

Aus der Neurologischen Klinik
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Faßbender)

**Die Rolle des TLR4 in der
Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis,
dem Tiermodell der Multiplen Sklerose**

Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2015

vorgelegt von:

Mareva Ciatipis
geb. am: 21.07.1980 in Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 ZUSAMMENFASSUNG	3
2 EINLEITUNG	5
2.1 Multiple Sklerose	5
2.1.1 Epidemiologie	5
2.1.2 Ätiologie.....	5
2.1.3 Klinik.....	6
2.1.4 Diagnostik	8
2.1.5 Therapie.....	9
2.2 Theoretische Grundlagen und aktueller Forschungsstand	10
2.2.1 Pathophysiologie	10
2.2.2 Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis.....	11
2.2.3 Die Blut-Hirn-Schranke	12
2.2.4 Einwanderung von T-Zellen in das Hirnparenchym.....	13
2.3 Das Immunsystem	15
2.3.1 Die Bedeutung des angeborenen Immunsystems.....	15
2.3.2 Toll-like Rezeptoren.....	16
2.3.3 Toll-like Rezeptor 4	18
2.4 Zielsetzung	19
3 MATERIAL UND METHODEN.....	20
3.1 Geräte	20
3.2 Medien und Zusatzstoffe	20
3.3 Endothelzellen.....	21
3.4 Versuchstiere.....	21

3.5	Tierexperimentelle Methoden	22
3.5.1	Induktion der aEAE und Versuchsaufbau	22
3.5.2	Klinischer Verlauf der EAE	23
3.5.3	Präparation von Lymphknoten	24
3.6	Zellkultur und Zellbiologische Methoden	24
3.6.1	Medien und Gebrauchslösungen	24
3.6.2	Endothelzellkultur	25
3.6.3	Herstellung einer Lymphknoten-Zellsuspension	26
3.6.4	Adhäsionsassay	27
3.6.5	Transmigrationsassay	28
3.6.6	FACS-Analyse	29
3.6.7	Fixierung und Färbung der Insert-Membran	30
3.7	Statistische Auswertung	30
4	ERGEBNISSE	31
4.1	Klinischer Verlauf der aEAE bei Tlr4 ^{Lps-d} -Mäusen <i>in vivo</i>	31
4.2	Adhäsionsfähigkeit von Tlr4 ^{Lps-d} -Lymphozyten an bEND.3 Endothelzellen <i>in vitro</i>	34
4.3	Transmigrationsfähigkeit von Tlr4 ^{Lps-d} -Lymphozyten an bEND.3 Endothelzellen <i>in vitro</i>	36
5	DISKUSSION	38
6	LITERATURVERZEICHNIS	42
7	DANKSAGUNG	51

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APC	Antigenpräsentierende Zelle
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CAM	Cellular Adhesion Molecule
CFA	Complete Freund-Adjuvans
DAMP	Damage Associated Molecular Pattern
dsRNA	Doppelstrang-RNA
DSS	Disability Status Scale
ED	Encephalitis disseminata
EDSS	Expanded Disability Status Scale
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
aEAE	aktive Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
pEAE	passive Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
FCS	Fetales Kälberserum
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IL	Interleucin
KIS	Klinisch isoliertes Syndrom
LBP	LPS-binding-protein
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucine Rich Repeats
MBP	Myelin Basisches Protein
MD2	Myeloid Differentiation Factor 2
MEP	Motorisch Evozierte Potentiale
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
OCT	Optische Kohärenztomographie
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PLP	Proteinlipidprotein
PPMS	Primär Progrediente MS
PRR	Pattern Recognition Receptor

PTX	Pertussis Toxin
RRMS	Relapsing-Remitting MS
SEP	Sensible Evozierte Potentiale
SPMS	Sekundär Progrediente MS
ssRNA	Einzelstrang-RNA
TIR-Domain	Toll/IL-1 Receptor Domain
TLR	Toll-like Rezeptor
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEP	Visuell Evozierte Potentiale
wt	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Multiple Sklerose ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des Zentralnervensystems mit meist schubförmigem Verlauf. Sie manifestiert sich entsprechend der Lokalisation der disseminierten Läsionen mit verschiedenen Symptomen in unterschiedlicher Ausprägung. Die Ätiologie der Multiplen Sklerose ist bis heute nicht vollständig geklärt. Es werden autoimmunologische Prozesse, Genetik und verschiedene Umwelteinflüsse diskutiert. Pathophysiologisch kommt es zur Einwanderung von aktivierten T-Zellen über die normalerweise undurchlässige Blut-Hirn-Schranke in das zentrale Nervensystem. Wie genau es zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke kommt, ist unklar. Im zentralen Nervensystem angelangt, führen Makrophagen und Mikroglia zur weiteren Aktivierung und Proliferation der Lymphozyten. Diese Entzündungsreaktion gipfelt in der Destruktion und im narbigen Umbau von Myelinscheiden und Neuronen.

Eine wesentliche Rolle bei der Initiierung einer Immunreaktion spielt das angeborene Immunsystem. Hierbei sind die Toll-like-Rezeptoren von entscheidender Bedeutung. Sie erkennen bestimmte Strukturen von Erregern sowie spezifische körpereigene Substanzen. Durch eine Rezeptor-Aktivierung kann eine Immunreaktion ausgelöst, verstärkt oder moduliert werden. Der Toll-like-Rezeptor 4 erkennt das Lipopolysaccharid, einen integralen Bestandteil der Membran Gram-negativer Bakterien, und initiiert nach Kontakt mit diesem eine Immunreaktion bis hin zum lebensgefährlichen Endotoxinschock.

In Läsionen des Zentralnervensystems von Multiple Sklerose-Patienten konnte eine erhöhte Expression des Toll-like-Rezeptor 4 nachgewiesen werden. Im Tiermodell der Multiplen Sklerose, der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis, wurde dem Toll-like-Rezeptor 4 mehrfach eine Rolle in der Erkrankungsmanifestation zugesprochen.

Um den Einfluss des Toll-like-Rezeptor 4 in der Manifestation der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis näher zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst der Krankheitsverlauf von Toll-like-Rezeptor 4-defekten C3H/HeJ-Mäusen im Vergleich zu C3H/HeN-Wildtypen im Rahmen einer Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis *in vivo* beobachtet. Des Weiteren wurde die Fähigkeit von isolierten Lymphknotenzellen zur Überwindung einer experimentellen Blut-Hirn-Schranke untersucht. Dafür wurden ein *in vitro* Adhäsions- und Transmigrationsassay mit einer experimentellen Blut-Hirn-Schranke mit Lymphknotenzellen der Toll-like-Rezeptor 4-defekten Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen durchgeführt.

Während der klinischen Beobachtung konnte festgestellt werden, dass sich die Toll-like-Rezeptor 4-defekten Mäuse nach Induktion der Experimentellen Autoimmunen

Enzephalomyelitis sowohl in der Erkrankungshäufigkeit als auch in der Symptompräsentation von den Wildtypen unterschieden. Die Toll-like-Rezeptor 4-Mutanten erkrankten seltener als die Wildtypen und zeigten im Erkrankungsfall ausschließlich Lähmungen der Extremitätenmuskulatur, während die Wildtypen sowohl Lähmungen als auch Gleichgewichtsstörungen präsentierten. In den *in vitro* Assays konnte bis auf eine erhöhte Adhäsionsfähigkeit der Toll-like-Rezeptor 4-defekten Lymphozyten in der klinischen Phase kein Unterschied bei den untersuchten Schritten der Überwindung der experimentellen Blut-Hirn-Schranke (Adhäsion und Transmigration) zwischen den Toll-like-Rezeptor 4-defekten Tieren und den Wildtypen festgestellt werden. Die untersuchten pathophysiologischen Prozesse in den *in vitro* Assays spiegelten die geringere Anfälligkeit der Toll-like-Rezeptor 4-defekten Tiere für die Induktion der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis *in vivo* somit nicht eindeutig wider. Es ist daher weitere Forschung nötig, um die Zusammenhänge besser zu verstehen und ggf. in potenzielle Behandlungsstrategien umzuwandeln.

Dennoch scheint dem Toll-like-Rezeptor 4 in der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis im Hinblick auf die hier aufgeführten Ergebnisse eine Bedeutung zu zukommen.

2 EINLEITUNG

2.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS), auch Encephalitis disseminata (ED) genannt, ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS). Durch entzündliche Prozesse, deren Ursache nicht vollständig geklärt ist, kommt es zur Destruktion und zum narbigen Umbau von Myelin und Neuronen.

2.1.1 Epidemiologie

Weltweit sind ca. zwei Millionen Menschen an MS erkrankt. Die USA zählen zwischen 250.000 und 350.000 Betroffene. In Deutschland leiden ca. 120.000 Patienten an der entzündlichen ZNS-Erkrankung (Flachenecker, 2006). Die MS zählt zu den häufigsten Erkrankungen, die im jungen Erwachsenenalter zu anhaltenden Funktionseinschränkungen führen können (Compston, Coles, 2002). In 70 % der Fälle liegt das Manifestationsalter zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, in selteneren Fällen tritt die Erkrankung auch bereits vor dem 10. oder nach dem 60. Lebensjahr auf. Frauen sind ca. 2,5-mal häufiger betroffen als Männer. Die höchste Prävalenz wurde in Nordeuropa, Nordamerika, Australien und Neuseeland festgestellt (Poser, 1994).

