC= *major histocompatibility complex*) Klasse-II präsentieren. T-Zellen können über ihren T-Zellrezeptor (TCR= *T cell receptor*) Antigenfragmente erfassen, die prozessiert wurden und mittels MHC I/II oder MHC-ähnlichen Molekülen auf der Oberfläche von APCs, die eine Art Zwischenschalter des angeborenen und adaptiven Immunsystems darstellen, präsentiert wurden. Bei Reinfektion

kann dieses „immunologische Gedächtnis“ direkt auf das Pathogen reagieren und führt zu einer lebenslangen Immunität.

Die Mehrheit der im Thymus gereiften T-Lymphozyten (Thymozyten) differenzieren zu der  $\alpha\beta$ -T-Zelllinie. Diese können weiter in CD4-Rezeptor positive Zellen ( $CD4^+$  oder T-Helfer-Zellen) und  $CD8^+$ -Zellen unterteilt werden. Die  $CD4^+$ -Helfer-Zellen erkennen auf der Zelloberfläche von APCs und B-Zellen Peptide, die von MHC Klasse-II Molekülen exprimiert wurden. Die  $CD8^+$ -Zellen indessen binden an Peptide, die von MHC Klasse-I Molekülen exprimiert wurden.  $CD8^+$ -Zellen werden als Antwort auf eine intrazelluläre Infektion aktiviert. Man nennt sie auch zytotoxische Zellen, da sie an der direkten Tötung infizierter Zellen über die Freisetzung toxischer Substanzen beteiligt sind.

In der Entwicklung von autoimmunen Erkrankungen spielt die Th17 Zell-Differenzierung eine große Rolle. Die Th17-Differenzierung und IL-17-Produktion ist vor allem von dem proinflammatorischen Zytokin IL-23 abhängig, welches durch TLR2 Agonisten induziert wird. Mit der Entdeckung von IL-23 wurde deutlich, dass viele autoimmune Krankheiten, die anfänglich auf T-Helfer1 (Th1) und IL-12 zurückgeführt wurden tatsächlich durch T-Helfer17-Zellen (Th17) oder beiden induziert werden (Weaver et al., 2007; Steinman, 2008). Th17 repräsentieren einen unabhängigen Subtyp der Th-Zellen mit einzigartigen Differenzierungs- und Transkriptionsfaktoren. Sie sind nicht nur die Quelle für ihr Hauptzytokin IL-17A, sondern auch für IL-17F, IL-21 und IL-22. Eine Kombination des immunregulatorischen Zytokins TGF $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) und des proinflammatorischen Zytokins IL-6 oder IL-21 sind zur Induktion von IL-17 in naiven T-Zellen essentiell (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006).

Dass das Zytokin IL-17 auch eine Rolle bei der EAN spielt, wurde durch Untersuchungen von Zhang et al. gezeigt. In Korrelation mit der Schwere der Erkrankung, akkumulieren IL-17 sezernierende Zellen im entzündeten Gewebe (Nervus ischiadicus) (Zhang et al., 2009b).

Der erste entscheidende Schritt bezüglich der „Selbsttoleranz“ besteht in der Eliminierung von autoreaktiven Zellen während der T-Zellentwicklung im Thymus. Es ist wichtig, dass autoreaktive Klone reguliert werden, um die Induktion einer Immunantwort, die gegen periphere Autoantigene gerichtet ist (Autoimmunantwort), zu vermeiden. Man teilt die Mechanismen, durch die die Toleranz gegen die Eigen-Reaktivität herrührt, in einen zentralen und peripheren Mechanismus.

Die zentrale Toleranz besteht in der Deletion potentieller autoreaktiver Lymphozyten durch phagozytierende Makrophagen sowie der Selektion regulatorischer Lymphozyten in den primären lymphatischen Organen. Das Immunsystem strebt infolgedessen auf ein T-Zellrepertoire, welches „selbsttolerant“ ist. Diese negative Selektion wird durch mehrere verschiedene Zelltypen vermittelt, wie z.B. den DCs und Makrophagen aus dem Knochenmark sowie die Epithelzellen im Thymus (Gao et al., 1990; Webb et al., 1990; Sprent et al., 1992). Dennoch ist dieser Prozess fehlerhaft, sodass autoreaktive T-Zellen der zentralen Toleranz entgehen und über periphere Mechanismen kontrolliert werden (van Noort et al., 1993). Autoimmune Erkrankungen, wie beispielsweise GBS, entstehen als ein Resultat adaptiver Immunantworten, die gegen Autoantigene gerichtet sind. Man nimmt an, dass bei der Autoimmunität aufgrund der Ähnlichkeit von körperfremden und körpereigenen Antigenen eine spezifische Immunantwort ausgelöst wird, wobei die produzierten Antikörper auch die körpereigenen Antigene schädigen. Des Weiteren kann die Persistenz des Autoantigens zu einer chronischen fortwährenden Reaktion, die in einer klinischen Erkrankung endet zu einer Autoimmunerkrankung führen.

Autoimmunerkrankungen lassen sich in organspezifische oder systemische Erkrankungen einteilen. Beispiele organspezifischer autoimmuner Krankheiten sind GBS, MS, Hashimoto Thyreoiditis, Morbus Basedow, Diabetes mellitus Typ I und Myasthenia Gravis, bei denen nur ein Organ oder Organsystem befallen wird. Bei Systemischem Lupus, dem Sjögren-Syndrom und Rheumatoider Arthritis handelt es sich um systemische Autoimmunerkrankungen, d.h. es werden systemsich verschiedene Organe oder Organsysteme befallen. Die meisten Untersuchungen mit immunologischen Aspekten von klinischen Erkrankungen werden anhand von experimentellen Tiermodellen durchgeführt. Die Autoimmunität verbindet die Anfälligkeit oder Suszeptibilität von Allelen an multiplen Loci und Umwelteinflüssen. Diese Faktoren scheinen bei der Eigentoleranz auszufallen, was eine autoimmune Reaktion gegen den eigenen Organismus zur Folge hat. Die höchste Suszeptibilität kann mit dem MHC-Phänotyp in Verbindung gebracht werden (Fugger et al., 2000), wobei auch andere Gene, wie CTLA-4 (Donner et al., 1997), IL-2 (Encinas et al., 1999) und Fas (Fischer et al., 2000) mit Autoimmunität in Zusammenhang stehen.

## 1.4. Das angeborene Immunsystem mit Toll-like Rezeptoren und ihre Bedeutung in der Autoimmunität

Bis heute kennt man insgesamt 12 unterschiedliche murine (1-9, 11-13) und 10 humane TLRs (1-10). Sie erkennen ein breites Spektrum an mikrobiellen Molekülen oder pathogen-assoziierten molekularen Strukturen (PAMPs), die eine Bindung und Aktivierung verschiedener PRRs bewirken können (Tab.1).

Die PAMPs beinhalten u.a. das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS) und Kohlenhydratmoleküle gram-positiver Bakterien, das bakterielle Flagellin, und bakterielle bzw. virale Nukleinsäuren (Akira et al., 2004) (Tab.1). Im Gegensatz zu anderen TLRs, die hauptsächlich als Homomere agieren, kann z.B. TLR2 entweder Homodimere oder Heterodimere mit TLR1 oder TLR6 ausbilden, um das Ligandenspektrum zu erweitern. Die meisten TLR-Liganden (TLR4/CD14; TLR3; TLR9) induzieren wirksame Th1 Antworten und eine starke IL-12-Produktion (Manicassamy et al., 2009). Im Gegensatz dazu sind TLR2-Heterodimere, wie z.B. TLR2/TLR6, in der Lage, nur geringe Mengen IL-12, jedoch massive Mengen an anti-inflammatorischem IL-10 zu produzieren. Dies führt in Richtung eines Th2 oder regulatorischen T-Zell-Phänotyps, um eine protektive inflammatorische Immunantwort zu unterdrücken (Depaolo et al., 2008; Manicassamy et al., 2009). Während TLR2/TLR1 Heterodimere triacylierte Lipoproteine erkennen, detektieren TLR2/TLR6 Heterodimere diacylierte Lipoproteine (Buwitt-Beckmann et al., 2005; Buwitt-Beckmann et al., 2006). Zusätzlich wird die Erkennung von TLR2-Agonisten durch mehrere akzessorische Rezeptoren, inklusive des Ko-Rezeptors CD14 (Henneke et al., 2001) oder des LPS-bindenden Proteins (Schroder et al., 2003) beeinflusst.

Die meisten TLR-Moleküle werden auf der Zelloberfläche exprimiert, während TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 in endosomalen Kompartimenten vorgefunden werden. Durch die intrazelluläre Lokalisation dieser TLRs scheint sich deren Reaktivität mit eigener DNA und RNA zu minimieren, ihre Erkennungsspezifität gegenüber ihrer Liganden, DNA- und RNA-Bestandteilen (Tab.1) bleibt jedoch erhalten (Barton et al., 2006). Die TLRs werden auf vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert, inklusive DCs, T-Zellen, Neutrophile, Eosinophile, Mastzellen, Makrophagen, Monozyten und Epithelzellen (Beutler, 2009; Kawai et al., 2009), wobei die Expression interessanterweise in Zusammenhang mit dem funktionellen Status der Zellen steht. Es wurde bereits gezeigt, dass TLR3, TLR6, TLR7 und TLR9 auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen exprimiert werden (Sutmuller et al., 2006), wobei naive

Rezeptor	Ligand	Herkunft der Liganden
TLR1	Triacyl Lipopeptide lösliche Faktoren	Bakterien und Mykobakterien <i>Neisseria meningitis</i>
TLR2	Lipoproteine / Lipopeptide Peptidoglykan Lipoteichonsäure Lipoarabinomannan Phenol-lösliches Modul Glykoinositolphospholipide Glykolipide Porine atypische Lipopolysaccharide atypische Lipopolysaccharide Zymosan Heat-shock Protein 70	Diverse Pathogene Gram-positive Bakterien Gram-positive Bakterien Mykobakterien <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Treponema maltophilum</i> <i>Neisseria</i> <i>Leptospira interrogans</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> Pilze Wirt
TLR3	doppelsträngige RNS	Viren
TLR4	Lipopolysaccharide Taxol Hüllenproteine Heat-shock Protein 60 Heat-shock Protein 70 Typ III Repeat Extra Domäne Oligosaccharide von Hyaluronsäure Polysaccharid Fragmente von Heparansulfat Fibrinogen	Gram-negative Bakterien Pflanzen Viren <i>Chlamydia pneumoniae</i> Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt
TLR5	Flagellin	Bakterien
TLR6	Diacyl Lipopeptide Lipoteichonsäure Zymosan	<i>Mykoplasma</i> Gram-positive Bakterien Pilze
TLR 7	Imidazolquinolin Loxoribin Bropirimin Einzelsträngige RNS	Synthetische Verbindungen Synthetische Verbindungen Synthetische Verbindungen Viren
TLR8	Imidazolquinolin Einzelsträngige RNS	Synthetische Verbindungen Viren
TLR9	CpG enthaltende DNS	Viren
TLR10*	nicht bekannt	nicht bekannt
TLR11	nicht bekannt Profilin	Uropathogene Bakterien <i>Toxoplasma gondii</i>
TLR12	nicht bekannt	nicht bekannt
TLR13	nicht bekannt	nicht bekannt

**Tabelle 1: Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden.**

Modifiziert nach Akira und Takeda, 2004. \*nur beim Menschen, \*\*beim Menschen durch Stop-Kodon inaktiv (Zhang et al., 2004).

Zellen weder signifikante Mengen an mRNA noch intrazelluläre Proteine von TLR2 und TLR4 produzieren. Nur einige CD3<sup>+</sup>-T-Zellen exprimieren vor Aktivierung TLR1, TLR2 oder TLR4 auf ihrer Oberfläche (Babu et al., 2006); dagegen exprimieren aktivierte T-Zellen oder Gedächtniszellen beachtenswerte Mengen an TLR2 und TLR4. Eine Stimulation des TCR mittels CD3-Antikörpern resultiert in einer erhöhten Expression von TLR2 und TLR4 (Liu et al., 2006; Suttmüller et al., 2006).

Die Erkennung von Pathogenen bzw. die Bindung der entsprechenden Liganden an die TLRs induziert die Reifung dendritischer Zellen und die Akquisition immunstimulatorischer Funktionen. Die anschließende TLR-Transduktion wird über die Rekrutierung eines oder mehrerer Adapterproteine initiiert (Akira et al., 2004; Liu et al., 2006; Baccala et al., 2009) (Abb.2).

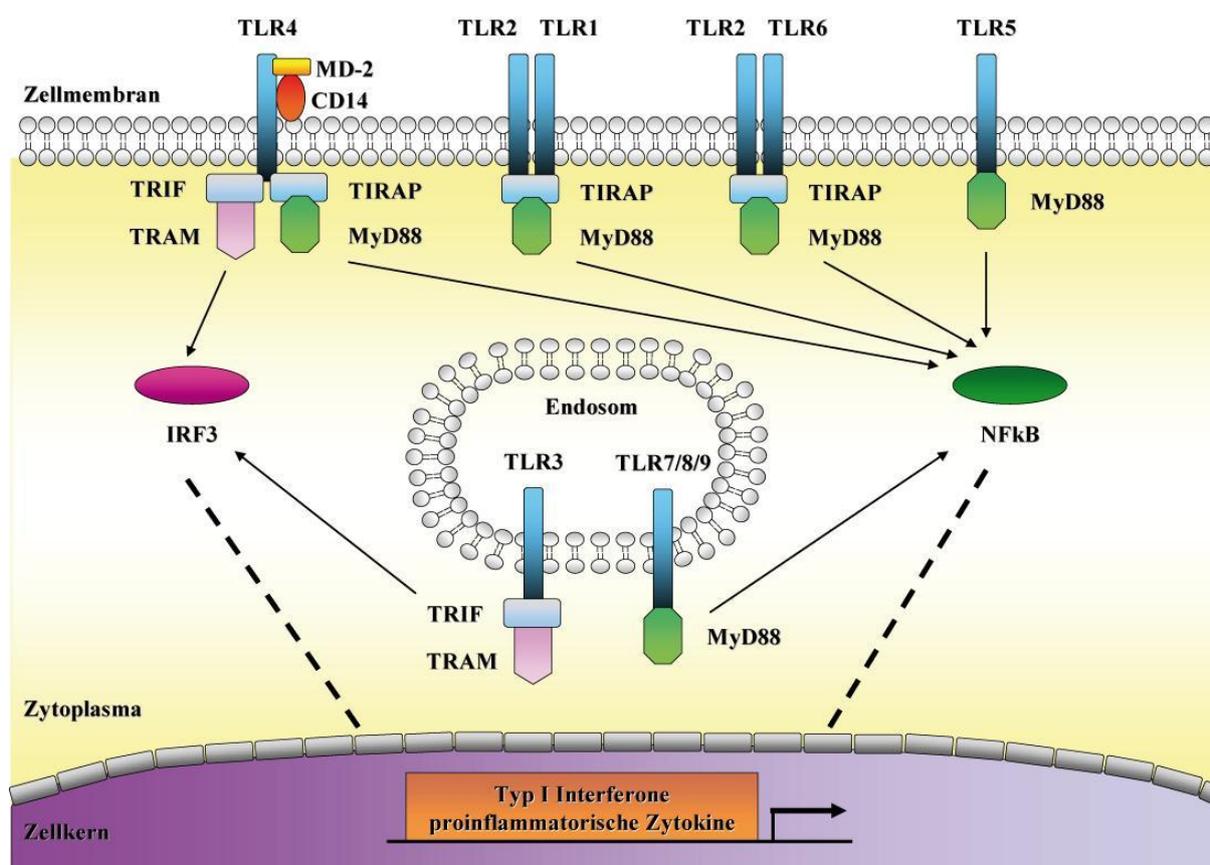


Abbildung 2: TLR-Signalweg (modifiziert nach Akira und Takeda, 2004)

Trotz der unterschiedlichen Signalweitergabe von MyD88 und TRIF, ist das Endresultat das Gleiche: die Aktivierung von NF-κB (=nuclear factor-κB), von IRFs (interferon-regulatory

factors) und anderen, mehr allgemeinen Transkriptionsfaktoren (Ivashkiv, 2008; Nikoopour et al., 2008; Barton et al., 2009).

TLRs können APCs zur Zytokin-Sekretion instruieren, sodass entsprechende Effektorzellen daraus entstehen. Die sich daraus entsprechend entwickelnde T-Zelllinie ist vom jeweiligen Zytokinprofil und der Umgebung abhängig, welches teilweise von TLRs und ihren Liganden beeinflusst wird (Medzhitov et al., 2000; Akira et al., 2001; Medzhitov, 2001). TLR getriggerte APCs migrieren zu den regionalen Lymphknoten und fördern mittels erhöhten Expressionen kostimulatorischer und MHC Moleküle T-Zellantworten. Dies führt zur Produktion inflammatorischer Zytokine, z.B. IL-1, IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  sowie Interferonen (Jones et al., 2010). In diesem Zusammenhang können ausgewählte TLR-Liganden allein oder in Kombination als potentielle Impfsätze (Adjuvanz) genutzt werden, um eine entsprechende Immunantwort in Mensch oder Maus hervorzurufen. Beispielsweise führt die Stimulation von TLR2, TLR4 und TLR5 via Expression kostimulatorischer Moleküle (CD80 und CD86) zur Reifung dendritischer Zellen zu APCs (Agrawal et al., 2003; van Duin et al., 2006).

TLRs werden in einer Vielzahl an autoimmunen Erkrankungen exprimiert, z.B. TLR2 und CD14 in Morbus Crohn (Arranz et al., 2008), Colitis ulcerosa (Kanai et al., 2007) und MS (Andersson et al., 2008). CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen reagieren beide auf eine TLR2 Stimulation mit zellulärer Aktivierung und gesteigerter Proliferation (Komai-Koma et al., 2004; Cottalorda et al., 2006; Mercier et al., 2009).

EAE-Studien zeigen, dass eine TLR2-Defizienz zu einem mildereren Verlauf der EAE führen (Reynolds et al., 2010); eine CD14-Defizienz, hingegen führt zu einer Verstärkung von EAE-Symptomen (Walter et al., 2006). Im Besonderen konnte sowohl in der EAE als auch in der EAN nachgewiesen werden, dass CD14 zusammen mit TLR2 im entzündlichen Gewebe (Gehirn bei EAE; Nervus ischiadicus bei EAN) exprimiert wird (Zekki et al., 2002; Zhang et al., 2009a) und demzufolge scheinbar beide eine pathogene Rolle haben.

TLR3 signalisiert über den MyD88-unabhängigen TRIF-Weg, der zur stark erhöhten Transkription von Typ I IFNs führt, welche bei der EAN die Migration inflammatorischer Zellen in das periphere Nervengewebe inhibieren (Zou et al., 1999; Sen et al., 2005). Im Zusammenhang mit der EAE konnte gezeigt werden, dass eine TLR3-Stimulation durch

erhöhte Typ I IFN-Mengen in einer reduzierten Anzahl infiltrierender Zellen und einer geringeren Demyelinisierung sowie zur erhöhten Viabilität von Neuronen (Touil et al., 2006).

Interessanterweise kann TLR4 über MyD88, aber auch MyD88-unabhängig über TRIF signalisieren (Akira et al., 2004). In anderen autoimmunen Erkrankungen, wie z.B. chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, wurde gezeigt, dass TLR4 nach Bindung seines Liganden, die Krankheit durch erhöhte Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS)-Aktivität induzieren kann (Shi et al., 2006). Übereinstimmend mit dem EAN-Modell finden sich im Nervus ischiadicus und den Spinalganglien vermehrte NOS-Aktivitäten (Lee et al., 2009; De La Hoz et al., 2010). Des Weiteren ist bekannt, dass TLR4 und TLR9 potentielle Vermittler von Gefahrensignalen sind, um APCs zu aktivieren und anschließend IL-12 zu produzieren. Aufgrund ihrer Hochregulierung in der Ratten-EAN und der murinen EAE, wird TLR4 und TLR9 eine Bedeutung in autoimmunen Erkrankungen zugeschrieben (Prinz et al., 2006; Deng et al., 2007).

Wie auch die TLRs gehört CD14 zu den angeborenen Immunrezeptoren und ist ein Strukturerkennungsrezeptor (PRR). Es handelt sich um ein Glykosyl-phosphatidylinositol (GPI)-gebundenes Protein, d.h. es besitzt keine eigene Domäne zur intrazellulären Kommunikation und ist auf die Mithilfe anderer TLRs wie TLR4 oder TLR2 angewiesen (Pugin et al., 1994). CD14 wird vorwiegend auf myeloiden Zellen exprimiert und erkennt, wie auch TLR4 bzw. TLR2, PAMPs, einschließlich LPS (TLR4-Ligand) auf der Zelloberfläche von gram-negativen Bakterien sowie Peptidoglykane oder Lipoteichonsäuren (TLR2-Liganden) auf gram-positiven Bakterien (Dziarski et al., 1998; Pfeiffer et al., 2001; Ellingsen et al., 2002; Alugupalli et al., 2007; Xu et al., 2007). CD14 als kann direkt an Pam3CSK4 (ein TLR2-Agonist) binden und dies an TLR2 weiter vermitteln, wodurch die Sensitivität von TLR2 um ein 100faches erhöht wird (Vasselon et al., 2002). TLR4 kann mit MD-2 einen Komplex bilden, der zur Oberflächenexpression und LPS-regulierten Aktivierung von TLR4 notwendig ist. Während TLR4 und MD-2 konstitutiv verbunden sind, wird CD14 erst nach Bindung von LPS rekrutiert (Ulevitch, 2003). Der durch TLR2 und CD14 bzw. anderen TLRs getriggerte Signalweg durch verschiedene Liganden führt zu einer angeborenen Immunantwort mit anschließender NF $\kappa$ B-Aktivierung und der Produktion pro-inflammatorische Moleküle.

Bezüglich der TLRs 11-13 gibt es nur wenige Informationen über ihre Aufgabe in autoimmunen oder neurologischen Erkrankungen. In einer Studie über murine

Neurocysticercosis, eine parasitische Infektion, wurde gezeigt, dass TLR11 und TLR12 vermehrt exprimiert werden, mit höchster Expressionsrate auf Neuronen, und TLR11 zusätzlich auf CD11b/c myeloiden Zellen (Mishra et al., 2008).

MyD88 scheint in autoimmunen Erkrankungen eine Schlüsselrolle zu spielen. Eine MyD88-Defizienz beispielsweise schützt vor Ausbildung einer EAE (Prinz et al., 2006; Marta et al., 2008), Diabetes Typ I (Wen et al., 2008) oder autoimmuner Nephritis (Sadanaga et al., 2007), was auf das Fehlen des TLR-Signalweges zurückgeführt wird.

Ungeachtet dieser Hinweise, ist die Rolle der TLRs und von MyD88 in der EAN noch immer unklar.

## **1.5. Das adaptive Immunsystem und seine Bedeutung bei der Autoimmunität**

Allen Immunantworten ist gemein, dass sie zur effizienten Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen zwei unterschiedliche Signale benötigen. Bereits vor über 40 Jahren stellten Bretscher und Cohn die Hypothese eines Zwei-Signal-Modells von B-Lymphozyten auf (Bretscher et al., 1970), welches durch Lafferty und Woolnough im Jahre 1977 um die T-Zellen erweitert wurde (Lafferty et al., 1977).

Beim ersten antigen-spezifischen Signal werden den T-Zellen Peptide über ihren TCR zusammen mit MHC-I oder -II von reifen DCs bzw. APCs präsentiert. Das zweite oder kostimulatorische Signal wird von löslichen Faktoren wie z.B. IL-2 oder kostimulatorischen Oberflächenmolekülen der APCs bereitgestellt (June et al., 1994). Ohne effiziente Kostimulation können die T-Zellen weder proliferieren noch IL-2 produzieren (Jenkins et al., 1987; DeSilva et al., 1991). Die Suche nach kostimulatorischen Molekülen führte u.a. zur Entdeckung des CD28-B7-Systems (June et al., 1990; Harding et al., 1992). Obwohl bereits mehrere kostimulatorische Signalwege bekannt sind, einschließlich des CD40 Ligands (CD154)/CD40, CD2/CD58, LFA-1 (CD18)/ICAM-1 (CD54), und andere, ist der CD28/ B7-Weg am wirksamsten und auch am besten untersucht.

Das Glykoprotein CD28 wird in einem sehr geringen, aber noch messbaren Niveau auf ruhenden CD4<sup>+</sup>-Zellen und CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten exprimiert (Turka et al., 1990). Reife CD3<sup>+</sup>-Thymozyten verfügen indessen über höhere Mengen an CD28 und sind diesbezüglich peripheren T-Zellen gleichzusetzen.

CD28 ist ein wichtiger regulatorischer Rezeptor der T-Zell-Aktivierung. Die Bindung der entsprechenden Liganden B7.1 (CD80) und/oder B7.2 (CD86) von APCs an CD28 führt zu einem positiven kostimulatorischen Signal (Linsley et al., 1991), einer erhöhten Proliferationsrate von T-Zellen (Gmunder et al., 1984; Hara et al., 1985; Pierres et al., 1988; Van Lier et al., 1988; Ledbetter et al., 1990) sowie einer erhöhten Expression und Produktion des IL-2-Rezeptors als auch der Th1-Zytokine IL-2, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  (Martin et al., 1986; Ledbetter et al., 1990). Interessanterweise kann die Gabe von B7.1- und B7.2-Antikörpern die T-Zellaktivierung *in vitro* hemmen (Salomon et al., 2001); *in vivo* Versuche mit CD28-defizienten Mäusen zeigen ebenfalls eine starke Verminderung der CD4<sup>+</sup>T-Zellaktivität (Green, et al. 1994).

In anfänglichen EAE-Studien wurde gezeigt, dass eine komplette Blockade von CD28/B7 zum Zeitpunkt des Krankheitsausbruchs, etwa 10-15 Tage p.i. (post Immunisierung), zur Reduktion der Symptome und der ZNS-reaktiven T-Zellproliferation führt (Oliveira-dos-Santos et al., 1999). Zum anderen haben die Arbeiten mehrerer anderer Gruppen gezeigt, dass die klinischen Rückläufe nicht aus einer Reaktivierung von Gedächtniszellen, sondern eine Konsequenz der Aktivierung naiver autoreaktiven T-Zellen sind. Die Aktivierung wird durch endogene Myelin-Epitope, die aus autoimmuner Gewebszerstörung hervorgehen, angesteuert (Lehmann et al., 1992; McRae et al., 1995; Oliveira-dos-Santos et al., 1999). Infolgedessen kann die Progression einer Autoimmunerkrankung ebenso durch eine Hemmung der Aktivierung von naiven T-Zellen und deren Expansion erreicht werden. Zusammenfassend unterstützen diese Untersuchungen eine primäre Rolle der CD28/B7-Aktivierung bei der Initiierung, nicht aber bei der Reaktivierung von Immunantworten.

Unmittelbar nach Entdeckung des positiven kostimulatorischen CD28/B7-Signalweges, wurde deutlich, dass das Zytotoxische-T-Lymphozyten-Antigen 4 (CTLA-4= cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 oder CD152) einen zweiten, zu CD28 homologen, induzierbaren Rezeptor und möglichen negativen Regulator der T-Zell-Aktivierung darstellt (Walunas et al., 1994; Krummel et al., 1995). Anders als CD28 wird CTLA-4 nicht konstitutiv auf der Zelloberfläche von naiven T-Zellen, sondern erst nach oder infolge der Aktivierung von T-Zellen hoch reguliert (Brunet et al., 1987; Freeman et al., 1992; Linsley et al., 1992). Natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen (nTregs) jedoch exprimieren dieses Molekül konstitutiv (Sakaguchi, 2004). Neben immunsuppressiven Funktionen (Read et al., 2000; Takahashi et al., 2000; Bluestone et al., 2003), spielt CTLA-4 auch bei der Generierung der regulatorischen T-Zellen eine Rolle (Tang et al., 2004; Zheng et al., 2006), während CD28

zur Homöostase der Tregs beiträgt (Salomon et al., 2000). CTLA-4 teilt die Liganden B7 mit dem positiven kostimulatorischen CD28, wobei CTLA-4 eine höhere Affinität als CD28 hat. Folglich wird die T-Zellaktivierung in Anwesenheit von CTLA-4 reduziert (Linsley et al., 1992). CTLA-4 defiziente Mäuse entwickeln lymphoproliferative Erkrankungen und sterben innerhalb 3-4 Wochen nach Geburt, was zusätzliche Beweise für die bedeutende Rolle von CTLA-4 bei der Hemmung der T-Zellantwort und der immunologischen Homöostase liefert (Tivol et al., 1995; Waterhouse et al., 1995).

Darüber hinaus wurde festgestellt, dass das CTLA-4-Gen mit einer Vielfalt von autoimmunen Erkrankungen in Zusammenhang steht, wie z.B. Diabetes mellitus Typ I (Marron et al., 1997), autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen (Simmonds et al., 2004) oder Asthma bronchiale (Munthe-Kaas et al., 2004).

## 1.6. Ziele der Arbeit

GBS ist eine inflammatorische Autoimmunerkrankung des peripheren Nervensystems und ist pathologisch durch den Zusammenbruch der BNS, der Demyelinisierung und der Akkumulation von T-Zellen und Makrophagen im entzündeten Gewebe gekennzeichnet. Bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen sind vor allem Th1- und Th17-Zellen beteiligt, welche ihrerseits teilweise von angeborenen Immunrezeptoren, z.B. TLRs und CD14, reguliert werden. Die Rolle der TLRs und von CD14 in der EAN Pathophysiologie ist bisher noch sehr unvollständig bekannt. Zur Aufklärung der an der EAN involvierten multifunktionellen TLRs und des LPS-Rezeptors CD14, wurden in dieser Arbeit Untersuchungen mit folgenden Fragestellungen durchgeführt:

- 1) In welcher Form variieren die pathologischen Merkmale der EAN (Leukozyteninfiltration, Demyelinisierung oder axonale Schädigung) während des Krankheitsverlaufes?
- 2) Welche Rolle spielt die Kostimulation bzw. Antigenpräsentation während der EAN-Pathogenese?
- 3) Verändert sich das TLR- und/oder Zytokin- Expressionsprofil während der EAN?
- 4) Welche TLRs sind im Blut von GBS-Patienten erhöht exprimiert?

- 5) Was passiert bei der Adhäsion bzw. Transmigration antigenspezifischer T-Zellen durch die BNS nach Induktion einer EAN?
- 6) Welche elektrophysiologischen Veränderungen können bei der EAN festgestellt werden?
- 7) Wie wirkt sich eine Defizienz des angeborenen Immunrezeptors CD14 auf die EAN (CD14-Knock-Out vs. Wildtyp) in Bezug auf den Verlauf, die Pathologie, die Pathophysiologie und die Elektrophysiologie aus?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Chemikalien mit Bezugsquelle

(3-Aminopropyl)triethoxysilane	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Aceton	Aug. Hedinger GmbH & Co. KG, Sachsen-Anhalt, Deutschland
AEC-Tabletten	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Aquatex	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Casein	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Citrat	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
DMEM-Medium + Glutamax	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
dNTP Mix 10mM	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
DTT 0,1M	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
EDTA-Trypsin 0,5%	Difco, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Entellan	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (EtOH) 100%	über Apotheke in den Universitätskliniken des Saarlandes

Fast-SYBR-Green-Puffer	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
FCS (Fetal calf serum)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Fibronectin 50µg/ml	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
First-Strand Puffer 5x (RT-PCR)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Flüssigstickstoff	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Formaldehyd 37%	über Apotheke in den Universitätskliniken des Saarlandes
Giemsa's Azur- Eosinmethylenblau-Lösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glutardialdehyd	Carl Roth GmbH + CO. KG, Karslsruhe, Deutschland
Glykogen	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Guanidinthiocyanat	Carl Roth GmbH + CO. KG, Karslsruhe, Deutschland
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% (Wasserstoffperoxid)	über Apotheke in den Universitätskliniken des Saarlandes
Hämalaun-Lösung nach Meyer	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HBSS H1387	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
HEPES Puffer 1M	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
IFA	Difco Bacto; über Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Immersions-Öl 518 F Fluoreszenzfrei	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland

Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland, über Apotheke in den Universitätskliniken des Saarlandes
Isopentan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol	Aug. Hedinger GmbH & Co. KG, Sachsen-Anhalt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kieselgel	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Luxol-Fast-Blue	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mykobakterien (inaktiv)	Difco Bacto; über Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
N,N, Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	über Apotheke in den Universitätskliniken des Saarlandes
Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumbicarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, über Apotheke
Natriumhydroxid (NaOH) 1M	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, über Apotheke
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Orsotamin (Ketaminhydrochlorid) 100mg/ml	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland, über die Tierschutzbeauftragte
$\text{PO}_{\text{aa}180-199}$ -Peptid (crude)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland

Paraffin (Tissue wax)	MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Difco, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Perjodsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PTX	Alexis Chemicals; über Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
random primer 3µg/ ml	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Rompun 2%	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Salpetersäure 65%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (HCl) 32%	über Apotheke in den Universitätskliniken des Saarlandes
Saponin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Schiff-Reagenz	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Silan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Silbernitrat (AgNO <sub>3</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tissue Tek	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
TNF $\alpha$ mouse	BIOMOL GmbH Hamburg, Deutschland
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Trizol LS	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland

Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Aug. Hedinger GmbH & Co. KG, Sachsen-Anhalt, Deutschland

### 2.1.2. Lösungen

<u>AEC-Puffer</u> frisch ansetzen	Natrium-Acetat 0,1M Essigsäure 0,1M	7,9ml 2,1ml
<u>AEC-Tabletten-Lösung</u> bei -20°C lagern	AEC DMF	1 Tablette 2,5 ml
<u>AEC-Reagent</u> 30 Minuten vor Gebrauch ansetzen	AEC-Puffer AEC-Tabletten-Lösung H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,4ml 100µl 1,5µl
<u>AgNO<sub>3</sub>-Lösung 20%</u> frisch ansetzen	AgNO <sub>3</sub> A.d.	40g ad 200ml
<u>bEnd3-Medium</u> bei 4°C lagern	DMEM-Medium+Glutamax FCS Pen/Strep	445ml 50ml 5ml
<u>BSA in PBS (0,1%)</u> bei RT lagern	PBS BSA	10ml 0,1g
<u>CFA (complete Freund's Adjuvanz)</u> 5mg zunächst in 1ml IFA lösen und mit Mikropistille zerstoßen, dann auf 10ml auffüllen, bei 4°C lagern	Mykobakterien  IFA	5mg  10ml

<u>Citratpuffer 10mM</u> pH= 6,0 bei RT lagern	Zitronensäure A.d.	1,9213g ad 1l
<u>Casein 0,02%</u> bei -20°C lagern	Casein A.d.	0,02g ad 100ml
<u>Entwickler</u> bei 4°C lagern, am besten 2-3 Monate vor Benutzen ansetzen	Formaldehyd 37% A.d. Citrat Salpetersäure 65%	20ml 100ml 0,5g 1 Tropfen
<u>Eosinstocklösung</u>	Eosin EtOH 100% A.d.	2g 152ml 48ml
<u>Eosingebrauchslösung</u>	Eosinstocklösung EtOH 100% A.d. Essigsäure 100%	50ml 120ml 29,5ml 0,5ml
<u>Essigsäure 0,1M</u> bei RT lagern	Essigsäure 100% A.d.	6,005g ad 1l
<u>FACS-Puffer</u>	PBS10x FCS NaN <sub>3</sub> 2M A.d.	100ml 50ml 5ml 945ml
<u>Formaldehyd 1% in PBS</u>	PBS 10x Formaldehyd 37% A.d.	100ml 27,027ml 872,973ml

Gefriermedium	FCS bEnd3-Medium DMSO	5ml 3ml 2ml
<u>Glutardialdehyd 2,5% in PBS</u>	Glutardialdehyd 50% PBS 10x A.d.	5ml 10ml 85ml
<u>Guanidinthiocyanat 4M</u> bei 4°C lagern	<u>Guanidinthiocyanat</u> A.d.	472,64g ad 1l
<u>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3%</u> bei 4°C lagern	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% A.d.	10µl 990µl
<u>HBSS-Lösung</u> pH=7,4, steril filtrieren	HBSS H1387 NaHCO <sub>3</sub> A.d.	1 Flasche 0,35g ad 1l
<u>HBSS-Waschpuffer</u>	HBSS-Lösung FCS HEPES 1M	437,5ml 50ml 12,5ml
<u>HCl-Alkohol 1%</u> bei RT lagern	HCl 32% A.d.	6,004ml ad 100ml
<u>Luxol-Fast-Blue-Lösung 0,1%</u> bei RT lagern	Luxol-Fast-Blue EtOH 96% Essigsäure 0,1%	0,1g 100ml 0,5ml
<u>MAM-Medium</u>	DMEM-Medium+Glutamax FCS HEPES 1M	462,5ml 25ml 12,5ml

<u>Natrium-Acetat 0,1M</u> bei RT lagern	Na(CH <sub>3</sub> COO) A.d.	8,203g ad 1l
<u>Natriumthiosulfat 2%</u> frisch ansetzen	Natriumthiosulfat A.d.	2g ad 100ml
<u>Natriumazid 2M</u>	NaN <sub>3</sub> A.d.	1,3002g 10ml
<u>PO<sub>aa180-199</sub>-Peptidstocklösung 4mg/ml</u> bei -20°C lagern	PO <sub>aa180-199</sub> -Peptid PBS 1x	10mg 2,5ml
<u>P0-Emulsion (Bsp. für 10 Mäuse)</u> in einer sterilen 2ml-Spritze herstellen dreimal für 20" beschallen mind. ÜN -20°C, wieder auftauen vor Applikation nochmals entsprechend beschallen und in Luer-Lok™Tip Spritzen transferieren	PO <sub>aa180-199</sub> -Peptidstocklösung CFA PBS 1x	250µl 1000µl ad 2ml
<u>PTX-Stocklösung</u> bei 4°C lagern	Pertussis Toxin A.d.	50µg 500µl
<u>PTX-Gebrauchslösung 400ng</u> frisch ansetzen	PTX-Stocklösung PBS 1x	4µl 96µl
<u>PTX-Gebrauchslösung 200ng</u> frisch ansetzen	PTX-Stocklösung PBS 1x	2µl 98µl

<u>PBS 10x</u> bei RT lagern	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> A.d.	400g 10g 71g 69g ad 5l
<u>TNF<math>\alpha</math>-Stocklösung (9x10<sup>8</sup>u/mg)</u> bei -80°C lagern (Lot No: 7908)	T NF $\alpha$ PBS + 0,1% BSA	50 $\mu$ g 50 $\mu$ l
<u>TNF<math>\alpha</math>-Gebrauchslösung (100.000u)</u> bei -80°C lagern (Lot No: 7908)	TNF $\alpha$ Stocklösung PBS	1,11 $\mu$ l 998,89 $\mu$ l
<u>TBS 10x</u> pH=7,4-7,5 bei RT lagern	Tris NaCl A.d.	302,5g 425g ad 5l
<u>TBST 10x</u> bei RT lagern	TBS Tween 20	999ml 1ml

### 2.1.3. Kits

<u>SuperScript® II Reverse Transcriptase</u>	Invitrogen, Darmstadt, Germany
<u>VectaStain Elite ABC kit</u>	Vector Laboratories Inc. Burlingame, CA

## 2.1.4. Antikörper

## 2.1.4.1. Immunhistochemie

Antigen	Typ/Konjugat	Bezugsquelle
rat anti-mouse CD4	purified monoklonal Klon: H129.19	BD Biosciences Heidelberg, Deutschland
rat anti-mouse CD8	purified monoklonal Klon: 53-6.7	BD Biosciences Heidelberg, Deutschland
rat anti-mouse CD14	purified monoklonal Klon: rmC5-3	BD Biosciences Heidelberg, Deutschland
rat anti-mouse CD45	purified monoklonal 3Klon: 0-F11	BD Biosciences Heidelberg, Deutschland
rat anti-mouse F4/80	purified monoklonal Klon: CI:A3-1	serotec AbD Düsseldorf, Deutschland
rat anti-mouse Gr-1	purified monoklonal Klon: RB6-8C5	BD Biosciences Heidelberg, Deutschland
rat anti-mouse Ly6B.2	purified monoklonal Klon: 7/4	serotec AbD Düsseldorf, Deutschland
rabbit anti-mouse TLR2	purified polyklonal ab47840	Abcam plc Cambridge, UK
rat anti-mouse TLR4	purified monoklonal Klon: MTS510	BioCarta LLC San Diego, USA
rat anti-mouse TLR6	purified monoklonal Klon: 418601	R&D Systems GmbH Wiesbaden-Nordenstadt Deutschland
goat anti-rat IgG	Sekundärantikörper Biotin	Vector Laboratories Inc.Burlingame, CA
goat anti-rabbit IgG	Sekundärantikörper Biotin	Vector Laboratories Inc.Burlingame, CA

## 2.1.4.2. Durchflusszytometrie

Antigen	Typ/Konjugat	Bezugsquelle
rat anti-mouse CD4	fluoresceinisothiocyanat (FITC) monoklonal Klon: GK1.5	BD Biosciences Heidelberg, Deutschland
rat anti-mouse CD8a	peridinin-chlorophyll- protein complex (PerCP) monoklonal Klon: 53-6.7	BD Biosciences Heidelberg, Deutschland
rat anti-mouse MHC class II	phycoerythrin (PE) monoklonal Klon: NIMR-4	SouthernBiotech Birmingham, USA
syrian hamster anti-mouse CD28	allophycocyanin (APC) monoklonal Klon 37.51	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH Eching, Deutschland
hamster anti-mouse CD152 (CTLA-4)	purified monoklonal Klon: UC10-4F10-11	BD Biosciences Heidelberg, Deutschland
armenian hamster anti-mouse CD80	fluoresceinisothiocyanat (FITC) monoklonal Klon: 16-10A1	BD Biosciences Heidelberg, Deutschland
rat anti-mouse CD86	purified monoklonal Klon: GL1	BD Biosciences Heidelberg, Deutschland
armenian hamster anti-mouse TCR $\beta$ chain	phycoerythrin (PE) monoklonal Klon: H57-597	BD Biosciences Heidelberg, Deutschland
rat anti-mouse TLR1	Alexa Fluor® 647 monoklonal Klon: eBioTR23	NatuTec GmbH eBioscience Company Frankfurt, Deutschland
rat anti-mouse TLR2	Alexa Fluor® 647 monoklonal Klon: 6C2	NatuTec GmbH eBioscience Company Frankfurt, Deutschland

rabbit anti-mouse TLR3	purified polyklonal SP7128P	Acris Antibodies GmbH Herford, Deutschland
rat anti-mouse TLR4/MD-2	allophycocyanin (APC) monoklonal Klon: MTS510	NatuTec GmbH eBioscience Company Frankfurt, Deutschland
rat anti-mouse TLR6	purified monoklonal Klon: 418601	R&D Systems GmbH Wiesbaden-Nordenstadt Deutschland
rat anti-mouse TLR9	Biotin monoklonal Klon: M9.D6	NatuTec GmbH eBioscience Company Frankfurt, Deutschland
rabbit anti-mouse TLR11	purified polyklonal 12231726A	Acris Antibodies GmbH Herford, Deutschland
rabbit anti-mouse TLR12	purified polyklonal Klon: AB081604B	Acris Antibodies GmbH Herford, Deutschland
rat anti-mouse MyD88	purified monoklonal Klon: 316902	R&D Systems GmbH Wiesbaden-Nordenstadt Deutschland
rat anti-mouse IL-17A	Alexa Fluor® 647 monoklonal Klon: eBio17B7	NatuTec GmbH eBioscience Company Frankfurt, Deutschland
goat anti-rabbit IgG	Cy5®	Abcam plc Cambridge, UK
goat anti-armenian hamster IgG	Cy5®	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. Suffolk, UK
goat anti-rat IgG	Biotin	Molecular Probes Leiden, The Netherlands
Streptavidin	allophycocyanin (APC)	BD Biosciences Heidelberg, Deutschland

### 2.1.5. Primer für die Quantitative Real-Time PCR

Gen	Forward primer	Reverse primer
TLR1	CTGGCGAAACTTCAAACAAA	AGTCCAGCTGACCCTGTAGC
TLR2	GGACTTCATTCTGGCAAGT	GAAGAATGAGAATGGCAGCA
TLR4	GGATGAGGACTGGGTAAGGA	AAAGATACACCAGCGGCTCT
TLR6	TCCTGCCATCCTATTGTGAG	GCAATTGGCAGCAAATCTAA
TLR9	CCCTGGAAGAGCTAAACCTG	ACAGTTGCCGTCCATGAATA
MyD88	TCTCTCCTTCCCAGAGCAAT	CATTCCTCCCAAGATCCTA
CD14	TAGGTCCTCGAGCGTCAGTT	CTGCAACTTCTCCGAACCTC
GAPDH	GAAGGACTCATGACCACAGT	GTCATCATATTTGGCAGGTT

### 2.1.6. Geräte, Zubehör und sonstige Hilfsmittel

In dieser Arbeit wurden die in 2.2. beschriebenen Methoden mittels der hier gelisteten Geräte, Zubehör und sonstigen Hilfsmitteln durchgeführt. Diese werden im Detail nicht mehr gesondert in 2.2. erfasst.