2.1.2 Ätiologie

Die Ätiologie der MS ist bis heute nicht geklärt; es werden autoimmunologische Prozesse, verschiedene Umwelteinflüsse und genetische Prädispositionen diskutiert. Angenommen wird derzeit ein multifaktoriell bedingter Erkrankungsprozess (Ramagopalan et al., 2010). Die geographische Verteilung der MS-Prävalenz zeigt einen deutlichen Bezug zum Breitengrad: die MS-Prävalenz nimmt mit der Nähe zum Äquator ab. Eine Rolle scheint zudem das Alter der Exposition zu spielen: Migranten, welche vor Erreichen der Pubertät auswanderten, nahmen das Erkrankungsrisiko des neuen Landes an; dies galt auch für ihre Nachkommen. Wurde dagegen das Heimatland nach der Pubertät verlassen, zeigten die Migranten das gleiche Erkrankungsrisiko wie die Menschen des Ursprungslandes (Gale, Martyn, 1995;

McLeod et al., 2012). Da die Regionen mit niedriger MS-Prävalenz mit einer höheren Sonnenexposition assoziiert sind, wird Vitamin D, ein sonnenabhängiges Vitamin, als Kofaktor für die Krankheitsmanifestation diskutiert (Weinstock-Guttman et al., 2012): es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass ein erhöhter Vitamin D-Spiegel mit einem erniedrigten Exazerbationsrisiko für die Relapsing-Remitting MS (RRMS) einhergeht (Banwell et al., 2011; Runia et al., 2012). In Anbetracht der geographischen Verteilung der MS-Risikogebiete (Europa sowie frühere europäischen Kolonien wie z.B. Kanada, USA, Australien, Neuseeland und Südafrika) und der MS-Verbreitungsgeschichte werden auch Infektionen u.a. mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) als Auslöser diskutiert (Kurtzke, 1993; Ascherio, Munger, 2007). Die Bedeutung genetischer Faktoren konnte in genetisch epidemiologischen Studien gezeigt werden (Dyment et al., 2004): so sprechen familiäre Häufungen, eine deutlich erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit bei Verwandten ersten Grades von Betroffenen sowie ein erhöhtes Risiko für monozygote im Vergleich zu dizygoten Zwillingen (31% versus 5%) für eine genetische Komponente in der MS-Entwicklung (Sadovnick, Ebers, 1993; Ebers et al., 1995). Das Erkrankungsrisiko adoptierter Kinder scheint hingegen das gleiche wie das der Allgemeinbevölkerung zu sein (Hammond et al., 2000; McLeod et al., 2012). Bis heute wurden keine ursächlichen Gene der MS identifiziert. Es besteht eine Assoziation der MS mit dem Haupt-Gewebekompatibilitäts-Komplex (*major histocompatibility complex*, MHC, oder auch *human leucocyte antigen*, HLA). Jedoch auch andere nicht-HLA Genloci konnten mit der MS in Verbindung gebracht werden (Interleukin-7 Rezeptor α , Interleukin-2 Rezeptor α , CD58, Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor Superfamilienmitglied 1A, Interferon Regulations-Faktor 8, und CD6) (De Jager et al., 2009).

2.1.3 Klinik

Das typische klinische Bild der MS zeigt rezidivierende bzw. schubförmig auftretende Symptome, welche unterschiedlicher Form und Ausprägung sein können. Unter dem Begriff des Schubes versteht man das Auftreten neuer oder das Wiederkehren bereits bekannter klinischer Symptome, welche länger als 24 Stunden anhalten und im zeitlichen Abstand von mindestens 30 Tagen zu vorangegangenen Schüben auftreten. Welche Symptome während eines Schubes auftreten, hängt von der jeweiligen Lokalisation des aktiven Entzündungsherdes im ZNS ab. Durch Entzündungen im Bereich des Sehnervs (z.B. Retrobulbärneuritis) entstehen Sehstörungen, wie z.B. Doppelbilder oder Schleiersehen. Im Bereich der sensiblen Nervenbahnen können Entzündungen zu Sensibilitätsstörungen, wie

Parästhesien, Taubheitsgefühle oder Schmerzen führen. Bei Affektion des motorischen Systems werden Paresen der Extremitätenmuskulatur und Veränderungen des Muskeltonus (z.B. Spastik) beobachtet. Entzündungsherde im Bereich des Hirnstamms oder Kleinhirns führen zu Schwindel, Koordinationsstörungen (z.B. Ataxie), Sprech- und Schluckbeschwerden sowie zu Augenmotilitätsstörungen (z.B. Doppelbilder oder Nystagmen). Ist das vegetative Nervensystem betroffen, sind Blasen- und Darmfunktionsstörungen sowie sexuelle Funktionseinschränkungen möglich. Kognitive und psychische Symptome werden apparent durch Störungen des Affekts (z.B. Depression) bis hin zur subkortikalen Demenz im späten Stadium der MS. Im Verlauf der Erkrankung kann zudem eine gesteigerte allgemeine körperliche und psychische Ermüdbarkeit (Fatigue) beobachtet werden (Flachenecker et al., 2002).

Es werden folgende Verlaufsformen der MS unterschieden:

- Das *klinisch isolierte Syndrom* (KIS, engl.: CIS) bezeichnet eine erstmalig festgestellte Funktionseinschränkung. Ist zu diesem Zeitpunkt bereits eine Läsion innerhalb des ZNS kernspintomographisch nachweisbar, besteht bereits das erhöhte Risiko, eine manifeste MS zu entwickeln (Brex et al., 2002; Swanton et al., 2009).
- Der schubförmige Verlauf der *Relapsing-Remitting MS* (RRMS) stellt mit ca. 80% die häufigste Ausprägung der MS dar. Die Symptome entstehen über mehrere Tage, stabilisieren und verbessern sich spontan oder nach Gabe von Steroiden innerhalb von Wochen.
- In ca. 50 % der Fälle wird nach mehreren Jahren eine progrediente Zunahme der neurologischen Beeinträchtigungen beobachtet, welche von zusätzlichen Schüben begleitet werden kann. Hier spricht man von der *Sekundär-Progressiven Form der MS* (SPMS).
- Ca. 10% der Betroffenen entwickeln eine *Primär-Progressive MS* (PPMS), wobei sich von Beginn an ein progredienter Verlauf ohne Schübe zeigt.

Zur Quantifizierung der Funktionseinschränkungen entwickelten Kurtzke et al. 1955 die *Disability Status Scale* (DSS). Diese wurde nach einigen Änderungen 1983 zur heute gebräuchlichen *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) weiterentwickelt. Hiernach wird das ZNS in 7 funktionelle Gruppen eingeteilt (Tabelle 1). In jeder Gruppe werden entsprechend der Schwere der Symptome Punkte von 0 – 10 vergeben. Die erreichte Punktzahl gibt Aufschluss über die funktionelle Beeinträchtigung des MS-Patienten insgesamt (Kurtzke, 1983).

Tabelle 1: Einteilung des ZNS in 7 Funktionsgruppen gemäß EDSS

Funktionsgruppe	Funktionseinschränkungen	Punkte
Pyramidenbahn	z.B. Lähmungen	1 - 10
Kleinhirn	z.B. Ataxie, Tremor, Gleichgewichtsstörungen	1 - 10
Hirnstamm	z.B. Sprach-/Schluckstörungen	1 - 10
Sensorium	z.B. Verminderung des Berührungssinns	1 - 10
Blasen-und Mastdarmfunktion	z.B. Harn- bzw. Stuhlinkontinenz	1 - 10
Sehfunktionen	z.B. eingeschränktes Gesichtsfeld-Skotom	1 - 10
Zerebrale Funktionen	z.B. Wesensveränderung, Demenz	1 - 10

Für jede Funktionsgruppe (linke Spalte) werden die auftretenden Symptome im Erkrankungsfall (Beispiele: mittlere Spalte) nach ihrer Ausprägung mit einem Punktwert quantifiziert (rechte Spalte).

2.1.4 Diagnostik

Zur Diagnostik der MS kommen die nach ihrem Erstbeschreiber benannten McDonald-Kriterien zur Anwendung. Die 2001 vom *International Panel on MS Diagnosis* erarbeiteten und 2005 sowie 2010 weiterentwickelten Kriterien zur Diagnosefindung der MS berücksichtigen die räumliche und zeitliche Dissemination von ZNS-Läsionen in der klinischen Präsentation und der kernspintomographischen Bildgebung (McDonald et al., 2001; Polman et al., 2005; Polman et al., 2011). Die aktualisierten McDonald-Kriterien helfen zu einer schnelleren Diagnosefindung bei Patienten mit einem klinisch isolierten Syndrom durch vereinfachte Interpretation einer Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) nach dem Vorschlag der *MAGNIMS Research Group* (Swanton et al., 2007; Rovira et al., 2009). Hierbei kann ggf. durch ein einziges MRT die zeitliche und räumliche Dissemination erkannt und so die Diagnose MS bereits in einem frühen Stadium gestellt werden (Montalban et al., 2010). Die Liquoranalyse geht zwar nur noch am Rande in die McDonald-Kriterien ein, ist aber nach wie vor ein integraler Bestandteil der Diagnosefindung. Sie liefert zusätzliche Informationen über erregerbedingte Entzündungen, erhärtet die Verdachtsdiagnose einer Grunderkrankung mit inflammatorischem Charakter oder gibt Hinweise auf eine alternative Diagnose (Freedman et al., 2005; Miller et al., 2008). Die elektrophysiologisch evozierten Potentiale (visuell evozierte Potentiale, VEP; somatosensibel evozierte Potentiale, SSEP; motorisch

evozierte Potenziale, MEP) gehen nicht mehr in die neuen Kriterien der MS-Diagnostik ein, können aber erste Hinweise auf eine Funktionseinschränkung geben oder als Prädiktoren dienen (Margaritella et al., 2011; Schlaeger et al., 2012). Die optische Kohärenztomografie (OCT) gewinnt als neues diagnostisches Verfahren zunehmend an Bedeutung. Hierbei können neurodegenerative Prozesse der Retina objektiviert werden (Frohman et al., 2008).

2.1.5 Therapie

Bis heute ist die MS nicht ursächlich therapierbar. Die aktuellen Behandlungsmöglichkeiten lassen sich in die akute Schubtherapie, die immunmodulierende Basistherapie sowie eine symptomatische Therapie gliedern. Im akuten Schub ist die intravenöse oder orale Gabe von hochdosiertem Methylprednisolon die Therapie der Wahl (Sellebjerg et al., 2005). Hohe Kortison-Dosen verkürzen die Schubdauer durch Suppression der Entzündungsreaktion auf zellulärer und humoraler Ebene sowie durch Restauration der Blut-Hirn-Schranke. Bei Unwirksamkeit ist die Durchführung einer Plasmapherese möglich.

Für die Langzeit- bzw. Basistherapie des CIS, der RRMS und SPMS stehen Immunmodulatoren wie Interferon β (1a, 1b) und Glatirameracetat (nur für CIS und RRMS) zur Verfügung. Diese dienen in erster Linie der Reduktion von Häufigkeit und Schwere der Schübe. Beide Therapeutika regulieren die Immunzellen, Verringern die Passage der BHS und hemmen die Entzündungsreaktion (Ramgolam et al., 2009; Praksova et al., 2012). Als Eskalationstherapie der RRMS wird bei Versagen der Basistherapeutika Natalizumab, ein α 4-Integrin-Inhibitor, und Fingolimod, ein Modulator der Sphingosin-1-Phosphat Rezeptoren, empfohlen. Seit 2013 bzw. 2014 stehen zudem neuere verlaufsmodifizierende Medikamente zur Erstbehandlung der RRMS zur Verfügung: Alemtuzumab, ein humanisierter monoklonaler Anti-CD52-Antikörper (Coles et al., 2012), Teriflunomid, ein Dihydroorotat-Dehydrogenase-Inhibitor, der die Proliferation von Lymphozyten reduziert (O'Connor et al., 2011) sowie Dimethylfumarat, ein Medikament das das Immunsystem hauptsächlich über eine Aktivierung des Nrf2-Transkriptionsweges zu beeinflussen scheint (Gold et al., 2012). In besonders schweren Fällen kann zudem auch Mitoxantron und Cyclophosphamid eingesetzt werden. Sie sind starke bis sehr starke Zytostatika, welche das aktivierte Immunsystem systemisch dämpfen.

Des Weiteren ist die symptomatische Therapie von großer Bedeutung. Hierbei kommen neben Physio- und Ergotherapie sowie Logopädie auch zusätzliche Pharmaka, z.B. Fampridin zur Verbesserung der Gehfähigkeit (Goodman et al., 2010), zum Einsatz. Zur Behandlung einer

Blasen- und/oder Mastdarmleerungsstörung, einer Spastik oder von Schmerzen kann ein stationärer Krankenhausaufenthalt nötig werden. Ziel aller Behandlungsmaßnahmen ist in erster Linie der Erhalt der bestmöglichen Selbstständigkeit der Patienten im Alltag; hierzu ist die interdisziplinäre Betreuung der Patienten zentraler Behandlungsaspekt.

2.2 Theoretische Grundlagen und aktueller Forschungsstand

2.2.1 Pathophysiologie

Als zentraler Mechanismus der Pathophysiologie werden zelluläre Immunreaktionen angenommen. Histopathologisch ist die MS durch multiple demyelinisierte Läsionen der weißen Substanz charakterisiert (Trapp et al., 1998). Diese Läsionen (Plaques) sind durch eine erhöhte Infiltration von aktivierten T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, Mikroglia und Astrozyten gekennzeichnet (Prat, Antel, 2005; Frohman et al., 2006). In MRT-Untersuchungen konnte in MS-typischen Läsionen eine Störung der BHS nachgewiesen werden (Filippi et al., 1996). Allerdings ist unklar, wie genau es zur Schrankenstörung kommt.

Durch das Tiermodell der MS, die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), konnte die Rolle von T-Zellen, insbesondere der CD4+ T-Helferzellen, nachgewiesen werden: durch eine CD4+ T-Zellaktivierung durch myelinspezifische Antigene oder durch Transfer von *in vitro* aktivierten CD4+ T-Lymphozyten in das Empfängertier wurde eine Migration der Leukozyten über die BHS ins ZNS mit konsekutiver Neurodegeneration beobachtet (Becher et al., 2006). Aktuelle Forschungen richten sich auch auf andere Zell-(Sub-) Populationen, wie Interleukin (IL)-17 produzierende T-Helfer-Zellen (Th17-Zellen) sowie B-Zellen und regulatorische T-Zellen (Kasper, Shoemaker, 2010). Es wird angenommen, dass es durch eine Kombination aus genetischer Disposition, Umweltfaktoren und anderen unbekanntem Faktoren zu einer Fehlregulation der adaptiven Immunantwort auf Eigen-Antigene kommt, insbesondere der durch Th17-Zellen vermittelten Immunreaktion. Dadurch kommt es zu einem Zusammenbruch der Immuntoleranz, was zu einer unkontrollierten Produktion von spezifischen Auto-Antikörpern und pathologischen T-Zellen mit konsekutiver Gewebeentzündung führt (Wing, Sakaguchi, 2010).

2.2.2 Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis

Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist derzeit das wichtigste Tiermodell der Multiplen Sklerose. Heute ist bekannt, dass es durch die Immunisierung der Tiere zur Aktivierung von Th1 und Th17 CD4⁺ Zellen durch antigenpräsentierende Zellen (APC) kommt (Rothhammer et al., 2011). Die Folge ist eine Einwanderung von Leukozyten in das ZNS, eine Expression pro-inflammatorischer Gene und letztlich die Demyelinisierung der Nervenzellen (Swanborg, 1995; Zekki et al., 2002).

Die EAE kann aktiv oder passiv induziert werden:

- Die aktive EAE (aEAE) wird durch Injektion eines Antigens, z.B. Rückenmarkshomogenat syngener Tiere oder durch Myelinkomponenten des ZNS, wie *Myelin Basisches Protein* (MBP), *Proteinlipidprotein* (PLP) oder *Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein* (MOG) (Adelmann et al., 1995; Kojima et al., 1997) in Verbindung mit einem Adjuvans - *komplettes Freund-Adjuvans* (CFA), eine Wasser-in-Öl-Emulsion, die abgetötete Mikroorganismen (*Mycobacterium tuberculosis*) enthält - induziert. Zusätzlich erhalten die Tiere ein Pertussis Toxin, ein Endotoxin des Bakteriums *Bordetella pertussis* (PTX), welches die Rekrutierung von Leukozyten ins ZNS bewirkt und deren Passage in das Hirnparenchym durch eine Erhöhung der Permeabilität der Bluthirnschranke erleichtert (Linthicum et al., 1982; Kerfoot et al., 2004).
- Die Induktion der passiven EAE (pEAE) erfolgt durch die Injektion antigenspezifischer T-Zellen, welche zuvor *in vitro* aktiviert wurden.

Klinisch manifestierte sich die Erkrankung in Abhängigkeit des verwendeten Antigens (z.B. MOG, PLP, MBP) und Tierstammes (z.B. C3H/HeJ, C57BL/6, SJL/J) unterschiedlich (Wekerle et al., 1994; Aharoni et al., 2011). Die „typische“ EAE zeigt einen progredienten Verlauf mit aufsteigenden Lähmungen, beginnend an Schwanz und Hinterläufen, mit histologisch nachweisbaren Läsionen insbesondere im Rückenmark (Gobel et al., 2011). Eine EAE, welche sich klinisch mit Gleichgewichtsstörungen sowie einer rotatorischen Komponente von Kopf und Rumpf manifestiert, zeigte histologisch vornehmlich Läsionen im Kleinhirn und Hirnstamm (Muller et al., 2000; Floris et al., 2004).

2.2.3 Die Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist eine physiologische Barriere zwischen dem Zentralnervensystem und dem Blutkreislauf. 1967 konnte die BHS erstmals elektronenmikroskopisch dargestellt werden (Reese, Karnovsky, 1967). Dabei gelang der Nachweis der Endothelzellen, welche über so genannte „Tight Junctions“ eng miteinander verknüpft sind. Die ZNS-Endothelzellen zeigen Eigenschaften, die allen Endothelzellen gemein sind, jedoch konnte ein spezifisches Gen-Expressions-Profil der humanen cerebralen Endothelzellen nachgewiesen werden (Kallmann et al., 2002). Neben den Endothelzellen besteht die BHS aus einer Basalmembran und Perizyten (Abbildung 1), welche neben der Regulation der Endothelzellen auch als Makrophagen dienen. Astrozyten sind ebenfalls ein bedeutender Teil der BHS; ihre Ausläufer umgreifen nahezu die gesamte Oberfläche der Mikrogefäße und sind lediglich durch die dünne Basalmembran von ihnen getrennt (Hawkins, Davis, 2005). Diese zusätzliche Glia-Barriere ist im ZNS, im Vergleich zu anderem Gewebe, einzigartig. Zu den wichtigsten Funktionen der BHS gehört die Steuerung hochempfindlicher elektro- und biochemischer Vorgänge, welche elementar für die komplexen Funktionen des Gehirns sind. Die BHS stellt darüber hinaus einen hochselektiven Filter dar, über welchen die für das Gehirn benötigten Nährstoffe aus dem Blutkreislauf selektiv entnommen und die entstandenen Stoffwechselprodukte wieder abgeführt werden. Weiterhin regelt die BHS den pH-Wert und den Salzgehalt des ZNS und schützt es vor im Blut zirkulierenden Erregern, Toxinen, Hormonen, aber auch vor körpereigenen zirkulierenden Immunzellen. Wird das Immunsystem jedoch aktiviert, gelangen die Leukozyten über die BHS in das ZNS und können nach Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen eine entzündliche Reaktion auslösen (Greenwood et al., 2011).

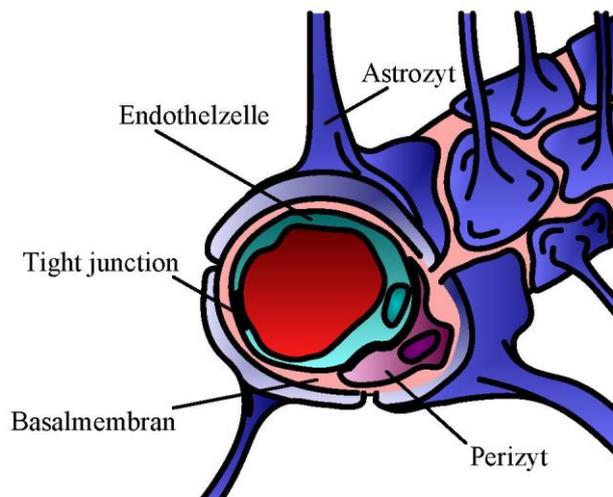


Abbildung 1: Schematischer Querschnitt einer cerebralen Kapillare

Die Kapillarwand ist durch eine Endothelzelle ausgekleidet, deren Enden durch „Tight Junctions“ miteinander verbunden sind. Perizyten befinden sich an der abluminalen Oberfläche der Endothelzellen. Beide Zellen sind von einer Basalmembran umgeben, die auf der anderen Seite in Kontakt mit den Astrozyten steht.

2.2.4 Einwanderung von T-Zellen in das Hirnparenchym

Die BHS reguliert die Einwanderung von sämtlichen Stoffen und Zellen (Wekerle et al., 1986; Hickey, 1991). Bei aktiven Entzündungsprozessen, z.B. im Rahmen der MS, ist die Passage von T-Zellen ins ZNS erleichtert. Die Migration von Leukozyten über die BHS ist gemäß dem „Multi-Step-Modell“ ein mehrstufiger Prozess (Abbildung 2) und geschieht in einem komplizierten Zusammenspiel von verschiedenen Adhäsions- und Signalmolekülen, welches einer strengen Regulation unterliegt (Butcher et al., 1999; Engelhardt, 2006; Greenwood et al., 2011; Takeshita, Ransohoff, 2012).

- Im ersten Schritt (*Rolling/Capture*) kommt es durch die Interaktion von leukozytären und endothelialen Adhäsionsmolekülen der Selektin-Familie zu einem Abbremsen und Rollen der Leukozyten entlang der Endothelwand.
- Im zweiten Schritt (*Aktivierung*) werden die Leukozyten durch endotheliale Chemokine aktiviert, wodurch sie die sekundären Adhäsionsmoleküle der Integrin-Familie exprimieren.
- Diese Integrine bewirken im dritten Schritt (*Adhäsion, Arrest*) durch Interaktion mit den Adhäsionsmolekülen (*cell adhesion molecules*; CAM) der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie eine Anheftung an die Endothelwand. Zu diesen Immunglobulinen gehören das vaskuläre Zell-Adhäsionsmolekül-1 (*vascular cell adhesion molecul*;

VCAM-1) und das intercelluläre Adhäsionsmolekül-1 (*intercellular adhesion molecule*; ICAM-1), welche auf mikrovaskulären Endothelzellen des ZNS exprimiert werden.