#### 2.1.6.1. Geräte

7500 fast Real-time PCR System	Applied Biosystems Carlsbad, CA
Accu-Jet	BrandTech Scientific Essex, CT
Autoclav V-150, V-2540EL	Systec Wettenberg, Deutschland
Backschrank	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Einzelkanalpipetten 2µl-20µl, 10µl-100µl, 100µl-1,000µl	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Eismaschine	Eurfrigor Ice Makers Srl Lainate, Italien
Entwässerungsautomat (Tissue Processor) TP1020	Leica Microsystems Nussloch GmbH Nussloch, Deutschland

Erhitzbare Paraffineinbettungsmaschine EG1150 H	Leica Microsystems Nussloch GmbH Nussloch, Deutschland
Exsikkator	VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland
FACSCanto™ II Durchflusszytometer mit FACS Diva Software	BD Biosciences Heidelberg, Deutschland
Fluoreszenz-Mikroskop Eclipse E600	Nikon Alzenau, Deutschland
Gefrierschrank profi line (-20°C)	Liebherr-International Deutschland GmbH Biberach an der Riss, Deutschland
HERAcell CO <sub>2</sub> Inkubator	Heraeus Hanau, Deutschland
Kühlplatte EG1150C	Leica Microsystems Nussloch GmbH Nussloch, Deutschland
Kühlschrank comfort (4°C)	Liebherr-International Deutschland GmbH Biberach an der Riss, Deutschland
Laborwaage ALS120-4, EW4200, EW420	Kern & Sohn Balingen, Deutschland
Laborzentrifuge SIGMA 4K15C	Sigma Laborzentrifugen GmbH Osterode am Harz, Deutschland
Magnetrührer	Ika-Combimag RCO Namur, Belgien
Multipette® plus	Eppendorf Hamburg, Deutschland
pH-Meter InoLab pH 720	WTW Weilheim, Deutschland
Präzisionswaage	Sartorius Göttingen, Deutschland
Sapphire 2ME	Medelec Old Woking, UK
Schlittenmikrotom SM 2000 R	Leica Microsystems Nussloch GmbH Nussloch, Deutschland
Sigma 4K10 Tischzentrifuge	Sigma Laborzentrifugen GmbH Osterode am Harz, Deutschland
SmartSpec3000 Spektrophotometer	Bio-Rad Laboratories Hercules, CA
Sterilbank mit Sauger	Kendro Laboratory Products GmbH Rodenbach, Deutschland
Taumel-Schüttler	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH Burgwedel, Deutschland

Thermomixer Comfort	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Ultra-pure water purification system PURELAB Ultra	ELGA Celle, Deutschland
Ultraschallstab Bandelin Sonopuls HD 2070	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG Berlin, Deutschland
Vortex-Mixer Reax 2000	Heidolph Schwabach, Deutschland
Wasserbad	Köttermann GmbH & Co KG Hänigsen, Deutschland

### 2.1.6.2. Zubehör und sonstige Hilfsmittel

Akupunkturadeln (Länge 30mm, Durchmesser 0,3mm)	Wujiang City Cloud & Dragon Medical Device Company, China
Base Molds (Einbettkästchen für Kryo)	Labonord Templemars, Frankreich
BD Falcon™ Serologische Pipetten 5ml, 10ml, 25ml	Becton und Dickinson Heidelberg, Deutschland
BD Plastipak™ syringe, 1ml	Becton und Dickinson Heidelberg, Deutschland
Biosphere® Filter tips 10ml, 100ml, 1000ml	Sarstedt Nürnbrecht, Deutschland
Broome Rodent Restrainer 15-30g	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH March-Hugstetten, Deutschland
chamber slides	VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland
Combitips (plus) 1ml, 5ml, 10ml	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Deckgläschen 24x32mm	R. Langenbrick Emmendingen, Deutschland
Einbettkassetten für Paraffin	Labonord Templemars, Frankreich
Flaschenaufsatzfilter 500ml, 0.22mm	Sarstedt Nürnbrecht, Deutschland
Glaswaren aller Art	VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland
Glaswaren und Zubehör	VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland

Handschuhe	B. Braun Tuttlingen, Deutschland
Histoschwämme als Abstandshalter	Labonord Templemars, Frankreich
Homogenisator aus Glas mit Kolben (Glaspotter)	A. Hartenstein GmbH Würzburg, Deutschland
Kanülen 20G, 23G, 26G, 27G	B. Braun Tuttlingen, Deutschland
Kryoeinfriergerät, Nalgene ® Mr. Frosty EC18	A. Hartenstein GmbH Würzburg, Deutschland
Kryotomklingen Typ C35	pfm medical ag Köln, Deutschland
Kryotubes	Sarstedt Nümbrecht, Deutschland
Luer-Lok™Tip Spritzen 1ml	Becton und Dickinson Heidelberg, Deutschland
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems Carlsbad, CA
Mikrotomklingen Typ A35	pfm medical ag Köln, Deutschland
Multiwell Zellkulturplatten 6well, 12well, 24well, 48well, 96well	Falcon ®, Becton und Dickinson Heidelberg, Deutschland
Neubauerzählkammer	A. Hartenstein GmbH Würzburg, Deutschland
Objektträger	R. Langenbrick Emmendingen, Deutschland
Optical 96-well Fast Thermal Cycling plate	Applied Biosystems Carlsbad, CA
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging Chicago, USA
Pasteurpipetten	VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland
Plastikröhrchen steril 15 ml, 50 ml	Sarstedt Nümbrecht, Deutschland
Präparierbesteck	VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland
Rundbodenröhrchen aus Polystyrol, 5ml	Becton und Dickinson Heidelberg, Deutschland
Safety-Multifly®-Set	Sarstedt Nümbrecht, Deutschland

Skalpellklingen	B. Braun Tuttlingen, Deutschland
Transmigrationswells mit Inserts (5µm Polycarbonatmembran)	VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland
UV Quartz Küvette, 10 mm	Hellma Müllheim, Deutschland
Zellkulturflaschen, 75cm <sup>2</sup>	Sarstedt Nürnbrecht, Deutschland
Zellsiebe 70µm mit Nylonmaschen, steril	Becton und Dickinson Heidelberg, Deutschland

### 2.1.7. Zell-Linien

Name	Antigenexpression	Wachstum	Organsimus	Zelltyp	Quelle
bEnd.3	ICAM-1 VCAM-1 MAdCAM-1	adhärent	Mus musculus (Maus)	Endothel Hirn Kortex Endothelioma	ATCC

### 2.1.8. Herkunft der Versuchstiere

In dieser Arbeit wurden männliche, 6-10 Wochen alte C57B6/J-Mäuse von Charles River (Sulzfeld, Germany) als Wildtypiere bzw. Kontrollen und 6-10 Wochen alte CD14-defiziente-Mäuse benutzt. Die CD14-defizienten Mäuse wurden von Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA) via Charles River (Sulzfeld, Germany) bezogen und per Embryotransfer in die hiesige Tierhaltung importiert.

Alle Tierexperimente wurden unter Speziellen pathogenfreien Bedingungen (SPF-Haltung) in der Tierhaltung der Experimentellen Chirurgie der Universität des Saarlandes, nach Genehmigung des Landesamtes für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz des Saarlandes sowie gemäß den Leitlinien Guter Laborpraxis (Good Laboratory Practice, GLP) durchgeführt.

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Induktion und Beurteilung der EAN

Zur erfolgreichen Induktion einer EAN müssen die Mäuse (s. 2.1.8.) mit einem peripheren Myelin-Antigen immunisiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden alle EAN-Experimente mit PO<sub>180-199</sub> als Antigen, dem Hauptproteinbestandteil des PNS, zusammen mit CFA und PTX nach Zou et al., 2000 durchgeführt.

**Material:**

PO<sub>aa180-199</sub>

CFA

PBS 1x

PTX-Gebrauchslösung

Pro Tier und Immunisierung werden 100µg Antigen durch subkutane Applikation verabreicht, wobei die angefertigte Emulsion im Verhältnis 1:1 mit CFA, welches 0,5µg/ml *Mycobacterium tuberculosis* enthält, und mit PBS verdünnt ist. Die entsprechenden Kontrolltiere erhalten eine Immunisierungsemulsion, die zwar CFA, aber anstelle des Antigens PBS enthält.

Bsp.: <u>EAN-Emulsion</u>		<u>Kontroll-Emulsion</u>	
PO <sub>180-199</sub> (4mg/ml)	250µl	CFA 0,5mg/ml	1000µl
CFA 0,5mg/ml	1000µl	PBS	ad 2ml
PBS	ad 2ml		

Die Paste wird in einer sterilen 2ml-Spritze hergestellt und die Löslichkeit des Proteins in der CFA/PBS-Lösung durch dreimalige Behandlung mit Ultraschall für 20'' bei 45-50% Intensität erhöht. Die so angefertigte Emulsion wird mind. ÜN bei -20°C gelagert, wieder aufgetaut, vor Applikation nochmals entsprechend beschallt und in 1ml LockLuer-Spritzen transferiert. Das zu applizierende Gesamtvolumen beträgt 200µl pro Maus, wobei je 50µl der Emulsion in Nähe der axillären und inguinalen Lymphknoten verteilt werden soll. Insgesamt erfolgen pro Maus zwei Immunisierungen, d.h. an Tag 0 und Tag 6.

Zur Verstärkung der Immunantwort erfolgt mit Hilfe eines Restrainers eine intravenöse Gabe von Pertussis Toxin pro Maus mit einem Gesamtvolumen von 100µl verdünnt mit PBS an folgenden Tagen: Tag -1: 400ng; Tag 0: 200ng; Tag 1: 200ng; Tag 3: 200ng.

Bei den Kontrolltieren wird das PTX, wie bei den EAN-Tieren, an den entsprechenden Tagen verabreicht.

Anschließend werden die Mäuse täglich klinisch überwacht, das Gewicht und das Fortschreiten der Erkrankung anhand des folgenden Score-Systems nach Zou et al., 2000 beurteilt und im zeitlichen Verlauf protokolliert: 0, gesund; 1, schlapper Schwanz, schwacher Griff; 2, leichte Extremitäten-Schwäche, abnormaler Gang; 3, schwere Extremitätenschwäche, leichte Extremitäten-Lähmung; 4, schwere Extremitäten-Lähmung; 5, Tetraplegie, Kräftezerfall; 6, Tod (Zou et al., 2000). Hierzu werden die Mäuse einzeln aus dem Käfig genommen und auf der Tischplatte entlang laufen gelassen; besonders die Stellung der Füße nach außen sowie die Haltung bzw. die Höhe des hinteren Körperteils bedingt durch die Kraft der Hüftbeugemuskulatur werden zur Evaluierung herangezogen. Des Weiteren wird die Fähigkeit der Mäuse, sich an einem Käfiggitter über Kopf festzuhalten, kontrolliert. Hier ist anzumerken, dass die Tiere vor Erreichen einer Score von 4 aus dem Experiment genommen werden (s. 2.2.2.).

### 2.2.2. Präparation der Versuchstiere

**Material:**

1% Formaldehyd in PBS  
Isofluran

Da sich das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf den Krankheitsverlauf und entsprechende Parameter konzentriert, werden die Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus dem Versuch genommen und in verschiedene Gruppen aufgeteilt.

Die Tiere werden mittels einer überdosierten Isofluran-Gasnarkose und einer anschließenden Perfusion über den linken Ventrikel mit 1% Formaldehyd in PBS oder PBS getötet.

Zur Untersuchung von nativem Gewebe, wie z.B. Lymphknoten, darf vor Entnahme der entsprechenden Organe keine Perfusion mit 1% Formaldehyd in PBS erfolgen, sondern mit PBS. Nach Entnahme kann das restliche Gewebe mit 1% Formaldehyd in PBS fixiert werden.

Die Maus wird, bis zur Entnahme des Nervus ischiadicus nach 1 Woche, in 1% Formaldehyd in PBS bei 4°C gelagert. Damit währenddessen ein Zugang der Flüssigkeit zu dem gesamten Nervensystem gegeben ist, wird das Rückenmark an einer kleinen Stelle leicht eröffnet. Bei darauffolgenden Arbeiten mit RNA ist darauf zu achten, dass nur sehr sauberes, und vor allem RNase-freies Präparierbesteck benutzt wird, und dass kein fixiertes, sondern natives Gewebe verwendet wird.

### 2.2.3. Herstellung einer Lymphknoten-Zellsuspension

**Material:**  
 HBSS-Waschpuffer  
 Glaspotter steril  
 Trypanblau

Nach semi-steriler Entnahme der axillären und inguinalen Lymphknoten werden diese in 1ml HBSS-Wasch-Puffer aufgenommen und in einen autoklavierten Glaspotter überführt. Die Lymphknoten werden mit Hilfe des Potters und zugegebenem HBSS-Wasch-Puffer homogenisiert. Das Volumen ist von der Größe der Potter und der Lymphknoten abhängig, pro Pottervorgang etwa 5-10ml und 4-6 Wiederholungen. Dies erfolgt solange, bis die Flüssigkeit im oberen Teil des Potters klar bleibt. Die Zellsuspension wird durch ein Zellsieb (70µm) in ein 50ml Falcon Tube gegeben und für 10' bei 1200rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen können in ein für weitere Versuche entsprechendes Medium aufgenommen werden. Die lebensfähigen Zellen werden mit Hilfe der Neubauerzählkammer und Trypanblau gezählt.

### 2.2.4. Histologische Untersuchungen

**Material:**

1% Formaldehyd in PBS	A.d.
Isopentan	Isopentan
Flüssigstickstoff	Flüssigstickstoff
Aceton	Tissue-Tek
Silan	Aceton

Zur Durchführung histologischer Untersuchungen am Nervus ischiadicus wird dieser zusammen mit der proximalen Nervenwurzel und den distalen Nervensegmenten nach 1 Woche Fixation (in 1% Formaldehyd in PBS) isoliert. Der Nerv wird in drei etwa gleich lange Teile zerlegt und zur Herstellung von Längsschnitten entweder in Paraffin oder in Gefriermedium eingebettet.

Zur Einbettung in Paraffin werden die Gewebeteile in entsprechende Einbettkassetten mit Histoschwämmen gelegt und mit Hilfe einer Entwässerungsmaschine über einen Zeitraum von 16h über eine aufsteigende alkoholische Reihe dehydriert. Danach kann das entwässerte Gewebe mit Hilfe eines Einbettgerätes in Flüssigparaffin eingebettet werden. Nach etwa 1h

auf einer Kühlplatte ist das Gewebe erkaltet und kann bis zum Anfertigen von 0,5µm Schnitten mittels eines Schlittenmikrotoms bei RT trocken gelagert werden.

**Material:**

Xylol

EtOH100%

EtOH 96%

EtOH 70%

EtOH 50%

Vor jeder histologischen Untersuchung müssen die Paraffinschnitte entparaffiniert bzw. mittels einer absteigenden alkoholischen Reihe (AR↓; 2x5' Xylol, 2x3' EtOH 100%, 1' EtOH 96%, 1' EtOH 70%, 1' EtOH 50%, 1' A.d.) für die hydrophile Färbung entsprechend vorbereitet werden. Nach der Färbung werden die Schnitte, je nachdem welches Substrat bzw. Farbstoff verwendet wurde, mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (AR↑) dehydriert (1' EtOH 50%, 1' EtOH 70%, 1' EtOH 96%, EtOH 100% 2x3' Xylol 2x5').

Im Falle von Gefrierschnitten muss das Gewebe in Gefriermedium oder Tissue Tek in Kunststoff-Kassetten wie für Paraffin beschrieben, eingebettet werden. Das Gewebe wird samt Kästchen mit Isopentan und Flüssigstickstoff schock-gefroren und anschließend bei -20°C, besser bei -80°C, gelagert. Die anschließende Anfertigung von 6µm Längs-Schnitten erfolgt mittels eines Kryostats. Es ist besonders darauf zu achten, dass die Gewebeblöckchen sich immer bei einer Temperatur von mind. -20°C befinden. Die Gefrierschnitte werden, vor einer möglichen dauerhaften Lagerung bei -20°C zusammen mit Kieselgel als Feuchtigkeitsindikator, für 2x10' in -20°C kaltem Aceton fixiert. Vor Beginn einer Färbung werden die Gefrierschnitte etwa 10' in einem Exsikkator aufgetaut und nochmals für 2x10' in -20°C kaltem Aceton fixiert.

Generell ist für alle histologischen Färbungen sehr bedeutend, dass die Schnitte während des Färbeprozesses nicht austrocknen, d.h. alle Färbungen werden zügig und in einer feuchten Inkubationskammer durchgeführt. Damit die gefertigten Gewebe-Schnitte während der Färbung auf den Glas-Objektträgern (OT) haften bleiben, werden sie auf zuvor silanisierte OTs transferiert. Zum Silanisieren der OT werden diese wie folgt behandelt: 1-2'' Aceton, 1' Aceton (250ml) + (3-Aminopropyl)triethoxysilane (5ml), 1-2'' Aceton, 1-2'' A.d. und anschließend unter dem Abzug trocknen.

### 2.2.4.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur morphologischen Beurteilung der Gewebeschnitte wird eine Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung durchgeführt. Es handelt sich um eine Übersichtsfärbung, bei der sich die Zellkerne blau-violett und das Zytoplasma rosa färben.

Grundlage des Färbprinzips ist die unterschiedliche Affinität von Gewebsbestandteilen zu den jeweiligen Farbstoffen, wobei hierfür meist elektrostatische Interaktionen verantwortlich sind. Der natürlich vorkommende Farbstoff Hämatoxylin entwickelt in seiner basischen Form als Hämalan färbende Eigenschaften. Es färbt alle sauren bzw. basophilen Strukturen, wie z.B. DNA oder Zellkerne, blau-violett. Eosin hingegen ist ein synthetischer Farbstoff, der basische oder azidophile Zellkomponenten, wie Proteine des Zytoplasmas rosa färbt. Die Anzahl infiltrierter Zellen wird am Mikroskop ermittelt.

**Material:**

Paraffinschnitte 0,5µm	0,1% Eosingebrauchslösung
AR↓/AR↑	A.d.
Hämalaun	Leitungswasser
HCl-Alkohol	Entellan

Durchführung:

Die entparaffinierten Schnitte werden für 7-10' in einer Hämalan-Lösung nach Meyer gefärbt und kurz in A.d. und HCl-Alkohol gedippt. Der ungebundene Farbstoff wird darauf für 10' in Leitungswasser ausgewaschen und das Hämalan gebläut. Nach einem weiteren Waschschrift mit A.d. wird das Gewebe für 1' mit einer 0,1% Eosinlösung gefärbt und wiederum mit A.d. gewaschen. Nach erfolgter Dehydratation durch eine aufsteigende Alkoholreihe (1' A.d., 1' EtOH 50%, 1' EtOH 70%, 1' EtOH 96%, 2x3' EtOH 100%, 2x5' Xylol) können die Schnitte in einem hydrophoben Medium, wie beispielsweise Entellan, mit Deckgläsern luftdicht eingedeckelt werden.

### 2.2.4.2. Luxol-Fast-Blau-Perjodsäure-Schiff-Färbung

Die Luxol-Fast-Blau-Perjodsäure-Färbung (LFB-PAS) ist prinzipiell eine kombinierte Färbemethode bestehend aus der Luxol-Fast-Blau (LFB) Färbung und der Perjodsäure-Schiff (PAS) Färbung.

LFB ist eine Färbung zur Detektion von Myelin oder myelinisierten Axonen, inklusive Phospholipiden. Der Myelinanteil wird dabei blau-türkis angefärbt, während die Neurone

violett werden. Die PAS-Reaktion ist eine histochemische Reaktion, bei der hauptsächlich kohlenhydrathaltige Komponenten, wie z.B. Glykoproteine oder Glykogen, mit Hilfe von Perjodsäure und Schiffreagenz nachgewiesen werden und pink/rosa erscheinen. Die Beurteilung des Myelinisierungsgrades erfolgt lichtmikroskopisch.

**Material:**

Paraffinschnitte 0,5µm	EtOH 70%
AR↓/AR↑	1% Perjodsäurelösung
0,1% Luxol-Fast-Blue-Lösung	Hämalaun nach Meyer
EtOH 96%	HCl-Alkohol
0,05% Lithiumcarbonat	Entellan
Schiff's Reagenz	

Durchführung:

Die entparaffinierten Schnitte (alkoholische Reihe nur bis EtOH 96%) werden ohne zu spülen direkt in eine 0,1% Luxol-Fast-Blau-Lösung transferiert und ÜN bei 60°C im Dunkeln inkubiert. Danach werden die Schnitte in 1) EtOH 96% gespült und weiter in 2) 0,05% Lithiumcarbonat, 3) EtOH 70% und 4) A.d. differenziert. Die Schritte 1-4 werden so lange wiederholt, bis die Schnitte hellblau-türkis sind. Anschließend wird das Gewebe für 5' in eine 1% Perjodsäurelösung gegeben, in A.d für 5' gewaschen und für 30' im Dunkeln mit dem Schiff-Reagenz inkubiert. Nach einem weiteren fünfminütigen Waschschrift in Leitungswasser werden die Schnitte mit Hämalaun nach Meyer gegengefärbt, evtl. (von der Farbtintensität des Hämalauns abhängig) in HCl-Alkohol differenziert und für 5' unter Leitungswasser bebläut. Darauf folgt eine Dehydratation mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe und die Schnitte können in einem hydrophoben Medium (Entellan) eingebettet werden.

## 2.2.4.3. Silberimprägnierung nach Bielschowsky

Die Silberimprägnierung nach Bielschowsky wird zur Visualisierung neuronaler Prozesse inklusive Dendriten, Axone und Neurofibrillen eingesetzt. Dabei wird das Silber aus Metallsalzlösungen unter Reduktion auf den Strukturanteilen niedergeschlagen, sodass bei Zellen Totalbilder durch Schwärzung (Silberoxid) ihrer gesamten Oberfläche zustande kommen. Die positiv gefärbten neuronalen Bestandteile erscheinen schwarz auf braunen Hintergrund.

**Material:**

Paraffinschnitte 0,5µm ohne Silan	A.d.
AR↓/AR↑	Natrium-Thiosulfat
20% AgNO <sub>3</sub> -Lösung	Leitungswasser
Entwickler	Entellan

Durchführung:

Die entparaffinierten Schnitte werden für 20' in einer 20% AgNO<sub>3</sub>-Lösung gefärbt und dann in A.d. gespült. Durch vorsichtige Zugabe von Ammoniak wird die AgNO<sub>3</sub>-Lösung erst braun und dann wieder klar. Die Schnitte werden darin 15' lang im Dunkeln gefärbt. Anschließend werden ein paar Tropfen Entwickler (besseres Farbe-Ergebnis bei Alter des Entwicklers von mindestens 1-2 Monaten) zugegeben, bis ein Farbumschlag zu trübem ockerbraun erfolgt. Nachdem auch die Schnitte ockerbraun bis braun sind (evtl. mikroskopische Kontrolle), werden sie schnell, bevor sie überfärbt sind, in A.d. gespült. Nach anschließender Behandlung mit Natrium-Thiosulfat für 2', spülen in Leitungswasser und A.d, können die Schnitte wieder mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert werden und in Entellan eingedeckelt werden.

## 2.2.4.4. Immunhistochemische Färbung

Die Immunhistochemie (IHC) ist ein Verfahren zur spezifischen Darstellung von Proteinen oder Antigenen auf Gewebsschnitten mittels Antikörpern und der anschließenden Visualisierung der gebundenen Antikörper. Die dabei entstehenden Antigen-Antikörper-Komplexe können mit entsprechenden Farbstoffen detektiert werden. Durch lichtmikroskopische Analyse wird die Verteilung des untersuchten Proteins im Gewebe deutlich. Je nach Lokalisation des untersuchten Antigens findet man Reaktionen im Zytoplasma, im Zellkern oder in der Zellmembran. Ist der Nachweis nicht sensitiv genug, gibt es Möglichkeiten, durch Vervielfachen der Marker die Empfindlichkeit zusteigern, z.B. über die ABC-Methode. Hierbei wird, nach Bindung des Primärantikörpers an das spezifische Antigen, ein an Biotin gekoppelter Sekundärantikörper, welcher den Primärantikörper spezifisch erkennt, hinzu gegeben. Durch Zugabe einer an Avidin gekoppelten Peroxidase bildet sich ein Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex. Dieser kann, beispielsweise 3-Amino-9-EthylCarbazol (AEC), ein Substrat der Peroxidase spalten, sodass ein farblches Produkt entsteht. Für alle Färbungen mit einer Peroxidase-Reaktion, muss die endogene Peroxidase vor Inkubation des Primärantikörpers geblockt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden

alle IHC-Färbungen aufgrund der erhöhten Sensitivität mit Hilfe des ABC-Komplexes mit AEC als Substrat durchgeführt. Die Beurteilung positiver immunreaktiver Zellen (braun-rote Färbung) wird am Mikroskop vorgenommen.

#### 2.2.4.4.1. IHC auf Paraffinschnitten

<b>Material:</b>	
Paraffinschnitte 0,5µm	TBST
AR↓	ABC-Komplex
Citrat-Puffer	AEC-Reagent
Guanidinthiocyanat (4M)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%
0,3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	PBS
0,02% Casein	A.d.
Antikörper (s.2.1.4.1.)	Hämalaun nach Meyer
TBS	Aquatex

#### Durchführung:

Zur immunhistochemischen Färbung werden die Paraffin-Schnitte entparaffiniert und danach durch zweimaliges Erhitzen in der Mikrowelle bei 560Watt für jeweils 3' in Citrat-Puffer (10mM, pH 6,0) vorbehandelt. Darauf folgt eine 15-minütige Inkubation in Guanidinthiocyanat (4M) bei RT. Anschließend wird die endogene Peroxidase für 20' bei RT in 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS geblockt. Das Blocken unspezifischer Bindestellen wird durch Inkubation mit 0,02% Casein für 45' erreicht. Die Primärantikörper werden in den entsprechenden Verdünnungen zugegeben: rabbit anti-mouse TLR2 Ab (1:200), rat anti-mouse TLR4 (1:100) and rat anti-mouse TLR6 (1:100) und ÜN bei RT inkubiert. Als Sekundärantikörper wird ein an Biotin gekoppelter goat anti-rat IgG Ab bzw. ein goat anti-rabbit IgG in einer 1:200 Verdünnung zu den Schnitten gegeben. Zwischen allen Einzelschritten werden die Schnitte je zweimal mit TBS und einmal mit TBST gewaschen. Schließlich erfolgt die Detektion über den ABC-Komplex zusammen mit AEC-Reagent (1,4ml AEC-Puffer + 100µl AEC + 1,5µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)). Es ist zu beachten, dass das Substrat der Peroxidase (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) nicht vergessen wird. Die AEC-Entwicklung (etwa 5-10') wird mit PBS abgestoppt und mit A.d. gespült. Nach einer Gegenfärbung mit Hämalaun nach Meyer, können die Schnitte in einem wässrigen Medium, wie Aquatex, eingebettet werden.

#### 2.2.4.4.2. IHC auf Gefrierschnitten

<b>Material:</b>	
Gefrierschnitte 5µm	AEC-Reagent
PBS	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%
0,2% Casein	PBS
PBST	A.d.
Antikörper (s.2.1.4.1.)	Hämalaun nach Meyer
ABC-Komplex	Aquatex

Zur immunhistochemischen Färbung werden 5µm dicke longitudinale Aceton-fixierte Gefrierschnitte des Nervus ischiadicus zunächst 5 Minuten in PBS gewässert, bevor sie mit 0,2% Casein für 45 Minuten geblockt werden. Nach einem Waschschrift (0,1% Tween 20 in PBS) werden die Schnitte mit folgenden Erstantikörpern für 1h inkubiert: rat anti-mouse CD4 (1:50), rat anti-mouse CD8 (1:50), rat anti-mouse CD14 (1:100), rat anti-mouse CD45 (1:100) und rat anti-mouse Gr-1 (1:50), rat anti-mouse F4/80 (1:200) und rat anti-mouse Ly6B.2 (1:100) (siehe auch Tab. 2.1.4.1). Nach erneutem Waschen werden die Schnitte mit dem Zweitantikörper, goat anti rat Biotin, für 1h inkubiert und anschließend wieder gewaschen. Die finale Detektion erfolgt wie bei den Paraffinschnitten (2.2.4.4.1) über den ABC-Komplex zusammen mit AEC-Reagent (1,4ml AEC-Puffer + 100µl AEC + 1,5µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)). Es ist zu beachten, dass das Substrat der Peroxidase (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) nicht vergessen wird. Die AEC-Entwicklung (etwa 5-10') wird mit PBS abgestoppt und mit A.d. gespült. Nach einer Gegenfärbung mit Hämalaun nach Meyer, können die Schnitte in einem wässrigen Medium, wie Aquatex, eingebettet werden.

#### 2.2.5. Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR oder qRT-PCR ist eine Methode zur Quantifizierung der Genexpression aus PCR-Templates, wie DNA oder cDNA, mittels einer PCR-Reaktion. Man unterscheidet die Taqman- und Interkalator-Reaktion. Zur Taqman-Reaktion wird neben dem normalen Primerpaar zusätzlich eine fluorogene Probe benötigt. Diese besteht aus einem Oligonukleotid und einem Reporter- und Quenchfarbstoff.

Zur Durchführung der interkalatorischen Methode, auch als SYBR-Green-Methode bekannt, braucht man einen Doppelstrang-DNA-Farbstoff in der PCR-Reaktion, der an neu synthetisierte doppelsträngige DNA bindet und eine Fluoreszenz emittiert. Beide Methoden werden in einem speziellen Thermocycler durchgeführt, der mit einer speziellen Kamera

ausgestattet ist, die die Fluoreszenz in jedem der 96 wells zu verschiedenen Intervallen der PCR verfolgt. Als Quantifizierungsstrategie wird die relative Quantifizierung, bei der die Genexpression eines bestimmten Zielgens auf ein weiteres, nicht reguliertes Haushaltsgen, wie z.B. GAPDH (=Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), bezogen wird (Normalisierung), verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde die Interkalator-Reaktion durchgeführt.

### 2.2.5.1. RNA-Isolation

Die EDTA-Vollblutproben (1ml) von GBS-Patienten und gesunden Kontrollpersonen wurden aus der Liquorbank (Lagerung bei -20°) der Neurologischen Klinik nach Zustimmung der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes gemäß der Bestimmungen der „World Medical Association’s Declaration of Helsinki“ bezogen. Die Proben wurden 1-3 Tage nach Ausbruch der klinischen Symptome bei stationärer Behandlung gesammelt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Schwere der Erkrankung wurde mit Hilfe eines funktionellen Sieben-Punkte-Systems nach van der Meché *et al.* (Van der Meche et al., 2001) wie folgt erfasst: 0, gesund; 1, geringe Symptome; 2, fähig unabhängig zu gehen; 3, fähig ohne Unterstützung  $\geq 10$  m zu gehen; 4, bettlägerig oder an den Rollstuhl gefesselt; 5, beatmungspflichtig; 6, Tod.

Zur Isolation der Gesamt-RNA werden die Proben gemäß der Trizol-Methode (Thermo Fisher Scientific) für geringe Gewebsmengen behandelt.

**Material:**

EDTA-Vollblut

Trizol LS

Glykogen

Chloroform

Isopropanol

EtOH 70%.

RNase freies A.d

**Durchführung:**

Zur RNA-Gewinnung werden die Blutproben vor Homogenisierung mit einer gelben (20G) und anschließend einer blauen Kanüle (23G) schnell bei 37°C aufgetaut. Zur zusätzlichen Fällung der RNA werden 200µg Glykogen zugegeben und 10’’ gevortext. Zur Trennung der RNA von den Proteinen wird 160µl Chloroform zugegeben, 30’’ stark gemischt und bei maximaler Geschwindigkeit für 5’ zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wird

abgenommen und in ein neues Gefäß transferiert. Zur Präzipitation der RNA wird 400µl eiskaltes Isopropanol für mind. 1h oder ÜN bei -20°C zu den Proben gegeben. Es folgt eine Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 15' und ein Waschschrift mit EtOH 70%. Das RNA-Pellet wird bei RT 10' unter dem Abzug getrocknet und kann in 30µl RNase freiem A.d aufgenommen werden. Die RNA-Ausbeute wird photometrisch bestimmt, indem die gelöste RNA in einer 1:100 Verdünnung der Gesamt-RNA in RNase freiem Wasser angesetzt und über die optische Dichte (OD) bei 260nm quantifiziert wird. Die Quantifizierung wurde unter der Annahme durchgeführt, dass eine Absorption von 1,0 der Menge von 40g/l Einzelstrang-RNA (ssRNA) entspricht. Als Referenzwert wurde das RNase freie Wasser eingesetzt. Parallel wurde die Kontamination mit Proteinen über die OD bei 280nm bestimmt. Das Verhältnis der OD-Werte bei einer Wellenlänge von 260nm zu 280nm stellt die Reinheit der Gesamt-RNA dar und sollte bei etwa 2,0 liegen. Die gelöste RNA wurde bei -80°C gelagert.

#### 2.2.5.2. Reverse Transkription

Der Nachweis einer spezifischen mRNA kann mit Anwendung einer Reversen Transkription (RT) und anschließender Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erbracht werden. Zur RT der isolierten RNA in cDNA wird das SuperScript™ II Reverse Transcriptase Kit von Invitrogen benutzt. Die SuperScript Reverse Transkriptase ist eine DNA-Polymerase, die einen komplementären DNA-Strang aus einzelsträngigen RNA- und/oder DNA-Molekülen sowie RNA:DNA-Hybriden herstellt.

##### **Material:**

Gesamt-RNA

SuperScript® II Reverse Transcriptase-Kit

##### Durchführung:

Ein 20µl Reaktionsvolumen kann für 1-5µg Gesamt-RNA benutzt werden. In dieser Arbeit wurden für alle Versuche 3µg Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Die Ansätze sind wie folgt zusammengesetzt:

3µg Gesamt-RNA	x µl
dNTP's 10mM	1,0 µl
random primer 3µg/ ml	0,5 µl
	<hr/>
	ad 12,5 µl

Das Gemisch wird für 5' bei 65°C erhitzt, danach schnell für 2' auf Eis abgekühlt und kurz abzentrifugiert. Als Nächstes werden folgende Reagenzien zugegeben:

DTT 0,1M	2 µl
First-Strand Puffer 5x	4 µl
Superscript II reverse Transcriptase	1 µl

Nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT wird das Gemisch für 1h bei 42°C inkubiert. Die Proben werden für 10' bei 70°C inaktiviert und können als Template zur Amplifikation in der PCR benutzt werden.

### 2.2.5.3. qRT-PCR-Reaktion

**Material:**  
 cDNA  
 Fast-SYBR-Green-Puffer  
 Primer forward (siehe 2.1.5)  
 Primer reverse (siehe 2.1.5)

Zur Durchführung der qRT-PCR werden Optical 96-well Fast Thermal Cycling plates benutzt. In die wells werden 1µl der cDNA-Reaktionen zu einem Master-Mix, der 10µl Fast-SYBR-Green-Puffer und 500nM eines jeden Primerpaars (siehe 2.1.5) enthält, zugegeben. Das Volumen wird mit A.d. auf ein Endvolumen von 20µl aufgefüllt. Die PCR-Platte mit Hilfe von MicroAmp Optical Adhesive films versiegelt. Zur Quantifizierung wird das Applied Biosystems 7500 fast Real-time PCR System mit insgesamt 40 Amplifikations-Zyklen (95°C für 15'' and 60°C 1') benutzt. Als Maß der Quantifizierungsmenge wird der sogenannte Ct-Wert oder Schwellenwert (Threshold cycle) herangezogen. Er entspricht der Anzahl der benötigten Zyklen, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Die Ct-Werte für jedes Testgen der replizierten PCRs werden in Bezug zu den Ct-Werten der GAPDH-Kontrolle der gleichen cDNA normalisiert. Eine 100% Effizienz der PCR (Verschiebung um 1 Ct-Einheit) bedeutet eine Verdopplung der DNA-Produktmenge und analog dazu das Fluoreszenzsignal. Das Verhältnis jedes Gens wird wie folgt berechnet:  $2^{(\Delta Ct)}$ .  $\Delta Ct$  besteht aus der Differenz Ct (Zielgen) - Ct (GAPDH-Kontrolle).

### 2.2.6. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder FACS (= Fluorescence Activated Cell Sorting) wird zur Messung spezieller physikalischer und chemischer Eigenschaften von Zellen oder Partikeln benutzt. Die Bezeichnung „Durchflusszytometrie“ kommt von Messen (Meter) einzelner

Zellen (Zyto), die eine Serie von Detektoren oder Laserstrahlen in einer Flüssigkeit passieren. Diese Methode ermöglicht eine schnelle, quantitative, multiparametrische Analyse auf lebenden oder toten Zellen. Sie beruht auf der Messung sichtbarer Fluoreszenz-Emissionen und kann zur näheren Charakterisierung und Separierung von Zellen benutzt werden. Gemessen wird die Fluoreszenzintensität von Fluoreszenz-markierten Antikörpern und Liganden, die an spezifische Zell-assoziierte Moleküle binden.

**Material:**

Lymphknoten-Zellsuspension  
Antikörper (s. 2.1.4.2.)  
FACS-Puffer  
0,1% Saponin in FACS-Puffer

Durchführung:

Die Antigen-Expression von Maus-Lymphozyten wird mittels einer Drei- oder Vierfach-Farben-FACS-Analyse bestimmt. Die in dieser Arbeit benutzten Antikörper sind in 2.1.4.2. gelistet. Es werden  $2 \times 10^5$  Lymphozyten/100 $\mu$ l FACS-Puffer für 40' bei 4°C mit einer vorher ermittelten optimalen Konzentration der Primärantikörper in FACS-Puffer in FACS-Röhrchen gefärbt. Für intrazelluläre Färbungen werden die Zellen permeabilisiert, indem die Primärantikörper mit 0,1% Saponin verdünnt werden. Nicht-konjugierte Antikörper werden zur weiteren Färbung mit Cy5-konjugierten oder biotinierten Sekundärantikörpern inkubiert. Letztere werden mit Allophycocyanin (APC)-konjugiertem Streptavidin detektiert. Die Zellen werden zwischen jedem Schritt mit 1ml FACS-Puffer gewaschen und schließlich mit 1% Formaldehyd in FACS-Puffer fixiert, bevor sie mit dem FACS Canto II und FACS Diva Software analysiert werden. Die mononukleären Zellen sowie die T-Lymphozyten werden mittels des „forward und side scatter“ nach Größe und Granularität als Population eingegrenzt und der prozentuale Anteil positiver Zellen ermittelt.

### 2.2.7. Untersuchungen der Blut-Nerven-Schranke

Zur Untersuchung der kritischen pathophysiologischen Schritte der EAN werden verschiedene Versuche zur Simulation der Adhäsions- und Transmigrations-Vorgänge von antigenspezifischen T-Zellen an Endothelzellen durchgeführt.

### 2.2.7.1. Kultivierung der Endothelzellen

Zur Untersuchung der BNS werden in dieser Arbeit bEnd3-Zellen verwendet. Es handelt sich um eine Endothelzelllinie des Maus-Hirns (s. 2.1.7), die die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und MAdCAM-1 exprimiert. Aufgrund der physiologischen Ähnlichkeiten der BNB zur Blut-Hirn-Schranke, eignet sich diese Zell-Linie nicht nur für Untersuchungen des ZNS bzw. der Blut-Hirn-Schranke, sondern auch für Untersuchungen des PNS bzw. der BNB.