- Im vierten Schritt (*crawling*) „kriechen“ die Leukozyten entlang der Endothelwand, um einen geeigneten Durchtrittsort zu finden.
- Im letzten Schritt (*Transmigration*) erfolgt schließlich die Durchwanderung der Lymphozyten durch die Endothelzellen in den perivaskulären Raum. Hierbei können die Leukozyten zwischen den Endothelzellen hindurchwandern oder aber einen transzellulären Weg durch eine Endothelzelle hindurch nehmen (Muller, 2009; Abadier et al., 2015).

Im perivaskulären Raum treffen die T-Zellen auf ihre spezifischen Antigene auf den APC, z.B. perivaskuläre dendritische Zellen. Dies führt zu einer Antigen-getriggerten Reaktivierung der T-Zellen und zur Überwindung der Glia-Barriere mit Progression in das Hirnparenchym. Dort aktivieren die T-Zellen lokale Mikroglia, welche wiederum zur Einwanderung weiterer Leukozyten und zu einer Progression der Entzündungsreaktion beitragen.

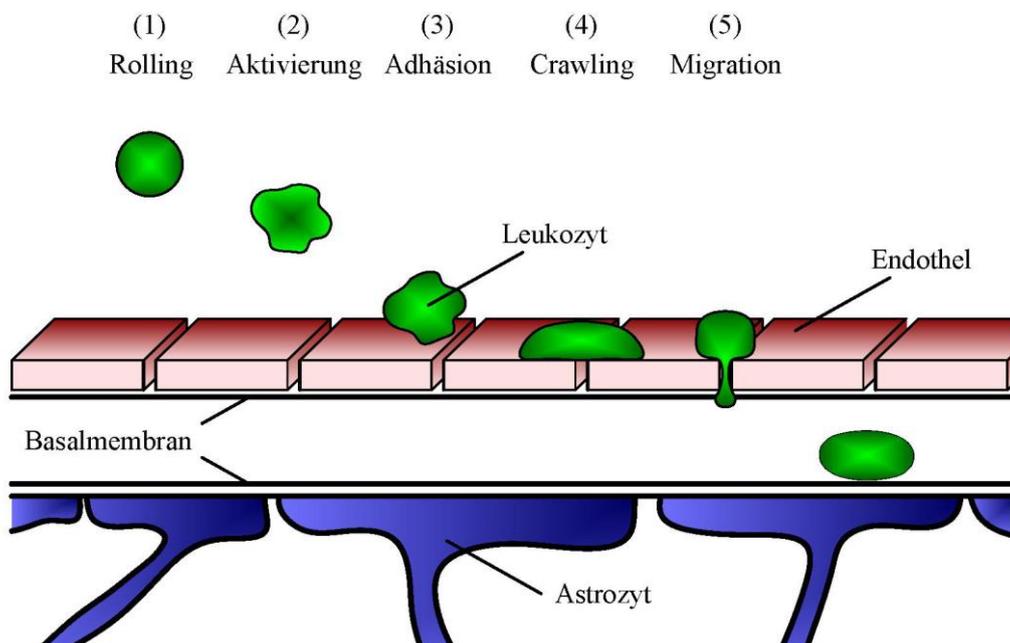


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Multi-Step Modells verändert nach Takeshita und Ransohoff et al. (Takeshita, Ransohoff, 2012)

Im 1. Schritt verlangsamt sich die Geschwindigkeit der Leukozyten (1). Durch ihre Aktivierung (2) adhären die Zellen (3) und bewegen sich entlang der Endothelzellschicht (4), um schließlich durch eine einzelne Endothelzelle oder zwischen den Endothelzellen hindurch zu wandern (5).

2.3 Das Immunsystem

2.3.1 Die Bedeutung des angeborenen Immunsystems

Das Immunsystem kann in die angeborene und erworbene (adaptive) Abwehr unterteilt werden: während die adaptive Immunität durch antigenaktivierte Lymphozyten mit konsekutiver Plasmazelleexpansion und antigenspezifischer Immunglobulinsynthese gekennzeichnet ist, wird die angeborene Abwehr durch eine große Anzahl an unterschiedlichen Zellen (Monozyten, Granulozyten, Mastzellen, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen) sowie gelösten Stoffen (Komplement, Interferone, Akute-Phase-Proteine, Lysozym, Laktoferrin) repräsentiert, welche sich unspezifisch gegen bestimmte Strukturen von Erregern richten. Die Einleitung der Immunantwort auf Pathogene sowie die Modulation der Immunreaktion erfolgt zum großen Teil durch das angeborene Abwehrsystem (Fearon, Locksley, 1996; Aderem, Ulevitch, 2000). Angesichts der enormen Vielfalt und molekularen Heterogenität der pathogenen Mikroorganismen sowie der zunehmenden Mutationsrate ist die angeborene Abwehr nicht auf spezifische Strukturen, sondern auf molekulare Muster, die so genannten Pathogen-assoziierten molekularen Muster (*pathogen associated molecular patterns*, PAMP) der Erreger ausgerichtet (Medzhitov, Janeway, 1997). Die wichtigsten Vertreter dieser PAMP sind das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS) der Gram-negativen Bakterien, Lipoteichonsäure der Gram-positiven Bakterien, unmethylierte DNA und doppelsträngige RNA. Da diese Moleküle ausschließlich durch mikrobielle Pathogene synthetisiert werden, können sie vom humanen Immunsystem nicht als körpereigen erkannt und fälschlicherweise angegriffen werden. Die PAMP werden durch so genannte Muster-Erkennungs-Rezeptoren (*pattern-recognition receptors*, PRRs) detektiert. Die PRRs gehören strukturell verschiedenen Proteinfamilien an: hierzu zählen die Lektine, Proteine und Leucin-reiche Regionen, wie CD14, sowie Lipidtransferasen, wie z.B. das LPS-Bindeprotein (Fearon, Locksley, 1996; Medzhitov, Janeway, 1997). Auf den Kontakt mit der Erregerstruktur folgen unterschiedliche Reaktionen, u.a. Phagozytose, die Expression antimikrobieller Peptide oder eine Sekretion endogener Signalstoffe. PRRs mit Signalfunktion induzieren durch Erkennung eines PAMP eine Signalkaskade, die zur Expression einer Vielzahl von Immunitäts-assoziierten Genen führt; zu diesen PRRs zählen die Toll-like-Rezeptoren.

Zwar besteht die Hauptfunktion der PRRs in der Einleitung einer Immunantwort auf eindringende Pathogene, sie dienen jedoch auch der Erkennung endogener Schädigungs- oder

Gefahrssignale (*damage-associated molecular patterns*, DAMP) (Rubartelli, Lotze, 2007). Durch die DAMP kann eine Immunreaktion im Sinne einer sterilen Inflammation ausgelöst werden, weshalb die PRRs auch mit autoimmunen und chronisch entzündlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden (Janeway, Medzhitov, 2002).

2.3.2 Toll-like Rezeptoren

Toll-ähnliche Rezeptoren (*toll-like receptors*, TLRs) gehören zu der Gruppe der PRRs und dienen als Teil der angeborenen Abwehr der Erkennung von PAMP/DAMP. Sie erhielten ihren Namen aufgrund ihrer Ähnlichkeit zum Toll-Protein, welches 1985 durch die Forschungsgruppe von Nobelpreisträgerin Nüsslein-Volhard in der *Drosophila melanogaster* identifiziert wurde (Anderson et al., 1985). Später konnte gezeigt werden, dass ein defekter Toll-Rezeptor der Drosophila, die nur über ein angeborenes Immunsystem verfügt, zu einer erhöhten Anfälligkeit für Pilzinfektionen führt (Lemaitre et al., 1996). Der erste Nachweis eines humanen Toll-Homologs (heute TLR4), welches die Genexpression von Entzündungsmediatoren induziert, gelang 1997 (Medzhitov et al., 1997). Bis heute wurden insgesamt 11 humane und 13 murine TLRs identifiziert. TLRs werden auf einer Vielzahl von Immunzellen (Makrophagen, dendritische Zellen, B-Zellen, T-Zellen), Nicht-Immunzellen (Fibroblasten, Epithelzellen) und ZNS-Zellen exprimiert (Akira et al., 2006).

Nach ihrer spezifischen PAMP-Erkennung (Abbildung 3) werden die TLRs in 3 Gruppen eingeteilt (Kawai, Akira, 2010):

- Die erste Gruppe, TLR1, 2, 4 und 6, erkennt Lipide. TLR1, TLR2 und TLR6 erkennen in bestimmter Konstellation Lipopeptide und Lipopolysaccharide von Gram-positiven Bakterien (Roach et al., 2005). TLR4 erkennt LPS, einen integralen Bestandteil der Zellmembran Gram-negativer Bakterien.
- Die Zweite Gruppe, TLR5 und TLR11, wird durch Proteine aktiviert. TLR5 wird v.a. im Gastrointestinaltrakt exprimiert, wo er bakterielles Flagellin erkennt (Uematsu et al., 2008). TLR11 erkennt Strukturen von uropathogenen *E. coli*-Bakterien (Zhang et al., 2004).
- Die dritte Gruppe der TLR-Genfamilie bilden TLR3, 7, 8 and 9. Diese TLRs werden durch bakterielle und virale Nukleinsäure aktiviert. TLR3 wird dabei durch virale Doppelstrang-RNA (dsRNA), TLR7 und TLR8 durch Imidazoquinoline und virale Einzelstrang-RNA (ssRNA) aktiviert. TLR9 erkennt unmethylierte CpG-Dinukleotide, welche sich im bakteriellen und viralen Genom befinden (Kawai, Akira, 2006).

Zu den körpereigenen Stoffen, die neben den mikrobiellen Strukturen einen aktivierenden Effekt auf die TLRs ausüben (endogene DAMP), gehören u.a. das Hitzeschock-Protein, gesättigte Fettsäuren und andere Stoffe von apoptotischen Zellen (Ohashi et al., 2000).

Die gemeinsamen Strukturmerkmale der Toll-like-Rezeptoren sind die extrazellulär gelegenen Leucin-reichen Sequenzen (*leucine rich repeats*, LRR), mit welchen sie die PAMP/DAMP erkennen sowie eine zytoplasmatische TIR-Domain (*Toll/IL-1Receptor domain*), welche die weitere Signalkaskade einleitet (Kawai, Akira, 2007).

Die TLRs aktivieren durch in der intrazellulär lokalisierten TIR-Domäne enthaltenen Adaptermoleküle (*TIR domain-containing adaptor molecules*) wie MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), TIRAP/Mal (*TIR-domaincontaining adaptor/MyD88 adaptor-like*), TICAM1/TRIF (*TIRdomain- containing adaptormolecule 1/TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- γ*) und TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) unterschiedliche Signalkaskaden (Wesche et al., 1997). Die TLR-Aktivierung stößt in Abhängigkeit des entsprechenden Adaptermoleküls somit verschiedene Reaktionsketten an (Horng et al., 2002; Yamamoto et al., 2002; Kawai, Akira, 2006). Gemeinsames Hauptziel der Signalpfade ist die Aktivierung des *nuclear factor* (NF)- κ B und in Folge die Expression von proinflammatorischen Zytokinen, u.a. INF- β , welche zu einer Aktivierung der spezifischen Abwehr führen (Muzio et al., 2000; Zhang, Ghosh, 2001; Takeda, Akira, 2005).

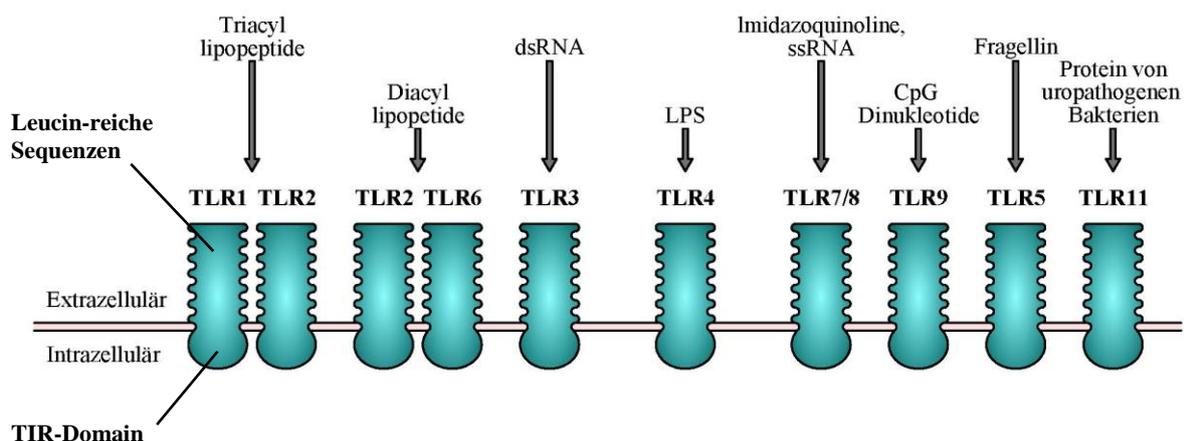


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Toll-like Rezeptoren mit ihren entsprechenden PAMP, verändert nach Kawai und Akira (Kawai, Akira, 2006)

Toll-like Rezeptoren 1 bis 11 und ihre verschiedenen PAMP. Extrazellulär befinden sich die Leucin-reichen Sequenzen der TLRs, mit welchen die PAMP erkannt werden. Die intrazellulär gelegene TIR-Domain leitet, abhängig vom Adaptermolekül, die weitere Signalkaskade ein.

2.3.3 Toll-like Rezeptor 4

Die Funktion des TLR4 als LPS-Rezeptor wurde von dem 2011 mit dem Nobelpreis ausgezeichneten Bruce A. Beutler und seiner Forschungsgruppe entdeckt (Poltorak et al., 1998; Poltorak et al., 2000). Identifiziert wurde TLR4 als LPS-Rezeptor aufgrund einer verminderten Reaktion auf LPS von C3H/HeJ-Mäusen, die durch Punktmutation einen funktionslosen TLR4 exprimierten. TLR4 wird auf dem Chromosom 9q32-q33 kodiert und kann durch Kontakt mit LPS einen lebensbedrohlichen Endotoxinschock auslösen. Nach Kontakt wird LPS zunächst durch das *LPS-binding-protein* (LBP) opsoniert und durch CD14 erkannt (Wright et al., 1990). CD14 ist auf der Zelloberfläche von Makrophagen lokalisiert und mit dieser verbunden, kann jedoch kein transmembranes Signal zur intrazellulären Verarbeitung weitergeben. TLR4 bildet zusammen mit dem Protein MD2 (*myeloid differentiation factor 2*) einen Komplex (Shimazu et al., 1999). Zwei TLR4-MD2-Komplexe in Verbindung mit dem LPS-LBP-CD14-Komplex führen zur Aktivierung des TLR4. Neben LPS, als mikrobieller Vertreter der PAMP, wurden auch DAMP, wie Hitzeschock-Proteine, Fibrinogen, Fibronectin, Heparin-Sulfate, lösliche Hyalurone, LDL, Ganglioside und andere Signalstoffe als Agonisten von TLR4 identifiziert (Beg, 2002; Marshak-Rothstein, 2006).

Die Bedeutung des TLR4 für die Entwicklung der EAE und MS wurde bereits vielfach untersucht. In MS-Läsionen von symptomatischen Patienten wurde im Vergleich zu gesunden Probanden eine erhöhte Expression von TLR4 auf Mikroglia and Astrozyten festgestellt (Bsibsi et al., 2002). Durch Applikation von LPS in Nagern konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine TLR4-vermittelte Aktivierung von Mikroglia mit konsekutivem Untergang von Oligodendrozyten und Neuronen im ZNS nachgewiesen werden (Lehnardt et al., 2002; Lehnardt et al., 2003; Maezawa et al., 2006). Bei der EAE-Induktion in C57BL/6 Mäusen wurde TLR4 als Ligand für PTX identifiziert. Nach seiner Aktivierung wurde eine Einwanderung von Leukozyten in das ZNS, einhergehend mit einer erhöhten Permeabilität der BHS beobachtet (Kerfoot et al., 2004). Reynolds et al. stellten fest, dass die TLR4-Aktivierung auf CD4+ T-Zellen sogar entscheidend für eine wirkungsvolle pEAE-Induktion ist (Reynolds et al., 2012). Marta et al. postulierten, dass ein funktionsloser TLR4 nach Induktion der EAE eine Verschlechterung der Symptome, mit einer erhöhten Expression von proinflammatorischen Zytokinen bewirkt (Marta et al., 2008). In Anbetracht der unterschiedlichen, zum Teil kontroversen Ergebnisse bleibt die Rolle des TLR4 in der EAE noch undefiniert.

2.4 Zielsetzung

Die Bedeutung des angeborenen Immunsystems in der Entwicklung der EAE und MS ist noch nicht hinreichend geklärt. Ein tiefer gehendes Verständnis dessen könnte zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze in der MS-Behandlung beitragen. Als Teil der angeborenen Immunabwehr wirken TLRs hauptsächlich als erste Abwehr mikrobieller Erreger. Eine erhöhte Expression von TLRs in MS-Läsionen lässt zudem eine Rolle in autoimmunvermittelten Prozessen erahnen. Zudem konnten Nachweise einer potenziellen Funktion des TLR4 bei der EAE-Manifestation erbracht werden, auch wenn mögliche Funktionen bisher ungeklärt sind.

In dieser Arbeit soll die Relevanz des TLR4 in der Pathogenese der aEAE genauer untersucht werden. Hierzu wird zunächst der klinische Verlauf der aEAE in C3H/HeJ-Mäusen mit defektem TLR4 im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen *in vivo* beobachtet. Des Weiteren soll *in vitro* geprüft werden, ob isolierte Lymphozyten der TLR4-defekten Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen ein unterschiedliches Potenzial aufweisen, in das ZNS einzudringen. Im Speziellen wird dazu das Adhäsions- und Transmigrationsverhalten entlang einer experimentellen Bluthirnschranke untersucht.

Fragestellungen:

- I. Besteht ein Unterschied beim klinischen Verlauf der aEAE in C3H/HeJ-Mäusen mit funktionslosem TLR4 im Vergleich zu C3H/HeN-Wildtypen ?
- II. Besteht ein Unterschied im Adhäsionsverhalten an bEND3-Endothelzellen von Lymphozyten TLR4-defekter C3H/HeJ-Mäuse im Vergleich zu den C3H/HeN-Wildtypen im *in vitro* Adhäsionsassay ?
- III. Besteht ein Unterschied in der Transmigration von Lymphozyten TLR4-defekter C3H/HeJ-Mäuse durch bEND3-Endothelzellen im Vergleich zu C3H/HeN-Wildtypen im *in vitro* Transmigrationsassay ?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Geräte

Brutschrank	Thermo Fisher Scientific (Waltham MA, USA)
FACSCanto™ II	BD (New York, USA)
Feinwaage	KERN (Eschenlohe, Deutschland)
Mikroskop	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Wipptisch	Fröbel Labortechnik (Lindau, Deutschland)
Zählkammer	Brand (Wertheim, Deutschland)
Zähllinse	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Zentrifuge	Sigma (St. Louis MO, USA)

3.2 Medien und Zusatzstoffe

Antibiotic-Antimycotic	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
DMEM+GlutaMAX	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
DMEM	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	AMRESCO (Solon OH, USA)
Dinatriumhydrogenphosphat	ROTH (Karlsruhe, Deutschland)
Eindeckmedium (Entellan®)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Fibronectin 1mg	Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
Formaldehyd 37%	ROTH (Karlsruhe, Deutschland)
Giemsa	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Glutardialdehyd (GDA) 50%	ROTH (Karlsruhe, Deutschland)
Hanks balanced salt solution (HBSS)	Sigma (St. Louis MO, USA)
Hepes solution 1M	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Isofluran	Baxter (Deerfield, IL, USA)
Kaliumchlorid (KCL)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Laminin from EHS-sarcoma (mouse)	Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland)

Natriumazid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumbicarbonat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natrium Pyrovat	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Pen Strep	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Pertussis Toxin (PTX)	Enzo LifeSciences (Farmingdale, NY, USA)
Proteolipid Protein (PLP) 190-209	AnaSpec (Fremont, CA, USA)
Trypanblau	Sigma (St. Louis MO, USA)
Trypsin-EDTA 25%	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)

3.3 Endothelzellen

Endothelzellen bEND.3	ATCC-LGC Standards (Manassas, Virginia, USA)
-----------------------	--

3.4 Versuchstiere

Sämtliche Versuche wurden mit weiblichen C3H/HeJ-Mäusen (n=26, Jackson Laboratory, USA) und den entsprechenden weiblichen Wildtypen C3H/HeN-Mäuse (n=26, Charles River, USA) durchgeführt. Bei den C3H/HeJ-Tieren kam es durch eine Spontanmutation zu einem funktionslosen TLR4 (Mutation im Gen des TLR4, *Tlr4*^{Lps-d}) (Poltorak et al., 1998). Alle Tiere waren zwischen acht und zehn Wochen alt und hatten Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum*. Alle Experimente wurden mit Genehmigung des Ministeriums für Umwelt- und Verbraucherschutz des Saarlandes durchgeführt.