**Material:**

bEnd3 Gefriermedium  
bEnd3 Kulturmedium  
Trypsin-EDTA  
Trypanblau

Die Zellen können bis zur (Wieder-)Verwendung in Flüssigstickstoff gelagert werden. Hierzu wird das Zellpellet nach Zentrifugation für 10' und 1200rpm und 4°C in 1ml Gefriermedium resuspendiert und mit Hilfe eines Freezing container, Nalgene R Mr. Frosty C1562, zunächst bei -80°C in einem Kryo-Gefäß weggefroren. Nach einer 1-2-tägigen Lagerung bei -80°C werden die Zellen in Flüssigstickstoff transferiert. Zum Auftauen der Zellen werden diese direkt aus dem Flüssigstickstoff kurz in einem 37°C Wasserbad aufgetaut und mit bereits erwärmten (37°C) bEnd3-Medium aufgefüllt. Die Kultivierung der Zellen erfolgt generell in 25cm<sup>3</sup>-Zellkulturflaschen in bEnd3-Medium (5ml/Flasche) bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> im HERAcell CO<sub>2</sub> Inkubator. Zur Ernte der Zellen werden diese mit 5ml aufgewärmten (37°C) Trypsin-EDTA bei 37°C für 10' behandelt und mittels leichtem, manuellem Anschlagen der Kulturflasche von dem Boden gelöst. Die Zellen können nach Überführung in sterile 50ml-Falcon-Tubes für 10' und 1200rpm und 4°C zentrifugiert werden. Der Überstand wird verworfen und die Konzentration lebensfähiger Zellen kann mittels der Neubauerzählkammer und Trypanblau ermittelt werden.

### 2.2.7.2. Zelladhäsionsversuche

**Material:**

bEnd3-Zellen            MAM  
T-Zellen (s. 2.2.3.)    2,5% Glutardialdehyd  
Fibronektin in        TNF $\alpha$ -  
PBS                    Gebrauchslösung  
PBS steril

Es werden OT mit 16 Zellkammern (16 well chamber slides) für 30-40' mit 50µg/ml sterilem Fibronectin in PBS bei 37°C im HERAcell CO<sub>2</sub> Inkubator beschichtet. Nach Absaugen des Fibronectins und zweimaligem Waschen mit sterilem PBS können pro Kammer 2x10<sup>4</sup> bEnd3-Zellen in 200µl bEnd3-Medium (Kultivierung s. 2.6.1.) ausgesät und 24h bei 37°C im HERAcell CO<sub>2</sub> Inkubator und 5%CO<sub>2</sub> wachsen gelassen werden. Die Zellen werden mit 100U/200µl TNFα zur Expression von Adhäsionsmolekülen stimuliert und weitere 24 h wachsen gelassen.

Die antigenspezifischen T-Zellen (frisch isolierte Primärzellen, siehe 2.2.3) werden in einer Zelldichte von 3x10<sup>5</sup> in 200µl Migrationsmedium (MAM) zu dem zuvor mikroskopisch kontrollierten und mit sterilem PBS gewaschenen bEnd3-Rasen gegeben. Danach werden die Chamberslides auf einem Wipptisch für 2x20' bei 4°C inkubiert. Zur Gewährleistung einer gleichmäßigen Adhäsion werden die Chamberslides nach 20' um 90° gedreht. Die Kammern werden danach von den OT abgebrochen und sehr vorsichtig in PBS gewaschen und anschließend für 2h in 2,5% Glutardialdehyd in PBS fixiert. Zur Auswertung wird die Anzahl der adhärenierten T-Zellen in 5 verschiedenen Arealen pro Kammer ausgezählt.

### 2.2.7.3. Transmigrationsversuche

Für die Untersuchung der Migration durch die BNB werden sogenannte Transmigrationsplatten benutzt. Diese bestehen aus einer Platte mit 24 Vertiefungen sowie 12 Filtereinsätzen mit einer Porengröße von 5µm.

#### **Material:**

bEND3-Zellen	Giensa-Lösung
T-Zellen (s. 2.2.3.)	Entellan
Laminin in PBS	TNFα-Gebrauchslösung
Formaldehyd 37%	

Die Filtereinsätze werden mit 50µg/ml Laminin in PBS für 30' bei RT beschichtet, abgesaugt und für 1h unter der Sterilbank getrocknet. Pro Filtereinsatz werden 5x10<sup>4</sup> bEnd3-Zellen in 200µl bEnd3-Medium ausgesät und 24h bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen werden mit 100U/200µl TNFα zur Expression von Adhäsionsmolekülen stimuliert und weitere 24 h wachsen gelassen. In die Vertiefungen ohne Filtereinsatz werden 600µl MAM vorgelegt. Aus den Einsätzen wird das Rest-Medium vorsichtig abgesaugt. Die Einsätze werden vorsichtig und luftblasenfrei in die Vertiefungen mit vorgelegtem MAM transferiert.

Die antigenspezifischen T-Zellen (frisch isolierte Primärzellen, siehe 2.2.3) werden in einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  in 100  $\mu$ l MAM auf die Filtereinsätze gegeben und für 4h bei 37°C im HERAcell CO<sub>2</sub> Inkubator inkubiert.

Anschließend werden die Einsätze heraus genommen (Achtung: letzten Tropfen abstreifen) und in TruCount-Tubes gegeben. Mit Hilfe dieser Tubes und deren Beadnummer als Referenz kann die tatsächlich migrierte Anzahl von T-Zellen am FACS-CantoII nach folgender Formel ermittelt werden: Anzahl T-Zellen (gate) / Anzahl beads (gate) \* Bead-Referenznummer

Zur Überprüfung des bEnd3-Monolayers in den Filtereinsätzen wird dieser mit 50  $\mu$ l Formaldehyd 37% ÜN dampffixiert. Die fixierten Einsätze können mit 100  $\mu$ l einer 1:20 verdünnten Giemsa-Lösung für 10' bei RT gefärbt, ÜN getrocknet und mit einem Skalpell ausgeschnitten werden. Nach Einbetten in Entellan können die Filter mikroskopisch beurteilt werden.

### 2.2.8. Elektroneurographie

Die Elektroneurographie ist eine diagnostische Methode zur Bestimmung des Funktionszustandes eines peripheren Nervs. Der zu untersuchende Nerv wird an mindestens zwei Stellen in seinem Verlauf elektrisch gereizt, wobei die Zeit, die von der Reizung bis zur Reaktion (Muskelkontraktion) vergeht, gemessen wird (Nervenleitgeschwindigkeit). Nach supramaximaler elektrischer Reizung eines peripheren Nervs wird der Impuls nicht nur orthodrom, sondern auch antidrom, d.h. gegen die Verlaufsrichtung des Nervs weitergeleitet. Im Bereich des Axonursprungs kommt es dadurch zu einer retrograden Erregung mit einem schwächeren Aktionspotential und nachfolgender Muskelkontraktion einzelner  $\alpha$ -Motoneurone. Die sogenannte F-Welle tritt mit einer gewissen Latenz oder Verzögerung nach dem ersten Aktionspotential auf, weil sie erst antidrom, danach orthodrom verläuft. Durch Messung dieser F-Welle und deren Latenzzeit, die die Funktion insbesondere der Nervenwurzel beurteilen kann, soll der individuelle Krankheitsstatus der Mäuse elektrophysiologisch beurteilt werden.

**Material:**

100/10 mg/kg Ketavet/Rompun-Lösung  
Akupunkturnadeln  
EtOH 70%

**Durchführung:**

Für die elektrophysiologischen Messungen werden die Mäuse zur Vermeidung von Stress und Schmerzen bei der Platzierung der Elektrodennadeln mittels einer 100/10 mg/kg Ketavet/Rompun-Lösung i.p. anästhesiert. Um die Körpertemperatur konstant zu halten, werden die Tiere während der gesamten Messung, die nicht länger als 30 Minuten andauert, von einer Lampe oder einer Decke gewärmt. Die Messungen erfolgen mit dem Sapphire 2ME, wobei der Nervus ischiadicus durch je einen Einzelpuls von 0,2ms bei supramaximaler Reizung von maximal 30mA auf Höhe des Knies und Höhe des Hüftgelenks auf der Rückseite des Oberschenkels gereizt wird. Zusätzlich wird eine Elektrode zur Erdung an den Zehen angebracht. Die distal-motorischen Latenzzeiten werden in ms aufgezeichnet und die Nervenleitgeschwindigkeit nach Ausmessung der Distanz zwischen proximaler und distaler Elektrode errechnet. Als Nadelelektroden werden sterile Akupunkturnadeln mit einer Länge von 30mm und 0,3mm Durchmesser verwendet. Die Elektroden werden zwischen den Messungen mit 70%igem Alkohol desinfiziert, um das Infektionsrisiko zu minimieren. Die Tiere werden nach Abschluss der Messung sofort ohne Wiedererwachen aus der Narkose getötet.

**2.3. Statistik**

Zur graphischen Darstellung und Berechnung der Mittelwerte, Standardabweichungen sowie des T-Tests zur Ermittlung einer Signifikanz zwischen 2 Gruppen wurde Microsoft® Excel 2003 (Microsoft Corporation, USA) verwendet. Der Signifikanzwert ( $p$ -value) wurde wie folgt festgelegt: \* =  $p \leq 0,5$ , \*\* =  $p \leq 0,01$  und \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Immunologische Prozesse während der EAN

##### 3.1.1. Klinik und Pathologie während der EAN

###### *P0-induzierte EAN führt zu konstanter Ausbildung klinischer Symptome.*

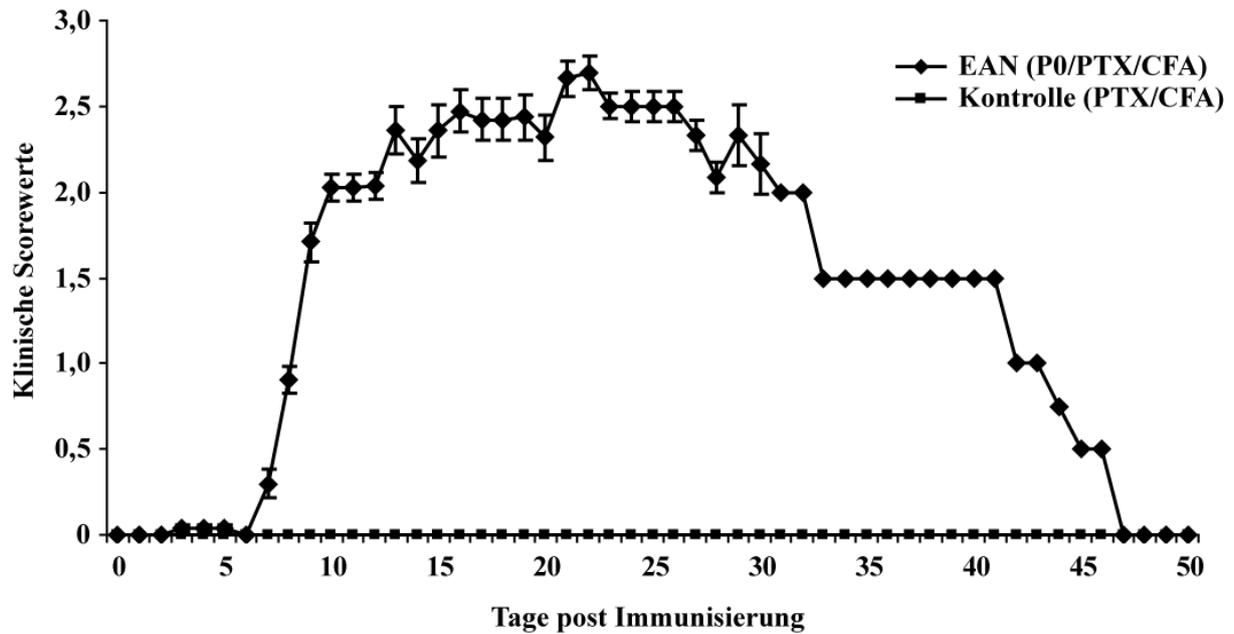
Die Induktion einer EAN in Mäusen gilt bis heute in der Literatur als schwer bzw. nicht stabil umsetzbar. In dieser Arbeit erfolgte die Induktion der EAN in C57B6/J-Mäusen mit P0<sub>aa180-199</sub>. Die Immunisierung führte zu einer klinisch konstanten Ausbildung einer EAN, mit einer Inzidenz von 90,0% (Tab.2).

Behandlung	EAN-Experimente (n)	Anzahl der Tiere	Anzahl der erkrankten Tiere*	Inzidenz (%)	Durchschnittlicher Tag des Krankheitsausbruches*
PBS	7	20	0	0	0
P0	7	20	18	90,00	7,37 ± 0,002

\* es wurden nur Tiere, die eine Erkrankung an d13 und d20 entwickelten, in die Berechnung mit einbezogen

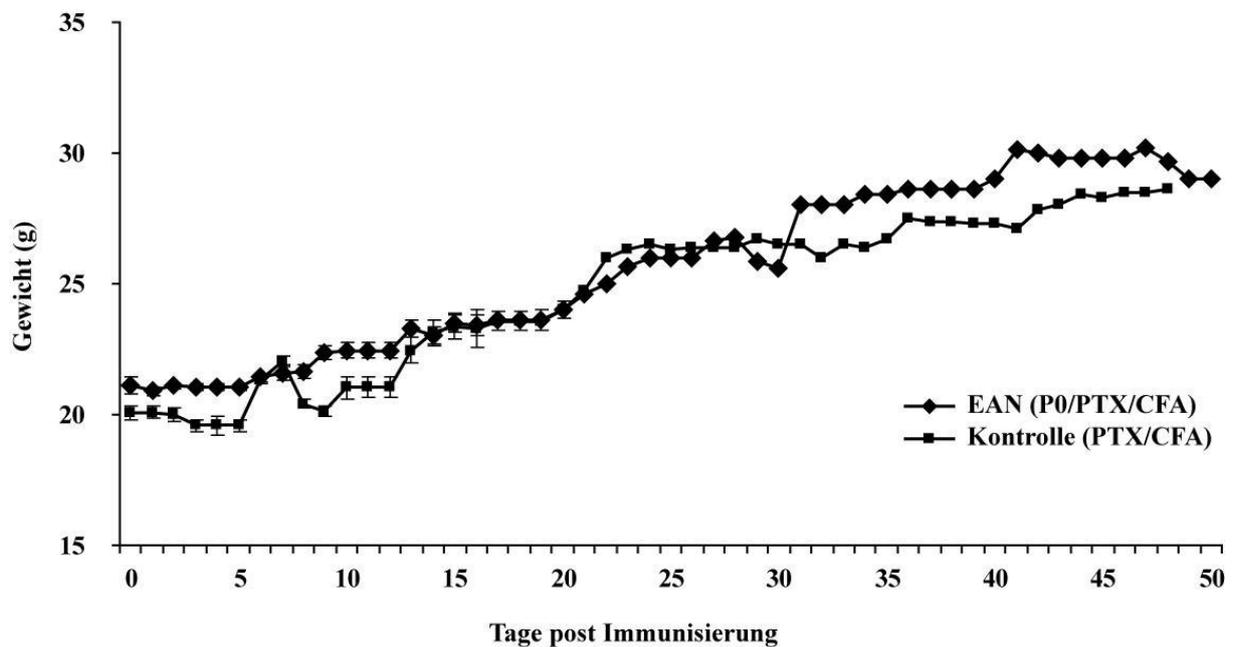
**Tabelle 2: Entwicklung einer EAN von mit P0<sub>aa180-199</sub> immunisierten oder PBS behandelten C57B16/J-Mäusen.**

Die ersten neurologischen Symptome, wie ein reduzierter Schwanztonus (1,0) konnten bereits an Tag (d) 7 (Mittelwert: d7,37 ± 0,002) post Immunisierung (p.i.) detektiert werden. (Abb.3). Die klinischen Scorewerte stiegen ab d7 p.i zunächst von einem reduzierten muskulären Tonus bis zur Extremitäten-Schwäche (score: 2,10 ± 0,3) an d10 p.i. stark an. Diese Plateauphase hielt sich bis etwa d20 p.i. (score: 2,21 ± 0,3), bevor sich die klinischen Symptome nochmals leicht und stufenweise, bis zu einem Maximalwert von 2,67 ± 0,1 an d22 p.i. dem Peak der Erkrankung erhöhten. Ab d23 p.i. verminderte sich die Schwere der EAN langsam von dem Plateau-Bereich weg (Abb.3); ein völliges Abklingen der Symptome konnte erst an d47 beobachtet werden. Die Tiere zeigten durchweg einen stabilen Gewichtsverlauf (Abb.4).



**Abbildung 3: Klinische Scorewerte von EAN (P0/PTX/CFA)- und Kontroll-(PTX/CFA)-Mäusen (C57B6/J) während des EAN-Krankheitsverlaufes.**

Die Werte repräsentieren 20 Mäuse pro Gruppe in 7 unterschiedlichen EAN-Experimenten.



**Abbildung 4: Gewichte von EAN- (P0/PTX/CFA) und Kontroll- (PTX/CFA)-Mäusen (C57B6/J) während des EAN-Krankheitsverlaufes.**

Die Werte repräsentieren 20 Mäuse pro Gruppe in 7 unterschiedlichen EAN-Experimenten.

***Zellinfiltration und Demyelinisierung korrelieren mit dem Schweregrad und dem Stadium der EAN.***

Zu den ausgeprägten Krankheitsmerkmalen der EAN gehören, neben entzündlichen Zellinfiltraten, fokale Demyelinisierungen und axonale Schädigungen des peripheren Nervengewebes (Gold et al., 1999; Kieseier et al., 2004). Zur Beurteilung des Ausmaßes dieser Schädigung wurden histologische Untersuchungen der Nn. Ischadici zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Erkrankungsverlauf durchgeführt.

Die morphologische Beurteilung der zellulären Infiltrate in der HE-Übersichtsfärbung auf Paraffinlängsschnitten (Abb.5) zeigte, dass die EAN-Tiere bereits an d2 p.i. beginnende Leukozyten-Infiltrate aufwiesen (Abb.5B), während sich in der nicht-immunisierten Kontrollgruppe keinerlei entzündliche zelluläre Infiltrate befanden (Abb.5A).

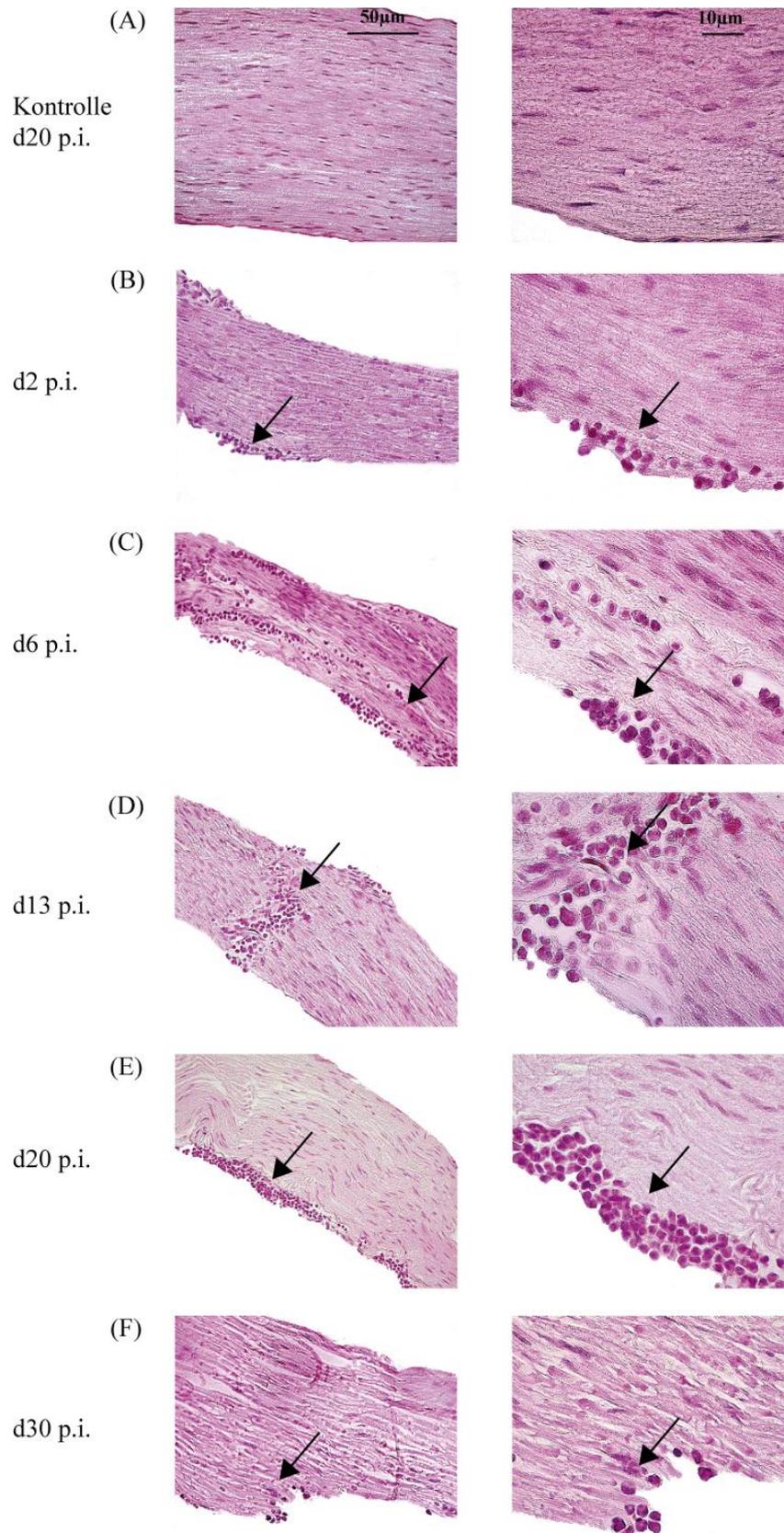
Das weitere Fortschreiten der Erkrankung (d6, d13 p.i.) führt zur stetig steigenden Akkumulation infiltrierender Leukozyten in den Nerv bis schließlich zum Peak der Erkrankung mit maximaler Infiltration (Abb.5C, D, E und F). Ab d30 p.i. der EAN verminderte sich die Anzahl der zellulären Infiltrate bereits wieder sehr stark (Abb.5G). Demzufolge korreliert die Anzahl infiltrierter Zellen mit dem Schweregrad der Erkrankung.

Zur Darstellung der multifokalen Demyelinisierung in der EAN, wurde das periphere Myelin mittels LFB-PAS auf Paraffinlängsschnitten angefärbt (Abb.6). Die EAN-Tiere zeigten, im Gegensatz zu den Kontrolltieren, zunehmende Demyelinisierung.

In Korrelation mit der Anzahl infiltrierter Leukozyten nahm auch der Grad der Demyelinisierung stetig von d2 über d6 und d13 p.i. zu (Abb.6B, C und D). Der höchste Myelinverlust zeigte sich an d20 p.i. (Peak der Erkrankung) (Abb.6E). Anschließend erholten sich die Mäuse, was durch die fast vollständige Remyelinisierung an d30 p.i. (Abb.6E) belegt wurde.

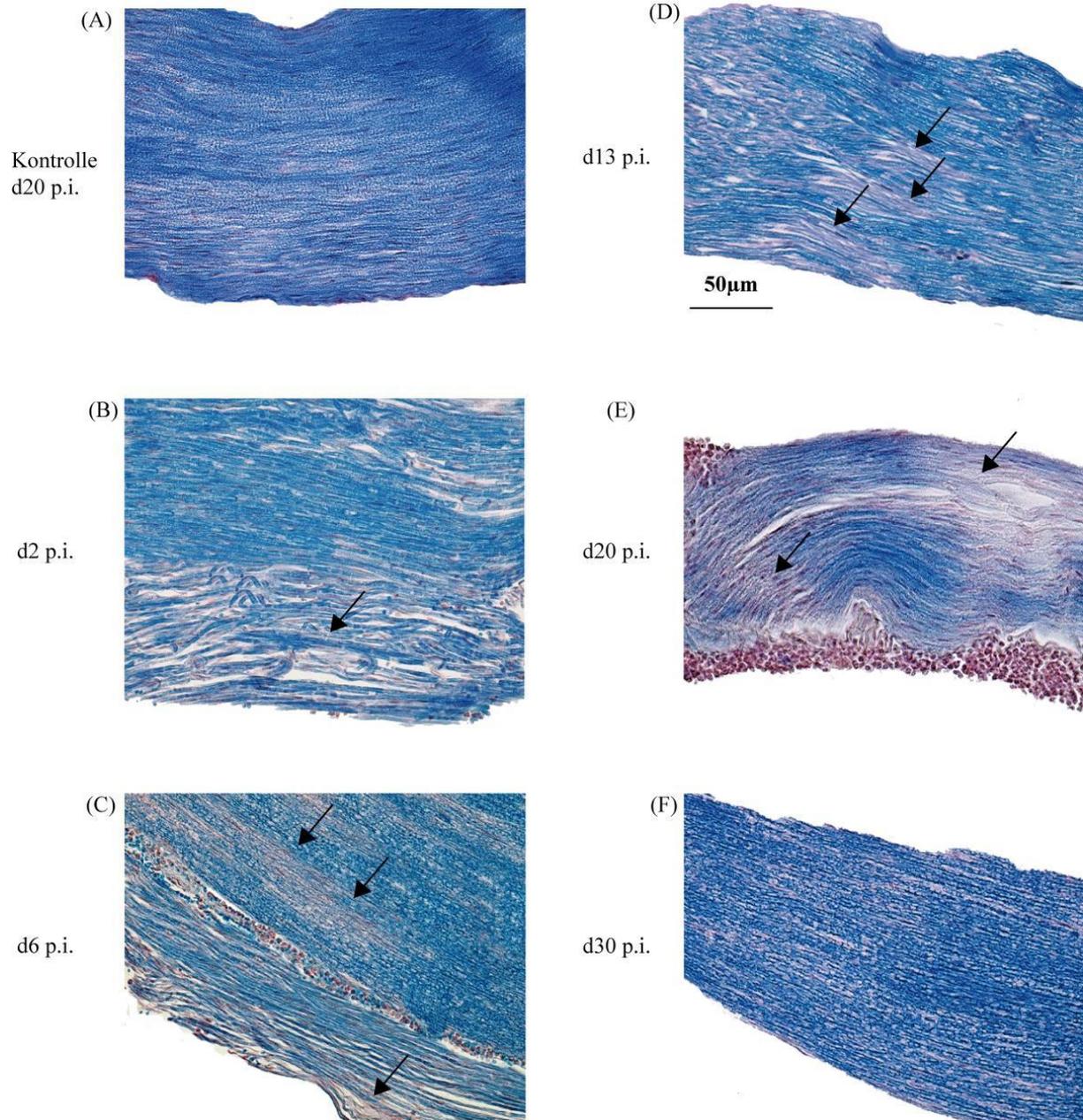
Zur Beurteilung der axonalen Schädigung wurden Paraffinlängsschnittpräparate des Nervus ischiadicus von EAN- und Kontrollmäusen mit der Silberimprägnierung nach Bielschowsky untersucht (Abb.7).

Wie erwartet zeigte das Kontrollgewebe (Abb.7A) keinerlei axonalen Verluste, wohingegen es mit fortschreitender Erkrankung von d2 p.i. (Abb.7B) über d6 p.i. (Abb.7C), d13 p.i. (Abb.7D), d20 p.i. (Abb.7E) bis einschließlich d30 p.i. (Abb.7F) zu keinem auffällig großen Axonverlust kam.



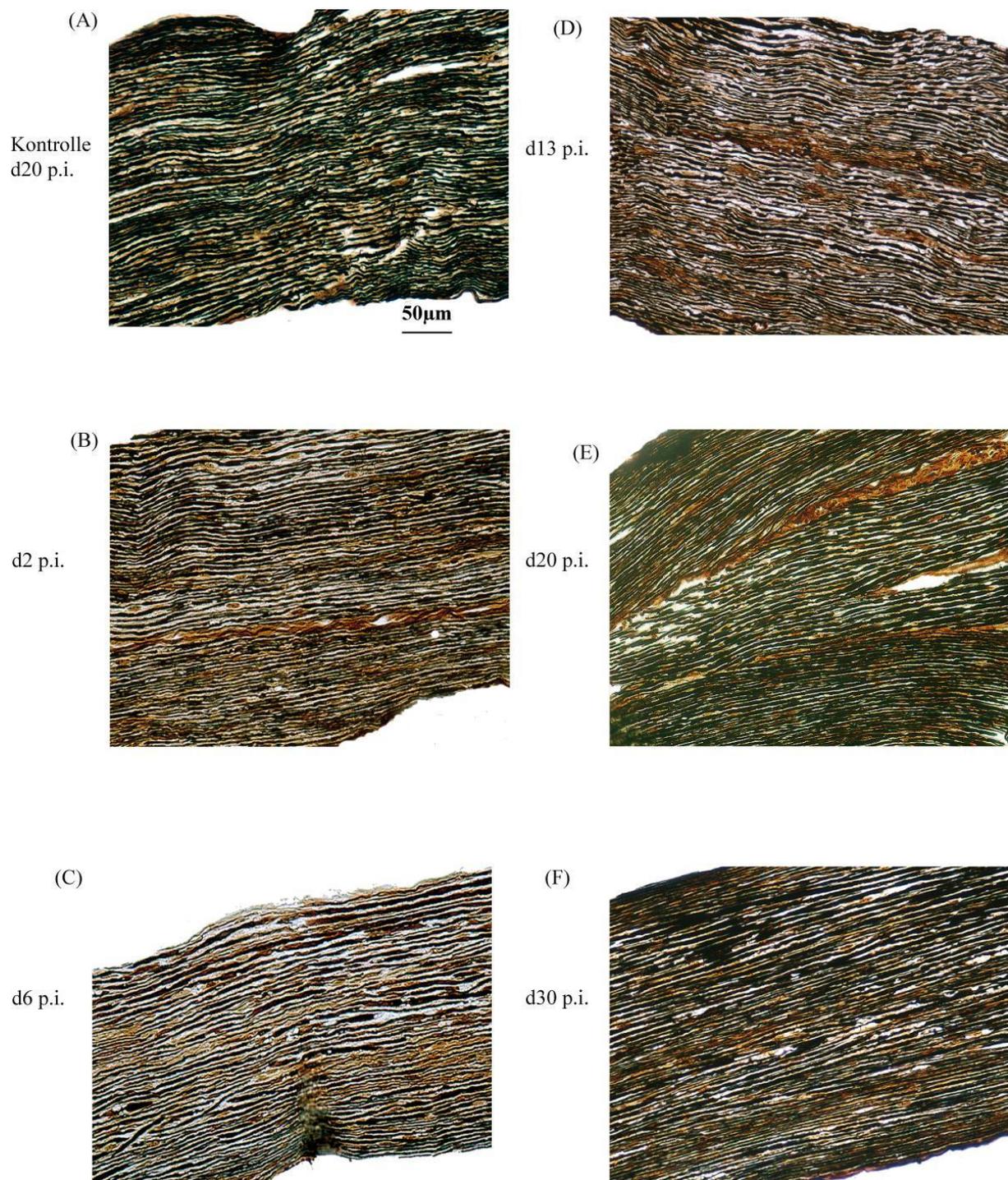
**Abbildung 5: Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Nervus ischiadicus von EAN-Mäusen (C57B6/J) während des Krankheitsverlaufes.**

(A) CFA/PTX Kontrolle, (B) d2, (C) d6, (D) d13, (E) d20, (F) d30 post Immunisierung. Die Pfeile zeigen die zellulären Infiltrate im Nervengewebe.



**Abbildung 6: Luxol-Fast-Blau-Perjodsäure-Färbung (LFB-PAS) des Nervus ischiadicus von EAN-Mäusen (C57B6/J) während des Krankheitsverlaufes.**

(A) CFA/PTX Kontrolle, (B) d2, (C) d6, (D) d13, (E) d20, (F) d30 post Immunisierung. Die Pfeile zeigen die demyelinisierten Bereiche im Nervengewebe.



**Abbildung 7: Silberimprägnierung des Nervus ischiadicus nach Bielschowsky von EAN-Mäusen (C57B6/J) während des Krankheitsverlaufes.**

(A) CFA/PTX Kontrolle, (B) d2, (C) d6, (D) d13, (E) d20 und (F) d30 post Immunisierung.

### 3.1.2. Antigenpräsentation und T-Zellaktivierung während der EAN

Eine effiziente Immunantwort erfordert zwei unterschiedliche Signale: zum einen das antigenspezifische Signal, bei dem APCs über ihren MHC-Komplex den T-Zellen über ihren TCR die entsprechenden Antigene präsentieren, d.h. die konstante Expression des TCR und der MHC-Moleküle sind zur T-Zellaktivierung obligatorisch; zum anderen das kostimulatorische Signal, welches durch Bindung des CD28-Rezeptors auf den T-Zellen an seine B7-Liganden (CD80 und CD86) auf den APCs erfolgt.

Um zu überprüfen, ob die DCs bereits zu reifen APCs differenziert sind, muss der Expressionsstatus der APCs bezüglich der MHC- sowie der ko-stimulatorischen Moleküle, CD80 und CD86, bestimmt werden. Reife T-Zellen exprimieren, neben dem konstant vorkommenden TCR, nach Aktivierung vermehrt CD28 bzw. CTLA-4 zur Vermittlung positiver bzw. negativer ko-stimulatorischer Signale. Um die Autoimmunantwort in der vorliegenden Arbeit zu demonstrieren, wurden mittels FACS-Analysen die Expressionen der oben genannten Moleküle ermittelt (zusammengefasst in Tabelle 3).

#### ***Die EAN führt zur vermehrten Expression kostimulatorischer Moleküle.***

Das Expressionsprofil auf DCs bzw. T-Zellen mittels FACS zeigte, dass sowohl der MHC-Klasse-II-Komplex als auch der TCR während der gesamten EAN kontinuierlich exprimiert werden, wobei am Peak der Erkrankung die MHC-Klasse-II-Expression signifikant gesteigert ist ( $p \leq 0,05$ ) (Abb.8).

Zur näheren Untersuchung des zweiten ko-stimulatorischen Signals, wurden erst einmal die Expressionsraten der kostimulatorischen B7-Moleküle, CD80 und CD86, basierend auf APCs in Maus-Lymphknotenzellen von PTX/CFA-Kontrollen, bestimmt.

Es zeigte sich, dass sowohl CD80 (d2: 21,50%  $\pm$  2,64, d6: 21,70%  $\pm$  1,72 d13: 20,05%  $\pm$  1,98, d20: 18,43%  $\pm$  1,38) als auch CD86 (d2: 11,98%  $\pm$  4,77, d6: 13,69%  $\pm$  3,86, d13: 8,23%  $\pm$  2,24, d20: 6,38%  $\pm$  1,67) konstitutiv und gleich bleibend auf deren APCs exprimiert werden (Abb.9, Tab.3 und Tab.9 im Anhang).

Nach adäquater Immunisierung mit dem P0-Antigen kam es in der Induktionsphase an d6 p.i zur vermehrten Expression von CD80 (d6:  $\Delta$ 19,40,  $p \leq 0,05$ ; Abb.9A). CD86 hingegen wurde erst in der Aktivierungsphase an d13 p.i. signifikant erhöht exprimiert (d13:  $\Delta$ 28,52,

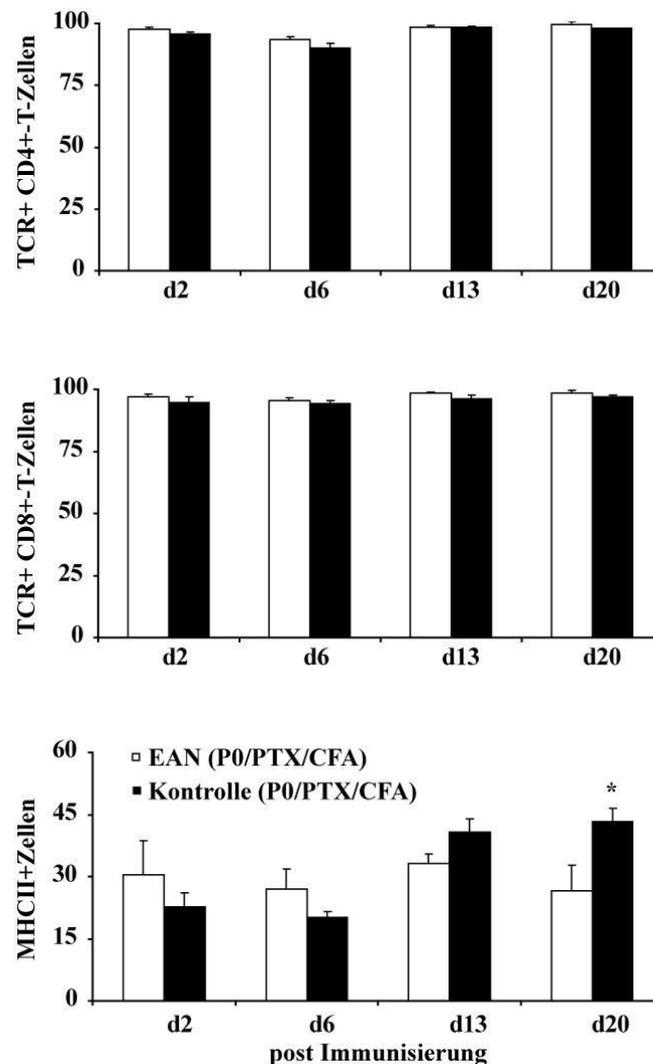
	CD4+- T-Zellen				CD8+- T-Zellen				MHCII+-Zellen				
	d2	d6	d13	d20	d2	d6	d13	d20	d2	d6	d13	d20	
Angeborene Immun-Rezeptoren	TLR1	↓*	-	-	-	↓*	-	-	-	↓***	↓*	-	-
	TLR2	-	↑***	↑*	↑**	-	-	-	↑*	-	↑*	-	-
	TLR3	-	-	-	↓*	-	-	-	-	-	-	-	-
	TLR4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑**	-
	TLR5												
	TLR6	-	↑**	↑***	-	-	-	↑***	-	-	-	↑***	-
	TLR7												
	TLR8												
	TLR9	↑**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TLR11	↑**	↑*	↑*	-	-	-	↑*	-	-	-	↑**	-
	TLR12	-	-	-	-	-	-	↑*	-	-	-	↑*	-
	TLR13												
	CD14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑**	-	-
	Adapter-Protein	MyD88	-	↑*	↑**	-	-	↑*	↑*	-	-	-	↑*
pro-inflammatorisches Zytokin	IL-17A	↑**	↑**	-	-	↑**	↑**	-	-	-	-	-	-
ko-stimulatorische Moleküle	CD80									-	↑*	-	-
	CD86									-	-	↑***	-
T-Zell- Aktivierung	CD28	-	-	↑***	-	-	-	↑***	-				
	CTLA-4	-	↑**	↑***	-	-	↑**	↑***	-				

**Tabelle 3: Regulation angeborener Immun-Rezeptoren und T-Zellen auf Protein-Ebene während des EAN-Krankheitsverlaufes.**

Mittels FACS ermittelte ↑/↓ Hoch- bzw./ Herunterregulierung im Vergleich zu PTX/CFA-Kontrollen; - = keine Veränderung im Vergleich zu PTX/CFA-Kontrollen; ■ = nicht untersucht. \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$  und \*\*\* =  $p \leq 0,001$

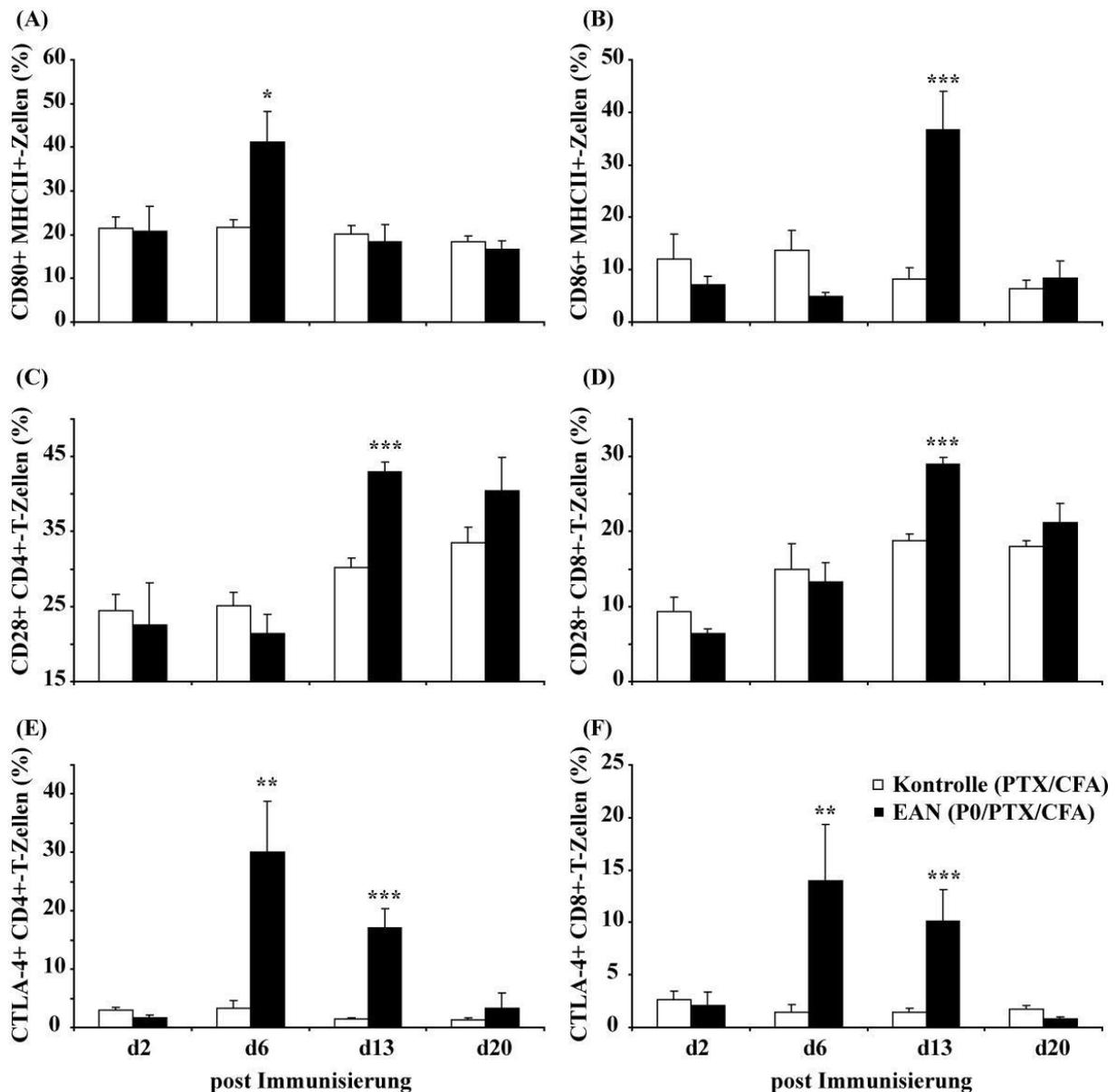
$\leq 0,001$ ; Abb.9B). Ansonsten zeigten die Werte keine Veränderung zur Kontrolle (siehe auch Tab.3 und Tab.9 im Anhang).