3.5 Tierexperimentelle Methoden

3.5.1 Induktion der aEAE und Versuchsaufbau

Die Induktion der aEAE erfolgte in mehreren Experimentenreihen bei insgesamt 16 TLR4-Mutanten (C3H/HeJ, *Tlr4^{Lps-d}*) und 16 Wildtypen (C3H/HeN, wt) durch eine subkutane Injektion von 100 µg PLP 190-209 emulgiert mit CFA und einer intraperitoneale (i.p.) Injektion von 300 ng PTX an Tag 0. Da auch PTX ein bekannter Ligand des TLR4 ist (Kerfoot et al., 2004), wurden alle Versuche auch mit Kontrolltieren, die nur mit PTX behandelt wurden durchgeführt. Als Kontrollen fungierten insgesamt 10 TLR4-Mutanten und 10 Wildtypen, bei welchen am selben Tag lediglich 300 ng PTX i.p. appliziert wurde (Tabelle 2). Bei den immunisierten Tieren sowie bei den Kontrollgruppen wurde die PTX-Injektion nach 2 Tagen (Tag 2) wiederholt. Nach der EAE-Induktion wurden die Tiere über einen Zeitraum von 26 Tagen regelmäßig gewogen und auf klinische Symptome (Tabelle 3) untersucht (Abbildung 4).

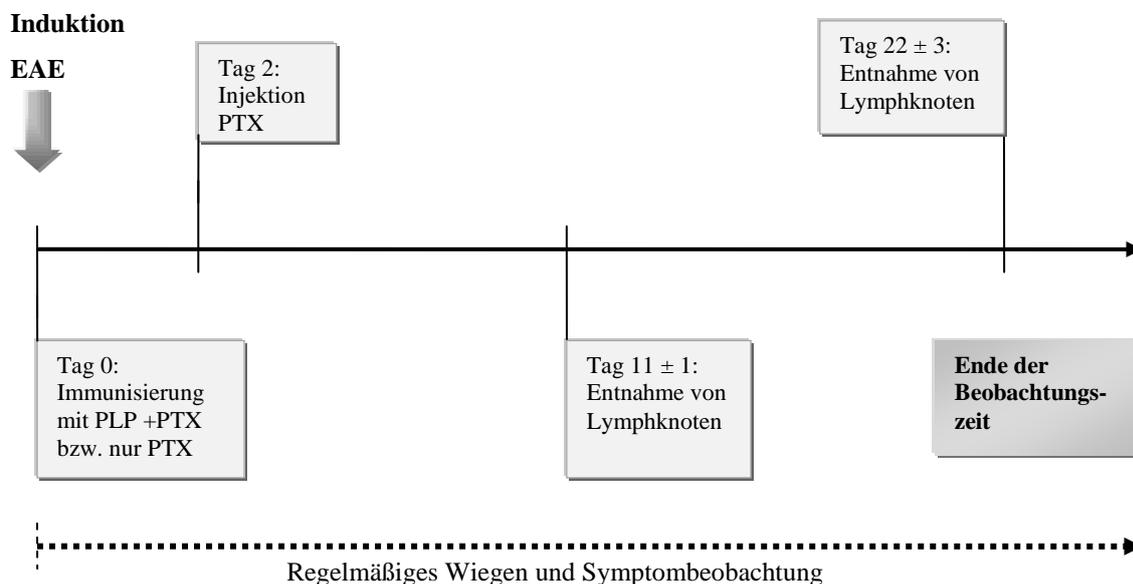


Abbildung 4: Versuchsaufbau von der Immunisierung bis zur Gewebeatnahme

Die Induktion der EAE durch Immunisierung mit PLP erfolgte zum Zeitpunkt Null (Tag 0). Zeitgleich erfolgte die erste Injektion von PTX. Die Kontrolltiere erhielten nur PTX. Die zweite PTX Injektion wurde an Tag 2 durchgeführt. Hiernach erfolgte die regelmäßige Gewichts- und Symptomkontrolle der Tiere. Die Entnahme der Lymphknoten für die *in vitro* Versuche erfolgte an Tag 11 ± 1 und Tag 22 ± post injectionem.

Für die *in vitro* Versuche wurden inguinale und axilläre Lymphknoten entnommen. In der prä-klinischen Phase der EAE, d.h. zu einem Zeitpunkt ohne zu erwartende oder apparente klinische Symptome, durchschnittlich am 11. Tag post injectionem (p.i.), erfolgte die Gewebeentnahme bei 12 immunisierten Tieren (6x $Tlr4^{Lps-d}$; 6x wt) und 8 nicht-immunisierten Kontroll-Tieren (4x $Tlr4^{Lps-d}$; 4x wt). In der klinischen Phase, durchschnittlich am 22. Tag p.i., wurden die Lymphknoten bei 13 immunisierten Tieren (7 x $Tlr4^{Lps-d}$; 6x wt) und bei 10 Kontrolltieren (5x $Tlr4^{Lps-d}$; 5x wt) extrahiert (Tabelle 2). Bei den restlichen 5 immunisierten (2 x $Tlr4^{Lps-d}$; 3x wt) und 2 Kontroll-Tieren (1x $Tlr4^{Lps-d}$; 1x wt) erfolgten keine *in vitro* Versuche.

Tabelle 2: Versuchstiergruppen und Anzahl der Versuchstiere

		<i>Anzahl Versuchstiere (n)</i>		
		gesamt	<i>in vitro</i> Tag 11	<i>in vitro</i> Tag 22
Versuchstiergruppen	Phänotyp			
Immunisierte Tiere (EAE)	C3H/HeJ (TLR4-Mutant)	16	6	7
	C3H/HeN (Wildtyp)	16	6	6
Nicht-immunisierte Tiere	C3H/HeJ (TLR4-Mutant)	10	4	5
	C3H/HeN (Wildtyp)	10	4	5

Anzahl der immunisierten und nicht immunisierten Versuchstiere insgesamt sowie Anzahl der Tiere, die für die *in vitro* Versuche in der prä-klinischen (Tag 11) und klinischen Phase (Tag 22) berücksichtigt wurden.

3.5.2 Klinischer Verlauf der EAE

Alle Tiere wurden klinisch auf die zwei Hauptsymptome der EAE untersucht: Lähmungen der Extremitätenmuskulatur (aszendierende Parese) und Koordinations- bzw. Gleichgewichtsstörungen (axiale Rotation). Gemäß Tabelle 3 wurden für beide Hauptsymptome Punktwerte entsprechend der Symptomschwere vergeben (Tuohy et al., 1988; Greer et al., 1996).

Tabelle 3: Symptomausprägung in der EAE und entsprechende Punktwerte

Aufsteigende Parese		Axiale Rotation	
Keine Symptome	0	Keine Symptome	0
Verminderter Schwanztonus, schwerfälliger Gang	1	Leichte Kopfwendung	1
Schwanzatonie, deutlich schwerfälliger Gang, Schwierigkeit sich aufzurichten	2	Deutliche Kopfwendung	2
Schwäche der Hinterläufe	3	Schwankende Gang	3
Paraplegie	4	Auf der Seite liegend	4
Moribunder Zustand	5	Ständiges Seitwärtsrollen	5

Die linke Spalte gibt die 5 Schweregrade der aufsteigenden Parese mit entsprechendem Punktwert wieder. In der rechten Spalte sind die Symptome der axialen Rotation wiedergegeben.

3.5.3 Präparation von Lymphknoten

Die zu präparierenden Tiere wurden durch Isofluran-Narkose getötet. Axilla und Leiste wurden vorsichtig frei präpariert. Die inguinalen und axillären Lymphknoten wurden mittels Schere und Pinzette entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in 5 ml Waschpuffer aufgenommen.

3.6 Zellkultur und Zellbiologische Methoden

3.6.1 Medien und Gebrauchslösungen

Endothelzellmedium DMEM + GlutaMAX + 10 % FCS + 1 % Antibiotic-Antimycotic

FACS-Puffer Aqua dest. + 10% 10x PBS + 4% FCS + 0,4% 2,5M NaN₃

Fetales Kälberserum (FCS)	FCS wurde 20 Minuten bei 56°C inaktiviert
Formaldehyd-Lösung 1%	Formalin (37% Stammlösung) wurde mit Aqua dest. verdünnt
Gefriermedium (für bEND3 und Leukozyten)	40% DMEM + 50% FCS + 10% DMSO
GDA 2,5%	GDA 50% wurde mit 1x PBS auf 2,5% verdünnt
Giensa-Lösung	Giensa 1:20 Verdünnung mit Aqua dest.
HBSS steril	HBS wurde in Aqua dest. gelöst und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und steril über einen Milliporefilter filtriert.
Phosphate buffered saline (PBS) 10x	Für 1 Liter wurden 8,0 g/l Natriumchlorid 0,2 g/l Kaliumchlorid 1,44g/l Dinatriumhydrogenphosphat 0,24 g/l Kaliumdihydrogenphosphat mit Aqua dest. (pH-Wert 7,4) auf 1Liter aufgefüllt
PBS 1x	10x PBS wurde 1:10 mit Aqua dest. verdünnt
Waschpuffer	HBSS steril wurde mit 10% FCS und 2,5% 1M Hepes
Zellmigrationsmedium (MAM)	DMEM+GlutaMAX + 2,5% Hepes + 5% FCS + 1% Pen-Strep

3.6.2 Endothelzellkultur

3.6.2.1 Kultivieren

Die bEND.3 Zellen wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen (BD, New York, USA) bei 37° C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit bis zu ihrer Konfluenz inkubiert. Alle 3-4 Tage wurde das Medium gewechselt und die Zellen bei Konfluenz passagiert.

3.6.2.2 Passagieren

Konfluierende Endothelzellen wurden je nach Dichte im Verhältnis 1:1 - 1:3 auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Hierfür wurde das Nährmedium mittels Glaspipette aus den Zellkulturflaschen abgesaugt. Die Zellen wurden 3-5 Min mit 5 ml ca. 37° C warmem Trypsin-EDTA inkubiert und abgelöst. Die gelösten Zellen wurden abpipettiert, sofort in 5 ml Endothelzellmedium aufgenommen und 8 Minuten lang bei 4° C und 1200 rpm sedimentiert. Nach Absaugen des flüssigen Überstandes wurden die Zellen in 1 ml Endothelzellmedium aufgenommen und direkt wieder auf 25 cm² Zellkulturflaschen verteilt.