Zur weiteren Kontrolle der T-Zellaktivierung wurden die entsprechenden B7-Rezeptoren, CD28 und CTLA-4, auf ihre Expression auf CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in den Lymphknoten untersucht (Abb.9, Tab.3 und Tab.9 im Anhang).



**Abbildung 8: Expression des T-Zellrezeptors (TCR) auf T-Lymphozyten und Expression des MHC-KlasseII-Komplexes in murinen Lymphknotenzellen während des EAN-Krankheitsverlaufes.**

(A) Mittels FACS ermittelte TCR-Expression basierend auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, (B) TCR-Expression basierend auf CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und (C) MHC-Klasse-II-Komplex-Expression, erfasst mittels Durchflusszytometrie. \* =  $p \leq 0,05$



**Abbildung 9: Expression der ko-stimulatorischen Moleküle, CD80 und CD86, und ihrer entsprechenden Rezeptoren, CD28 und CTLA-4 während des EAN-Krankheitsverlaufes in Maus-Lymphozyten.**

Mittels FACS ermittelte Expression von (A) CD80 und (B) CD86 basierend auf MHCII<sup>+</sup> Zellen, (C) CD28 basierend auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und (D) CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (D) sowie (E) CTLA-4 basierend auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und (F) CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$

Die P0-immunisierte Gruppe zeigte im Vergleich zu den PTX/CFA-Kontrollen, dass der CD28-Rezeptor, der eine positive Ko-Stimulation vermittelt, in der Aktivierungsphase an d13 p.i. auf beiden, CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, verstärkt exprimiert wird (CD4:  $\Delta 12,71$ ,  $p \leq 0,001$ ; Abb.9C und CD8:  $\Delta 10,26$ ,  $p \leq 0,001$ ; Abb.9D). Der inhibierende Rezeptor CTLA-4 hingegen, zeigte nach Immunisierung der Mäuse bereits vor klinischer Manifestation an d6 p.i. signifikant erhöhte Expressionen (CD4:  $\Delta 26,69$ ,  $p \leq 0,01$ ; CD8:  $\Delta 12,48$ ,  $p \leq 0,001$ ), die

bis d13 p.i., auch auf beiden T-Lymphozyten (CD4:  $\Delta$  15,62,  $p \leq 0,001$ ; CD8:  $\Delta$  8,72,  $p \leq 0,001$ ), erhöht blieben (Abb.9E und F).

Insgesamt wurde demzufolge während der EAN der CD80 und CTLA-4 an d6 p.i. hochreguliert, anschließend an d13 p.i. CD86 und CD28.

## 3.2. Die Rolle der TLRs bei der EAN

### 3.2.1. Bestimmung des basalen TLR-Expression in Lymphknoten

Die T-Zellaktivierung und die anschließende T-Zelldifferenzierung finden in den sekundären lymphatischen Organen, wie beispielsweise den inguinalen und axillären Lymphknoten, statt. Da es sich bei der EAN ursprünglich um eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung handelt und erst kürzlich durchgeführte Studien zeigen, dass T-Helfer-Zellen teilweise durch TLR-Agonisten reguliert werden, wurde die TLR Expression während der EAN systematisch untersucht.

Um die EAN induzierte TLR-Expression zu untersuchen (zusammengefasst in Tabelle 3) wurde zunächst die grundlegende TLR-Expression bestimmt. Anschließend wurde das TLR-Expressionsmuster zu unterschiedlichen Zeitpunkten der EAN in Lymphknotenzellen bezüglich ihrer zellulären Quelle mittels FACS-Analysen als auch im Nervus ischiadicus immunhistochemisch untersucht.

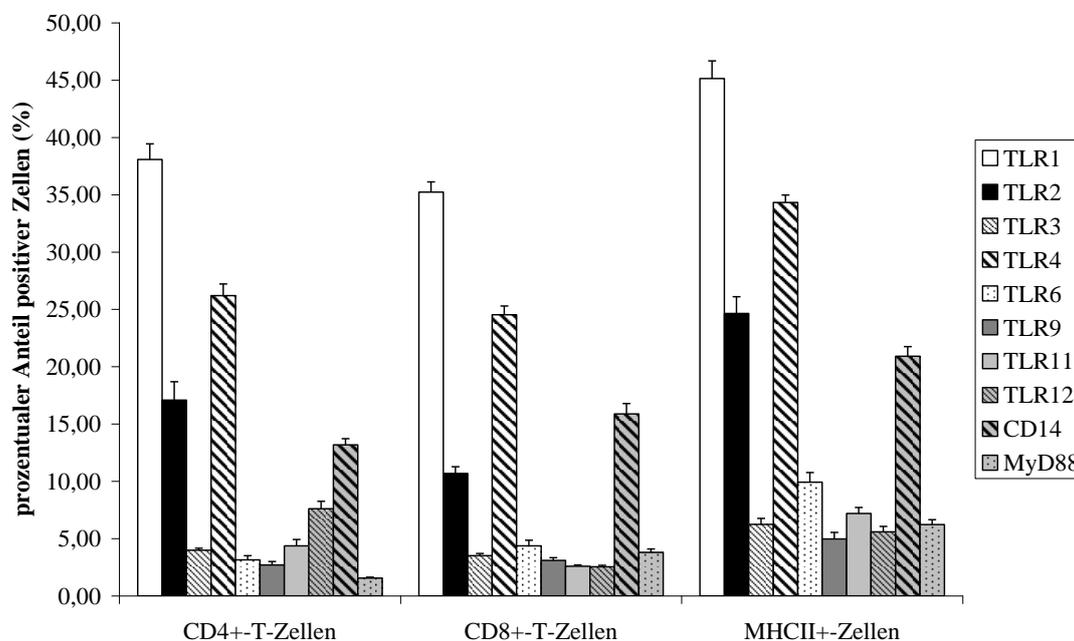
#### ***TLR1, TLR2, TLR4 und CD14 werden in gesunden Kontroll-Mäusen exprimiert.***

Zur Untersuchung der Basalexpressionen wurden die Lymphknoten gesunder Kontrollmäuse (PTX/CFA-Kontrollen) auf ihre Expression der verschiedenen TLRs auf T-Lymphozyten und APCs untersucht.

Bezüglich der T-Lymphozyten wurde die stärkste Expression für TLR1 beobachtet, nachfolgend für TLR4, TLR2 und CD14. Für TLR3, TLR6, TLR9, TLR11, TLR12 und MyD88 wurden sehr geringe, aber dennoch erfassbare Werte detektiert (Abb.10, Tab.10 im Anhang).

Die Expression der angeborenen Immunrezeptoren war auf APCs mit TLR1 am höchsten, gefolgt von TLR4, TLR2 und CD14. Übereinstimmend mit den T-Lymphozyten sind die Basalexpressionen von TLR3, TLR6, TLR9, TLR11, TLR12 und MyD88 auf einem sehr geringen Niveau. Demzufolge ist die TLR- bzw. MyD88-Expression in Lymphknotenzellen

von PTX/CFA-behandelten Tieren unabhängig der zellulären Quelle (Abb.10, Tab.10 im Anhang).



**Abbildung 10: Basale Expressionen von TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, TLR9, TLR11, TLR12, CD14 und MyD88 auf T-Lymphozyten und APCs in Lymphknotenzellen von PTX/CFA-Kontroll-Mäusen (C57B6/J).**

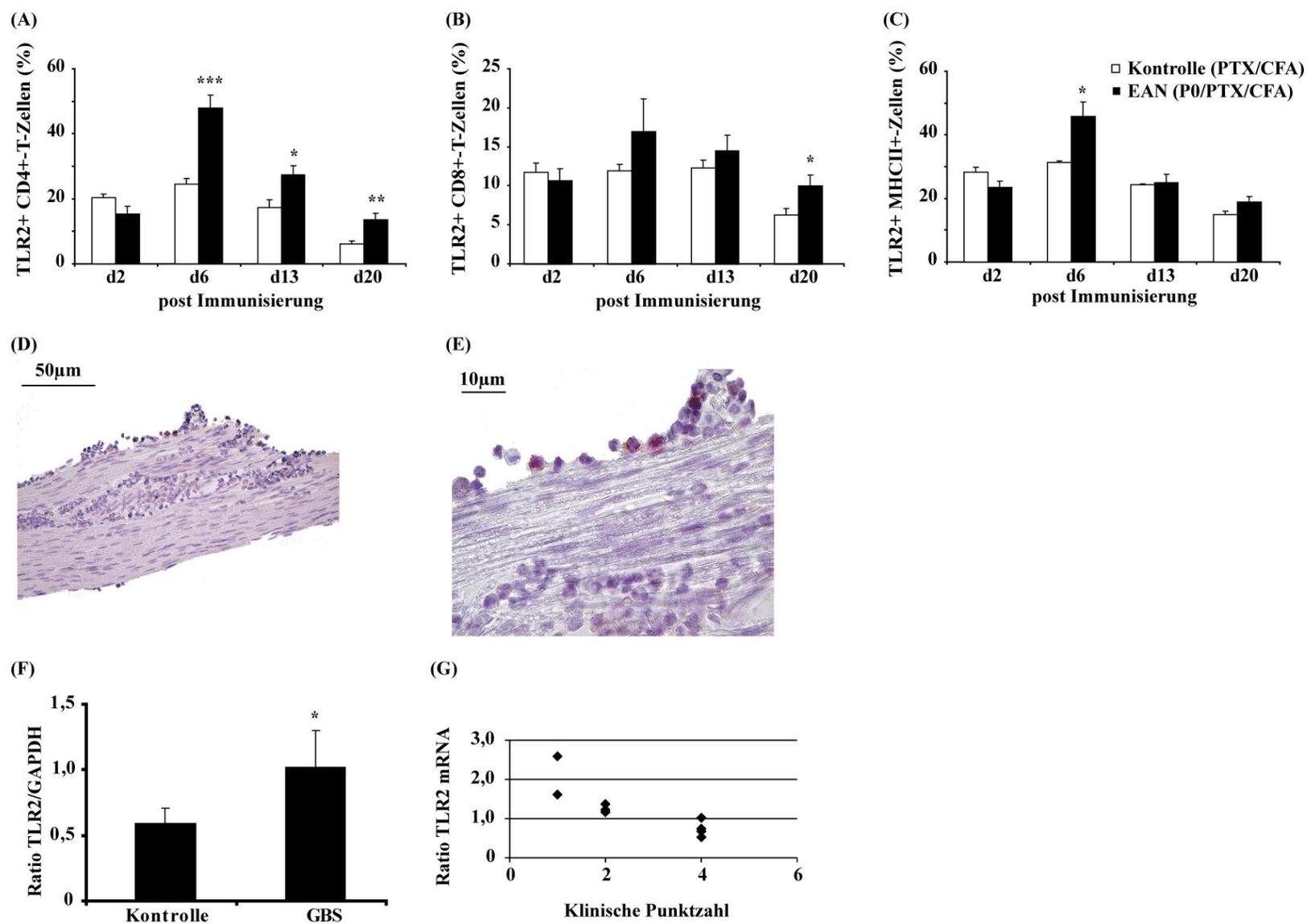
Die Daten wurden mittels FACS erfasst.

### 3.2.2. Bestimmung des TLR-Expressionsprofils bei der EAN und dem GBS

***Die TLR2/TLR6-Expression wird während der EAN signifikant auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, im Nervus ischiadicus von EAN-Mäusen als auch im Blut von GBS-Patienten hochreguliert.***

Wie bereits beschrieben, werden TLRs in einer Reihe von autoimmunen Erkrankungen exprimiert, wie beispielsweise TLR2 in Multipler Sklerose (Andersson et al., 2008). Zur Erweiterung des Liganden-Spektrums kann TLR2 entweder ein Homodimer oder ein Heterodimer zusammen mit TLR6 bilden. Folglich wurden die Expressionslevel von TLR2 und TLR6 auf EAN-aktivierten Lymphknotenzellen von P0-immunisierten Mäusen mittels FACS identifiziert.

CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zeigten während der Induktionsphase an d6 p.i. einen hoch signifikanten Anstieg von beiden, TLR2 ( $\Delta 23,34\%$ ,  $p \leq 0,001$ ) und TLR6 ( $\Delta 11,7\%$ ,  $p \leq 0,01$ ),



**Abbildung 11: TLR2-Expression auf Protein-Ebene in murinen Lymphknotenzellen während der EAN und auf mRNA-Ebene im Blut von GBS-Patienten in Korrelation zu klinischen Symptomen.**

Mittels FACS ermittelte TLR2-Protein-Expression auf (A) CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, (B) CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, (C) MHCII<sup>+</sup>-Zellen und (D) 200x bzw. (E) 600x vergrößert im Nervus ischiadicus an d13 p.i. der EAN sowie (F) auf mRNA-Ebene im Blut von GBS-Patienten und (G) in Korrelation zu den klinischen Symptomen. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$

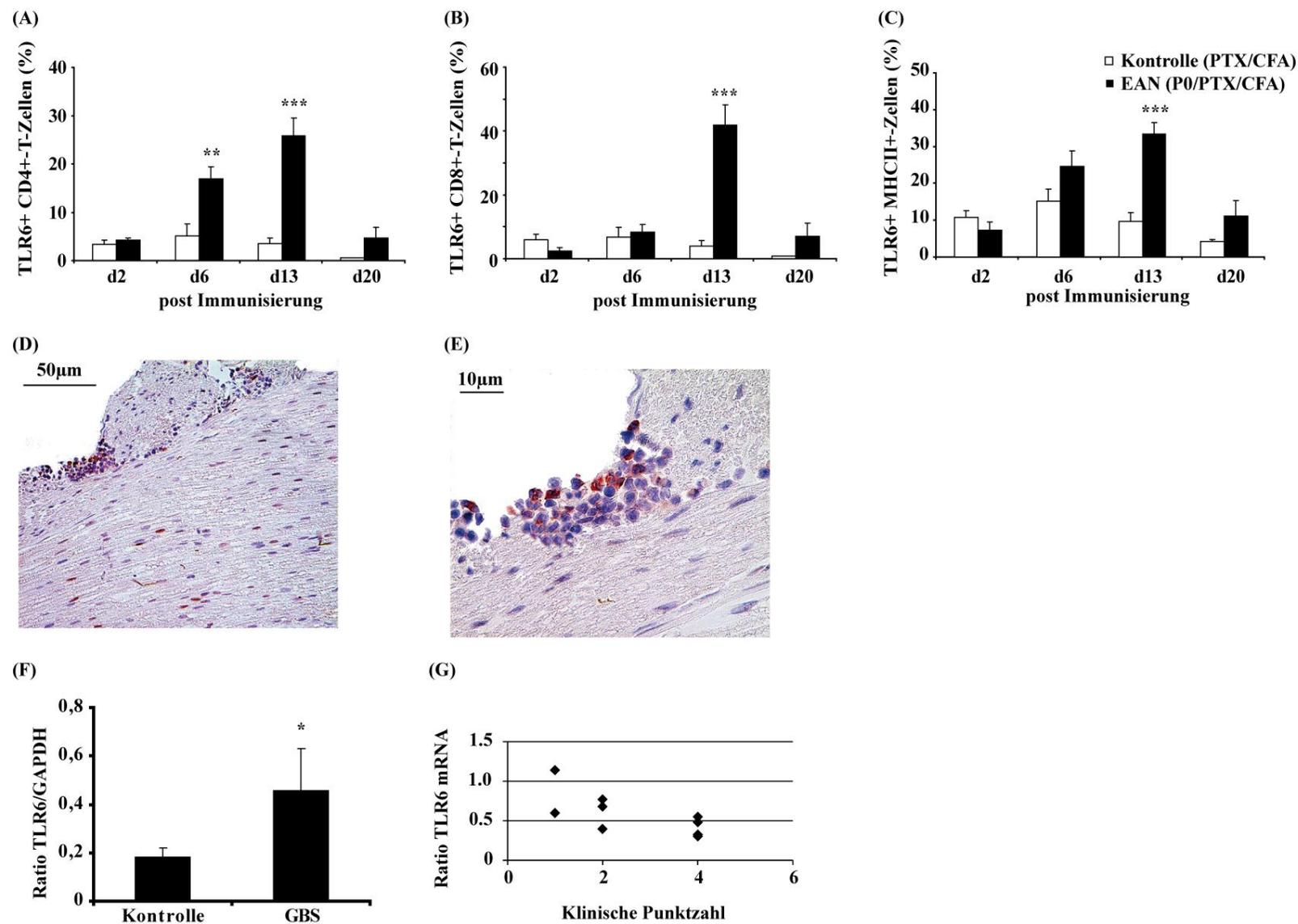
APCs exprimierten während der Induktionsphase (d6 p.i.,  $\Delta 14,63\%$ ,  $p \leq 0,05$ ) erhöhte TLR2-Level, TLR6 wurde in der frühen klinischen Phase der Erkrankung (d13 p.i.,  $\Delta 23,82\%$ ,  $p \leq 0,001$ ) (Abb.11C und 12C) hochreguliert (vgl. auch Abb. 32, Tab.3 und Tab.11 im Anhang).

Des Weiteren wurden die Effekte der EAN auf die TLR2- und TLR6-Expression im entzündeten Nervus ischiadicus von EAN-Mäusen analysiert. Hierzu wurden die Nn. ischiadici an d13 p.i. entsprechend isoliert und eine TLR-Quantifizierung via Immunhistochemie durchgeführt. In Übereinstimmung mit den Durchflusszytometrie-Daten zeigte die TLR-Immunreaktivität im Ischiasnerv eine  $20,0\% \pm 3,0$  erhöhte Expression von TLR2 (Abb.11D und E, Tab.4) und eine  $23,5\% \pm 1,6$  gesteigerte Expression von TLR6 (Abb.12D und E, Tab.4) auf den infiltrierten Zellen in der frühen klinischen Phase.

Um eine Verbindung zwischen den EAN-Ergebnissen und der humanen Erkrankung zu schaffen, wurde der TLR-Expressionsstatus im Menschen bestimmt. Die mRNA-Expressionslevel wurden im Blut von GBS-Patienten mittels Quantitativer Real-Time PCR bestimmt. In Kongruenz mit den experimentellen Maus-Ergebnissen, zeigte die TLR2- (Abb.11F) und TLR6-Quantifizierung (Abb.12F) eine deutliche mRNA-Hochregulierung im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (siehe auch Tab.12 im Anhang). Die Korrelation zur funktionellen GBS-Punkteskala zeigte wie auch bei den Mäusen für beide, TLR2 und TLR6, die höchsten mRNA-Level bei Ausbruch der Erkrankung mit einer fallenden Tendenz bei stärkerer klinischer Erkrankung (höhere klinische Punktzahlen; Abb.12G, Tab.12 im Anhang).

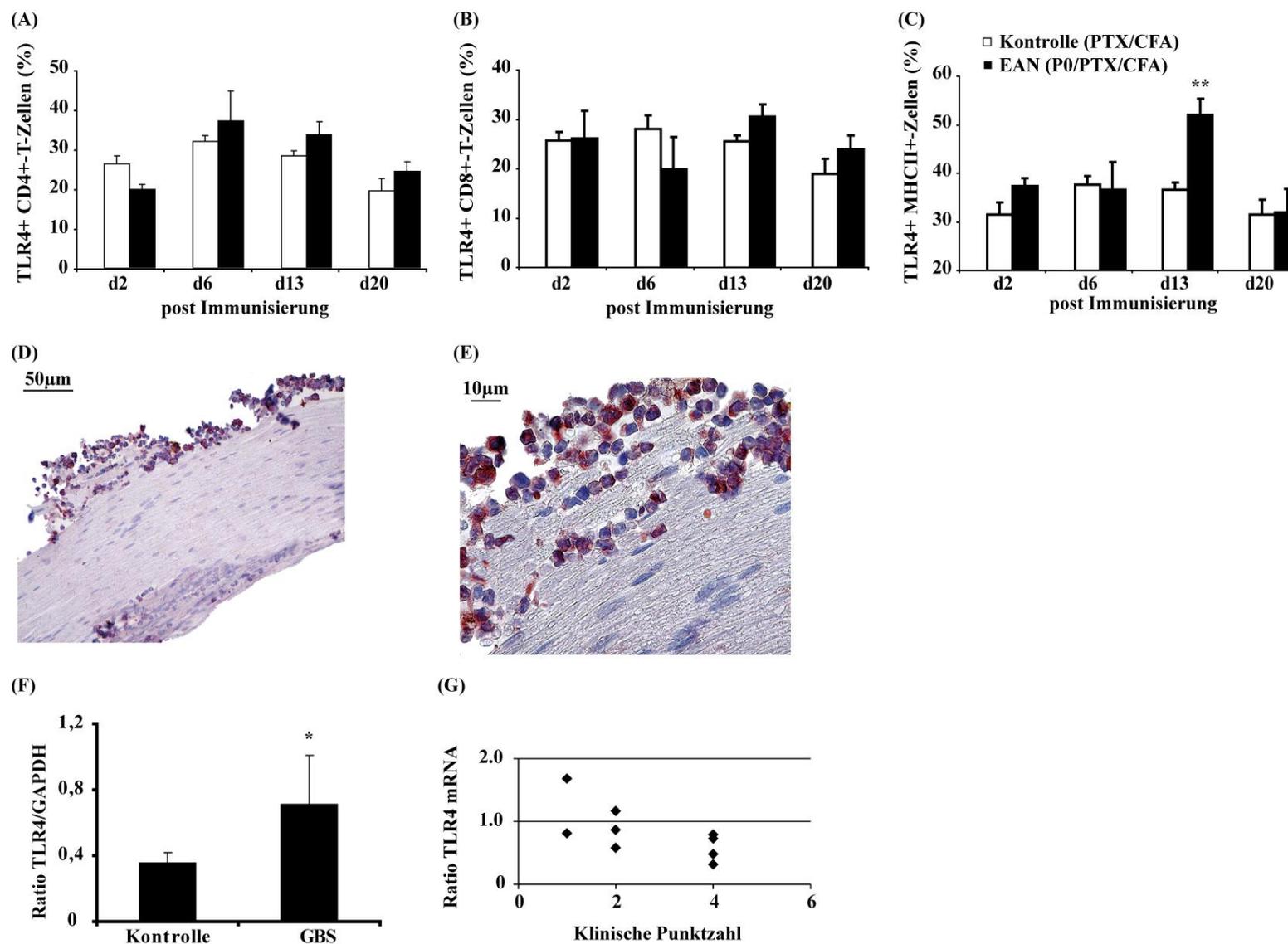
***TLR4 wird auf murinen EAN- induzierten APCs, im Nervus ischiadicus von EAN-Mäusen und in GBS-Patienten exprimiert.***

Es ist bekannt, dass TLR4, ein Rezeptor für LPS, APCs aktivieren und eine pro-inflammatorische Immunantwort induzieren kann. Darüber hinaus wird TLR4 auf mRNA-Ebene in der Ratten-EAN hochreguliert. Folglich wurde die TLR4-Protein-Expression während der EAN mittels FACS und dessen mRNA-Expression in GBS-Patienten mittels quantitativer Real-Time PCR untersucht.



**Abbildung 12: TLR6-Expression auf Protein-Ebene in murinen Lymphknotenzellen während der EAN und auf mRNA-Ebene im Blut von GBS-Patienten in Korrelation zu klinischen Symptomen.**

Mittels FACS ermittelte TLR6-Protein-Expression auf (A) CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, (B) CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, (C) MHCII<sup>+</sup>-Zellen und (D) 200x bzw. (E) 600x vergrößert im Nervus ischiadicus an d13 p.i. der EAN sowie (F) auf mRNA-Ebene im Blut von GBS-Patienten und (G) in Korrelation zu den klinischen Symptomen. \* p = ≤ 0,05, \*\* p = ≤ 0,01, \*\*\* p = ≤ 0,001



**Abbildung 13: TLR4-Expression auf Protein-Ebene in murinen Lymphknotenzellen während der EAN und auf mRNA-Ebene im Blut von GBS-Patienten in Korrelation zu klinischen Symptomen.**

Mittels FACS ermittelte TLR4-Protein-Expression auf (A) CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, (B) CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, (C) MHCII<sup>+</sup>-Zellen und (D) 200x bzw. (E) 600x vergrößert im Nervus ischiadicus an d13 p.i. der EAN sowie (F) auf mRNA-Ebene im Blut von GBS-Patienten und (G) in Korrelation zu den klinischen Symptomen. \* p = ≤ 0,05, \*\* p = ≤ 0,01

Während die CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (Abb.13A und B) von EAN-Lymphknotenzellen keine veränderten TLR4-Protein-Expressionen im gesamten EAN-Verlauf zeigten, exprimierten APCs in der Effektorphase der EAN an d13 p.i. hoch signifikant erhöhte Mengen an TLR4 ( $\Delta 15,27\%$ ,  $p \leq 0,01$ , Abb.13C). Zu den anderen untersuchten Zeitpunkten (d2, d6 und d20 p.i.) konnten keine veränderten TLR4-Expressionsraten beobachtet werden (vgl. auch Abb.32, Tab.3 und Tab.11 im Anhang).

Die den N. ischiadicus infiltrierenden Zellen exprimierten den TLR4-Rezeptor in hoher Anzahl ( $54,3\% \pm 4,9$  positive Zellen, Abb.13D und E).

Die mRNA-Level von TLR4 in GBS-Patienten ergaben im Vergleich zu Kontrollen eine signifikant erhöhte TLR4-Expression, mit stärkster Expression bei Ausbruch der Erkrankung und in Übereinstimmung mit den Mausexperimenten mit einer Tendenz zu geringeren mRNA-Mengen bei stärkeren klinischen Symptomen (Abb.13F und G, Tab.12 im Anhang).

	Anzahl infiltrierter Zellen	Anzahl TLR positiver Zellen	prozentualer Anteil positiver Zellen (%)	Mittelwert prozentualer Anteil positiver Zellen (%)	Standardabweichung
TLR2	73	32	43,84	29,54	7,36
	62	12	19,35		
	114	29	25,44		
TLR4	161	103	63,98	54,27	4,85
	91	45	49,45		
	83	41	49,40		
TLR6	63	15	23,81	23,52	1,60
	97	20	20,62		
	88	23	26,14		

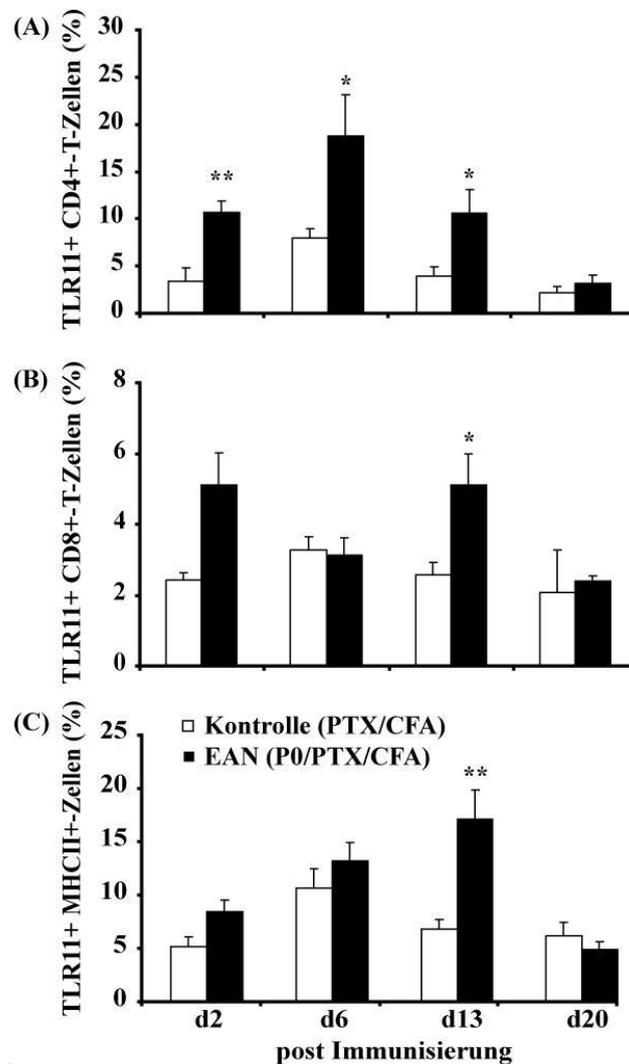
**Tabelle 4: Anzahl TLR-positiver infiltrierter Zellen im Nervus ischiadicus von EAN-Mäusen (C57B6/J) an d20 p.i. der Erkrankung (n=3).**

***Während der EAN kommt es zur übermäßigen TLR11-Expression auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen.***

Über die Rolle des TLR11-Rezeptors in peripheren Nervenerkrankungen ist bisher nur wenig bekannt. Um die Expressionslevel von TLR11 von EAN-Mäusen in Lymphknoten zu bestimmen, wurde dessen Proteinexpression mittels Durchflusszytometrie erfasst.

Die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zeigten eine signifikante Hochregulierung von TLR11, beginnend in der sehr frühen Induktionsphase an d2 p.i. ( $\Delta 7,26\%$ ,  $p \leq 0,01$ ), über d6 p.i. ( $\Delta 10,76\%$ ,  $p \leq 0,05$ ) bis einschließlich der Aktivierungsphase an d13 p.i. ( $\Delta 6,58\%$ ,  $p \leq 0,05$ , Abb.14A).

Für CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ( $\Delta 2,54\%$ ,  $p \leq 0,05$ , Abb.14B) bzw. APCs ( $\Delta 3,33\%$ ,  $p \leq 0,05$ , Abb.14C) wurde nur eine leichte, aber dennoch signifikante, Erhöhung in der frühen klinischen Phase an d13 p.i. gefunden (vgl. auch Abb.32, Tab.3 und Tab.11 im Anhang).

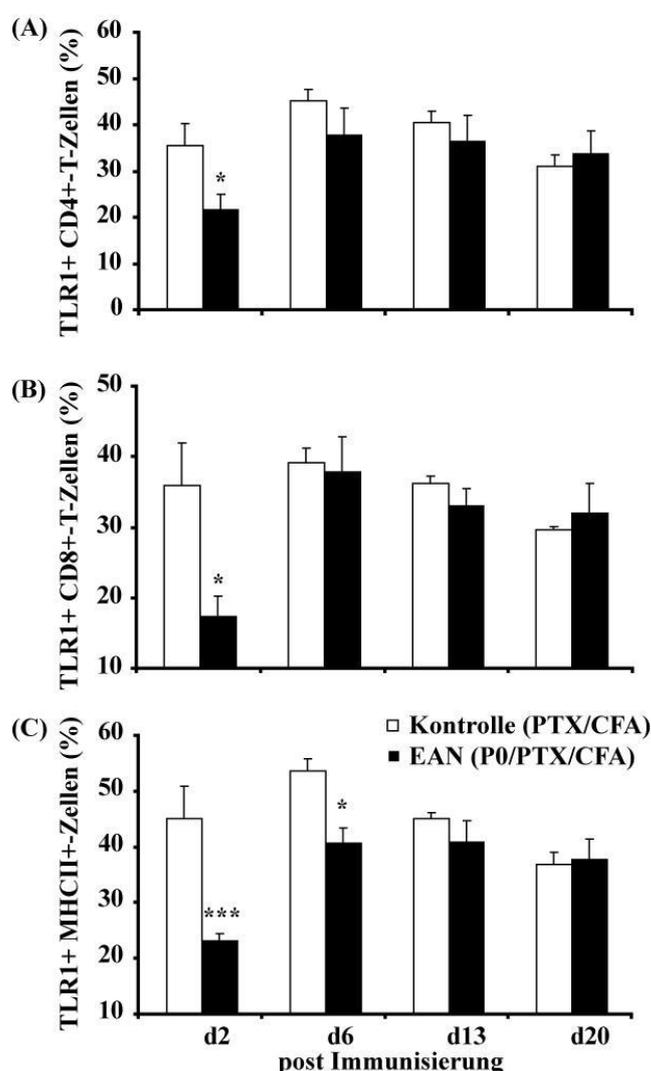


**Abbildung 14: TLR11-Expression auf Protein-Ebene in murinen Lymphknotenzellen während der EAN.** Mittels FACS ermittelte TLR11-Protein-Expression auf (A) CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, (B) CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und (C) MHCII<sup>+</sup>-Zellen. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$

***Die TLR1-Expression wird in der Induktionsphase der EAN signifikant reduziert.***

Zur Analyse der EAN induzierten Immunantwort des TLR1-Rezeptors, welcher einen potentiellen Dimerisationspartner für TLR2 darstellt, wurden durchflusszytometrische Messungen mit Lymphknotenzellen von EAN erkrankten Mäusen durchgeführt.

In der sehr frühen Induktionsphase an d2 p.i. konnten sowohl auf CD4<sup>+</sup>-( $\Delta$ 14,10%,  $p \leq 0,05$ , Abb.15A) und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ( $\Delta$ 18,59%,  $p \leq 0,05$ , Abb.15B) als auch auf APCs ( $\Delta$ 21,96%,  $p \leq 0,001$ , Abb.15C) signifikant verminderte TLR1-Level detektiert werden. Die TLR1-Reduktion auf APCs hielt sich bis einschließlich d6 p.i. ( $\Delta$ 12,99%,  $p \leq 0,05$ ). Im weiteren Verlauf, ab der Aktivierungsphase (d13 p.i.) bzw. bis einschließlich des Peak der Erkrankung (d20 p.i.) blieben die TLR1-Expressionslevel unverändert (vgl. auch Abb.32, Tab.3 und Tab.11 im Anhang). Demnach führt die EAN zu einer starken zellunabhängigen Reduktion von TLR1 in der Induktionsphase.



**Abbildung 15: TLR1-Expression auf Protein-Ebene in murinen Lymphknotenzellen während der EAN.** Mittels FACS ermittelte TLR1-Protein-Expression auf (A) CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, (B) CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und (C) MHCII<sup>+</sup>-Zellen. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$

### ***Andere TLRs in der EAN und GBS.***

Neben den oben genannten, wesentlichen Erkenntnissen der TLR-Änderungen während der EAN, existieren auch geringfügige Veränderungen anderer TLRs.

Für TLR3 konnte am Peak der Erkrankung (d20 p.i.) eine Herunterregulierung auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ( $\Delta 1,67\%$ ,  $p \leq 0,05$ ) beobachtet werden. Außerdem zeigten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen eine signifikante Hochregulierung von TLR9 in der frühen Induktionsphase an d2 p.i. ( $\Delta 1,75\%$ ,  $p \leq 0,05$ ). Die Analyse des TLR9-Rezeptors auf mRNA-Ebene bei GBS-Patienten hingegen zeigte keine veränderten Expressionsraten im Vergleich zu den Kontrollen (nicht gezeigt). CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ( $\Delta 1,18\%$ ,  $p \leq 0,05$ ) und APCs ( $\Delta 9,08\%$ ,  $p \leq 0,05$ ) exprimierten signifikant gesteigerte Mengen an TLR12 in der Effektorphase an d13 p.i. Alle anderen untersuchten TLRs zeigten keinerlei Veränderungen im Expressionsprofil (Abb.32, Tab.3 und Tab.11 im Anhang).

### 3.3. Die Rolle von MyD88 und IL-17A bei der EAN

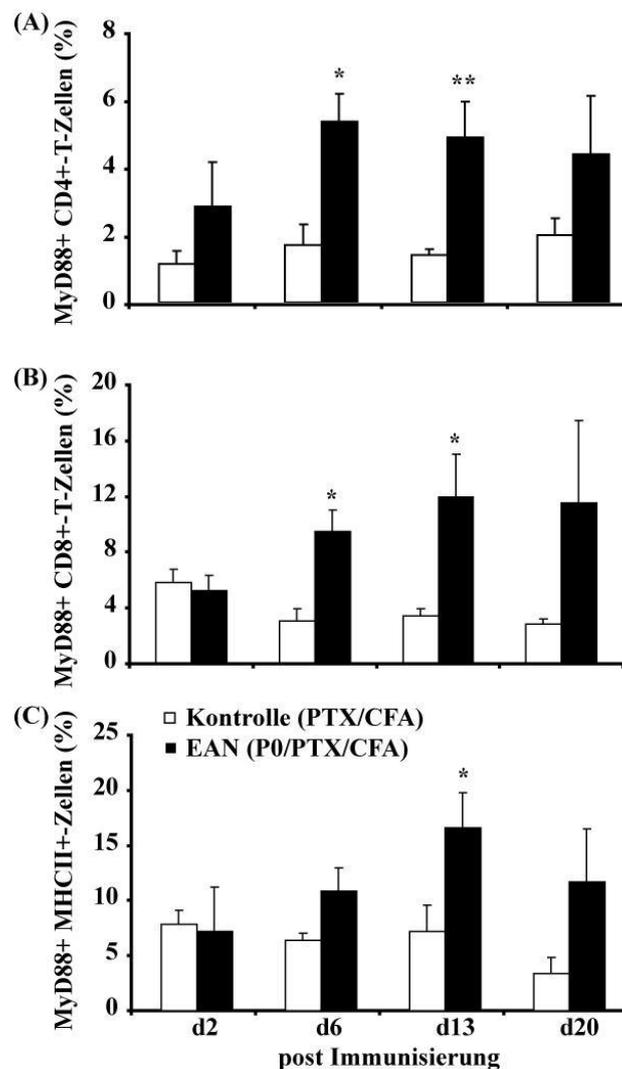
#### ***Die MyD88- und IL-17A-Expression ist in EAN-Mäusen verstärkt***

Der intrazelluläre TLR-Signalweg wird durch das Adapterprotein MyD88 vermittelt; allerdings ist darüber wenig in der EAN bekannt. In der EAE Pathophysiologie jedoch wird MyD88 als wichtige Komponente in der Entwicklung von T-Helfer17-Zellen angesehen, e.g. eine MyD88-Defizienz beispielsweise führt zu einer Resistenz gegen die EAE (Cohen et al., 2010). Infolgedessen wurden die Protein-Expressionen des intrazellulär lokalisierten MyD88 und die prozentualen Anteile IL-17A-sezierender Zellen während des EAN-Verlaufes ermittelt.

Durch die EAN wurde im gesamten Verlauf der Erkrankung eine vermehrte Expression von MyD88 auf T-Lymphozyten detektiert, wobei nur an d6 p.i. und d13 p.i. signifikant veränderte Expressionsraten beobachtet werden konnten (Abb.16). Im Speziellen wiesen die CD4<sup>+</sup>- (Abb.16A) und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (Abb.16B) einen signifikanten Anstieg des MyD88-Proteins in der Induktionsphase an d6 p.i. (CD4:  $\Delta 3,65\%$ ,  $p \leq 0,05$ ; CD8:  $\Delta 6,42\%$ ,  $p \leq 0,05$ ) und der frühen klinischen Phase an d13 p.i. (CD4:  $\Delta 3,48\%$ ,  $p \leq 0,01$ ; CD8:  $\Delta 8,50\%$ ,  $p \leq 0,05$ ) auf. Zusätzlich waren auch auf APCs verstärkte MyD88-Expressionen in der Effektorphase an d13 p.i. ( $\Delta 13,36\%$ ,  $p \leq 0,05$ ) präsent (Abb.16C). Selbst am Peak der EAN (d20 p.i.) ist die

MyD88-Expression im Vergleich zu den Kontrollen auf allen untersuchten Zelltypen noch leicht erhöht (vgl. auch Abb.32, Tab.3 und Tab.11 im Anhang).

Die Untersuchung der MyD88 mRNA im Blut von GBS-Patienten zeigte keine Änderung im Vergleich zu gesunden Kontrollen (nicht gezeigt).

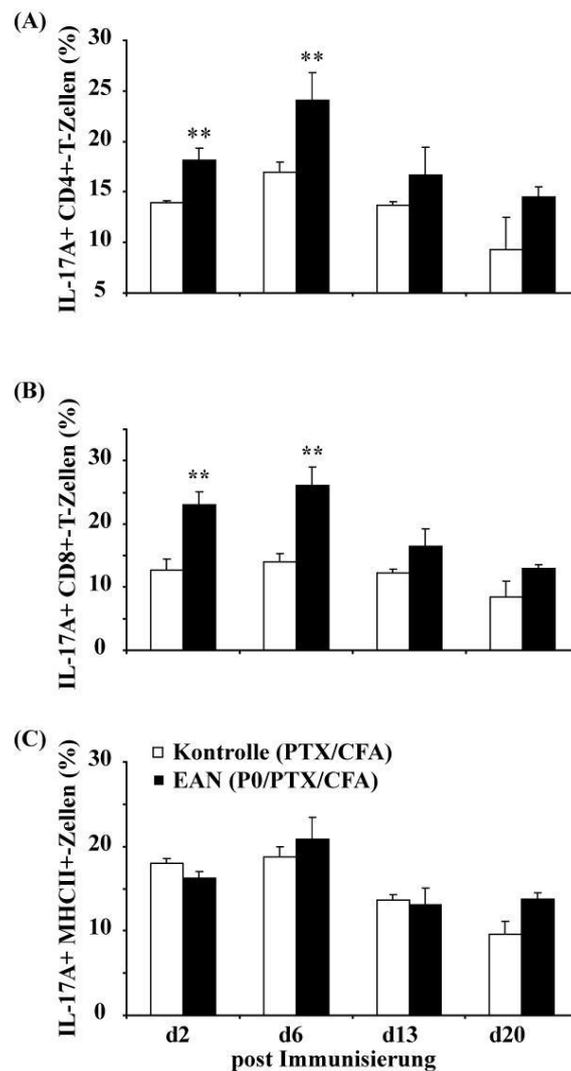


**Abbildung 16: MyD88-Expression auf Protein-Ebene in murinen Lymphknotenzellen während der EAN.** Mittels FACS ermittelte MyD88-Protein-Expression auf (A) CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, (B) CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und (C) MHCII<sup>+</sup>-Zellen. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$

Die Untersuchungen von IL-17A ergaben bereits vor klinischer Manifestation erhöhte Mengen an IL-17A-produzierenden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (d2 p.i.:  $\Delta 4,23\%$ ,  $p \leq 0,01$ ; d6 p.i.:  $\Delta 7,11\%$ ,  $p \leq 0,01$ , Abb.17A) und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (d2 p.i.:  $\Delta 10,31\%$ ,  $p \leq 0,01$ ; d6 p.i.:  $\Delta 12,10\%$ ,  $p \leq 0,01$ , Abb.17B), während ab der Aktivierungsphase (d13 p.i.) bis einschließlich

dem Peak der Erkrankung (d20 p.i.) kein Unterschied mehr detektierbar war. Auf APCs konnten keine signifikant veränderten IL-17A-Mengen detektiert werden (Abb.17C, vgl. auch Tab.3 und Tab.11 im Anhang).