3.6.2.3 Einfrieren und Auftauen

Maximal 8 Millionen Zellen wurden nach dem Ernten und Pelletieren in 1 ml Gefriermedium aufgenommen und in 1,8 ml Gefrier-Tubes gegeben. Diese wurden in Gefrierschalen bei -80° C gelagert und nach einigen Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die 1,8 ml Tubes in einem 37° C warmen Wasserbad aufgetaut. Im Anschluss wurde die Zellsuspension zügig in 10 ml Endothelzellmedium aufgenommen. Nach dem Pelletieren wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen in Endothelzellmedium resuspendiert und auf 3-4 25 cm² Zellkulturflaschen verteilt.

3.6.3 Herstellung einer Lymphknoten-Zellsuspension

Die entnommenen Lymphknoten wurden in ca. 5 ml Waschpuffer homogenisiert, über einen Zell-Filter (Filter Cell Strainer, BD, NY, USA) in ein Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) gegeben und 8 Minuten mit 1200 rpm zentrifugiert. Die pelletierten Lymphknotenzellen wurden in 1 ml MAM aufgenommen und gezählt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension für das Adhäsions- oder Transmigrationsassay hergestellt. Überschüssige Zellen wurden zur Weiterverwendung eingefroren.

3.6.4 Adhäsionsassay

Ein 16 Kammer-Objektträger (ChamberSlide, Thermo Fischer Scientific, Watham MA, USA) wurde zunächst mit Fibronectin beschichtet. Hierzu wurde die Stocklösung von Fibronectin 1 mg/ml im Verhältnis 1:20 verdünnt um eine Gebrauchslösung von 50 µg/ml zu erhalten. Die 16 Kammern wurden mit 50 µl des verdünnten Fibronectins 40 Minuten bei 37°C inkubiert. Zwischenzeitlich wurden bEND3 Zellen aus 25 cm² Zellkulturflaschen durch o.g. Verfahren mit Trypsin-EDTA abgelöst. Nach 40 Minuten wurde der 16 Kammer-Objektträger aus dem Brutschrank genommen. Aus jeder Kammer wurde überstehendes Fibronectin vorsichtig mit einer Glaspipette abgesaugt und einmal mit 100 µl 1x PBS pro Kammer gewaschen. Dann wurden pro Kammer 20.000 Endothelzellen in 200 µl Endothelzellmedium gegeben und bis zu ihrer Konfluenz 2 Tage im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nachdem die Zellen ihre Konfluenz erreicht hatten, wurden alle Kammern des Objektträgers zweimal mit MAM gewaschen. Die zuvor hergestellte Zellsuspension aus Lymphknotenzellen wurde so verteilt, dass sich pro Kammer 300.000 Zellen in 200 µl MAM befanden (Abbildung 5). Direkt nach der vorsichtigen Zugabe der Zellen auf den Endothelzellrasen wurde der Kammer-Objektträger für 40 Minuten bei 4° C zentral auf einen Wipptisch gelegt. Nach 20 Minuten erfolgte eine Achsendrehung des Objektträgers um 90°. Um nicht-adherierende Lymphknoten-Zellen abzuwaschen, wurden die 16 Kammern nach den 40 Minuten vorsichtig vom Objektträgers abgelöst und dieser Objektträger mit dem darauf verbleibendem Zellrasen und den Lymphknotenzellen hochkant einmal von jeder Seite in 1x PBS getaucht. Im Anschluss erfolgte die Fixierung der adhärierenden Zellen in 2,5% Glutardialdehyd für 2 Stunden. Danach wurde der Objektträger bis zur Zellzählung in 1x PBS bei 4° C aufbewahrt. Die Auswertung des Adhäsionsassays erfolgte am Lichtmikroskop. Die Anzahl der adhärierenden antigen-spezifischen Zellen wurde in fünf zufällig gewählten Arealen pro Kammer bestimmt und pro mm² berechnet. Die Werte wurden pro Kammer gemittelt.

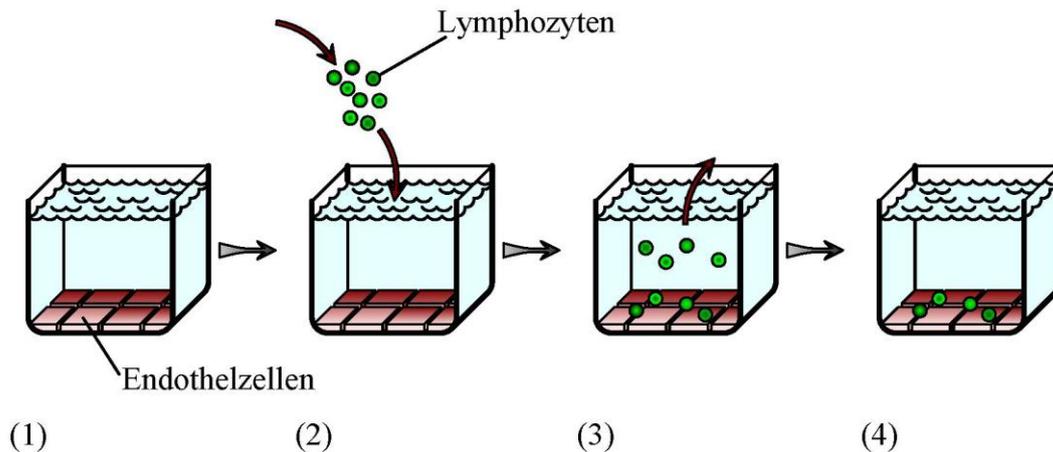


Abbildung 5: Schematischer Aufbau des Adhäsionsassays

In jeder Kammer des 16-Kammer-Objektträgers befinden sich konfluente Endothelzellen (1). Die frisch hergestellte Zellsuspension mit Lymphozyten wurden pro Kammer verteilt (2) und für 4 Stunden in den Kammern belassen (3). Nach Spülung des Assays wurden die verbleibenden adhärenierenden Zellen quantifiziert (4).

3.6.5 Transmigrationsassay

Das Transmigrationsassay wurde mit einer 24-Kammer-Platte (BD, NY, USA) mit 12 einsetzbaren Netzen mit einer semipermeablen Membran (5 μm Porengröße) durchgeführt. Zunächst erfolgte die Beschichtung der Netze mit Laminin. Um eine Gebrauchslösung von Laminin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zu erhalten, wurde die Stocklösung von 0,5 mg/ml im Verhältnis 1:10 mit 1xPBS verdünnt. Jedes Netz wurde mit 50 μl der Gebrauchslösung beschichtet und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Netze eine Stunde unter der Sterilbank getrocknet. Konfluente Endothelzellen in 25 cm^2 wurden zwischenzeitlich nach o.g. Methode abgelöst und gezählt. Eine Zellsuspension von 50.000 Zellen in 200 μl Endothelzellmedium pro Netz wurde hergestellt und in die getrockneten Netze verbracht. Bis zu ihrer Konfluenz wurden die Endothelzellen 2 Tage bei 37°C inkubiert. Hiernach wurde der Überstand des bEND3-Mediums aus den Netzen vorsichtig abgesaugt. Im Anschluss wurden die Netze luftblasenfrei in zuvor mit ca. 600 μl MAM befüllte Kammern eingesetzt. Die zwischenzeitlich aus dem entnommenen Lymphknoten-Gewebe hergestellte Zellsuspension wurde nun so verteilt, dass sich pro Netz 1.000.000 Zellen in 100 μl MAM befanden (Abbildung 6). Die Kammer-Platte wurde im Anschluss für vier Stunden bei 37° C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Netze vorsichtig wieder herausgenommen und in einer neuen Kammerplatte bis zur Fixierung und

Giemsa-Färbung aufbewahrt. Die durch Transmigration durch das Netz in die mit MAM gefüllte Kammer gelangten Zellen wurden in TruCount-Röhrchen (BD, NY, USA) zur FACS-Analyse pipettiert. Um alle transmigrierten Zellen zu gewinnen, wurde jede Kammer abschließend mit 1 ml MAM gespült und dann das MAM-Zellgemisch ebenfalls in das TruCount-Röhrchen pipettiert. Im Anschluss erfolgte die FACS-Analyse.

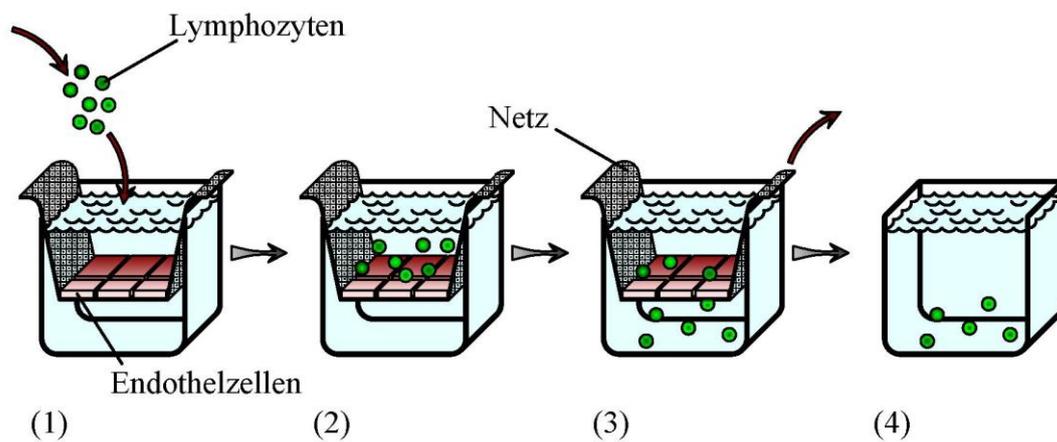


Abbildung 6: Schematischer Aufbau des Transmigrationsassays

In jeder Kammer der 24 Kammer-Platte befinden sich Netze mit semipermeabler Membran, auf denen konfluierende Endothelzellen haften (1). Frisch entnommene Lymphozyten wurden in das Netz gegeben und dort für 4 Stunden belassen (2). Die durch die Endothelzellschicht und das Netz transmigrierten Zellen wurden nach Entfernung des Netzes schließlich quantifiziert (3 und 4).

3.6.6 FACS-Analyse

Zur Quantifizierung der transmigrierten Zellen wurde eine durchflußzytometrische FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) Analyse durchgeführt. Mittels TruCount-Röhrchen wurde die absolute Anzahl von Leukozyten in der Probe bestimmt. Die TruCount-Methode beruht darauf, dass sich nach Zugabe der Zellsuspension in das TruCount-Röhrchen ein lyophilisiertes Sediment am Boden des Röhrchens auflöst und eine bekannte Anzahl von fluoreszierenden Mikropartikeln freisetzt. Durch Division der gemessenen Ereignisse der Zellen durch die gemessenen Ereignisse der Mikropartikel multipliziert mit der Mikropartikelkonzentration wurde die absolute Anzahl der Leukozyten in einem definierten Volumen berechnet.