Das pro-inflammatorische Zytokin IL-17A scheint, insbesondere zu Beginn der Induktionsphase, essentiell zu sein, da es zu diesen Zeitpunkten zu einer vermehrten Expression des Zytokins kommt.



**Abbildung 17: IL-17A-Expression auf Protein-Ebene in murinen Lymphknotenzellen während der EAN.** Mittels FACS ermittelte IL17A-Protein-Expression auf (A) CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, (B) CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und (C) MHCII<sup>+</sup>-Zellen. \*\* p = ≤ 0,01

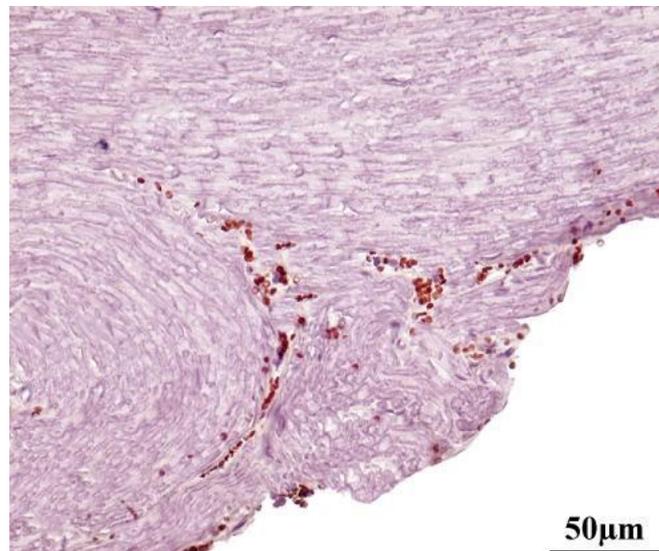
### 3.4. Die Rolle von CD14 bei der EAN

#### ***Der LPS-Rezeptor CD14 wird vermehrt im entzündeten Gewebe exprimiert.***

CD14 ist ein angeborener Immunrezeptor und erkennt wie TLR2 sowohl Peptidoglykane (TLR2-Agonist) als auch wie TLR4 LPS (TLR4-Agonist). Um aufzuklären, ob neben TLR2 und TLR4 auch deren Ko-Rezeptor CD14 eine entscheidende Rolle bei der EAN spielt, wurde dessen Expressionsmuster im Nervus ischiadicus (Abb.18) und in Lymphknoten (Abb.19) bestimmt.

Zur immunhistochemischen Untersuchung wurden Gefrierlängsschnitte des Nervus ischiadicus von EAN-Wildtyp-Mäusen an d13 p.i. analysiert. Nach entsprechender Immunisierung und Infiltration in das Gewebe, wurde untersucht, ob es sich bei den infiltrierten Zellen um Monozyten/Makrophagen bzw. CD14-positive Zellen handelt.

Wie in Abb.18 verdeutlicht, zeigt das entzündete Gewebe der EAN-Maus in der Effektorphase der Erkrankung (d13 p.i.) viele entzündliche Infiltrate. Die CD14-positiven Zellen sind in rot-braun gezeigt. Man findet sie auf fast allen infiltrierten Zellen.



**Abbildung 18: CD14-Immunhistochemie auf Kryoschnitten des Nervus ischiadicus von EAN-Mäusen (C57B6/J) an Tag 13 p.i.**

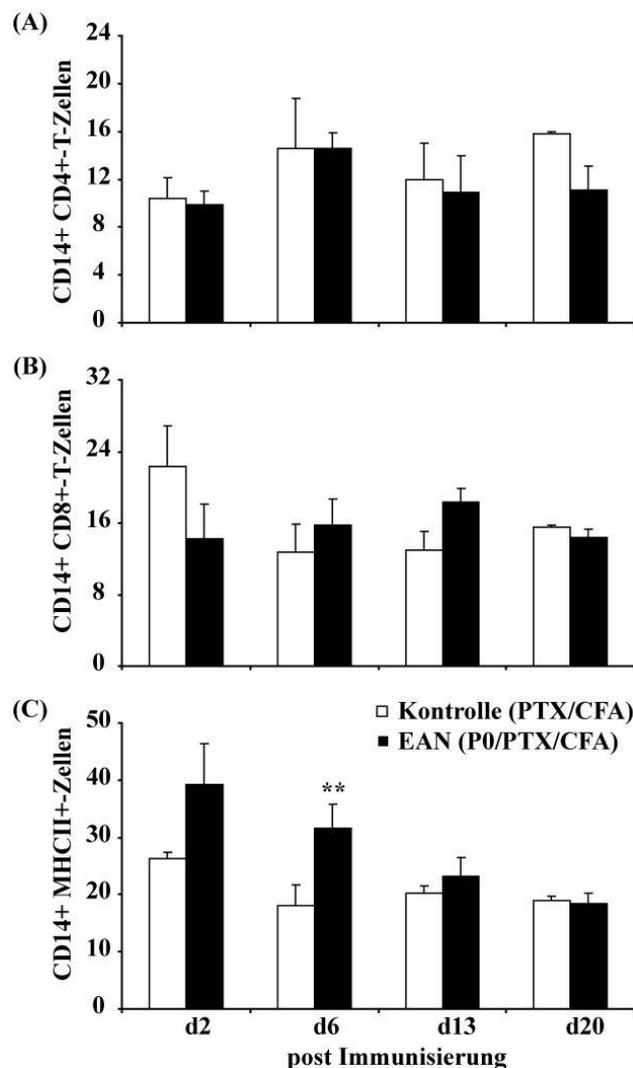
Die positive Färbung ist in rot-braun gezeigt. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Zur zellulären Lokalisation des CD14-Rezeptors wurde dessen Expressionsmuster in Lymphknotenzellen mittels FACS bestimmt. Als typischer Marker für aktivierte Monozyten

bzw. Makrophagen ist vor allem auf APCs ein basal höheres, aber auch ein durch die EAN verändertes CD14-Expressionsprofil zu erwarten.

Wie die Ergebnisse der FACS-Analysen zeigen (Abb.19, Tab.11 im Anhang), wird der LPS-Rezeptor auf allen untersuchten Zelltypen (T-Zellen und APCs) mit einem Grundlevel exprimiert (vgl. Kontrollen).

Auf EAN-induzierten APCs kommt es aber bereits an d2 p.i. zu einem leichten Anstieg ( $\Delta 13,04\%$ ), an d6 p.i. zur signifikant vermehrten Proteinexpression des CD14-Rezeptors ( $\Delta 13,50\%$ ,  $p \leq 0,01$ ). Aufgrund konstant bleibender CD14-Expressionen auf T-Zellen, auch während der EAN, scheint CD14 selbst die T-Zellen nicht zu beeinflussen.



**Abbildung 19: CD14-Expression auf Protein-Ebene in murinen Lymphknotenzellen während der EAN.** Mittels FACS ermittelte CD14-Expression auf (A) CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, (B) CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und (C) MHCII<sup>+</sup>-Zellen. \*\*  $p \leq 0,01$

### 3.5. Die Funktionelle Bedeutung des CD14-Rezeptors in der Pathologie und Pathophysiologie der EAN

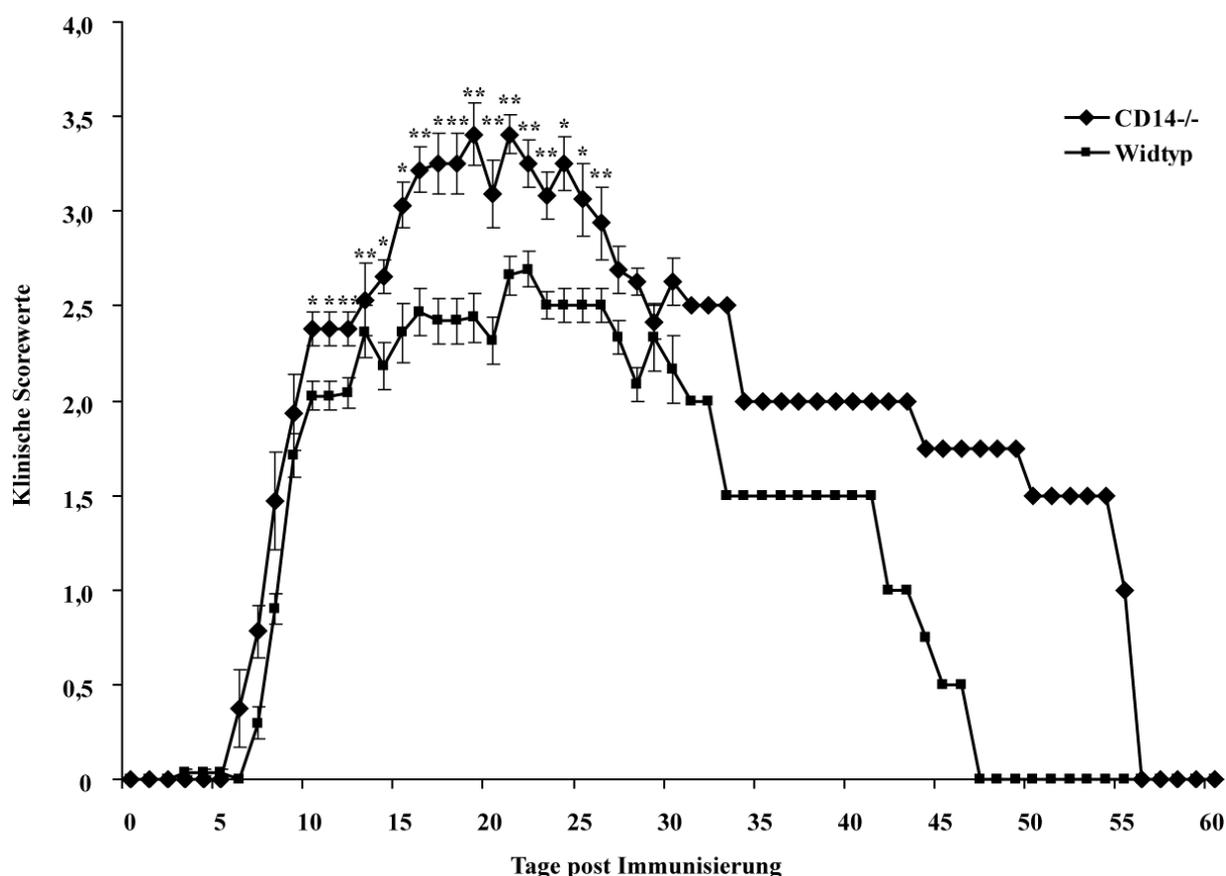
Der kritische pathologische Schritt der EAN stellt die Infiltration entzündlicher Zellen in das Nervengewebe dar. Wie anhand der Ergebnisse in 3.4. (Abb.18) gezeigt wurde, exprimieren fast alle zellulären Infiltrate in das entzündete Gewebe von EAN-Mäusen den LPS-Rezeptor CD14. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CD14 auf APCs in Lymphknotenzellen in der Induktionsphase der EAN hochreguliert wird. Da eine CD14-Defizienz bei der pathophysiologisch ähnlichen EAE zu einer verstärkten Krankheitsentwicklung führt, (Walter et al., 2006), wurde angenommen, dass CD14 auch bei der EAN eine potentielle Rolle spielt. Demzufolge wurde untersucht, ob das Fehlen dieses Rezeptors zu einer veränderten klinischen Ausprägung, Pathologie, Elektrophysiologie und/oder pathophysiologischen Abläufen der EAN führt. Hierzu wurden CD14-defiziente zusammen mit C57B6/J-Mäusen mit P0 immunisiert und sowohl die klinische Entwicklung der EAN als auch die Gewichte der Tiere zu Beginn und während des EAN-Verlaufs dokumentiert.

#### 3.5.1. Klinik der EAN bei einer CD14-Defizienz

***Die EAN in CD14<sup>-/-</sup> Mäusen führt zu einem verstärkten klinischen und histopathologischen Krankheitsverlauf.***

Wie Abb.20 zeigt, entwickelten die CD14-defizienten Mäuse bereits ab d6 (Mittelwert:  $d6,57 \pm 0,20$ ) die ersten neurologischen Symptome (reduzierter Schwanztonus), die Wildtypen hingegen durchschnittlich etwa erst einen Tag später an  $d7,37 \pm 0,002$ . Ab d9 p.i. gingen die Symptome rasch in die weiterführenden Extremitäten-Schwächen (Score:  $1,9 \pm 0,2$ ) und bis d15 in Lähmungen der Extremitäten (Score:  $3,1 \pm 0,12$ ) über.

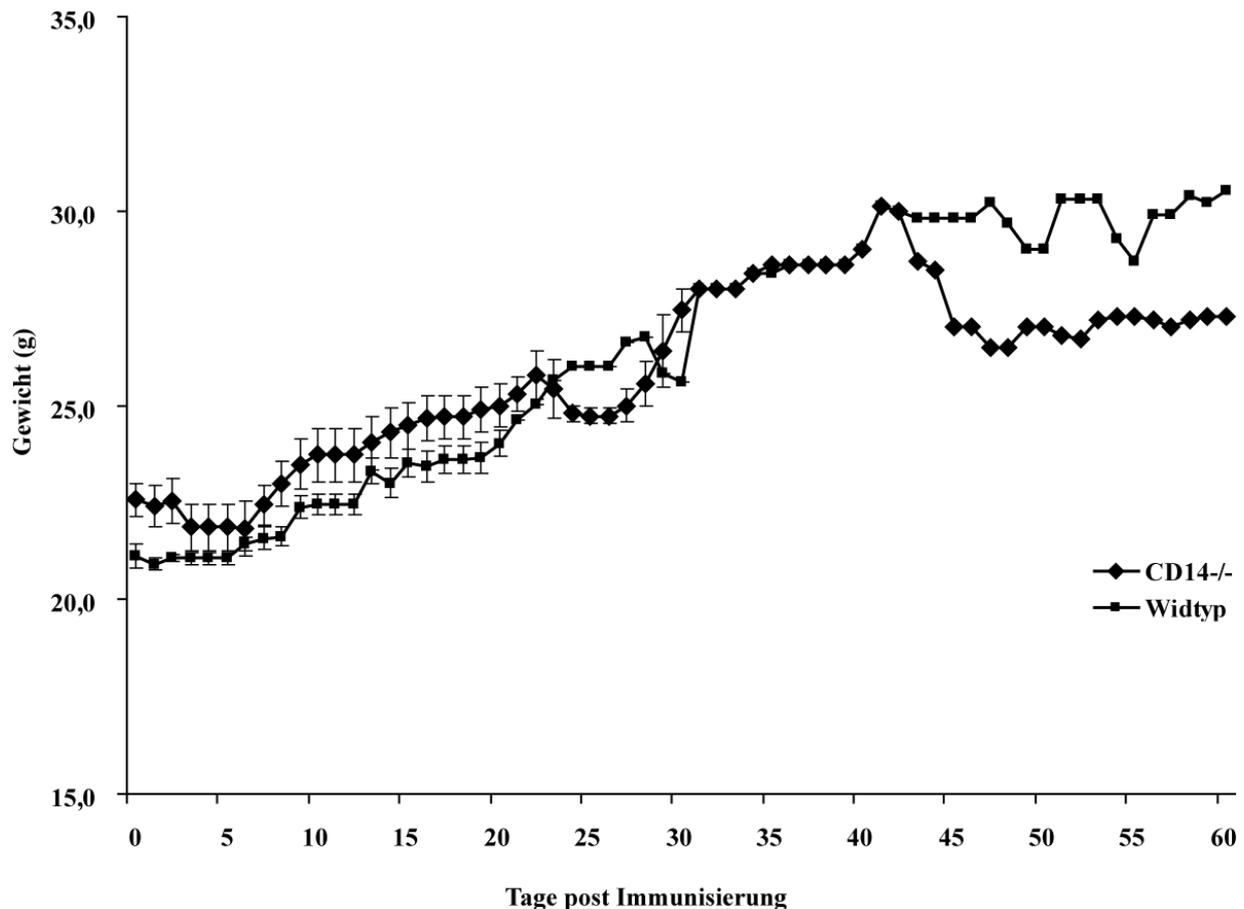
Interessanterweise zeigten die CD14<sup>-/-</sup>-Mäuse, neben dem früheren Ausbruch der EAN, während des gesamten Verlaufs einen anhaltend schwereren klinischen Verlauf als die entsprechenden Wildtypiere, wobei der Unterschied der Scorewerte ab d10 p.i. als signifikant eingestuft werden kann (Abb.20).



**Abbildung 20: Durchschnittliche klinische Scorewerte von CD14<sup>-/-</sup>-Mäusen und C57B6/J-Kontrollmäusen während des EAN-Krankheitsverlaufes.**

Bis d30 sind die Werte dreier repräsentativer EAN-Experimente mit insgesamt 6 Tieren je Gruppe gezeigt. Ab d30 ist jeweils ein EAN-Experiment gezeigt. \* $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$

Vergleichbar mit den Kontrollen, die in diesem Beispiel an d22 p.i. den klinischen Peak mit einem Score von  $2,8 \pm 0,11$  erreichten, fand sich auch der klinische Peak der CD14-Knock-Out-Mäuse an etwa dem gleichen Zeitpunkt p.i. (d21p.i) mit einem maximalen Score von  $3,5 \pm 0,1$ . Ein weiterer Unterschied zwischen CD14-defizienten und Wildtypmäusen wurde in der Reigrationszeit beobachtet, die bei Wildtypmäusen nicht vor d47, bei CD14<sup>-/-</sup>-Mäusen hingegen erst an d55 p.i. eingetreten war (Abb.21). Die Gewichtskontrolle zeigt sowohl für die CD14<sup>-/-</sup> Tiere als auch für die Wildtypiere keine großen Gewichts-Schwankungen oder Unterschiede (Abb.21).



**Abbildung 21: Gewichtsverlauf von CD14-defizienten und Wildtyp-EAN-(P0/PTX/CFA)-Mäusen (C57B6/J) während des EAN-Krankheitsverlaufes.**

Bis d30 sind die Werte zweier repräsentativer EAN-Runden mit insgesamt 6 Tieren je Gruppe gezeigt. Ab d30 ist jeweils eine EAN-Runde gezeigt. \* $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$

### 3.5.2. Elektrophysiologische Veränderungen während der EAN bei einer CD14-Defizienz

Neben den typischen klinischen Symptomen von GBS und der EAN, können auch die elektrophysiologischen Charakteristika als aussagekräftige Diagnosemöglichkeiten herangezogen werden, um den Zustand peripherer Nerven zu beurteilen.

Folglich wurden elektrophysiologische Messungen am Nervus ischiadicus von Wildtyp-Mäusen (EAN und PTX/CFA) vs. CD14-KO-Mäusen (EAN und PTX/CFA) durchgeführt und deren Krankheitsstatus ermittelt. Des Weiteren wurde überprüft, ob die für GBS typischen A-Wellen nach Reizung des Nervus ischiadicus vorhanden sind.

***Eine CD14-Defizienz führt zur signifikant verlängerten Latenzzeiten von F-Wellen bei EAN-Mäusen.***

Die F-Wellenableitungen von Kontroll- und EAN-Mäusen von Wildtypen und CD14-defizienten Mäusen sind in den Abbildungen 22 und 23 gezeigt. Man erkennt jeweils sehr deutlich, dass bei den gesunden Tieren bzw. den PTX/CFA-Kontrollen nach erfolgtem Reiz eines Einzelpulses von  $> 25\text{mA}$  mit einer Dauer von  $200\mu\text{s}$ , zunächst eine Muskel-Antwort (M-Antwort) eingetreten war, gefolgt von der retrograden Erregung, der F-Welle. Letztere wurde in diesen Beispielen nach  $4,0\text{ms}$  mit jeweils 100% Inzidenz detektiert (Abb.22, 23 und Tab.5).

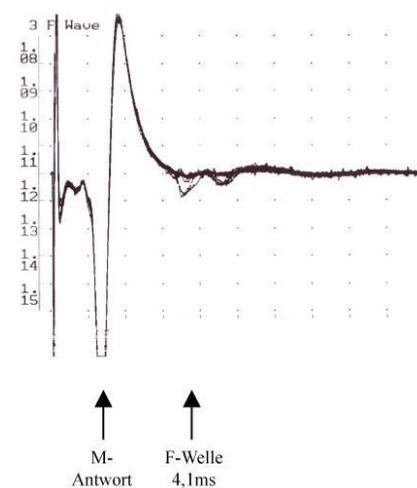
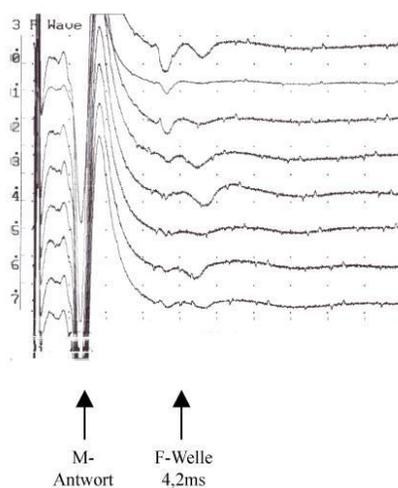
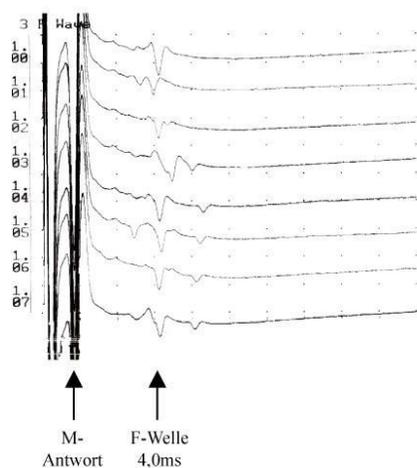
Nach Immunisierung hatte sich die Latenzzeit der F-Wellen bereits ab d2 p.i. sowohl von Wildtyp- als auch CD14-/-EAN-Tieren stark signifikant verlängert ( $p = \leq 0,001$ ; Tab.5 und Abb.24). Ferner konnten die F-Wellen bei CD14-defizienten Tieren nur noch mit einer Persistenz von  $89,58\% \pm 0,03$ , bei den Wildtypen hingegen immer noch mit 100% beobachtet werden (Tab.5). Das weitere Fortschreiten der EAN führte sowohl bei den Wildtypen als auch bei den CD14-defizienten Mäusen zu immer größer werdenden Latenzzeiten (Tab.5 und Abb.24). Die Persistenz der F-Wellen reduzierte sich ab d6 p.i. auch bei den Wildtypen von 100% auf  $93,75\% \pm 0,04$ , ein ähnlicher Wert wurde auch für die CD14-/-Mäuse an d6 p.i. gefunden ( $94,53\% \pm 0,02$ ) (Tab.5).

	CFA/PTX-Kontrolle		EAN d2		EAN d6	
	Wildtyp	CD14-/-	Wildtyp	CD14-/-	Wildtyp	CD14-/-
Latenzzeit F-Welle (ms)	4,10	4,16	4,48	4,41	4,70	4,98
Standardabweichung	0,04	0,06	0,10	0,06	0,06	0,06
Persistenz F-Welle (%)	100,00	100,00	100,00	89,58	93,75	94,53
Standardabweichung	0,00	0,00	0,00	0,03	0,04	0,02

	EAN d13		EAN d20		EAN d30	
	Wildtyp	CD14-/-	Wildtyp	CD14-/-	Wildtyp	CD14-/-
Latenzzeit F-Welle (ms)	4,79	5,50	6,11	7,38	6,99	7,25
Standardabweichung	0,15	0,21	0,12	0,56	0,09	0,15
Persistenz F-Welle (%)	87,50	75,00	58,33	37,81	74,60	79,81
Standardabweichung	0,06	0,08	0,06	0,07	0,07	0,07

**Tabelle 5: Latenzzeiten und Persistenz von F-Wellen von CD14-defizienten- und Wildtyp-Mäusen mittels Neurographie bei supramaximaler Reizstärke ( $> 25\text{mA}$ ,  $200\mu\text{s}$ ).**

Wildtyp-CFA/PTX-Kontrolle



Wildtyp-EAN d20 p.i.

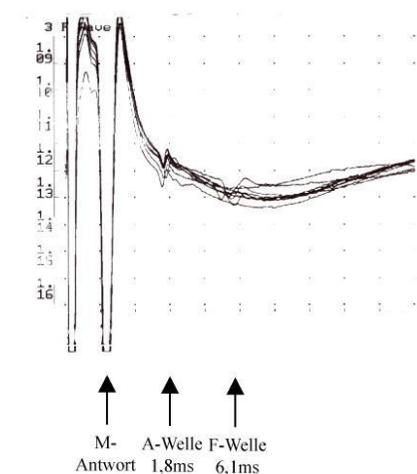
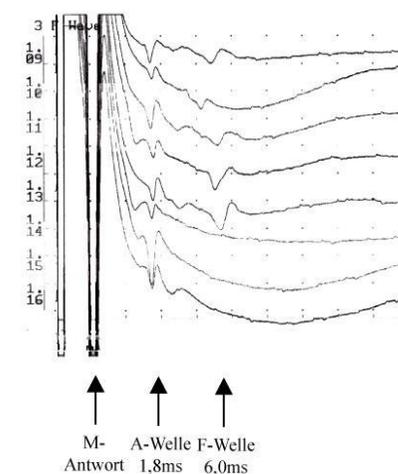
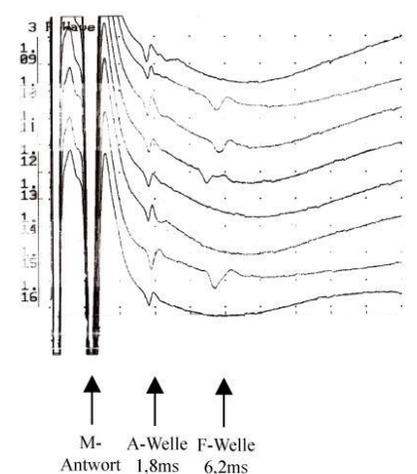
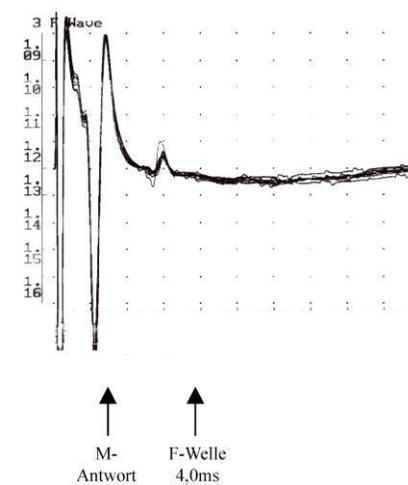
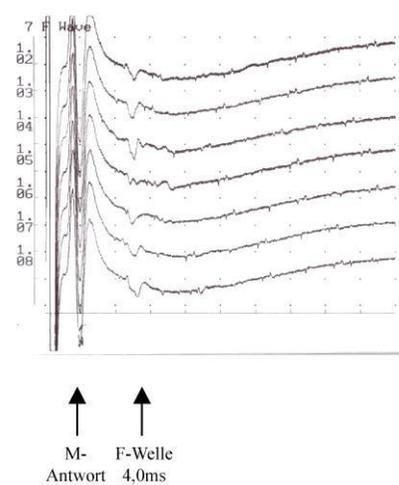
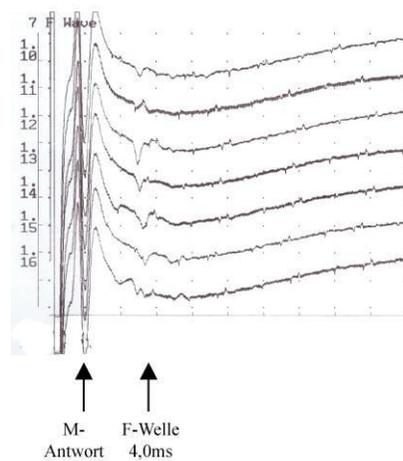


Abbildung 22: Neurographische Messungen des Nervus ischiadicus von EAN (P0/PTX/CFA)- und Kontroll (PTX/CFA)-Mäusen (C57B6/J) an d20 p.i. der Erkrankung bei supramaximaler Reizstärke (> 25mA, 200µs).

CD14<sup>-/-</sup>/CFA/PTX-Kontrolle



CD14<sup>-/-</sup> EAN d20 p.i.

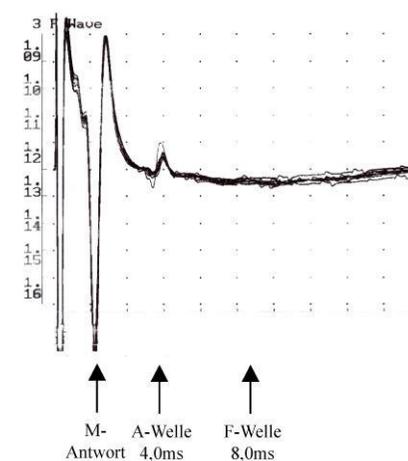
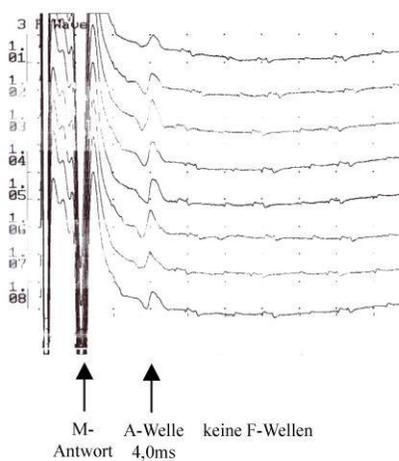
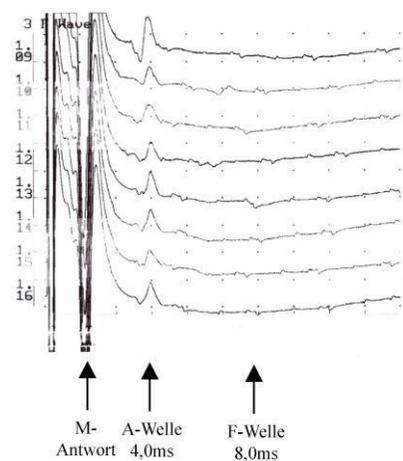
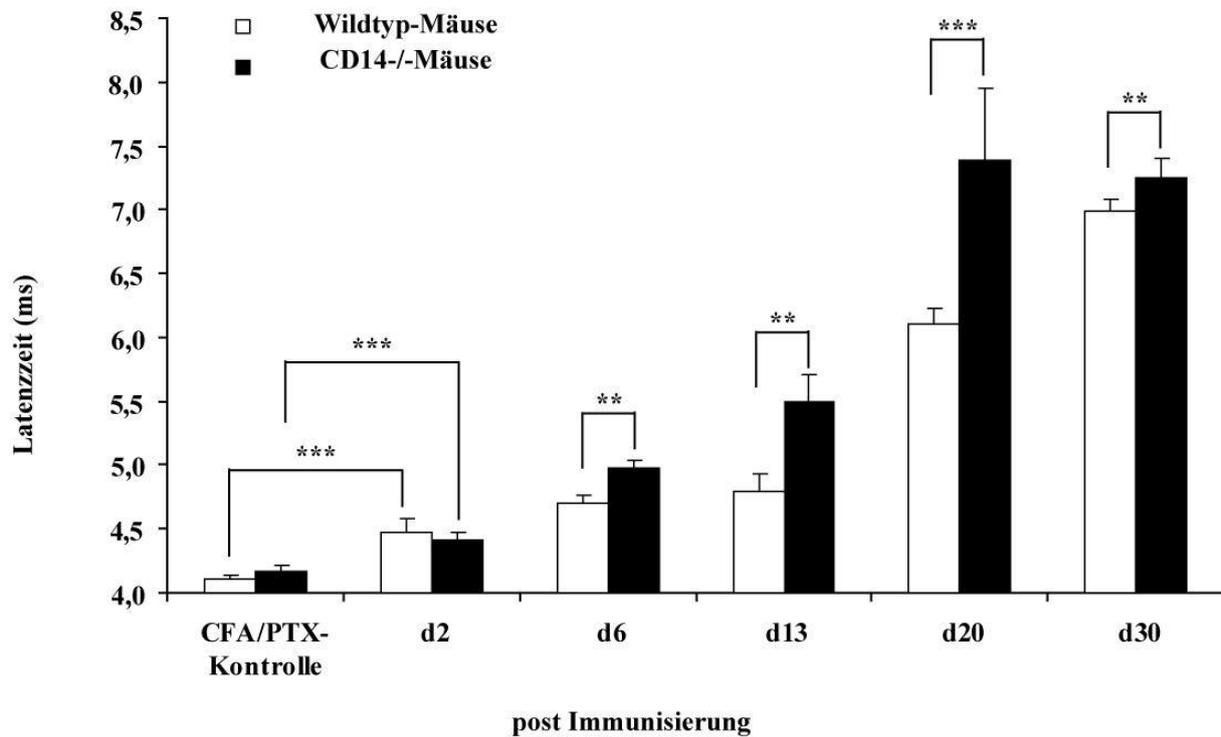


Abbildung 23: Neurographische Messungen des Nervus ischiadicus von CD14-defizienten EAN (PO/PTX/CFA)- und Kontroll-(PTX/CFA)-Mäusen an d20 p.i. der Erkrankung bei supramaximaler Reizstärke (> 25mA, 200µs).



**Abbildung 24:** F-Wellen-Latenzzeit des Nervus ischiadicus von CD14-defizienten- vs. Wildtyp-(C57B6/J) EAN-Mäusen nach supramaximaler Reizung (0,2ms je Einzelpuls) gemessen mittels Neurographie.

\*\*  $p = \leq 0,01$ , \*\*\*  $p = \leq 0,001$

An d13 p.i. und an dem Peak der EAN (d20 p.i.) kam es sowohl bei den Wildtypen als auch bei den CD14-defizienten Mäusen zu einer immer geringer werdenden Persistenz, wobei die Frequenz des F-Wellen-Ausfalls bei den CD14<sup>-/-</sup> höher ist (Tab.5). Außerdem war die F-Wellen-Latenzzeit der CD14<sup>-/-</sup> Mäuse ab d6 bis einschließlich d30 p.i. signifikant länger als die der Wildtypen (d6:  $p = \leq 0,01$ ; d13:  $p = \leq 0,01$ ; d20:  $p = \leq 0,001$ ; d30:  $p = \leq 0,01$ , Abb.24).

Darüber hinaus wurden an d20 p.i. der EAN sowohl bei den Wildtypen (Abb.23) als auch bei den CD14-defizienten Mäusen (Abb.24) A-Wellen detektiert. Die Persistenz lag bei den Wildtypen bei 57,96% bzw. bei 61,13% im Falle der CD14-KO-Mäuse (Tab.6).

	Wildtyp	CD14 <sup>-/-</sup>
A-Wellen-Latenzzeit (ms)	4,44	3,64
Standardabweichung	0,07	0,03
Persistenz (%)	57,96	61,13
Standardabweichung	11,68	9,53

**Tabelle 6: Latenzzeiten und Persistenz von A-Wellen von CD14-defizienten- und Wildtyp-Mäusen mittels Neurographie bei supramaximaler Reizstärke (> 25mA, 200µs).**

### 3.5.3. Pathologische Veränderungen während der EAN bei einer CD14-Defizienz

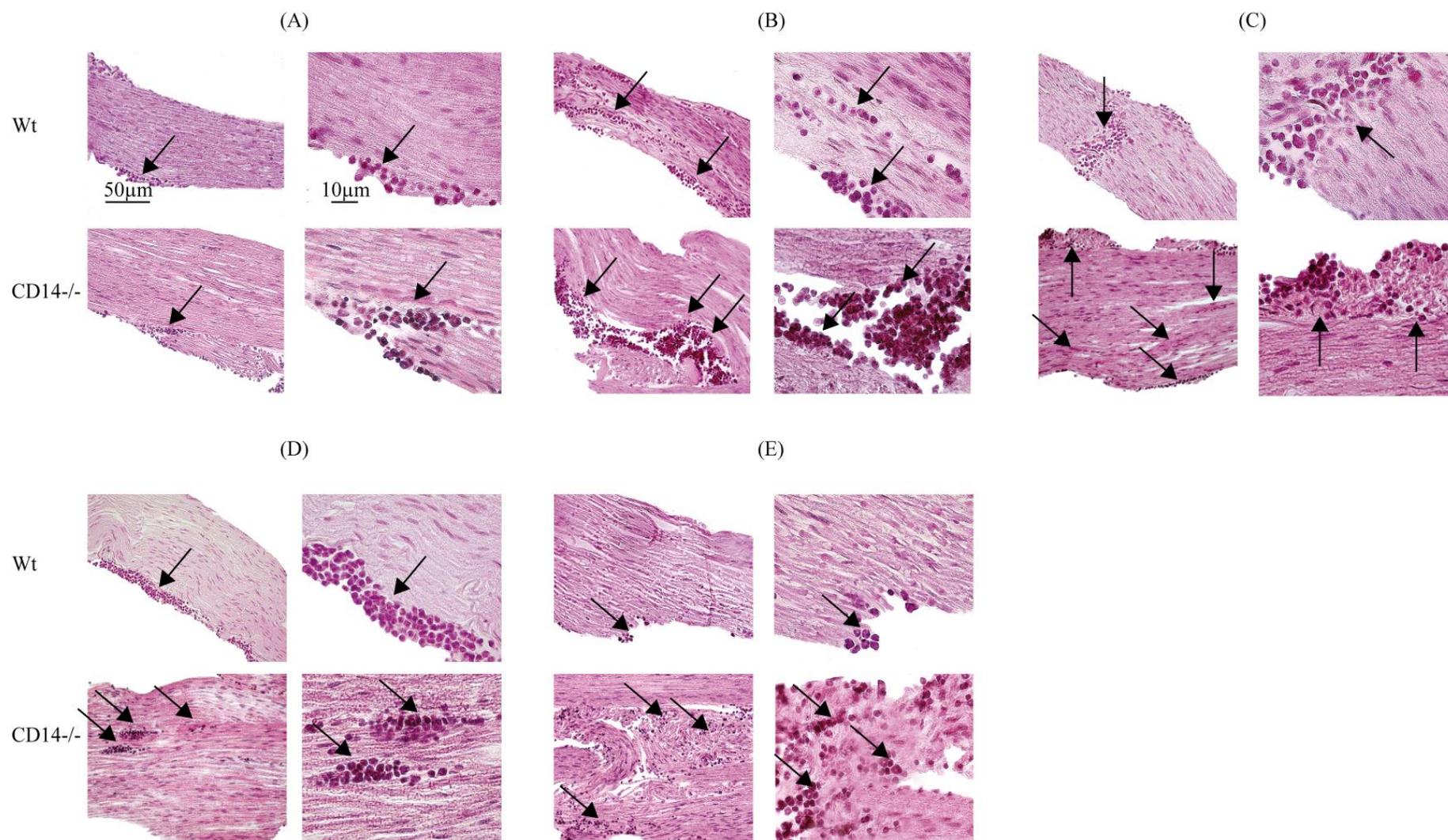
#### *Eine CD14-Defizienz führt zur vermehrten Infiltration und Demyelinisierung während einer EAN.*

Zur Aufklärung des verstärkten klinischen Verlaufs der EAN mit höheren Scorewerten bei CD14<sup>-/-</sup> Mäusen, wurden die pathologischen Merkmale einer CD14<sup>-/-</sup> EAN näher untersucht.

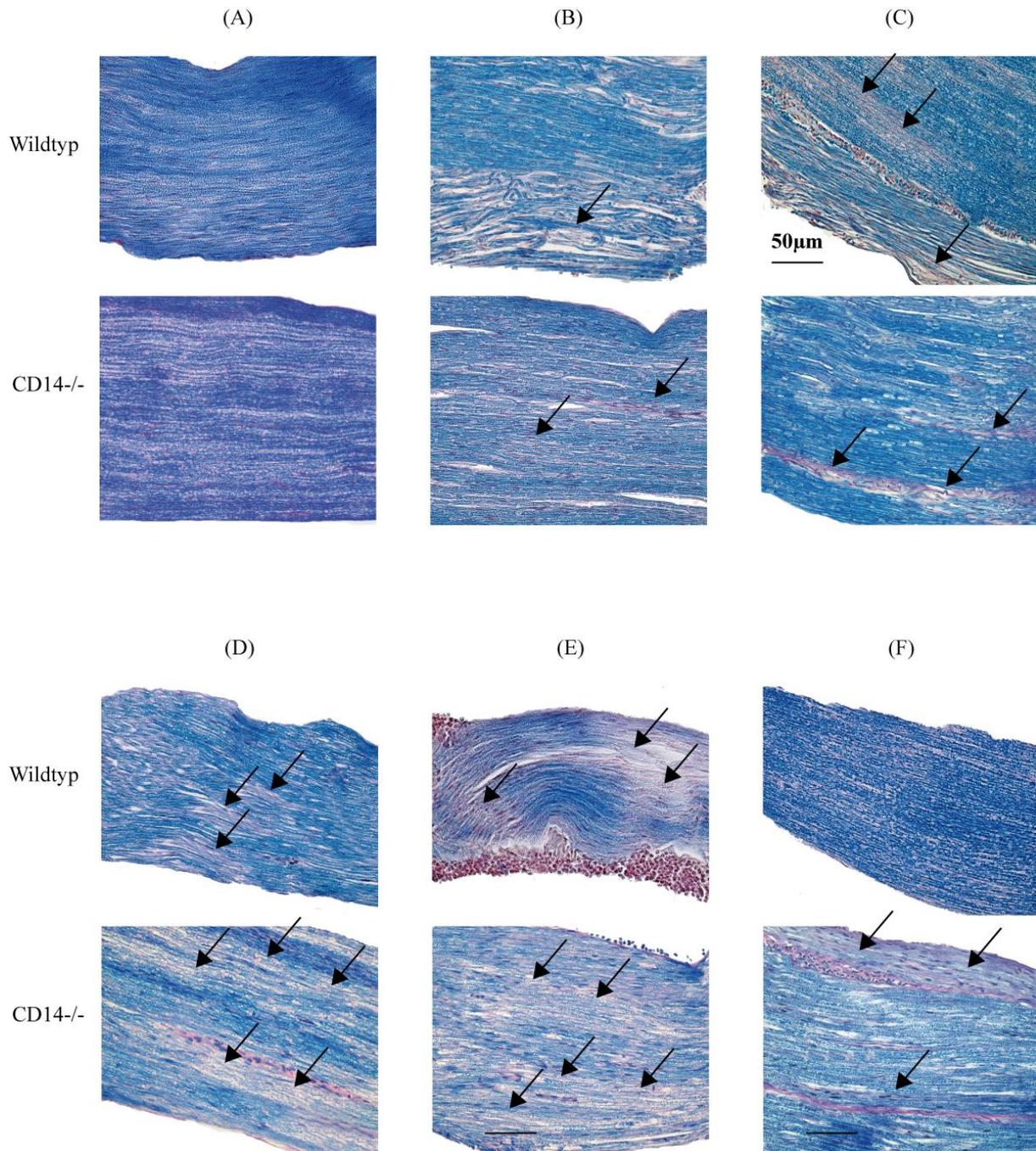
Bei näherer Betrachtung der morphologischen Merkmale von CD14<sup>-/-</sup> EAN-Mäusen wurden, wie vorangehend auch für die Wildtypen in 3.1.1. beschrieben, bereits an d2 p.i. (Abb.25A) entzündliche Infiltrate gefunden, die während des Krankheits-Verlaufes immer stärker akkumulierten (d6, d13, d20, d30 p.i.). Ab d13 p.i. bis einschließlich d20 p.i., hatten sich die inflammatorischen Zellen im gesamten entzündeten Gewebe verteilt (in Abb.25C und D anhand der Pfeile angezeigt) und konnten, bis inklusive d30 p.i., in hoher Anzahl im Gewebe identifiziert werden (Abb.25E).

Im direkten Vergleich mit den Wildtyp-Mäusen zeigten die Mäuse der CD14-EAN jedoch deutliche morphologische Unterschiede. Zu jedem untersuchten Zeitpunkt zeigten sich bei den CD14<sup>-/-</sup> Mäusen ebenfalls zelluläre entzündliche Infiltrate in Korrelation mit der Schwere der Erkrankung, aber anteilmäßig als bei den Wildtypen. Die infiltrierte Zellen sind mit den Pfeilen gekennzeichnet (Abb.25).

Einleitend mit d2 p.i. zeigten beide, Wildtypen und CD14<sup>-/-</sup>, entzündliche Zellen im Nervus ischiadicus, jedoch ist in Abb.25A erkennbar, dass das CD14-defiziente Gewebe weitaus mehr infiltrierte Zellen aufweist. Im Weiteren kam es bei der CD14-Defizienz bereits an d6 p.i. (Abb.25B) zu einer sehr starken Infiltration. An d13 und d20 p.i. hatten sich die inflammatorischen Zellen bereits entlang des gesamten Nervs verteilt. Solche



**Abbildung 25: Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Nervus ischiadicus von CD14-defizienten und C57B6/J-Wildtyp-Mäusen während des EAN-Krankheitsverlaufes. (A) d2 p.i., (B) d6 p.i., (C) d13 p.i., (D) d20 p.i. und (E) d30 p.i.**



**Abbildung 26: Luxol-Fast-Blau-Perjodsäure (LFB-PAS) –Färbung des Nervus ischiadicus von CD14-defizienten und C57B6/J-Wildtyp-Mäusen während des EAN-Krankheitsverlaufes.**

(A) PTX/CFA-Kontrolle d 20 p.i., (B) d2 p.i., (C) d6 p.i., (D) d13 p.i., (E) d20 p.i. und (F) d30 p.i.

entzündlichen zellulären Ansammlungen sind in Abb.25C und D jeweils mit den Pfeilen gekennzeichnet.

Ein weiterer wichtiger Unterschied zu den Wildtypen konnte an d30 p.i. beobachtet werden. Obwohl die Symptome zu diesem Zeitpunkt, wie bei den Wildtypen auch, bereits langsam abklingen, zeigten die CD14<sup>-/-</sup> Mäuse im Gegensatz zu den Wt, die kaum noch zelluläre

Infiltrate im Nerv aufweisen, sehr viele Infiltrate; zusätzlich scheint die Gewebsstruktur leicht verändert zu sein (Abb.25E).

Durch Visualisierung des Myelins von CD14<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp mittels LFB-PAS konnten an d2 und 6 p.i. zunächst keine besonders großen Unterschiede im Demyelinisierungsgrad beobachtet werden.

Die untersuchten Zeitpunkte d13 und d20 p.i. zeigten jedoch für die CD14-defiziente EAN-Gruppe einen weitaus größeren Myelin-Verlust im Nervus ischiadicus als die Wildtypen (Abb.26D und E). Während sich die Wildtypen ab d30 p.i. nicht nur klinisch (Abb.3), mit stark rückläufiger Anzahl infiltrierender Zellen und Remyelinisierung erholten (Abb.4 und 5), sind die CD14<sup>-/-</sup> Mäuse an d30 p.i. nicht nur klinisch, sondern, aufgrund der vermehrt vorkommenden zellulären Infiltrate (Abb.25), die mit einer immer noch starken Demyelinisierung einhergehen (Abb.26F), sind sie auch histopathologisch als kränker einzustufen.

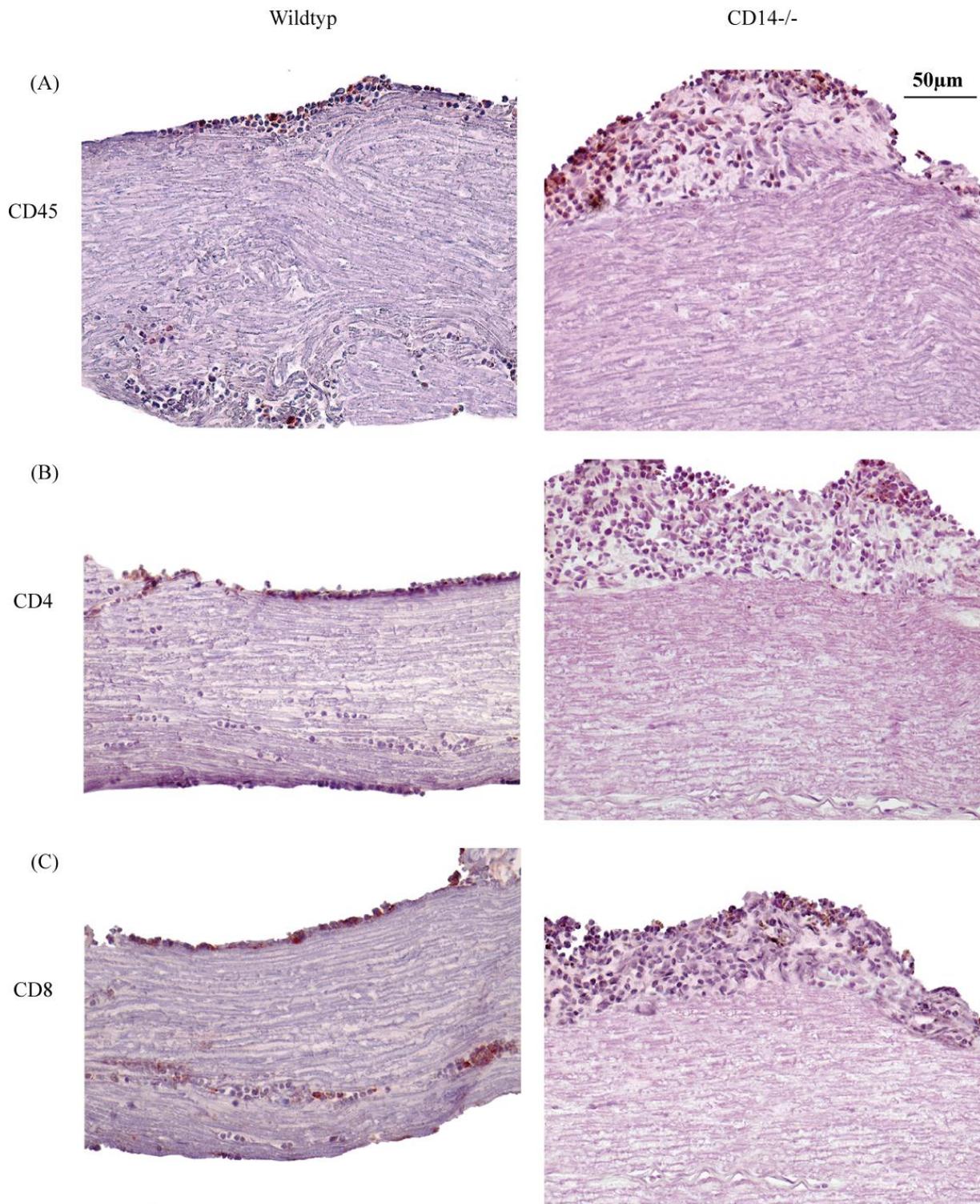
***Eine CD14-Defizienz führt zur vermehrten Infiltration von T-Lymphozyten und Makrophagen sowie neutrophilen Granulozyten.***

Zur Identifikation der jeweiligen Subpopulationen der vermehrt infiltrierten Zellen bei einer CD14-Defizienz, wurden mehrere immunhistologische Färbungen mit unterschiedlichen Antikörpern zur Erkennung verschiedener Zellpopulationen auf Kryoschnitten des Nervus ischiadicus durchgeführt.

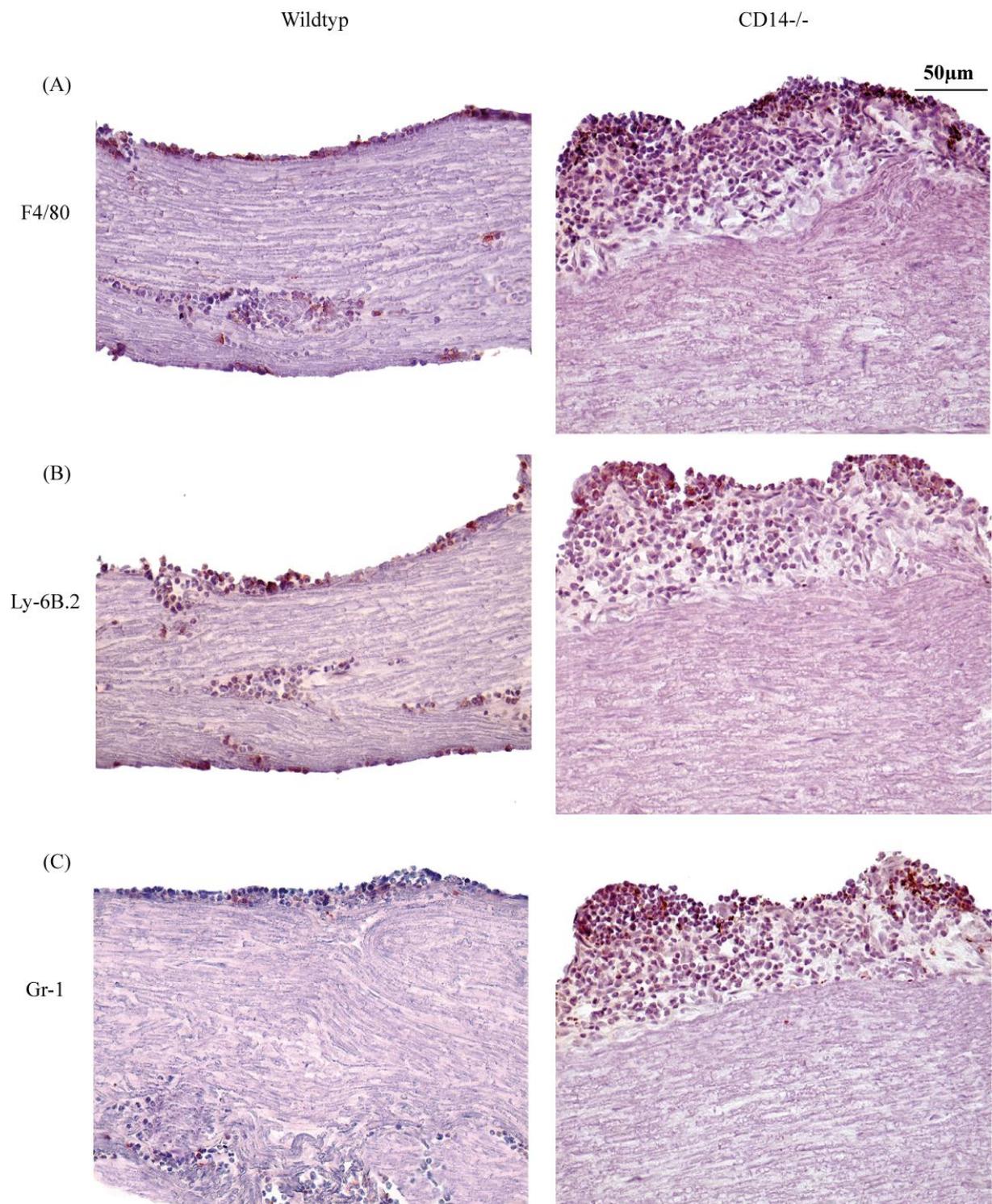
Bei den Infiltraten im Nervengewebe von Wildtyp- als auch von CD14-defizienten Mäusen handelt es sich um CD45<sup>+</sup>-Leukozyten (Abb.27A).

Um zu beurteilen, ob sich unter den infiltrierten Zellen auch vermehrt T-Lymphozyten befinden, wurden sowohl die CD4-positiven als auch die CD8-positiven Zellen der jeweiligen Gruppe angefärbt. Wie Abb.27B und C zeigen, fanden sich sowohl im Infiltrat der Wildtypen als auch der CD14<sup>-/-</sup> Mäuse mehrere T-Lymphozyten. Dennoch war ihre Zahl geringer als die der Makrophagen (Abb.28A), die auch in Wildtypen den Hauptanteil der Infiltrate ausmachen (Gold et al., 1999).

Die Makrophagen wurden mittels des F4/80-Antikörpers dargestellt und machten die Hauptpopulation an infiltrierte Zellen aus. Ferner konnten neutrophile Granulozyten mit Gr-1 und Ly-6B.2 im Nervengewebe von Wildtypen und CD14-defizienten Tieren, identifiziert werden (Abb.28B und C).



**Abbildung 27: Immunhistochemie des Nervus ischiadicus auf Kryoschnitten von CD14-defizienten und Wildtyp-Mäusen (C57B6/J) am Peak der Erkrankung. (A) CD45, (B) CD4 und (C) CD8.**



**Abbildung 28: Immunhistochemie des Nervus ischiadicus auf Kryoschnitten von CD14-defizienten und Wildtyp-Mäusen (C57B6/J) am Peak der Erkrankung.**  
(A) F4/80, (B) Ly-6B.2 und (C) Gr-1.

Aus den immunhistochemischen Untersuchungen geht hervor, dass die vermehrte Infiltration im CD14-defizienten Gewebe nicht auf eine spezielle oder einzelne Zellpopulation zurückzuführen ist.

#### 3.5.4. Pathophysiologische Vorgänge an der BNS während der EAN bei einer CD14-Defizienz

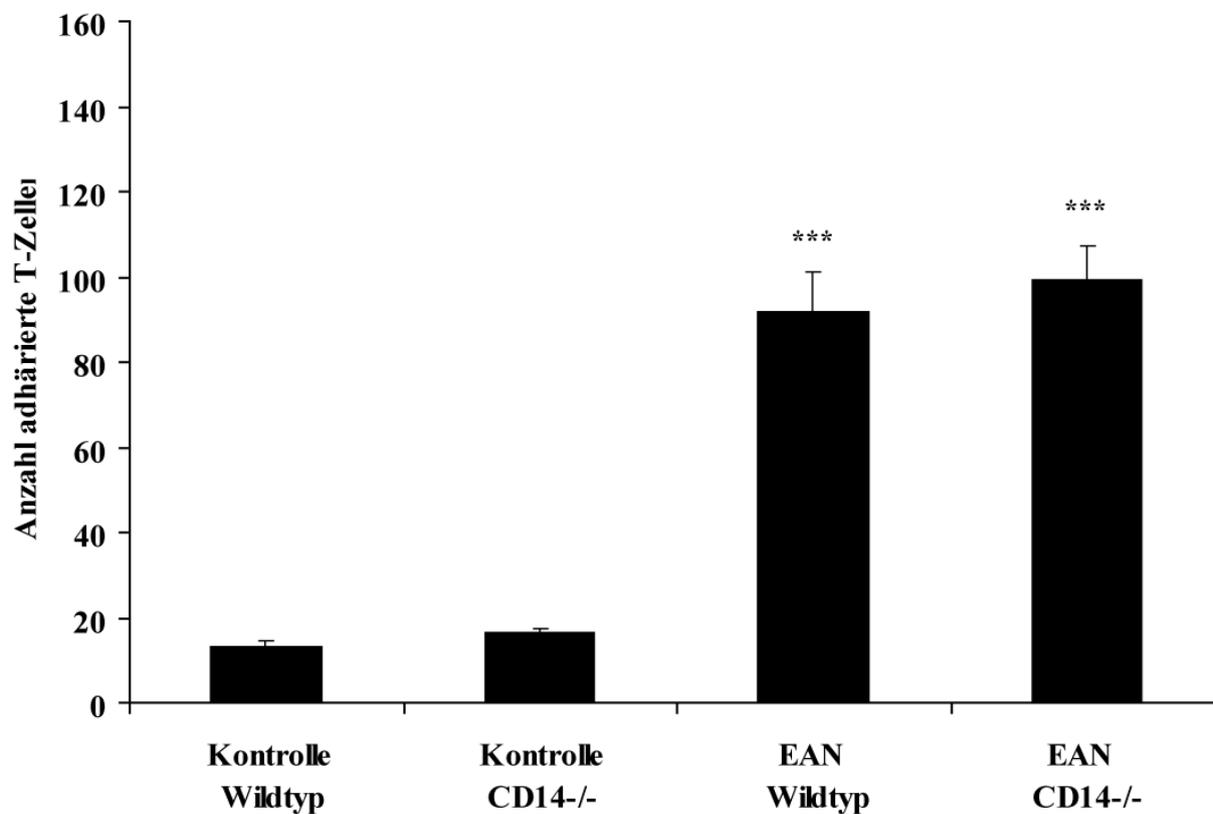
Die Leukozyteninfiltration, das pathologische Kennzeichen der EAN, ist letztendlich der zelluläre Ausgangspunkt der nachfolgenden Demyelinisierung und der Axon-Schädigung durch inflammatorische Zellen. Um diesen pathologischen Ursprung näher zu untersuchen, wurden die Einzelschritte der Infiltration in das periphere Nervengewebe *in vitro* untersucht. Im Speziellen wurde die Auswirkung einer EAN auf die Adhäsion und Migration antigenspezifischer T-Lymphozyten über die Blut-Nerven-Schranke untersucht.

##### ***Die CD14-Defizienz führt bei der EAN zu keiner veränderten Adhäsion antigenspezifischer T-Zellen.***

Bevor die Zellen die BNS überqueren können, müssen sie zunächst mit dem Endothel mittels Adhäsion in Kontakt treten. Dies geschieht durch die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen des Endothels während der Entzündung. Um zu überprüfen, ob der CD14-Rezeptor eine Rolle während der Adhäsion bei der EAN spielt, wurden Adhäsionsexperimente mit antigenspezifischen T-Zellen von CD14-defizienten und den jeweiligen Kontroll-EAN-Mäusen durchgeführt. Hierzu wurden die frisch isolierten antigenspezifischen Lymphozyten und solche von gesunden Kontrolltieren auf einen mit TNF $\alpha$  stimulierten Endothelzellrasen transferiert, entsprechend inkubiert und die Anzahl adhärerter Zellen durch Auszählen ermittelt. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Endothelzellen, die bEnd3-Zellen, handelt es sich um eine Maushirnzell-Linie, die jedoch in der Expression der Adhäsionsmoleküle mit der von Gefäßendothelzellen identisch sind und somit für diesen Versuch geeignet sind.

Die Adhäsionsversuche zeigten sowohl für die immunisierten Wildtypen (EAN  $92 \pm 9,45$  vs. Kontrolle  $13 \pm 1,03$  T-Zellen,  $p = \leq 0,001$ ) als auch für die immunisierten CD14<sup>-/-</sup> Mäuse (EAN  $99 \pm 8,22$  vs. Kontrolle  $16 \pm 0,92$  T-Zellen,  $p = \leq 0,001$ ) eine signifikant verstärkte Adhäsion an den Endothelrasen im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollen (Tab.7, Abb.29). Dieser deutliche Unterschied konnte auch anhand mikroskopischer Aufnahmen des bEnd3-Rasen mit den daran adhärerten T-Zellen visualisiert werden (Abb.30). Die gesunden Mäuse

weisen eine etwa gleiche Anzahl adhärierter T-Zellen auf. Das Fehlen des Rezeptors CD14 führte weder zu einer verstärkten noch verminderten Adhäsion der T-Zellen an die BNS.



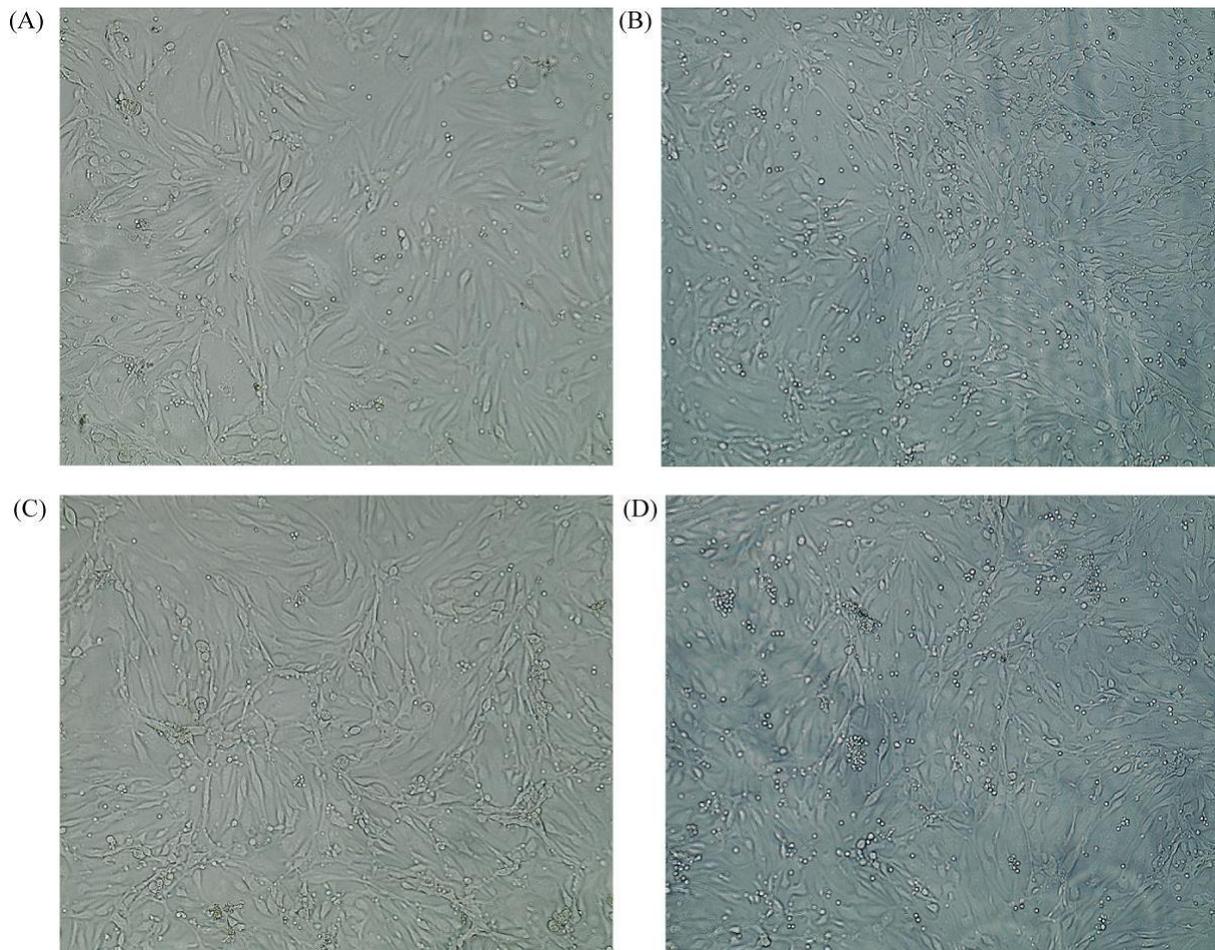
**Abbildung 29:** Adhäsionsexperimente mit bEnd3-Zellen und antigenspezifischen T-Zellen von P0-immunisierten (P0/PTX/CFA) und gesunden Wildtyp- und CD14-defizienten Mäusen an d15 p.i. der EAN (n=3).

Die Mittelwerte repräsentieren 3 unabhängige EAN-Experimente (n=3). \*\*\*  $p = \leq 0,001$

	Wildtyp		CD14-/-	
	Kontrolle	EAN	Kontrolle	EAN
Mittelwert adhärerte T-Zellen	13	92	16	99
Standardabweichung	1,03	9,45	0,92	8,22
$\Delta$ adhärerte T-Zellen	78		83	

**Tabelle 7:** Anzahl adhärierter antigenspezifischer T-Zellen an mit TNF $\alpha$  (24h, 100u) stimulierte bEnd3-Zellen an d15 p.i. der EAN.

Die Mittelwerte repräsentieren 3 unabhängige EAN-Experimente (n=3). \*\*\*  $p = \leq 0,001$

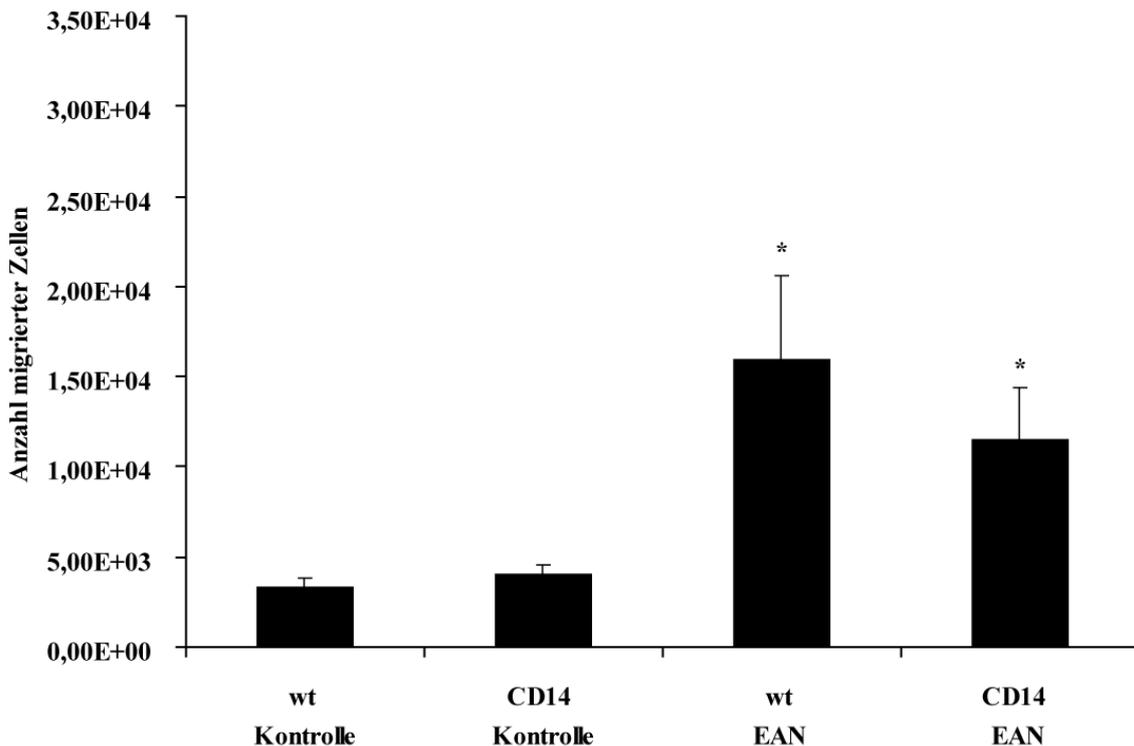


**Abbildung 30: Mikroskopische Aufnahme Adhäsionsexperimente mit bEnd3-Zellen und antigenspezifischen T-Zellen von P0-immunisierten (P0/PTX/CFA) und gesunden Wildtyp- und CD14-defizienten Mäusen an d15 p.i. der EAN (n=3).**

(A) gesunde Wildtyp-Kontroll-Mäuse, (B) Wildtyp-EAN-Mäuse, (C) gesunde CD14-defiziente Kontroll-Mäuse und (D) CD14-defiziente EAN-Mäuse.

***Die Transmigration antigenspezifischer T-Zellen wird nicht durch die EAN beeinflusst.***

Um ihr eigentliches Ziel, das PNS, letztendlich zu erreichen, müssen die antigenspezifischen T-Zellen nach adäquater Adhäsion an das Gefäßendothel dieses schließlich überqueren. Mit Hilfe des Transmigrationsassays, bei dem dieser Schritt *in vitro* simuliert wird, wurde untersucht, ob es zu einem veränderten Migrationsverhalten der T-Zellen aufgrund einer CD14-Defizienz kommt. Es wurden frisch isolierte antigenspezifische Lymphozyten auf einen mit TNF $\alpha$  stimulierten bEnd3-Rasen transferiert. Der Endothel-Rasen selbst wurde auf einer für die T-Zellen durchlässigen Membran kultiviert. Nach entsprechender Inkubation wurde die Anzahl migrierter T-Zellen ermittelt (Abb.31).



**Abbildung 31:** Transmigrationsexperimente mit bEnd3-Zellen und antigenspezifischen T-Zellen von P0-immunisierten (P0/PTX/CFA) und gesunden Wildtyp- und CD14-defizienten Mäusen an d15 p.i. der EAN (n=3).

	Wildtyp		CD14 <sup>-/-</sup>	
	Kontrolle	EAN	Kontrolle	EAN
Mittelwert migrierte T-Zellen	3363	15985	4010	11513
Standardabweichung	493	4652	565	2912
Δ migrierte T-Zellen	12622		7503	

**Tabelle 8:** Anzahl migrierter antigenspezifischer T-Zellen durch einen mit TNF $\alpha$  (24h, 100u) stimulierten bEnd3-Rasen an d15 p.i. der EAN.

Die Mittelwerte repräsentieren 3 unabhängige EAN-Runden (n=3).

Nach entsprechender Kalkulation der effektiv migrierten T-Zellen durch die Membran, d.h. durch den Endothel-Rasen, wurde deutlich, dass EAN-induzierte T-Zellen sowohl bei den Wildtypen (15985  $\pm$  4652 Zellen) als auch bei den CD14-defizienten Tieren (11513  $\pm$  2912 Zellen) im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollen (3363  $\pm$  493 Zellen und 4010  $\pm$  565 Zellen) zu einer signifikant verstärkten Transmigration führen. Die CD14-Defizienz selbst führte zu keiner veränderten Transmigration (Tab.8).

## 4. Diskussion

### 4.1. Immunologische Prozesse während der EAN

#### 4.1.1. Klinik und Histopathologie

Die EAN ist das aktuell am häufigsten eingesetzte Tiermodell des GBS. Beide teilen klinische, histologische, pathologische und elektrophysiologische Merkmale. Die vorliegende Arbeit zeigte, dass sich die EAN mit repräsentativem Verlauf in sonst stark resistenten C57B6/J-Mäusen induzieren lässt, was sich sowohl in den klinischen als auch den histologischen Untersuchungen ausdrückt. Die aktive EAN-Induktion erfolgte mittels des P0-Antigens mit einer Inzidenz von 90% sowie einem maximalen klinischen Score von  $2,67 \pm 0,1$  und entspricht der Studie von Zou et al., bei der die Tiere mit einer Inzidenz von 94% und mit einem maximalen klinischen Score von 2,0 eine EAN entwickelten (Zou et al., 2000). Die pathologischen Kennzeichen des GBS, wie entzündliche Zellinfiltrate und demyelinisierte Bereiche im Nervus ischiadicus (Kieseier et al., 2004), konnten auch im Tiermodell dieser Arbeit bestätigt werden. Im Speziellen korrelierte die Anzahl infiltrierender Zellen und der Demyelinisierungsgrad der Nn. ischiadici mit den klinischen Symptomen in Abhängigkeit des fortgeschrittenen Stadiums der EAN, ohne dass die Axone betroffen waren; die Kontrolltiere zeigten erwartungsgemäß keinerlei entzündlichen Zellinfiltrate oder demyelinisierte Bereiche (Gries et al., 2012).

Während der EAN kommt es zu einer gegen P0 gerichteten Immunantwort, die mit Hilfe von T-Zellen vermittelt wird. Zu einer effizienten Immunantwort bedarf es zwei spezifische Signale, zum einen ein antigenspezifisches Signal und zum anderen ein ko-stimulatorisches Signal.

Die Charakterisierung der antigenspezifischen Immunantwort zeigte, dass das erste Signal auf die Applikation des CFA und PTX zurückzuführen ist, da sowohl die Kontrolltiere als auch die erkrankten Tiere eine entsprechend hohe Expression des TCR und MHCII-Komplexes zeigten. Wie bereits beschrieben, fördert PTX die Reifung und funktionelle Kapazität von APCs (Hou et al., 2003), erhöht die Produktion und das Freisetzen pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-12 (He et al., 2000) und vermindert die Freisetzung anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 (Arimoto et al., 2000); das CFA kann verschiedene TLRs aktivieren (von Meyenn et al., 2006; Imanishi et al., 2007). Wird PTX als Adjuvant bei der EAE beispielsweise genutzt, führt es außerdem zu einer Reduktion der Treg-Anzahl und -Funktion

(Cassan et al., 2006; Chen et al., 2006). Außerdem scheint sowohl PTX als auch CFA bei der EAE nicht nur zur effizienten Th1-, sondern auch zur Th17-Entwicklung notwendig zu sein (Hofstetter et al., 2007; Tigno-Aranjuez et al., 2009), wobei die Pathologie nicht mit den kinetischen und migrierenden Eigenschaften der Th17-Zellen korreliert (Hofstetter et al., 2010). Folglich wird vermutet, dass das PTX auch bei der hier induzierten EAN zur Aktivierung von T-Zellen und somit zur Verstärkung der Immunantwort führt, und bestätigt nochmals, dass die EAN-induzierten Effekte nicht auf PTX, sondern auf eine antigenspezifische Antwort zurückzuführen sind.

Das zweite zur effizienten Immunantwort benötigte ko-stimulatorische Signal konnte in der vorliegenden Arbeit bereits in der Induktionsphase bis einschließlich der Aktivierungsphase der EAN in den Lymphknoten demonstriert werden, was der vermehrten Expression der kostimulatorischen B7-Moleküle und ihrer entsprechenden Rezeptoren CD28 und CTLA-4 entspricht. Der CTLA-4-Rezeptor scheint zusammen mit CD80 vorwiegend in der Induktionsphase eine Rolle zu spielen, während die Aktivierungsphase von dem kostimulatorischen Signal von CD28 gemeinsam mit CD86, aber auch von CTLA-4 geprägt ist. Dass die Bindung des konstitutiv exprimierten CD28-Rezeptors an seine Liganden zu einem positiven ko-stimulatorischen Signal und somit zur Aktivierung von T-Zellen führt, wurde bereits durch frühere Studien gezeigt (Linsley et al., 1991). CTLA-4 ist ein Marker der regulatorischen T-Zellen und hat als Gegenspieler von CD28 in der Regel suppressive Funktionen (Linsley et al., 1992; Walunas et al., 1994). Tregs können aber nach starker Stimulation ihre Suppressivität kurzzeitig verlieren (Sutmuller et al., 2006a). Dementsprechend scheint CTLA-4 zu Beginn der EAN-Erkrankung sein suppressives Potential entfalten zu wollen, wird jedoch vermutlich durch das positiv ko-stimulatorische Signal überlagert. Eine weitere Erklärung für die Ausbildung der EAN wäre, dass die Tregs aufgrund eines starken Stimulus, z.B. eine TLR-Ligation, ihre suppressive Wirkung vorübergehend verlieren und es somit zur Ausbildung einer Autoimmunität kommen kann (Sutmuller et al., 2006a). Dies deutet darauf hin, dass in der EAN nicht CD28 alleine, sondern auch CTLA-4 zur verstärkten oder anhaltenden Kostimulation führt, da beide signifikant verstärkt exprimiert werden.

#### 4.1.2. Die Rolle der TLRs bei der EAN

Die Aktivierung verschiedener TLRs in dendritischen Zellen führt zur indirekten Stimulation der adaptiven Immunität. Die sich daraus entwickelnde Effektor-T-Zelllinie ist von dem Zytokinprofil der näheren Umgebung abhängig, welches teilweise von TLRs und deren

Liganden beeinflusst wird (Medzhitov et al., 2000; Akira et al., 2001; Medzhitov, 2001). Dass TLRs auch direkt T-Zellen stimulieren bzw. aktivieren können, wurde bereits in mehreren Studien beschrieben (Komai-Koma et al., 2004; Imanishi et al., 2007; Mercier et al., 2009). Dennoch ist die Rolle der TLRs in der EAN bisher noch unaufgeklärt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TLR2 und TLR6 während der EAN in Lymphknoten und im entzündeten Gewebe des Nervus ischiadicus auf Protein-Ebene in der Initial- und Aktivierungsphase der Erkrankung mit geringen klinischen Symptomen signifikant erhöht waren. Die Blut-Analyse von GBS-Patienten zeigte übereinstimmend, aber im Gegensatz zu einer kürzlich veröffentlichten Studie (Wang et al., 2012), erhöhte mRNA-Level von TLR2, TLR4 und TLR6 bei Ausbruch der Erkrankung mit noch milden Symptomen (Gries et al., 2012).

Diese Ergebnisse entsprechen Teile einer Ratten EAN-Studie, bei der die signifikante Hochregulierung von TLR2 im Nervus ischiadicus mit der Schwere der Erkrankung korrelierte (Zhang et al., 2009b). Die Detektion des TLR6-Rezeptors auf infiltrierten Zellen in der EAN wird dadurch unterstützt, dass der TLR6-Rezeptor zur effizienten Signalweitergabe bei einer TLR2-Ligation notwendig ist. TLR2 benötigt nämlich zur vollständigen Signaltransduktion entweder eine Homodimerisierung mit einem anderen TLR2-Molekül oder eine Heterodimerisierung mit einem TLR6- oder TLR1-Molekül (Schumann et al., 2007). Im Allgemeinen ist bekannt, dass TLR6 hauptsächlich auf der Oberfläche von Monozyten, DCs und Neutrophilen exprimiert wird (Nakao et al., 2005). Bisher existieren nur einige Studien über eine TLR6-Expression auf T-Zellen. In diesen Arbeiten wird beschrieben, dass TLR6 vermutlich die Aktivierung von T-Zellen durch erhöhte TLR2-Aktivierung, welche ein potentes kostimulatorisches Signal an Antigenpräsentierenden Zellen weiterleitet, beeinträchtigt, indem die T-Zell-Proliferation sowie die Überlebens- und Effektorfunktionen beeinflusst werden (Cottalorda et al., 2006). Darüber hinaus wurde berichtet, dass TLR2/TLR6-Heterodimere diacylierte Thioester-Bindungen an Cysteinresten erkennen können (Farhat et al., 2008). Dies ist möglicherweise von Bedeutung für die EAN-Induktion, da Bizzozero et al., zeigen konnten, dass die neuritogenen und immunogenen Eigenschaften des P0, der Hauptbestandteil des peripheren Myelins und genutzte Antigen in dieser Arbeit, durch dessen Acylierung bedingt sind (Bizzozero et al., 1994). Außerdem wurde erst kürzlich gezeigt, dass eine TLR2-Ligation experimentelle autoimmune Erkrankungen verschlimmert, indem die Th17-Entwicklung gefördert wird (Hansen et al., 2006; Reynolds et al., 2010; Summers et al., 2011). Folglich ist davon auszugehen, dass der Rezeptorkomplex

TLR2/TLR6 eine bedeutende Rolle zur Erkennung von P0-diacyleirten Lipopeptiden spielt und demzufolge zur Krankheitsentwicklung bei der EAN und beim humanen GBS beiträgt.

Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit stellt die Hochregulierung von TLR4 auf APCs und im Ischiasnerv von P0-induzierten EAN-Mäusen sowie die erhöhten TLR4-mRNA-Level im Blut von GBS-Patienten dar, wobei letztere in negativer Korrelation mit dem Behinderungsgrad der Patienten stehen und das Tiermodell mit der humanen Erkrankung verbinden (Gries et al., 2012). Bei den zellulären Quellen der TLR4-Expression handelt es sich hauptsächlich um Monozyten bzw. Makrophagen, der dominant vorherrschenden Zellpopulation im entzündeten Gewebe bei der EAN (Gold et al., 1999).

Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Diskrepanz der TLR4-Expression zwischen lymphatischen Organen und dem entzündeten Nervengewebe und dem Blut der GBS-Patienten. Eine Autoimmunität wird normalerweise nicht von klinischen Symptomen begleitet, solange keine weiteren Prozesse, wie z.B. eine lokale inflammatorische Reaktion im Gewebe, die Krankheitsausbildung weiter fördern (Wraith et al., 2003). Dies erklärt gegebenenfalls den signifikanten Anstieg der TLR4-Expression an nur einem Zeitpunkt der Erkrankung in Lymphknoten, und im Vergleich dazu, die stark erhöhte TLR4-Expression auf infiltrierten Zellen im Nervus ischiadicus bzw. im Blut der GBS-Patienten kurz nach Ausbruch der Erkrankung. Demzufolge deutet dies auf unterschiedliche lokale Prozesse sowohl im Tier-Modell als auch bei GBS hin. Wahrscheinlich steht diese Hochregulierung in Verbindung mit den häufig beobachteten vorangehenden Infektionen bei GBS-Patienten mit dem gram-negativen Bakterium *C. jejuni*, da es sich bei TLR4 um den Schlüsselrezeptor für LPS, eine Zellwandkomponente gram-negativer Bakterien, handelt (Hughes et al., 2005).

Ferner wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit bereits beschrieben, dass die Transkription des TLR4-Gens während der Ratten-EAN erhöht ist (Deng et al., 2007). In der EAE, das Tiermodell der pathophysiologisch ähnlichen Multiplen Sklerose, zeigten Kerfoot et al., dass die PTX-induzierte Leukozyten-Rekrutierung direkt von TLR4 abhängig ist (Kerfoot et al., 2004). Außerdem kann die Aktivierung von TLR4 zur Produktion von IL-6 und IL-23 führen, was letztendlich einen krankheitsfördernden Th17-Phänotyp induziert (Marta et al., 2008). Demzufolge wird möglicherweise auch die EAN, als PTX-induziertes und auch Th17-abhängiges Krankheitsmodell, mit Hilfe einer verstärkten TLR4-Aktivierung moduliert.

Interessanterweise konnten signifikante Hochregulierungen des relativ unbekanntes TLR11-Rezeptors vor allem in der Induktionsphase (d2 und d6 p.i.) bis einschließlich der Aktivierungsphase der EAN (d13 p.i) detektiert werden. Erst kürzlich wurde beschrieben, dass das Profilin von *Toxoplasma gondii* ein potentieller Ligand des TLR11-Rezeptors ist (Kucera et al., 2010). Des Weiteren wurde dargestellt, dass TLR11 eine entscheidende Rolle zur Förderung der Aktivierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen bei *Toxoplasma*-Infektionen spielt (Pepper et al., 2008). Zusätzlich ist die Reifung dendritischer Zellen sowie die Zytokinproduktion während solcher Infektionen von TLR11 abhängig (Yarovinsky et al., 2006). Als Antwort auf eine TLR11-Ligation sezernieren Makrophagen und Phagozyten entsprechende Mengen an IL-12. Dieses pro-inflammatorische Zytokin favorisiert eine Th1-Differenzierung. Zum einen spielt IL-12 bei der IFN $\gamma$ -Produktion eine ausschlaggebende Rolle, welche wiederum die antimikrobiellen Effektorzellen aktiviert (Trinchieri, 2003); zum anderen trägt es zusammen mit IL-23 zur Entwicklung einer EAE bei (Kroenke et al., 2008). Folglich scheint der TLR11-Rezeptor in Verbindung mit einer Th1-Antwort auch eine entscheidende Komponente bei der EAN-Induktion zu sein. Zur Aufklärung der funktionellen Rolle von TLR11 in der EAN werden weiterführende Arbeiten benötigt.

TLR1 kann mit einem anderen TLR2-Molekül heterodimerisieren, um triacylierte Lipoproteine zu erkennen (Schumann et al., 2007). Normalerweise führt eine TLR1-Ligation, beispielsweise mit Lipoproteinen von *Borrelia burgdorferi*, zu einer aktivierten angeborenen Immunantwort (Alexopoulou et al., 2002). In dem autoimmunen Typ1-Diabetes-Modell führt eine Herunterregulierung des TLR1-Rezeptors, speziell auf APCs von Milzzellen, zu einer reduzierten Proliferation von CD4<sup>+</sup>-Effektor und regulatorischen T-Zellen (Vallois et al., 2007). Es wurde erst kürzlich beschrieben, dass CD4<sup>+</sup>-T-Zellen direkt auf *M. tuberculosis*-Produkte reagieren können, indem sie TLR2/TLR1-Heterodimere ausbilden (Lancioni et al., 2011). Die Induktion der EAN in dem Modell dieser Arbeit wird dadurch erreicht, dass die gegen P0-gerichtete Immunantwort durch den Zusatz von *M. tuberculosis* verstärkt wird. Folglich ist davon auszugehen, dass die signifikante Reduktion des TLR1 auf T-Zellen und APCs während der Induktionsphase der EAN ein Hinweis auf eine Schutzfunktion vor einer autoimmunen Reaktion ist. Dies wird dadurch getragen, dass auch andere TLR-Agonisten (TLR2) die Proliferation von CD4<sup>+</sup>-Effektor-Zellen und Tregs zunächst verstärken, die Tregs aber ihr suppressives Potential anschließend vorübergehend verlieren (Liu et al., 2006). Da die Tregs in der Regel für die Aufrechterhaltung der Homöostase verantwortlich sind und

eigentlich das Auftreten von Autoimmunität vermeiden sollten, ist es durchaus denkbar, dass dieser vorübergehende Ausfall der Tregs, die Ausbildung einer Autoimmunität fördert.

Th17-Zellen und ihr Hauptzytokin IL-17A spielen eine entscheidende Rolle bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen (Weaver et al., 2007; Aranami et al., 2008; Bettelli et al., 2008). Während *Chlamydia*-Infektionen etwa, ist die frühe IL-17-Produktion von MyD88 abhängig, dem überwiegend benutzten Adaptermolekül des TLR-Signalweges (Zhang et al., 2009a). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl IL-17A in der Induktionsphase der EAN auf T-Zellen stark hochreguliert wird, als auch MyD88 auf T-Zellen und APCs. Infolgedessen scheint bei der EAN die TLR-vermittelte Signalisierung über MyD88 auch an der IL-17A-Genaktivierung beteiligt zu sein. Dass IL-17A während der EAN eine Rolle spielt, wurde bereits durch Studien an der Ratten-EAN gezeigt. Hierbei ist die erhöhte Anzahl IL-17-produzierender Zellen im Ischiasnerv von entscheidender Bedeutung bei der Entwicklung der Erkrankung (Zhang et al., 2009b). Aus EAE-Studien ist bekannt, dass eine MyD88-Defizienz zu einer verminderten Inflammation und Resistenz führt, was erklärt, dass MyD88 zur EAE-Induktion notwendig ist (Prinz et al., 2006; Marta et al., 2008). Da MyD88 zur Expression der inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-23p40 reifer DCs und der Entwicklung von Th17-Zellen unentbehrlich ist, führen die detektierten erhöhten MyD88-Expressionen der EAN in dieser Arbeit möglicherweise zu einer verstärkten Entwicklung der krankheitsfördernden Th17-Zellen. Folglich spielen die vermehrten MyD88- sowie IL-17A-Expressionen während der EAN nicht nur bei der Induktion, sondern darüber hinaus auch bei der Progression der EAN eine Rolle.

## **4.2. Die Bedeutung von CD14 bei der EAN**

### **4.2.1. CD14-Expression während der EAN**

Die hier präsentierten Daten zeigen, dass CD14 im Verlauf der EAN induziert wird. Im Hinblick auf die bekanntermaßen verstärkenden Effekte des angeborenen Immunrezeptors CD14, sowohl auf gram-positive Zellwandkomponenten, wie Lipoteichonsäuren und Peptidoglykane zusammen mit TLR2 als auch auf das LPS gram-negativer Bakterien in Kombination mit TLR4 (Dziarski et al., 1998; Pfeiffer et al., 2001; Ellingsen et al., 2002; Alugupalli et al., 2007; Xu et al., 2007), wurde nicht nur die TLR2- und TLR4-, sondern auch die CD14-Antwort bei der EAN untersucht. Die bereits in dieser Arbeit beschriebenen erhöhten TLR4- und TLR2-Antworten während der EAN, welche beide einen Th17-Phänotyp bei autoimmunen Erkrankungen induzieren können, werden vermutlich durch die vermehrte

CD14-Expression zusätzlich verstärkt. Die synergistische Antwort und erhöhte Ko-Expression von CD14 sowohl im entzündeten Nervengewebe mit TLR2 und TLR4 als auch im Lymphknoten zusammen mit TLR2 während der EAN, bestärkt nochmals die pathogene Rolle von CD14 bei der EAN. Übereinstimmend mit diesen Daten wird CD14 sowohl bei Multipler Sklerose (Lutterotti et al., 2006) und ihrem Tiermodell der EAE (Zekki et al., 2002), als auch im experimentellen GBS-Ratten-Modell zusammen mit TLR2 hochreguliert (Zhang et al., 2009b).

#### 4.2.2. Auswirkung einer CD14-Defizienz auf die EAN

In dieser Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass CD14 eine modulierende Rolle bei der EAN hat. Eine CD14-Defizienz resultierte interessanterweise in einer signifikant schwereren Erkrankung mit erhöhten und länger anhaltenden klinischen Scorewerten mit stark vermehrter Infiltration und Demyelinisierung und späterer Krankheitserholung, was vermutlich auf eine letztendlich protektive Funktion des CD14 bei der EAN zurückzuführen ist. Immunhistochemische Untersuchungen von wt- und CD14-defizientem Gewebe erlaubten eine weitere Differenzierung der infiltrierten Zellen und zeigten, dass die Zellinfiltration nicht auf eine spezielle Zellpopulation beschränkt ist, sondern dass alle untersuchten Leukozytenpopulationen, inklusive T-Lymphozyten, Makrophagen, Neutrophile Granulozyten, im entzündeten Gewebe vorzufinden sind, wobei die Makrophagen dominierten. Eine CD14-Defizienz jedoch beeinflusste nicht die relative Anzahl jener Zellpopulationen, verstärkte wohl aber die Gesamtanzahl der infiltrierten entzündlichen Zellen. Das letztere Resultat ist konform zu Untersuchungen in der EAE, dem zentralen Pendant der EAN, wo eine CD14-Defizienz in einem verstärkt erkrankten Phänotyp verbunden mit vermehrter Infiltration resultierte (Walter et al., 2006) und darauf hindeutet, dass die CD14-Defizienz selbst auch die inflammatorische Antwort bei der EAN beeinflussen kann.

Die elektrophysiologischen Messungen in dieser Arbeit spiegeln den klinischen Verlauf zusammen mit der Histopathologie der EAN und des GBS wider. Die durch die EAN induzierten veränderten elektrophysiologischen Charakteristika, welche bei einer CD14-Defizienz zusätzlich signifikant erhöht sind, bestätigen nochmals, dass die verstärkte Krankheitsausbildung durch die CD14-Defizienz bedingt wird. Die verlängerten F-Wellen-Latenzzeiten mit geringer werdender Persistenz sowie vermehrt vorkommende A-Wellen bei CD14-defizienten Mäusen entsprechen den klinischen Merkmalen der EAN. Sowohl die

Wildtypen als auch die CD14<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen, trotz teilweiser Remyelinisierung bzw. Reduktion der infiltrierten Zellen (d30 p.i.), einen anhaltenden funktionellen Schaden des Nervus ischiadicus, belegt durch die signifikant verlängerten F-Wellen-Latenzzeiten im Vergleich zu Kontrolltieren. Die im Tiermodell detektierte Inzidenz stimmt mit Untersuchungen von Kiers et al. am Menschen überein, bei denen mehr als 90% der untersuchten GBS-Patienten eine F-Wellenabnormalität aufwiesen, wobei etwa 10% der Patienten eine F-Wellenausfall zeigten (Kiers et al., 1994). Ropper et al. berichteten, dass sogar 27% der GBS-Patienten einen F-Wellenausfall bzw. eine Reduktion aufwiesen (Ropper et al., 1990). Obwohl sich die Latenzzeiten der F-Wellen signifikant von denen der Kontrolltieren unterscheiden, ist der Anstieg der F-Wellen-Persistenz nach dem Peak der Erkrankung parallel zur Remyelinisierung bzw. der Reduktion der Infiltrate ein Hinweis auf eine Krankheitserholung.

Die detaillierte Darstellung der Rolle von CD14 bei der EAN-Pathophysiologie zeigte, dass die Adhäsion und die Transmigration, die kritischen Schritte der Leukozyteninfiltration in das Nervengewebe, unabhängig von CD14 sind.

Eine TLR2- bzw. TLR4-Stimulation von humanen diabetischen Endothelzellen beispielsweise, führt zu einer vermehrten Expression von ICAM-1, IL-6 und IL-8 und somit zu einer erhöhten Adhäsion (Li et al., 2010). Da CD14 auch an dem Signalweg des TLR2- und TLR4-Rezeptors beteiligt ist (Dziarski et al., 1998; Pfeiffer et al., 2001; Ellingsen et al., 2002; Alugupalli et al., 2007; Xu et al., 2007), wurde angenommen, dass eine CD14-Defizienz möglicherweise eine Auswirkung auf die ICAM-1-Expression bzw. die Adhäsion und Transmigration bei der EAN hat. In einer anderen Studie wurde beschrieben, dass ein gezieltes Knockdown von CD14 mit siRNA zu einer verminderten LPS-stimulierten Expression von Adhäsionsmolekülen führt (Lubos et al., 2010). Im Gegensatz dazu wurde außerdem beschrieben, dass eine Stimulation mit LPS über TLR4 gewebsspezifisch auch CD14-unabhängig verlaufen kann (Andonegui et al., 2002). Wie sich herausstellte, führt die Induktion einer EAN zwar zur vermehrten Adhäsion und anschließenden Transmigration gegenüber gesunden Kontrolltieren, jedoch führt die CD14-Defizienz zu keinem veränderten Adhäsions- bzw. Transmigrationsverhalten. Dies lässt darauf schließen, dass die Adhäsion und Transmigration bei der EAN ohne direkte CD14-Beteiligung abläuft. Übereinstimmend zu diesen Ergebnissen konnte in einer Arbeit von Echchannaoui et al. gezeigt werden, dass Meningitis-infizierte CD14-defiziente Mäuse gleich große Mengen an Adhäsionsmolekülen exprimieren wie die entsprechenden Wildtypen, was darauf hindeutet, dass CD14 selbst auch

keine Rolle bei der EAN-Adhäsion spielt. Dennoch konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass eine CD14-Defizienz mit einer erhöhten Rekrutierung von Neutrophilen und der anschließenden Inflammation in Verbindung steht (Echchannaoui et al., 2005). Dies erklärt möglicherweise auch die vermehrte Infiltration, aber unveränderte Adhäsion und Transmigration bei den EAN-induzierten CD14<sup>-/-</sup> Mäusen dieser Arbeit. Welche explizite Rolle oder welchem Mechanismus CD14 bei der EAN zugrunde liegt, bleibt jedoch Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine prominente Rolle der angeborenen Immunrezeptoren TLR2/TLR6, TLR4, TLR11 sowie MyD88 und IL17A bei der EAN und GBS hin (Gries et al., 2012). Des Weiteren konnte eine protektive und modulierende Rolle für CD14 in der EAN *in vivo* nachgewiesen werden und dient als wichtiger Ansatzpunkt für weitere Forschungen in der EAN- und GBS-Pathophysiologie.

## 5. Referenzen

1. Akira S., Takeda K. and Kaisho T. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2, 675-80.
2. Akira S. and Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 4, 499-511.
3. Alugupalli K.R., Akira S., Lien E. and Leong J.M. 2007. MyD88- and Bruton's tyrosine kinase-mediated signals are essential for T cell-independent pathogen-specific IgM responses. *J Immunol.* 178, 3740-9.
4. Anderson K.V., Jurgens G. and Nusslein-Volhard C. 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell.* 42, 779-89.
5. Andersson A., Covacu R., Sunnemark D., Danilov A.I., Dal Bianco A., Khademi M., Wallstrom E., Lobell A., Brundin L., Lassmann H. and Harris R.A. 2008. Pivotal advance: HMGB1 expression in active lesions of human and experimental multiple sclerosis. *J Leukoc Biol.* 84, 1248-55.
6. Andonegui G., Goyert S.M. and Kubes P. 2002. Lipopolysaccharide-induced leukocyte-endothelial cell interactions: a role for CD14 versus toll-like receptor 4 within microvessels. *J Immunol.* 169, 2111-9.
7. Archelos J.J., Previtali S.C. and Hartung H.P. 1999. The role of integrins in immune-mediated diseases of the nervous system. *Trends Neurosci.* 22, 30-8.
8. Asbury A.K. and Cornblath D.R. 1990. Assessment of current diagnostic criteria for Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol.* 27 Suppl, S21-4.
9. Babu S., Blauvelt C.P., Kumaraswami V. and Nutman T.B. 2006. Cutting edge: diminished T cell TLR expression and function modulates the immune response in human filarial infection. *J Immunol.* 176, 3885-9.
10. Baccala R., Gonzalez-Quintial R., Lawson B.R., Stern M.E., Kono D.H., Beutler B. and Theofilopoulos A.N. 2009. Sensors of the innate immune system: their mode of action. *Nat Rev Rheumatol.* 5, 448-56.
11. Barton G.M., Kagan J.C. and Medzhitov R. 2006. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol.* 7, 49-56.
12. Barton G.M. and Kagan J.C. 2009. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol.* 9, 535-42.
13. Basta M., Illa I. and Dalakas M.C. 1996. Increased in vitro uptake of the complement C3b in the serum of patients with Guillain-Barre syndrome, myasthenia gravis and dermatomyositis. *J Neuroimmunol.* 71, 227-9.
14. Bayry J., Lacroix-Desmazes S., Carbonneil C., Misra N., Donkova V., Pashov A., Chevaller A., Mouthon L., Weill B., Bruneval P., Kazatchkine M.D. and Kaveri S.V.

- 2003a. Inhibition of maturation and function of dendritic cells by intravenous immunoglobulin. *Blood*. 101, 758-65.
15. Bayry J., Lacroix-Desmazes S., Delignat S., Mouthon L., Weill B., Kazatchkine M.D. and Kaveri S.V. 2003b. Intravenous immunoglobulin abrogates dendritic cell differentiation induced by interferon-alpha present in serum from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 48, 3497-502.
  16. Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T.B., Oukka M., Weiner H.L. and Kuchroo V.K. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 441, 235-8.
  17. Beutler B.A. 2009. TLRs and innate immunity. *Blood*. 113, 1399-407.
  18. Bizzozero O.A., Fridal K. and Pastuszyn A. 1994. Identification of the palmitoylation site in rat myelin P0 glycoprotein. *J Neurochem*. 62, 1163-71.
  19. Blaser M.J. 1997. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *J Infect Dis*. 176 Suppl 2, S103-5.
  20. Bluestone J.A. and Abbas A.K. 2003. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. 3, 253-7.
  21. Bowie A.G. 2008. Insights from vaccinia virus into Toll-like receptor signalling proteins and their regulation by ubiquitin: role of IRAK-2. *Biochem Soc Trans*. 36, 449-52.
  22. Bretscher P. and Cohn M. 1970. A theory of self-nonsel discrimination. *Science*. 169, 1042-9.
  23. Brunet J.F., Denizot F., Luciani M.F., Roux-Dosseto M., Suzan M., Mattei M.G. and Golstein P. 1987. A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature*. 328, 267-70.
  24. Brunn A., Utermohlen O., Carstov M., Ruiz M.S., Miletic H., Schluter D. and Deckert M. 2008. CD4 T cells mediate axonal damage and spinal cord motor neuron apoptosis in murine p0106-125-induced experimental autoimmune neuritis. *Am J Pathol*. 173, 93-105.
  25. Buchwald B., Ahangari R., Weishaupt A. and Toyka K.V. 2002. Intravenous immunoglobulins neutralize blocking antibodies in Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol*. 51, 673-80.
  26. Buwitt-Beckmann U., Heine H., Wiesmuller K.H., Jung G., Brock R., Akira S. and Ulmer A.J. 2005. Toll-like receptor 6-independent signaling by diacylated lipopeptides. *Eur J Immunol*. 35, 282-9.
  27. Buwitt-Beckmann U., Heine H., Wiesmuller K.H., Jung G., Brock R., Akira S. and Ulmer A.J. 2006. TLR1- and TLR6-independent recognition of bacterial lipopeptides. *J Biol Chem*. 281, 9049-57.

28. Cohen S.J., Cohen I.R. and Nussbaum G. 2010. IL-10 mediates resistance to adoptive transfer experimental autoimmune encephalomyelitis in MyD88(-/-) mice. *J Immunol.* 184, 212-21.
29. Cottalorda A., Vershelde C., Marcais A., Tomkowiak M., Musette P., Uematsu S., Akira S., Marvel J. and Bonnefoy-Berard N. 2006. TLR2 engagement on CD8 T cells lowers the threshold for optimal antigen-induced T cell activation. *Eur J Immunol.* 36, 1684-93.
30. Craggs R.I., King R.H. and Thomas P.K. 1984. The effect of suppression of macrophage activity on the development of experimental allergic neuritis. *Acta Neuropathol.* 62, 316-23.
31. De La Hoz C.L., Castro F.R., Santos L.M. and Langone F. 2010. Distribution of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha in the peripheral nervous system of Lewis rats during ascending paresis and spontaneous recovery from experimental autoimmune neuritis. *Neuroimmunomodulation.* 17, 56-66.
32. Deng Y.N. and Zhou W.B. 2007. Expression of TLR4 and TLR9 mRNA in Lewis rats with experimental allergic neuritis. *Neuroimmunomodulation.* 14, 337-43.
33. DeSilva D.R., Urdahl K.B. and Jenkins M.K. 1991. Clonal anergy is induced in vitro by T cell receptor occupancy in the absence of proliferation. *J Immunol.* 147, 3261-7.
34. Donner H., Braun J., Seidl C., Rau H., Finke R., Ventz M., Walfish P.G., Usadel K.H. and Badenhop K. 1997. Codon 17 polymorphism of the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene in Hashimoto's thyroiditis and Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 82, 4130-2.
35. Dziarski R., Tapping R.I. and Tobias P.S. 1998. Binding of bacterial peptidoglycan to CD14. *J Biol Chem.* 273, 8680-90.
36. Echchannaoui H., Frei K., Letiembre M., Strieter R.M., Adachi Y. and Landmann R. 2005. CD14 deficiency leads to increased MIP-2 production, CXCR2 expression, neutrophil transmigration, and early death in pneumococcal infection. *J Leukoc Biol.* 78, 705-15.
37. Ellingsen E., Morath S., Flo T., Schromm A., Hartung T., Thiemermann C., Espevik T., Golenbock D., Foster D., Solberg R., Aasen A. and Wang J. 2002. Induction of cytokine production in human T cells and monocytes by highly purified lipoteichoic acid: involvement of Toll-like receptors and CD14. *Med Sci Monit.* 8, BR149-56.
38. Encinas J.A., Wicker L.S., Peterson L.B., Mukasa A., Teuscher C., Sobel R., Weiner H.L., Seidman C.E., Seidman J.G. and Kuchroo V.K. 1999. QTL influencing autoimmune diabetes and encephalomyelitis map to a 0.15-cM region containing Il2. *Nat Genet.* 21, 158-60.
39. Engelhardt B. 2008. Adhesion and Signalling Molecules Controlling the Extravasation of Leukocytes across the Endothelium. *Transfus Med Hemother.* 35, 73-75.
40. Feasby T.E. 1994. Axonal Guillain-Barre syndrome. *Muscle Nerve.* 17, 678-9.

41. Fischer A., Rieux-Laucat F. and Le Deist F. 2000. Autoimmune lymphoproliferative syndromes (ALPS): models for the study of peripheral tolerance. *Rev Immunogenet.* 2, 52-60.
42. Flachenecker P., Hartung H.P. and Reiners K. 1997a. Power spectrum analysis of heart rate variability in Guillain-Barre syndrome. A longitudinal study. *Brain.* 120 ( Pt 10), 1885-94.
43. Flachenecker P., Wermuth P., Hartung H.P. and Reiners K. 1997b. Quantitative assessment of cardiovascular autonomic function in Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol.* 42, 171-9.
44. Freeman G.J., Lombard D.B., Gimmi C.D., Brod S.A., Lee K., Laning J.C., Hafler D.A., Dorf M.E., Gray G.S., Reiser H. and et al. 1992. CTLA-4 and CD28 mRNA are coexpressed in most T cells after activation. Expression of CTLA-4 and CD28 mRNA does not correlate with the pattern of lymphokine production. *J Immunol.* 149, 3795-801.
45. Fugger L. and Svejgaard A. 2000. Association of MHC and rheumatoid arthritis. HLA-DR4 and rheumatoid arthritis: studies in mice and men. *Arthritis Res.* 2, 208-11.
46. Geijtenbeek T.B., den Dunnen J. and Gringhuis S.I. 2009. Pathogen recognition by DC-SIGN shapes adaptive immunity. *Future Microbiol.* 4, 879-90.
47. Gmunder H. and Lesslauer W. 1984. A 45-kDa human T-cell membrane glycoprotein functions in the regulation of cell proliferative responses. *Eur J Biochem.* 142, 153-60.
48. Gold R., Archelos J.J. and Hartung H.P. 1999. Mechanisms of immune regulation in the peripheral nervous system. *Brain Pathol.* 9, 343-60.
49. Gold R., Hartung H.P. and Toyka K.V. 2000. Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Mol Med Today.* 6, 88-91.
50. Gordon P.H. and Wilbourn A.J. 2001. Early electrodiagnostic findings in Guillain-Barre syndrome. *Arch Neurol.* 58, 913-7.
51. Gries M., Davies L., Liu Y., Bachhuber A., Spiegel J., Dillmann U., Hartmann T., Fassbender K. and Walter S. 2012. Response of Toll-like receptors in experimental Guillain-Barre syndrome: A kinetic analysis. *Neurosci Lett.* 518, 154-60.
52. Guillain G., Barré J. and Strohl A. 1916. Sur un syndrome de radiculo-nevrite avec hyperalbuminose du liquide cephalorachidien sans reaction cellulaire. Remarques sur les caracteres cliniques et graphiques des reflexes tendineux *Bull Soc Med Hop Paris* 28, 1462-70.
53. Hara T., Fu S.M. and Hansen J.A. 1985. Human T cell activation. II. A new activation pathway used by a major T cell population via a disulfide-bonded dimer of a 44 kilodalton polypeptide (9.3 antigen). *J Exp Med.* 161, 1513-24.

54. Harding F.A., McArthur J.G., Gross J.A., Raulet D.H. and Allison J.P. 1992. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature*. 356, 607-9.
55. Hartung H.P., Kieseier B.C. and Kiefer R. 2001. Progress in Guillain-Barre syndrome. *Curr Opin Neurol*. 14, 597-604.
56. He J., Gurunathan S., Iwasaki A., Ash-Shaheed B. and Kelsall B.L. 2000. Primary role for Gi protein signaling in the regulation of interleukin 12 production and the induction of T helper cell type 1 responses. *J Exp Med*. 191, 1605-10.
57. Heininger K., Stoll G., Linington C., Toyka K.V. and Wekerle H. 1986. Conduction failure and nerve conduction slowing in experimental allergic neuritis induced by P2-specific T-cell lines. *Ann Neurol*. 19, 44-9.
58. Henneke P., Takeuchi O., van Strijp J.A., Guttormsen H.K., Smith J.A., Schromm A.B., Espevik T.A., Akira S., Nizet V., Kasper D.L. and Golenbock D.T. 2001. Novel engagement of CD14 and multiple toll-like receptors by group B streptococci. *J Immunol*. 167, 7069-76.
59. Hofstetter H.H., Grau C., Buttmann M., Forsthuber T.G., Gaupp S., Toyka K.V. and Gold R. 2007. The PLPp-specific T-cell population promoted by pertussis toxin is characterized by high frequencies of IL-17-producing cells. *Cytokine*. 40, 35-43.
60. Hofstetter H.H. and Forsthuber T.G. 2010. Kinetics of IL-17- and interferon-gamma-producing PLPp-specific CD4 T cells in EAE induced by coinjection of PLPp/IFA with pertussis toxin in SJL mice. *Neurosci Lett*. 476, 150-5.
61. Hughes R., Sanders E., Hall S., Atkinson P., Colchester A. and Payan P. 1992. Subacute idiopathic demyelinating polyradiculoneuropathy. *Arch Neurol*. 49, 612-6.
62. Hughes R.A. 1995. The concept and classification of Guillain-Barre syndrome and related disorders. *Rev Neurol (Paris)*. 151, 291-4.
63. Hughes R.A. and Cornblath D.R. 2005. Guillain-Barre syndrome. *Lancet*. 366, 1653-66.
64. Imanishi T., Hara H., Suzuki S., Suzuki N., Akira S. and Saito T. 2007. Cutting edge: TLR2 directly triggers Th1 effector functions. *J Immunol*. 178, 6715-9.
65. Ivashkiv L.B. 2008. A signal-switch hypothesis for cross-regulation of cytokine and TLR signalling pathways. *Nat Rev Immunol*. 8, 816-22.
66. Janeway C.A., Jr. 1989. The priming of helper T cells. *Semin Immunol*. 1, 13-20.
67. Jenkins M.K., Pardoll D.M., Mizuguchi J., Chused T.M. and Schwartz R.H. 1987. Molecular events in the induction of a nonresponsive state in interleukin 2-producing helper T-lymphocyte clones. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84, 5409-13.
68. Jones S.C., Brahmakshatriya V., Huston G., Dibble J. and Swain S.L. 2010. TLR-activated dendritic cells enhance the response of aged naive CD4 T cells via an IL-6-dependent mechanism. *J Immunol*. 185, 6783-94.

69. June C.H., Ledbetter J.A., Linsley P.S. and Thompson C.B. 1990. Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol Today*. 11, 211-6.
70. June C.H., Bluestone J.A., Nadler L.M. and Thompson C.B. 1994. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today*. 15, 321-31.
71. Kawai T. and Akira S. 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*. 21, 317-37.
72. Kerfoot S.M., Long E.M., Hickey M.J., Andonegui G., Lapointe B.M., Zanardo R.C., Bonder C., James W.G., Robbins S.M. and Kubes P. 2004. TLR4 contributes to disease-inducing mechanisms resulting in central nervous system autoimmune disease. *J Immunol*. 173, 7070-7.
73. Kiefer R., Kieseier B.C., Stoll G. and Hartung H.P. 2001. The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol*. 64, 109-27.
74. Kiers L., Clouston P., Zuniga G. and Cros D. 1994. Quantitative studies of F responses in Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 93, 255-64.
75. Kieseier B.C., Clements J.M., Pischel H.B., Wells G.M., Miller K., Gearing A.J. and Hartung H.P. 1998. Matrix metalloproteinases MMP-9 and MMP-7 are expressed in experimental autoimmune neuritis and the Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol*. 43, 427-34.
76. Kieseier B.C., Krivacic K., Jung S., Pischel H., Toyka K.V., Ransohoff R.M. and Hartung H.P. 2000. Sequential expression of chemokines in experimental autoimmune neuritis. *J Neuroimmunol*. 110, 121-9.
77. Kieseier B.C., Kiefer R., Gold R., Hemmer B., Willison H.J. and Hartung H.P. 2004. Advances in understanding and treatment of immune-mediated disorders of the peripheral nervous system. *Muscle Nerve*. 30, 131-56.
78. Kondo M., Weissman I.L. and Akashi K. 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. 91, 661-72.
79. Kroenke M.A., Carlson T.J., Andjelkovic A.V. and Segal B.M. 2008. IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *J Exp Med*. 205, 1535-41.
80. Krummel M.F. and Allison J.P. 1995. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med*. 182, 459-65.
81. Kulkarni R., Behboudi S. and Sharif S. 2011. Insights into the role of Toll-like receptors in modulation of T cell responses. *Cell Tissue Res*. 343, 141-52.
82. Lafferty K.J. and Woolnough J. 1977. The origin and mechanism of the allograft reaction. *Immunol Rev*. 35, 231-62.

83. Landry O. 1859. Note sur la paralysie ascendante aigue. . Gazette Hebdomadaire Méd Chir 6, 472–74,486–88.
84. Ledbetter J.A., Imboden J.B., Schieven G.L., Grosmaire L.S., Rabinovitch P.S., Lindsten T., Thompson C.B. and June C.H. 1990. CD28 ligation in T-cell activation: evidence for two signal transduction pathways. *Blood*. 75, 1531-9.
85. Lee S.M., Joo Y.D. and Seo S.K. 2009. Expression and Function of TLR2 on CD4 Versus CD8 T Cells. *Immune Netw*. 9, 127-32.
86. Li J., Jin C., Cleveland J.C., Jr., Ao L., Xu D., Fullerton D.A. and Meng X. 2010. Enhanced inflammatory responses to toll-like receptor 2/4 stimulation in type 1 diabetic coronary artery endothelial cells: the effect of insulin. *Cardiovasc Diabetol*. 9, 90.
87. Linington C., Izumo S., Suzuki M., Uyemura K., Meyermann R. and Wekerle H. 1984. A permanent rat T cell line that mediates experimental allergic neuritis in the Lewis rat in vivo. *J Immunol*. 133, 1946-50.
88. Linsley P.S., Brady W., Grosmaire L., Aruffo A., Damle N.K. and Ledbetter J.A. 1991. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med*. 173, 721-30.
89. Linsley P.S., Greene J.L., Tan P., Bradshaw J., Ledbetter J.A., Anasetti C. and Damle N.K. 1992. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med*. 176, 1595-604.
90. Liu G., Zhang L. and Zhao Y. 2010. Modulation of immune responses through direct activation of Toll-like receptors to T cells. *Clin Exp Immunol*. 160, 168-75.
91. Liu H., Komai-Koma M., Xu D. and Liew F.Y. 2006. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 7048-53.
92. Lubos E., Mahoney C.E., Leopold J.A., Zhang Y.Y., Loscalzo J. and Handy D.E. 2010. Glutathione peroxidase-1 modulates lipopolysaccharide-induced adhesion molecule expression in endothelial cells by altering CD14 expression. *FASEB J*. 24, 2525-32.
93. Mangan P.R., Harrington L.E., O'Quinn D.B., Helms W.S., Bullard D.C., Elson C.O., Hatton R.D., Wahl S.M., Schoeb T.R. and Weaver C.T. 2006. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*. 441, 231-4.
94. Manicassamy S. and Pulendran B. 2009. Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. *Semin Immunol*. 21, 185-93.
95. Marron M.P., Raffel L.J., Garchon H.J., Jacob C.O., Serrano-Rios M., Martinez Larrad M.T., Teng W.P., Park Y., Zhang Z.X., Goldstein D.R., Tao Y.W., Beaurain G., Bach J.F., Huang H.S., Luo D.F., Zeidler A., Rotter J.I., Yang M.C., Modilevsky T., Maclaren N.K. and She J.X. 1997. Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is

- associated with CTLA4 polymorphisms in multiple ethnic groups. *Hum Mol Genet.* 6, 1275-82.
96. Marta M., Andersson A., Isaksson M., Kampe O. and Lobell A. 2008. Unexpected regulatory roles of TLR4 and TLR9 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* 38, 565-75.
  97. Martin P.J., Ledbetter J.A., Morishita Y., June C.H., Beatty P.G. and Hansen J.A. 1986. A 44 kilodalton cell surface homodimer regulates interleukin 2 production by activated human T lymphocytes. *J Immunol.* 136, 3282-7.
  98. Maurer M. and Gold R. 2002. Animal models of immune-mediated neuropathies. *Curr Opin Neurol.* 15, 617-22.
  99. Medzhitov R. and Janeway C., Jr. 2000. Innate immunity. *N Engl J Med.* 343, 338-44.
  100. Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 1, 135-45.
  101. Mishra B.B., Gundra U.M. and Teale J.M. 2008. Expression and distribution of Toll-like receptors 11-13 in the brain during murine neurocysticercosis. *J Neuroinflammation.* 5, 53.
  102. Munthe-Kaas M.C., Carlsen K.H., Helms P.J., Gerritsen J., Whyte M., Feijen M., Skinningsrud B., Main M., Kwong G.N., Lie B.A., Lodrup Carlsen K.C. and Undlien D.E. 2004. CTLA-4 polymorphisms in allergy and asthma and the TH1/ TH2 paradigm. *J Allergy Clin Immunol.* 114, 280-7.
  103. Nakao Y., Funami K., Kikkawa S., Taniguchi M., Nishiguchi M., Fukumori Y., Seya T. and Matsumoto M. 2005. Surface-expressed TLR6 participates in the recognition of diacylated lipopeptide and peptidoglycan in human cells. *J Immunol.* 174, 1566-73.
  104. Nikoopour E., Schwartz J.A. and Singh B. 2008. Therapeutic benefits of regulating inflammation in autoimmunity. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 7, 203-10.
  105. Oliveira-dos-Santos A.J., Ho A., Tada Y., Lafaille J.J., Tonegawa S., Mak T.W. and Penninger J.M. 1999. CD28 costimulation is crucial for the development of spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 162, 4490-5.
  106. Pedraza L., Owens G.C., Green L.A. and Salzer J.L. 1990. The myelin-associated glycoproteins: membrane disposition, evidence of a novel disulfide linkage between immunoglobulin-like domains, and posttranslational palmitoylation. *J Cell Biol.* 111, 2651-61.
  107. Pfeiffer A., Bottcher A., Orso E., Kapinsky M., Nagy P., Bodnar A., Spreitzer I., Liebisch G., Drobnik W., Gempel K., Horn M., Holmer S., Hartung T., Multhoff G., Schutz G., Schindler H., Ulmer A.J., Heine H., Stelter F., Schutt C., Rothe G., Szollosi J., Damjanovich S. and Schmitz G. 2001. Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. *Eur J Immunol.* 31, 3153-64.

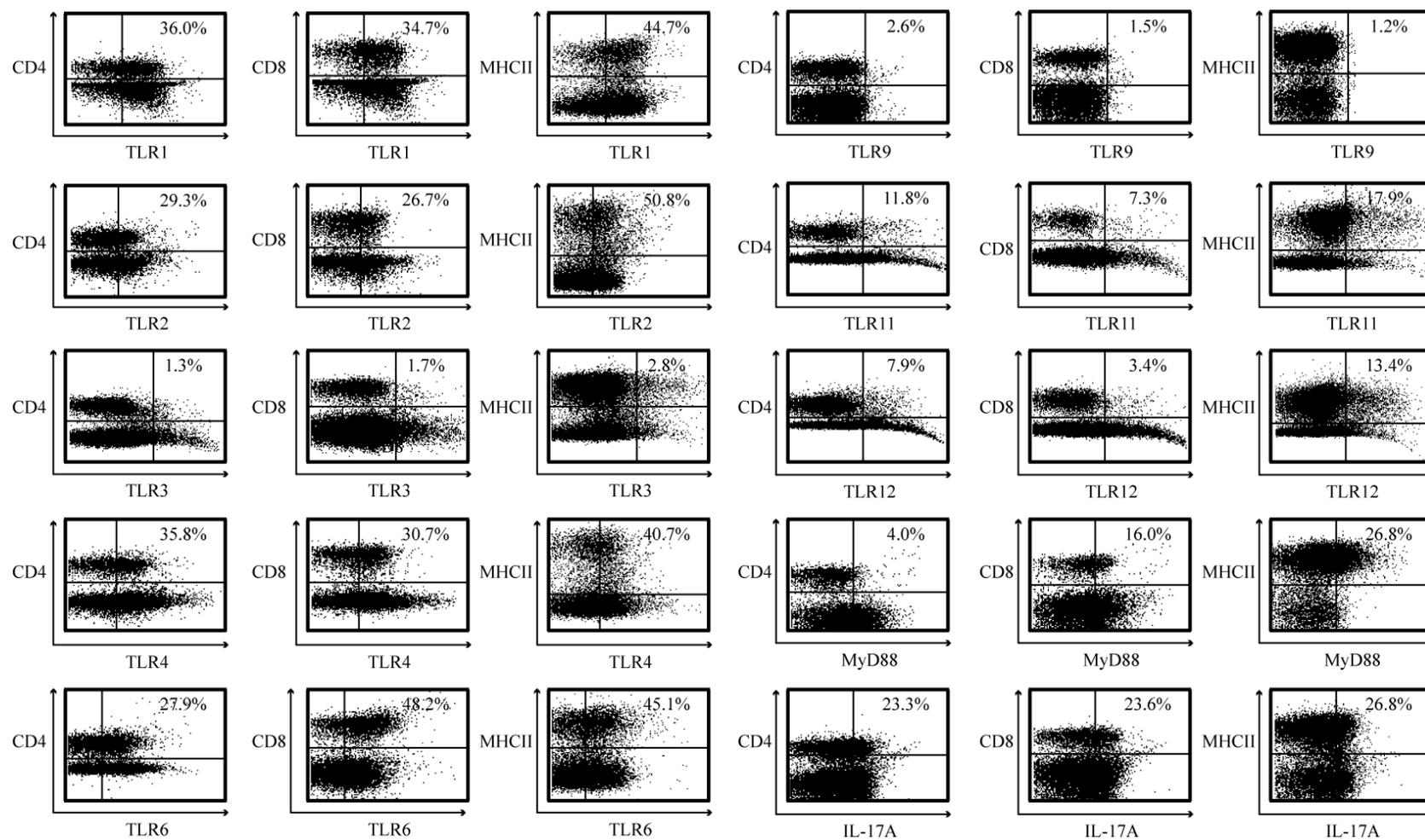
108. Pierres A., Lopez M., Cerdan C., Nunes J., Olive D. and Mawas C. 1988. Triggering CD 28 molecules synergize with CD 2 (T 11.1 and T 11.2)-mediated T cell activation. *Eur J Immunol.* 18, 685-90.
109. Prinz M., Garbe F., Schmidt H., Mildner A., Gutcher I., Wolter K., Piesche M., Schroers R., Weiss E., Kirschning C.J., Rochford C.D., Bruck W. and Becher B. 2006. Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 116, 456-64.
110. Pugin J., Heumann I.D., Tomasz A., Kravchenko V.V., Akamatsu Y., Nishijima M., Glauser M.P., Tobias P.S. and Ulevitch R.J. 1994. CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity.* 1, 509-16.
111. Read S., Malmstrom V. and Powrie F. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med.* 192, 295-302.
112. Ropper A.H., Wijdicks E.F. and Shahani B.T. 1990. Electrodiagnostic abnormalities in 113 consecutive patients with Guillain-Barre syndrome. *Arch Neurol.* 47, 881-7.
113. Ropper A.H. 1992. The Guillain-Barre syndrome. *N Engl J Med.* 326, 1130-6.
114. Sadanaga A., Nakashima H., Akahoshi M., Masutani K., Miyake K., Igawa T., Sugiyama N., Niino H. and Harada M. 2007. Protection against autoimmune nephritis in MyD88-deficient MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum.* 56, 1618-28.
115. Salomon B. and Bluestone J.A. 2001. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol.* 19, 225-52.
116. Schmidt B., Stoll G., van der Meide P., Jung S. and Hartung H.P. 1992. Transient cellular expression of gamma-interferon in myelin-induced and T-cell line-mediated experimental autoimmune neuritis. *Brain.* 115 ( Pt 6), 1633-46.
117. Schroder N.W., Morath S., Alexander C., Hamann L., Hartung T., Zahringer U., Gobel U.B., Weber J.R. and Schumann R.R. 2003. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem.* 278, 15587-94.
118. Schumann R.R. and Tapping R.I. 2007. Genomic variants of TLR1--it takes (TLR-)two to tango. *Eur J Immunol.* 37, 2059-62.
119. Sen G.C. and Sarkar S.N. 2005. Transcriptional signaling by double-stranded RNA: role of TLR3. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 1-14.
120. Shi D., Das J. and Das G. 2006. Inflammatory bowel disease requires the interplay between innate and adaptive immune signals. *Cell Res.* 16, 70-4.
121. Simmonds M.J. and Gough S.C. 2004. Unravelling the genetic complexity of autoimmune thyroid disease: HLA, CTLA-4 and beyond. *Clin Exp Immunol.* 136, 1-10.

122. Suttmuller R.P., Morgan M.E., Netea M.G., Grauer O. and Adema G.J. 2006. Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends Immunol.* 27, 387-93.
123. Takahashi T., Tagami T., Yamazaki S., Uede T., Shimizu J., Sakaguchi N., Mak T.W. and Sakaguchi S. 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med.* 192, 303-10.
124. Tang Q., Boden E.K., Henriksen K.J., Bour-Jordan H., Bi M. and Bluestone J.A. 2004. Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol.* 34, 2996-3005.
125. Thornton C.A. and Griggs R.C. 1994. Plasma exchange and intravenous immunoglobulin treatment of neuromuscular disease. *Ann Neurol.* 35, 260-8.
126. Tigno-Aranjuez J.T., Jaini R., Tuohy V.K., Lehmann P.V. and Tary-Lehmann M. 2009. Encephalitogenicity of complete Freund's adjuvant relative to CpG is linked to induction of Th17 cells. *J Immunol.* 183, 5654-61.
127. Tivol E.A., Borriello F., Schweitzer A.N., Lynch W.P., Bluestone J.A. and Sharpe A.H. 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity.* 3, 541-7.
128. Touil T., Fitzgerald D., Zhang G.X., Rostami A. and Gran B. 2006. Cutting Edge: TLR3 stimulation suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis by inducing endogenous IFN-beta. *J Immunol.* 177, 7505-9.
129. Trinchieri G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 3, 133-46.
130. Turka L.A., Ledbetter J.A., Lee K., June C.H. and Thompson C.B. 1990. CD28 is an inducible T cell surface antigen that transduces a proliferative signal in CD3+ mature thymocytes. *J Immunol.* 144, 1646-53.
131. Ulevitch R.J. 2003. Regulation of receptor-dependent activation of the innate immune response. *J Infect Dis.* 187 Suppl 2, S351-5.
132. Vallois D., Grimm C.H., Avner P., Boitard C. and Rogner U.C. 2007. The type 1 diabetes locus Idd6 controls TLR1 expression. *J Immunol.* 179, 3896-903.
133. Van der Meche F.G., Van Doorn P.A., Meulstee J. and Jennekens F.G. 2001. Diagnostic and classification criteria for the Guillain-Barre syndrome. *Eur Neurol.* 45, 133-9.
134. Van Lier R.A., Brouwer M. and Aarden L.A. 1988. Signals involved in T cell activation. T cell proliferation induced through the synergistic action of anti-CD28 and anti-CD2 monoclonal antibodies. *Eur J Immunol.* 18, 167-72.

135. van Noort J.M., van Sechel A., Boon J., Boersma W.J., Polman C.H. and Lucas C.J. 1993. Minor myelin proteins can be major targets for peripheral blood T cells from both multiple sclerosis patients and healthy subjects. *J Neuroimmunol.* 46, 67-72.
136. Vasselon T., Hanlon W.A., Wright S.D. and Detmers P.A. 2002. Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates activation of stress-activated MAP kinase p38. *J Leukoc Biol.* 71, 503-10.
137. Veldhoen M., Hocking R.J., Atkins C.J., Locksley R.M. and Stockinger B. 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 24, 179-89.
138. von Meyenn F., Schaefer M., Weighardt H., Bauer S., Kirschning C.J., Wagner H. and Sparwasser T. 2006. Toll-like receptor 9 contributes to recognition of Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin by Flt3-ligand generated dendritic cells. *Immunobiology.* 211, 557-65.
139. Waksman B.H. and Adams R.D. 1955. Allergic neuritis: an experimental disease of rabbits induced by the injection of peripheral nervous tissue and adjuvants. *J Exp Med.* 102, 213-36.
140. Walter S., Doering A., Letiembre M., Liu Y., Hao W., Diem R., Bernreuther C., Glatzel M., Engelhardt B. and Fassbender K. 2006. The LPS receptor, CD14, in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Cell Physiol Biochem.* 17, 167-72.
141. Walunas T.L., Lenschow D.J., Bakker C.Y., Linsley P.S., Freeman G.J., Green J.M., Thompson C.B. and Bluestone J.A. 1994. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity.* 1, 405-13.
142. Wang Y.Z., Liang Q.H., Ramkalawan H., Wang Y.L., Yang Y.F., Zhou W.B., Tian F.F., Li J. and Yang H. 2012. Expression of Toll-like receptors 2, 4 and 9 in patients with Guillain-Barre syndrome. *Neuroimmunomodulation.* 19, 60-8.
143. Waterhouse P., Penninger J.M., Timms E., Wakeham A., Shahinian A., Lee K.P., Thompson C.B., Griesser H. and Mak T.W. 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl-4. *Science.* 270, 985-8.
144. Wen L., Ley R.E., Volchkov P.Y., Stranges P.B., Avanesyan L., Stonebraker A.C., Hu C., Wong F.S., Szot G.L., Bluestone J.A., Gordon J.I. and Chervonsky A.V. 2008. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature.* 455, 1109-13.
145. Willison H.J. and O'Hanlon G.M. 1999. The immunopathogenesis of Miller Fisher syndrome. *J Neuroimmunol.* 100, 3-12.
146. Wraith D.C., Goldman M. and Lambert P.H. 2003. Vaccination and autoimmune disease: what is the evidence? *Lancet.* 362, 1659-66.

147. Xu J. and Drew P.D. 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists suppress the production of IL-12 family cytokines by activated glia. *J Immunol.* 178, 1904-13.
148. Yarovinsky F. and Sher A. 2006. Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 36, 255-9.
149. Yuki N., Taki T., Inagaki F., Kasama T., Takahashi M., Saito K., Handa S. and Miyatake T. 1993. A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barre syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *J Exp Med.* 178, 1771-5.
150. Yuki N. and Odaka M. 2005. Ganglioside mimicry as a cause of Guillain-Barre syndrome. *Curr Opin Neurol.* 18, 557-61.
151. Zekki H., Feinstein D.L. and Rivest S. 2002. The clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis is associated with a profound and sustained transcriptional activation of the genes encoding toll-like receptor 2 and CD14 in the mouse CNS. *Brain Pathol.* 12, 308-19.
152. Zhang D., Zhang G., Hayden M.S., Greenblatt M.B., Bussey C., Flavell R.A. and Ghosh S. 2004. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science.* 303, 1522-6.
153. Zhang Z.Y., Zhang Z. and Schluesener H.J. 2009a. Toll-like receptor-2, CD14 and heat-shock protein 70 in inflammatory lesions of rat experimental autoimmune neuritis. *Neuroscience.* 159, 136-42.
154. Zhang Z.Y., Zhang Z. and Schluesener H.J. 2009b. FTY720 attenuates lesional interleukin-17(+) cell accumulation in rat experimental autoimmune neuritis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 35, 487-95.
155. Zheng S.G., Wang J.H., Stohl W., Kim K.S., Gray J.D. and Horwitz D.A. 2006. TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. *J Immunol.* 176, 3321-9.
156. Zhu J., Nennesmo I., Deng G.M., Levi M., Wahren B., Diab A., Mix E., Zhou J.N. and Ljunggren H.G. 1999. Induction of experimental autoimmune neuritis in CD4-8-C57BL/6J mice. *J Neuroimmunol.* 94, 196-203.
157. Zou L.P., Ma D.H., Wei L., van der Meide P.H., Mix E. and Zhu J. 1999. IFN-beta suppresses experimental autoimmune neuritis in Lewis rats by inhibiting the migration of inflammatory cells into peripheral nervous tissue. *J Neurosci Res.* 56, 123-30.
158. Zou L.P., Ljunggren H.G., Levi M., Nennesmo I., Wahren B., Mix E., Winblad B., Schalling M. and Zhu J. 2000. P0 protein peptide 180-199 together with pertussis toxin induces experimental autoimmune neuritis in resistant C57BL/6 mice. *J Neurosci Res.* 62, 717-21.

## 6. Anhang



**Abbildung 32: FACS-Analysen der TLR-, MyD88- und IL-17A-Expressionen in Lymphknotenzellen von EAN-Mäusen.**

Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer, mittels Durchflusszytometrie generierter Dot Plot der EAN-Lymphknotenzellen der untersuchten TLRs, von MyD88 und IL-17A.

Gen	Probe	prozentualer Anteil der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen (%)				prozentualer Anteil der CD8 <sup>+</sup> T-Zellen (%)				prozentualer Anteil der MHCII <sup>+</sup> Zellen (%)			
		d2 p.i.	d6 p.i.	d13 p.i.	d20 p.i.	d2 p.i.	d6 p.i.	d13 p.i.	d20 p.i.	d2 p.i.	d6 p.i.	d13 p.i.	d20 p.i.
MHCII	PTX/CFA Kontrolle									30,47 ± 8,35	27,04 ± 4,82	33,27 ± 2,28	26,52 ± 6,18
	P0/PTX/CFA EAN									22,71 ± 3,34	20,26 ± 1,35	40,76 ± 3,17	43,24 ± 3,36
	Δ EAN - Kontrolle									-7,76	-6,78	7,49	16,72
TCR	PTX/CFA Kontrolle	97,63 ± 0,62	93,66 ± 2,09	98,4 ± 0,74	99,62 ± 0,39	97,07 ± 1,16	95,34 ± 1,36	98,30 ± 0,61	98,58 ± 1,04				
	P0/PTX/CFA EAN	95,64 ± 0,73	89,94 ± 1,95	98,50 ± 0,48	97,94 ± 0,22	94,64 ± 2,16	94,13 ± 1,44	96,30 ± 1,27	97,00 ± 0,54				
	Δ EAN - Kontrolle	-1,99	-3,72	0,10	-1,68	-2,43	-1,21	-2,00	-1,58				
CD80	PTX/CFA Kontrolle									21,50 ± 2,64	21,70 ± 1,72	20,05 ± 1,98	18,43 ± 1,38
	P0/PTX/CFA EAN									20,82 ± 5,58	41,10 ± 6,97	18,32 ± 3,91	16,71 ± 1,88
	Δ EAN - Kontrolle									-0,68	19,40	-1,73	-1,72
CD86	PTX/CFA Kontrolle									11,98 ± 4,77	13,69 ± 3,86	8,23 ± 2,24	6,38 ± 1,67
	P0/PTX/CFA EAN									7,20 ± 1,65	4,84 ± 0,78	36,75 ± 7,22	8,33 ± 3,40
	Δ EAN - Kontrolle									-4,78	-8,85	28,52	1,95
CD152/TCR	PTX/CFA Kontrolle	3,02 ± 0,41	3,35 ± 1,19	1,44 ± 0,26	1,35 ± 0,32	2,68 ± 0,75	1,48 ± 0,69	1,44 ± 0,38	1,78 ± 0,36				
	P0/PTX/CFA EAN	1,58 ± 0,53	30,04 ± 8,66	17,06 ± 3,32	3,24 ± 2,71	2,12 ± 1,25	13,96 ± 5,43	10,16 ± 2,96	0,84 ± 0,14				
	Δ EAN - Kontrolle	-1,44	26,69	15,62	1,89	-0,56	12,48	8,72	-0,94				
CD28/TCR	PTX/CFA Kontrolle	24,50 ± 2,13	25,04 ± 1,80	30,26 ± 1,20	33,52 ± 2,11	9,28 ± 1,91	14,94 ± 3,46	18,77 ± 0,83	18,00 ± 0,78				
	P0/PTX/CFA EAN	22,50 ± 5,60	21,33 ± 2,55	42,97 ± 1,27	40,41 ± 4,43	6,40 ± 0,63	13,29 ± 2,56	29,03 ± 0,87	21,20 ± 2,62				
	Δ EAN - Kontrolle	-2,00	-3,71	12,71	6,89	-2,88	-1,65	10,26	3,20				

**Tabelle 9: Prozentuale Anteile der in die Antigenpräsentation involvierten Moleküle auf T-Zellen und APCs während dem EAN-Verlauf.**

Protein	CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen	CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen	MHCII <sup>+</sup> -Zellen
TLR1	38,08 1,37	35,23 0,90	45,13 1,54
TLR2	17,09 1,61	10,68 0,59	24,65 1,45
TLR3	3,99 0,17	3,51 0,19	6,24 0,53
TLR4	26,20 1,01	24,54 0,76	34,33 0,65
TLR6	3,15 0,37	4,36 0,50	9,92 0,85
TLR9	2,70 0,30	3,10 0,23	4,97 0,58
TLR11	4,37 0,55	2,58 0,11	7,20 0,52
TLR12	7,60 0,65	2,54 0,12	5,59 0,47
CD14	13,19 0,53	15,88 0,90	20,91 0,84
MyD88	1,55 0,08	3,80 0,30	6,23 0,42

**Tabelle 10: Prozentuale Anteile der TLR-, CD14 und MyD88-Basalexpression von T-Zellen und APCs in Lymphknoten von C57B6/J-Mäusen.**

Gen	Probe	prozentualer Anteil der CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen (%)				prozentualer Anteil der CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen (%)				prozentualer Anteil der MHCII <sup>+</sup> -Zellen (%)			
		d2 p.i.	d6 p.i.	d13 p.i.	d20 p.i.	d2 p.i.	d6 p.i.	d13 p.i.	d20 p.i.	d2 p.i.	d6 p.i.	d13 p.i.	d20 p.i.
TLR1	PTX/CFA Kontrolle	35,60 ± 4,70	45,22 ± 2,40	40,45 ± 2,46	31,05 ± 2,46	35,98 ± 5,99	39,11 ± 2,16	36,24 ± 1,04	29,60 ± 0,46	45,12 ± 5,83	53,63 ± 2,21	45,04 ± 1,01	36,75 ± 2,32
	P0/PTX/CFA EAN	21,50 ± 3,44	37,80 ± 5,87	36,47 ± 5,53	33,67 ± 5,08	17,39 ± 2,84	37,80 ± 5,07	32,98 ± 2,48	31,93 ± 4,24	23,16 ± 1,23	40,64 ± 2,74	40,75 ± 4,00	37,80 ± 3,55
	Δ EAN - Kontrolle	-14,10	-7,42	-3,98	2,62	-18,59	-1,31	-3,26	2,33	-21,96	-12,99	-4,29	1,05
TLR2	PTX/CFA Kontrolle	20,30 ± 1,21	24,56 ± 1,71	17,36 ± 2,36	6,14 ± 0,89	11,84 ± 1,18	12,09 ± 0,75	12,44 ± 0,92	6,36 ± 0,85	28,23 ± 1,60	31,22 ± 0,59	24,29 ± 0,31	14,86 ± 1,10
	P0/PTX/CFA EAN	15,36 ± 2,48	47,90 ± 3,97	27,41 ± 2,89	13,53 ± 1,93	10,80 ± 1,50	17,04 ± 4,21	14,62 ± 1,99	10,10 ± 1,39	23,48 ± 2,03	45,85 ± 4,48	24,98 ± 2,72	18,81 ± 1,71
	Δ EAN - Kontrolle	-4,94	23,34	10,05	7,39	-1,04	4,95	2,18	3,74	-4,75	14,63	0,69	3,95
TLR3	PTX/CFA Kontrolle	3,90 ± 0,92	4,97 ± 0,61	2,98 ± 0,41	4,10 ± 0,43	4,07 ± 1,62	4,47 ± 0,96	3,04 ± 0,24	2,45 ± 0,34	8,30 ± 1,84	8,18 ± 1,20	4,08 ± 0,40	4,40 ± 1,08
	P0/PTX/CFA EAN	3,26 ± 0,44	3,94 ± 1,06	2,50 ± 0,63	2,43 ± 0,31	5,02 ± 0,98	3,83 ± 0,78	3,06 ± 0,51	3,45 ± 0,33	5,04 ± 0,71	11,06 ± 2,69	3,88 ± 1,08	3,58 ± 0,30
	Δ EAN - Kontrolle	-0,64	-1,03	-0,48	-1,67	0,95	-0,64	0,02	1,00	-3,26	2,88	-0,20	-0,82
TLR4	PTX/CFA Kontrolle	25,96 ± 1,99	31,58 ± 1,58	27,97 ± 1,30	19,30 ± 3,15	25,68 ± 1,79	27,97 ± 2,82	25,50 ± 1,26	19,00 ± 3,05	31,46 ± 2,61	37,69 ± 1,67	36,66 ± 1,40	31,50 ± 3,10
	P0/PTX/CFA EAN	19,64 ± 1,34	36,70 ± 7,53	33,29 ± 3,17	24,16 ± 2,44	26,10 ± 5,56	19,88 ± 6,59	30,47 ± 2,54	24,01 ± 2,76	37,38 ± 1,54	36,64 ± 5,76	51,93 ± 3,42	31,92 ± 4,81
	Δ EAN - Kontrolle	-6,32	5,12	5,32	4,86	0,42	-8,09	-4,97	5,01	5,92	-1,05	15,27	0,42
TLR6	PTX/CFA Kontrolle	3,36 ± 0,90	5,17 ± 2,45	3,54 ± 1,12	0,51 ± 0,11	5,85 ± 1,80	6,83 ± 2,99	3,98 ± 1,77	0,79 ± 0,14	10,68 ± 1,90	15,15 ± 3,22	9,64 ± 2,31	4,21 ± 0,53
	P0/PTX/CFA EAN	4,18 ± 0,51	16,87 ± 2,52	25,86 ± 3,62	4,61 ± 2,32	2,33 ± 1,13	8,43 ± 2,28	41,76 ± 6,45	7,07 ± 4,03	7,34 ± 2,16	24,58 ± 4,29	33,46 ± 2,95	11,13 ± 4,17
	Δ EAN - Kontrolle	0,82	11,70	22,32	4,10	-3,52	1,60	37,78	6,28	-3,25	9,43	23,82	6,92
TLR9	PTX/CFA Kontrolle	1,03 ± 0,36	4,79 ± 0,44	2,34 ± 0,30	2,66 ± 0,61	2,33 ± 0,33	4,83 ± 0,60	3,68 ± 0,41	2,16 ± 0,48	3,20 ± 0,66	7,94 ± 1,85	1,76 ± 0,40	6,97 ± 2,27
	P0/PTX/CFA EAN	2,78 ± 0,42	4,50 ± 0,81	2,12 ± 0,28	2,43 ± 0,37	3,54 ± 0,69	6,08 ± 1,26	2,38 ± 0,38	3,65 ± 0,43	2,30 ± 0,27	7,76 ± 2,09	2,12 ± 0,93	3,25 ± 1,12
	Δ EAN - Kontrolle	1,75	-0,29	-0,22	-0,23	1,21	1,25	-1,30	1,49	-0,90	-0,18	0,36	-3,72
TLR11	PTX/CFA Kontrolle	3,40 ± 1,37	7,96 ± 1,02	3,96 ± 0,96	2,16 ± 0,70	2,43 ± 0,19	3,26 ± 0,40	2,58 ± 0,34	2,06 ± 1,21	5,17 ± 0,89	10,66 ± 1,81	6,80 ± 0,95	6,16 ± 1,26
	P0/PTX/CFA EAN	10,66 ± 1,18	18,72 ± 4,35	10,54 ± 2,58	3,20 ± 0,88	5,10 ± 0,90	3,12 ± 0,49	5,12 ± 0,86	2,40 ± 0,15	8,50 ± 1,07	13,22 ± 1,73	17,13 ± 2,65	4,88 ± 0,77
	Δ EAN - Kontrolle	7,26	10,76	6,58	1,04	2,67	-0,14	2,54	0,34	3,33	2,56	10,33	-1,28
TLR12	PTX/CFA Kontrolle	8,27 ± 4,79	11,67 ± 5,06	5,84 ± 1,81	4,63 ± 0,99	1,69 ± 0,66	3,01 ± 0,67	2,56 ± 0,32	2,90 ± 0,36	4,87 ± 0,82	8,42 ± 2,12	3,70 ± 0,52	5,37 ± 0,75
	P0/PTX/CFA EAN	8,64 ± 0,44	13,90 ± 3,74	10,44 ± 1,91	4,55 ± 0,53	4,03 ± 1,05	1,98 ± 0,50	3,74 ± 0,38	2,63 ± 0,63	6,56 ± 1,26	10,18 ± 1,63	12,78 ± 3,01	4,23 ± 0,92
	Δ EAN - Kontrolle	0,37	2,23	4,60	-0,08	2,34	1,03	1,18	-0,27	1,69	1,76	9,08	-1,14
MyD88	PTX/CFA Kontrolle	1,13 ± 0,39	1,68 ± 0,62	1,40 ± 0,19	2,00 ± 0,47	5,87 ± 0,91	3,04 ± 0,92	3,46 ± 0,46	2,83 ± 0,37	7,85 ± 1,25	6,43 ± 0,58	7,24 ± 2,35	3,40 ± 1,39
	P0/PTX/CFA EAN	2,83 ± 1,30	5,33 ± 0,82	4,88 ± 1,06	4,38 ± 1,73	5,26 ± 1,13	9,46 ± 1,55	11,96 ± 3,07	11,50 ± 5,95	7,19 ± 4,04	10,84 ± 2,14	16,58 ± 3,22	11,63 ± 4,84
	Δ EAN - Kontrolle	1,70	3,65	3,48	2,38	-0,61	6,42	8,50	8,67	-0,66	4,41	13,36	8,23
CD14	PTX/CFA Kontrolle	10,38 ± 1,74	14,56 ± 4,18	12,00 ± 3,04	15,80 ± 0,17	22,26 ± 4,59	12,77 ± 3,07	12,98 ± 2,06	15,50 ± 0,29	26,20 ± 1,10	18,09 ± 3,58	20,31 ± 1,29	19,05 ± 0,69
	P0/PTX/CFA EAN	9,90 ± 1,14	14,54 ± 1,38	10,94 ± 2,98	11,07 ± 2,04	14,21 ± 3,94	15,77 ± 2,89	18,37 ± 1,44	14,34 ± 1,00	39,24 ± 7,17	31,59 ± 4,15	23,10 ± 3,43	18,51 ± 1,74
	Δ EAN - Kontrolle	-0,48	-0,02	-1,06	-4,73	-8,05	3,00	5,39	-1,16	13,04	13,50	2,79	-0,54
IL-17A	PTX/CFA Kontrolle	13,93 ± 0,22	16,99 ± 0,93	13,66 ± 0,38	9,30 ± 3,15	12,69 ± 1,77	14,02 ± 1,31	12,28 ± 0,62	8,45 ± 2,51	17,95 ± 0,54	18,76 ± 1,23	13,66 ± 0,59	9,60 ± 1,49
	P0/PTX/CFA EAN	18,16 ± 1,20	24,10 ± 2,68	16,70 ± 2,67	14,48 ± 1,04	23,00 ± 2,14	26,12 ± 2,92	16,42 ± 2,88	12,95 ± 0,60	16,24 ± 0,77	20,86 ± 2,65	13,04 ± 2,01	13,75 ± 0,75
	Δ EAN - Kontrolle	4,23	7,11	3,04	5,18	10,31	12,1	4,14	4,5	-1,71	2,1	-0,62	4,15

Tabelle 11: Prozentuale Anteile von TLRs, MyD88 und IL-17A von T-Zellen und APCs während des EAN-Verlaufes.

<b>Gen</b>	<b>fold change</b>	<b>p-Wert</b>
<b>TLR2</b>	<b>1,72</b>	<b>0,05</b>
<b>TLR4</b>	<b>2,01</b>	<b>0,04</b>
<b>TLR6</b>	<b>2,53</b>	<b>0,02</b>
<b>TLR9</b>	<b>1,21</b>	<b>0,69</b>
<b>MyD88</b>	<b>0,84</b>	<b>0,53</b>

**Tabelle 12: Relative Änderung (Fold change) der Gen-Expression von TLRs und MyD88 normalisiert zur GAPDH-Expression im Blut von GBS-Patienten.**

## 7. Publikationen

Gries M., Davies L., Liu Y., Spiegel J., Dillmann U., Hartmann T., Fassbender K. and Walter S. 2012. Response of Toll-like Receptors in Experimental Guillain-Barré-Syndrome: a Kinetic Analysis. *Neuroscience Letters* 518 (2012) 154-160.

Gries M., Davies L., Liu Y., Spiegel J., Dillmann U., Hartmann T., Fassbender K. and Walter S. 2012. CD14 in Experimental Autoimmune Neuritis. Manuskript angefertigt.

Schuster A., Schwab T., Nguyen T.D., Nguyen T.N., Gries M., Fassbender K. and Schäfer K-H. 2012. Maintenance of “Stemcellness” in the Enteric Nervous System - Role of Bacterial Lipopolysaccharides. *Stem Cells*. Manuskript eingereicht.

ASM deficiency and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Manuskript in der Vorbereitung, in Kooperation mit Prof. Dr. Erich Gulbins des Universitätsklinikums Essen, Institut für Molekularbiologie.

## 8. Kooperationen

	Titel	Personen und Aufgabe	
Abbildung 1	Schematische Darstellung der pathophysiologischen Vorgänge bei der EAN.	Manuela Gries: Silke Walter:	Konzeption Kritische Durchsicht
Abbildung 2	TLR-Signalweg (modifiziert nach Akira und Takeda, 2004).	Manuela Gries:	Konzeption
Abbildung 3	Klinische Scorewerte von EAN (P0/PTX/CFA)- und Kontroll-(PTX/CFA)-Mäusen (C57B6/J) während des EAN-Krankheitsverlaufes.	Manuela Gries: Nadine Commercon: Andrea Schottek:	Konzeption, Beurteilung der klinischen Scorewerte Beurteilung der klinischen Scorewerte Hilfestellung bei Immunisierung
Abbildung 4	Gewichte von EAN- (P0/PTX/CFA) und Kontroll-(PTX/CFA)-Mäusen (C57B6/J) während des EAN-Krankheitsverlaufes.	Manuela Gries: Nadine Commercon: Andrea Schottek:	Konzeption, Beurteilung der klinischen Scorewerte Beurteilung der klinischen Scorewerte Hilfestellung bei Immunisierung
Abbildung 5	Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Nervus ischiadicus von EAN-Mäusen (C57B6/J) während des Krankheitsverlaufes.	Manuela Gries: Nadine Commercon: Tobias Hartmann:	Konzeption, Durchführung Hilfestellung bei der Erstdurchführung Kritische Beurteilung
Abbildung 6	Luxol-Fast-Blau-Perjodsäure-Färbung (LFB-PAS) des Nervus ischiadicus von EAN-Mäusen (C57B6/J) während des Krankheitsverlaufes.	Manuela Gries: Nadine Commercon: Tobias Hartmann: Laura Davies:	Konzeption, Durchführung Hilfestellung bei der Erstdurchführung Kritische Beurteilung Praktische Hilfestellung
Abbildung 7	Silberimprägnierung des Nervus ischiadicus nach Bielschowsky von EAN-Mäusen (C57B6/J) während des Krankheitsverlaufes.	Manuela Gries:	Konzeption, Durchführung
Abbildung 8	Expression des T-Zellrezeptors (TCR) auf T-Lymphozyten und Expression des MHC-KlasseII-Komplexes in murinen Lymphknotenzellen während des EAN-Krankheitsverlaufes.	Manuela Gries: Nadine Commercon:	Konzeption, Durchführung Hilfestellung bei der Erstdurchführung

	Titel	Personen und Aufgabe	
Abbildung 9	Expression der ko-stimulatorischen Moleküle, CD80 und CD86, und ihrer entsprechenden Rezeptoren, CD28 und CTLA-4, während des EAN-Krankheitsverlaufes in Maus-Lymphozyten, mittels Durchflusszytometrie auf Proteinebene erfasst.	Manuela Gries:	Konzeption, Durchführung
Abbildung 10	Basale Expressionen von TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, TLR9, TLR11, TLR12, CD14 und MyD88 auf T-Lymphozyten und APCs in Lymphknotenzellen von PTX/CFA-Kontroll-Mäusen (C57B6/J).	Manuela Gries:	Konzeption, Durchführung
Abbildung 11	TLR2-Expression auf Protein-Ebene in Lymphknotenzellen während der EAN und auf mRNA-Ebene im Blut von GBS-Patienten in Korrelation zu klinischen Symptomen.	Manuela Gries: Maryse Letiembre:	Konzeption, Durchführung Hilfestellung bei der Erstdurchführung
Abbildung 12	TLR6-Expression auf Protein-Ebene in murinen Lymphknotenzellen während der EAN und auf mRNA-Ebene im Blut von GBS-Patienten in Korrelation zu klinischen Symptomen.	Manuela Gries:	Konzeption, Durchführung
Abbildung 13	TLR4-Expression auf Protein-Ebene in murinen Lymphknotenzellen während der EAN und auf mRNA-Ebene im Blut von GBS-Patienten in Korrelation zu klinischen Symptomen.	Manuela Gries:	Konzeption, Durchführung
Abbildung 14	TLR11-Expression auf Protein-Ebene in murinen Lymphknotenzellen während der EAN.	Manuela Gries: Armin Bachhuber:	Konzeption, Durchführung Hilfestellung
Abbildung 15	TLR1-Expression auf Protein-Ebene in murinen Lymphknotenzellen während der EAN.	Manuela Gries:	Konzeption, Durchführung
Abbildung 16	MyD88-Expression auf Protein-Ebene in murinen Lymphknotenzellen während der EAN.	Manuela Gries: Maryse Letiembre:	Konzeption, Durchführung Hilfestellung bei der Erstdurchführung

	Titel	Personen und Aufgabe	
Abbildung 17	IL-17A-Expression auf Protein-Ebene in murinen Lymphknotenzellen während der EAN.	Manuela Gries:	Konzeption, Durchführung
Abbildung 18	CD14-Immunhistochemie auf Kryoschnitten des Nervus ischiadicus von EAN-Mäusen (C57B6/J) an Tag 13 p.i.	Manuela Gries: Tobias Hartmann:	Konzeption, Durchführung Kritische Beurteilung
Abbildung 19	CD14-Expression auf Protein-Ebene in murinen Lymphknotenzellen während der EAN.	Manuela Gries:	Konzeption, Durchführung
Abbildung 20	Durchschnittliche klinische Scorewerte von CD14-/-Mäusen und C57B6/J-Kontrollmäusen während des EAN-Krankheitsverlaufes.	Manuela Gries:	Konzeption, Durchführung
Abbildung 21	Gewichtsverlauf von CD14-defizienten und Wildtyp-EAN-(P0/PTX/CFA)-Mäusen (C57B6/J) während des EAN-Krankheitsverlaufes.	Manuela Gries:	Konzeption, Durchführung
Abbildung 22	Neurographische Messungen des Nervus ischiadicus von EAN (P0/PTX/CFA)- und Kontroll (PTX/CFA)-Mäusen (C57B6/J) an d20 p.i. der Erkrankung bei supramaximaler Reizstärke (> 25mA, 200µs).	Manuela Gries: Jörg Spiegel: Ulrich Dillmann: Silke Walter: Klaus Fassbender:	Konzeption, Durchführung Einführung neurographische Messungen Einführung neurographische Messungen Kritische Beurteilung Kritische Beurteilung
Abbildung 23	Neurographische Messungen des Nervus ischiadicus von CD14-defizienten EAN (P0/PTX/CFA)- und Kontroll-(PTX/CFA)-Mäusen an d20 p.i. der Erkrankung bei supramaximaler Reizstärke (> 25mA, 200µs).	Manuela Gries: Jörg Spiegel: Ulrich Dillmann: Silke Walter: Klaus Fassbender:	Konzeption, Durchführung Einführung neurographische Messungen Einführung neurographische Messungen Kritische Beurteilung Kritische Beurteilung
Abbildung 24	F-Wellen-Latenzzeit des Nervus ischiadicus von CD14-defizienten- vs. Wildtyp-(C57B6/J) EAN-Mäusen nach supramaximaler Reizung (0,2ms je Einzelpuls) gemessen mittels Neurographie.	Manuela Gries: SilkeWalter:	Konzeption, Durchführung Beurteilung der F-Wellen

	Titel	Personen und Aufgabe	
Abbildung 25	Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Nervus ischiadicus von CD14-defizienten und C57B6/J-Wildtyp-Mäusen während des EAN-Krankheitsverlaufes.	Manuela Gries:	Konzeption, Durchführung
Abbildung 26	Luxol-Fast-Blau-Perjodsäure (LFB-PAS) –Färbung des Nervus ischiadicus von CD14-defizienten und C57B6/J-Wildtyp-Mäusen während des EAN-Krankheitsverlaufes.	Manuela Gries:	Konzeption, Durchführung
Abbildung 27	Immunhistochemie des Nervus ischiadicus auf Kryoschnitten von CD14-defizienten und Wildtyp-Mäusen (C57B6/J) am Peak der Erkrankung.	Manuela Gries: Nadine Commercon:	Konzeption, Durchführung Hilfestellung bei der Erstdurchführung
Abbildung 28	Immunhistochemie des Nervus ischiadicus auf Kryoschnitten von CD14-defizienten und Wildtyp-Mäusen (C57B6/J) am Peak der Erkrankung.	Manuela Gries: Nadine Commercon:	Konzeption, Durchführung Hilfestellung bei der Erstdurchführung
Abbildung 29	Adhäsionsexperimente mit bEnd3-Zellen und antigenspezifischen T-Zellen von P0-immunisierten (P0/PTX/CFA) und gesunden Wildtyp- und CD14-defizienten Mäusen an d15 p.i. der EAN (n=3).	Manuela Gries: Nadine Commercon: Ramona Halmer:	Konzeption, Durchführung Hilfestellung bei der Erstdurchführung Kultivierung der bEnd3-Zellen
Abbildung 30	Mikroskopische Aufnahme Adhäsionsexperimente mit bEnd3-Zellen und antigenspezifischen T-Zellen von P0-immunisierten (P0/PTX/CFA) und gesunden Wildtyp- und CD14-defizienten Mäusen an d15 p.i. der EAN (n=3).	Manuela Gries: Nadine Commercon: Ramona Halmer:	Konzeption, Durchführung Hilfestellung bei der Erstdurchführung Mikroskopische Auswertung
Abbildung 31	Transmigrationsexperimente mit bEnd3-Zellen und antigenspezifischen T-Zellen von P0-immunisierten (P0/PTX/CFA) und gesunden Wildtyp- und CD14-defizienten Mäusen an d15 p.i. der EAN (n=3).	Manuela Gries: Nadine Commercon: Ramona Halmer:	Konzeption, Durchführung Hilfestellung bei der Erstdurchführung Kultivierung der bEnd3-Zellen
Abbildung 32	FACS-Analysen der TLR-, MyD88- und IL-17A-Expressionen in Lymphknotenzellen von EAN-Mäusen.	Manuela Gries:	Konzeption, Durchführung

	Titel	Personen und Aufgabe	
Tabelle 1	Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden.	Manuela Gries:	Konzeption, Durchführung
Tabelle 2	Entwicklung einer EAN von mit P0aa180-199 immunisierten oder PBS behandelten C57Bl6/J-Mäusen.	Manuela Gries: Nadine Commercon: Andrea Schottek:	Konzeption, Beurteilung der klinischen Scorewerte Beurteilung der klinischen Scorewerte Hilfestellung bei Immunisierung
Tabelle 3	Regulation angeborener Immun-Rezeptoren und T-Zellen auf Protein-Ebene während des EAN-Krankheitsverlaufes.	Manuela Gries: Silke Walter: Maryse Letiembre:	Konzeption, Durchführung Kritische Beurteilung Kritische Beurteilung
Tabelle 4	Anzahl TLR-positiver infiltrierter Zellen im Nervus ischiadicus von EAN-Mäusen (C57B6/J) an d20 p.i. der Erkrankung (n=3).	Manuela Gries:	Konzeption, Durchführung
Tabelle 5	Latenzzeiten und Persistenz von F-Wellen von CD14-defizienten- und Wildtyp-Mäusen mittels Neurographie bei supramaximaler Reizstärke (> 25mA, 200µs).	Manuela Gries: Silke Walter:	Konzeption, Durchführung Hilfestellung bei Auswertung
Tabelle 6	Latenzzeiten und Persistenz von A-Wellen von CD14-defizienten- und Wildtyp-Mäusen mittels Neurographie bei supramaximaler Reizstärke (> 25mA, 200µs).	Manuela Gries: Silke Walter:	Konzeption, Durchführung Hilfestellung bei Auswertung
Tabelle 7	Anzahl adhärierter antigenspezifischer T-Zellen an mit TNFα (24h, 100u) stimulierte bEnd3-Zellen an d15 p.i. der EAN.	Manuela Gries:	Konzeption, Durchführung
Tabelle 8	Anzahl migrierter antigenspezifischer T-Zellen durch einen mit TNFα (24h, 100u) stimulierten bEnd3-Rasen an d15 p.i. der EAN.	Manuela Gries:	Konzeption, Durchführung
Tabelle 9	Prozentuale Anteile der in die Antigenpräsentation involvierten Moleküle auf T-Zellen und APCs während dem EAN-Verlauf.	Manuela Gries:	Konzeption, Durchführung

	Titel	Personen und Aufgabe	
Tabelle 10	Prozentuale Anteile der TLR-, CD14 und MyD88-Basalexpression von T-Zellen und APCs in Lymphknoten von C57B6/J-Mäusen.	Manuela Gries:	Konzeption, Durchführung
Tabelle 11	Prozentuale Anteile von TLRs, MyD88 und IL-17A von T-Zellen und APCs während des EAN-Verlaufes.	Manuela Gries:	Konzeption, Durchführung
Tabelle 12	Relative Änderung (Fold change) der Gen-Expression von TLRs und MyD88 normalisiert zur GAPDH-Expression im Blut von GBS-Patienten.	Manuela Gries:	Konzeption, Durchführung
Manuskript Doktorarbeit	Die Bedeutung angeborener Immunrezeptoren beim experimentellen Guillain-Barré-Syndrom	Manuela Gries: Tobias Hartmann: Klaus Fassbender: Silke Walter: Maryse Letiembre: Sarah Williams	Verfasser Kritische Durchsicht Kritische Durchsicht Kritische Durchsicht Kritische Durchsicht Englische Übersetzung der Zusammenfassung
Tierantrag	EAN in Innate Immunity defizienten Mäusen	Manuela Gries: Silke Walter: Yang Liu:	Projektleiter, Verfasser Stellvertreter, Kritische Durchsicht Kritische Durchsicht
Manuskript Gries et al., 2012:	Response of Toll-like Receptors in Experimental Guillain-Barré syndrome: a Kinetic Analysis	Manuela Gries: Laura Davies: Silke Walter: Yang Liu: Armin Bachhuber: Tobias Hartmann: Klaus Fassbender:	Erstautor Kritische Durchsicht Kritische Durchsicht Kritische Durchsicht Kritische Durchsicht Kritische Durchsicht Kritische Durchsicht

## 9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Klaus Faßbender danke ich sehr herzlich für die Überlassung des äußerst interessanten Themas und des Arbeitsplatzes. Er gestaltete für mich Rahmenbedingungen, die ganz wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beitrugen.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Tobias Hartmann für seine Unterstützung, Ratschläge und kritischen Fragen meine Arbeit betreffend und für seine Bereitschaft, mich als Doktorandin zu betreuen.

Insbesondere danke ich Frau Dr. med. Silke Walter für ihre uneingeschränkte Hilfe, die Betreuung, Anleitung und Korrekturlektüre der Arbeit. Ihre unermüdliche Geduld, Vertrauen und bedingungslose Unterstützung haben in sehr großem Maße zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich bedanke mich bei all meinen Kollegen im Labor der AG Fassbender sowie der AG Diem und AG Hartmann für das angenehme Arbeitsklima sowie bei allen Kooperationspartnern für ihre Hilfe.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich ganz besonders bei Frau Dr. rer. nat. Maryse Letiembre bedanken, die mir in allen praktischen und auch theoretischen Fragestellungen und Problemen mit ihrer wissenschaftlichen Fachkompetenz und Diskussionsbereitschaft immer geduldig weiter geholfen und mich unterstützt hat.

Des Weiteren möchte ich explizit Frau Nadine Commercon, Frau Andrea Schottek und Frau Ramona Halmer erwähnen. Ich bin ihnen für ihre freundliche und professionelle Einarbeitung in die notwendige Methodik äußerst dankbar. Ihre ständige Unterstützung und Hilfsbereitschaft haben wesentlich zum Erfolg meiner Arbeit beigetragen.

Gesondert bedanke ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Williams für ihre Hilfe bei der englischen Übersetzung der Zusammenfassung.

Ferner möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Jörg Spiegel sowie Herrn Prof. Dr. Dillmann für die freundliche und kompetente Einweisung und Hilfe am Elektromyographen bedanken.

Ich möchte mich außerdem bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester bedanken, die mir während dieser Arbeit zur Seite gestanden haben und immer an mich geglaubt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann, der mich bereits seit meinem Studium bis zur Anfertigung dieser Doktorarbeit liebevoll unterstützt und mir den Rücken gestärkt hat. Für seine Geduld, Motivation sowie Unterstützung jeglicher Art, in guten wie in schlechten Tagen, bin ich ihm sehr dankbar.

## 10. Curriculum vitae

### Persönliche Daten

Vor- und Zuname: Manuela Gries, geb. Hauck  
 Geburtsdatum: 08. Juli 1980  
 Geburtsort: Landstuhl  
 Anschrift: In den Dorfwiesen 37  
 66919 Hermersberg  
 Familienstand: verheiratet  
 Kinder: Leonie Gries (9 Monate)

### Schulbildung

Sep. / 1986 – Juni / 1990 Besuch der Grundschule in Weselberg  
 Aug. / 1990 – Juni / 2000 Besuch des Sickingen Gymnasiums in Landstuhl  
 Juni / 2000 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

### Hochschulbildung

Okt. / 2000 – Aug. / 2005 Studium der Biologie an der Technischen Universität  
 Kaiserslautern  
 Diplomarbeit in der Abteilung Genetik zum Thema:  
 Untersuchungen zur Replikation des linearen Plasmides SCP1  
 aus *Streptomyces coelicolor* A(3)2  
 Abschluss: Diplom- Biologin

### Berufliche Erfahrung

Apr. / 2006 – Apr. / 2008 Diplom- Biologin am Prüf- und Forschungsinstitut Pirmasens  
 e.V.  
 Apr. / 2008 – Sep. / 2011 Naturwissenschaftliche Doktorandin an der Universität des  
 Saarlandes, Neurologische Klinik  
 seit Sep. / 2011 Elternzeit

## **11. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Homburg, den

---

Manuela Gries