3.6.7 Fixierung und Färbung der Insert-Membran

Um die Konfluenz der Endothelzellen auf den semipermeablen Netzen der 24 Kammer-Platte nach dem Transmigrationsassay zu beurteilen, wurden die Netze fixiert und gefärbt. Hierzu wurden sie zunächst in 1xPBS gewaschen. 50 µl 37% Formalin wurden über den Boden einer Kammer verstrichen und die Netze im Anschluss wieder eingesetzt und über Nacht fixiert. Zur farbunterstützten Darstellung des Endothelrasens wurden die Endothelzellen mit Giemsa gefärbt. In jedes Netz wurden 100 µl der Giemsa-Lösung gegeben. Nach einer Einwirkzeit von 10 Minuten wurde der Überstand abpipettiert, und die Netze wurden über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln getrocknet. Die gefärbten Inserts wurden mit einem Einschlußmedium auf Objektträger fixiert und unter dem Lichtmikroskop beurteilt.

3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Prism (Prism GraphPad Software, USA) durchgeführt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Prozentzahl oder als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) bzw. Mittelwert \pm Standardfehler (SEM). Zur Berechnung der Signifikanz wurde der t-Test angewendet. Als statistisch signifikant wurde $p \leq 0,05$ angenommen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Klinischer Verlauf der aEAE bei $Tlr4^{Lps-d}$ -Mäusen *in vivo*

Zur Klärung der Frage, inwiefern sich Symptome und Erkrankungsverlauf im Rahmen der aEAE bei $Tlr4^{Lps-d}$ -Tieren von den Wildtypen unterscheiden, wurden die Tiere nach aEAE-Induktion regelmäßig auf klinische Symptome untersucht und das Gewicht dokumentiert.

Insgesamt erkrankten nach Induktion der aEAE 22 % der immunisierten $Tlr4^{Lps-d}$ -Tiere (2 von 9 Tieren); die immunisierten Wildtypen wiesen dagegen eine Erkrankungshäufigkeit von 67 % auf (6 von 9 Tieren; Abbildung 7). Neben der Erkrankungshäufigkeit wurde im Erkrankungsfall auch ein Unterschied in der Symptompräsentation zwischen $Tlr4^{Lps-d}$ -Tieren und Wildtypen beobachtet. Die erkrankten $Tlr4^{Lps-d}$ -Mäuse entwickelten ausschließlich Symptome einer ascendierenden Parese. Gleichgewichtsstörungen (axiale Rotation) wurden nicht beobachtet. Die erkrankten Wildtypen zeigten zum Teil beide Symptome: 83 % der erkrankten Wildtypen (5 von 6 Tieren) wurden durch eine ascendierende Parese symptomatisch; 50 % (3 von 6 Tieren) entwickelten Symptome einer axialen Rotation; und 33 % (2 von 6 Tieren) zeigten beide Symptome gleichzeitig (Abbildung 7).

Im Gegensatz zu den Wildtypen zeigten die beiden erkrankten $Tlr4^{Lps-d}$ -Mäuse eine frühe Erkrankungsmanifestation. Der Symptombeginn wurde an Tag 16 p.i. festgestellt. Es zeigte sich ein rasch progredienter Krankheitsverlauf mit einer maximalen Ausprägung der Lähmungen vor der Gewebeentnahme am 17. Tag p.i.. Bei den erkrankten Wildtypen wurde der Erkrankungsbeginn durchschnittlich an Tag $20 \pm 2,5$ p.i. beobachtet. Es zeigte sich bei den Wildtypen ein etwas langsamerer Krankheitsprogress als bei den $Tlr4^{Lps-d}$ -Tieren: über 2-3 Tage konnte bei den Wildtypen eine Progredienz der Symptome bis zu einer maximalen Ausprägung mit einem Punktwert von 4 ± 1 an Tag 22 ± 3 p.i. (ascendierende Parese: 21 ± 4 p.i.; axiale Rotation; 22 ± 1 p.i.) beobachtet werden.

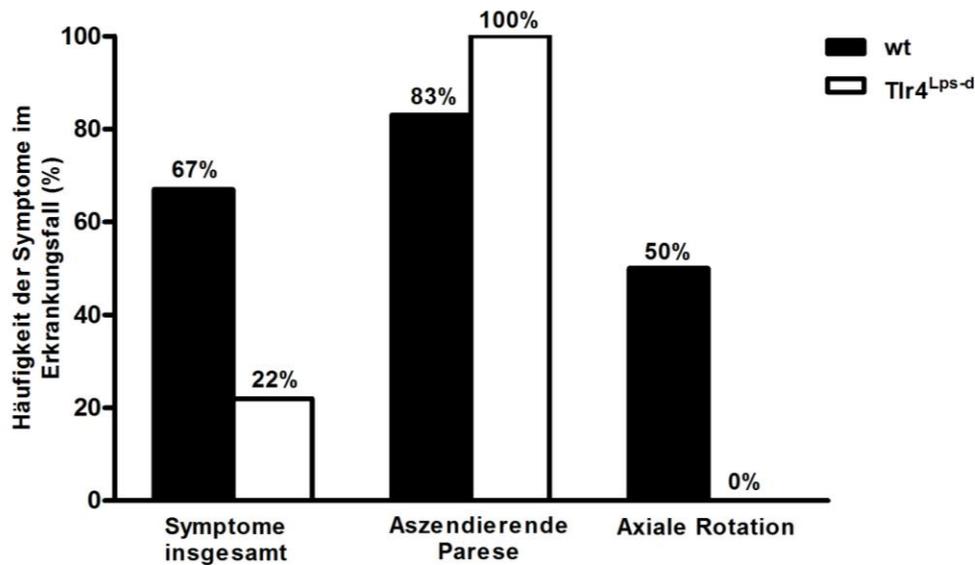


Abbildung 7: Prozentuale Häufigkeit der Symptome im Erkrankungsfall

Insgesamt erkrankten 67% der Wildtypen und 22% der *Tlr4^{Lps-d}*-Tiere (links). Dabei entwickelten alle erkrankten *Tlr4^{Lps-d}*-Tiere sowie 83% der Wildtypen Symptome einer aszendierende Parese (Mitte). Eine axiale Rotation konnte bei keinem der *Tlr4^{Lps-d}*-Tiere festgestellt werden (0%), jedoch bei 50% der erkrankten Wildtypen (rechts).

Gewichtsmäßig konnte eine signifikante Unterlegenheit ohne Krankheitswert aller *Tlr4^{Lps-d}*-Tiere gegenüber den Wildtypen festgestellt werden (Mittelwert \pm SD: *Tlr4^{Lps-d}* $21,9 \pm 2,0$ versus wt $24,0 \pm 1,4$; $p=0,0014$)

Darüber hinaus wurde bei den immunisierten, asymptomatischen *Tlr4^{Lps-d}*-Tieren im Vergleich zu den ebenfalls asymptomatischen Wildtypen weder in der prä-klinischen noch in der klinischen Phase eine signifikante Gewichtsveränderung festgestellt (Mittelwert \pm SD: prä-klinische Phase: *Tlr4^{Lps-d}* $21,8 \pm 1,0$ versus wt $24,6 \pm 0,8$; klinische Phase: *Tlr4^{Lps-d}* $22,5 \pm 0,8$ versus wt $25,0 \pm 1,8$).

Im Erkrankungsfall konnte bei den immunisierten *Tlr4^{Lps-d}*- und wt-Tieren, zeitgleich mit der Symptomentwicklung im Sinne einer aszendierenden Parese bzw. axialen Rotation, ein Gewichtsverlust detektiert werden (Abbildung 8).

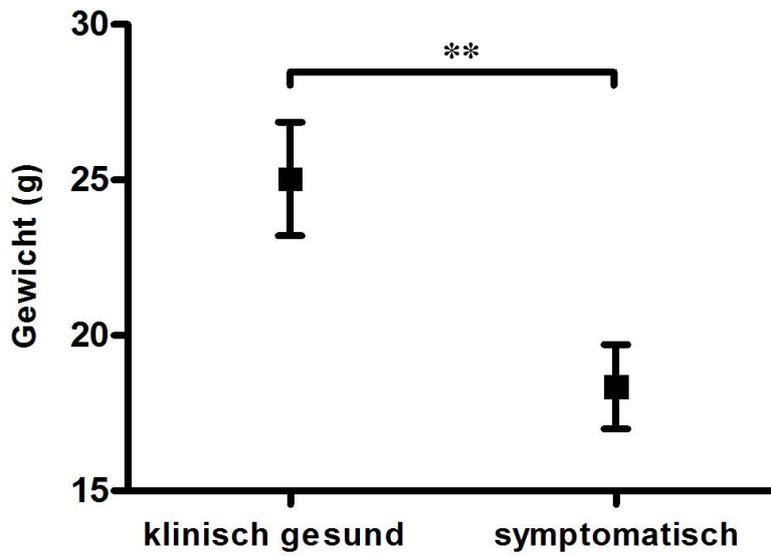


Abbildung 8: Gewicht der symptomatischen Wildtypen bei maximaler Krankheitsausprägung vor Gewebeentnahme im Vergleich zu den klinisch gesunden immunisierten Tieren

Bei maximalen Symptomausprägung (Tag 22 ± 3 p.i.) zeigte sich eine signifikante Gewichtsabnahme (**= $p \leq 0,01$)

4.2 Adhäsionsfähigkeit von $Tlr4^{Lps-d}$ -Lymphozyten an bEND.3 Endothelzellen *in vitro*

Bei der Einwanderung von Lymphozyten in das Hirnparenchym stellt die Adhäsion der Zellen am Endothel gemäß dem Multistep-Modell einen von fünf entscheidenden Schritten der Blut-Hirn-Schranken-Überwindung dar. Um zu untersuchen, ob $Tlr4^{Lps-d}$ -Lymphknotenzellen ein verändertes Adhäsionsverhalten aufzeigen, wurde die Adhäsionsfähigkeit von isolierten $Tlr4^{Lps-d}$ -Lymphozyten an bEND.3 Endothelzellen im Vergleich zu Lymphozyten von Wildtypen im Adhäsionsassay *in vitro* getestet. Die Entnahme der Lymphknoten sowie die Zellisolierung erfolgte in der prä-klinischen Phase an Tag 11 ± 1 p.i. sowie in der klinischen Phase an Tag 22 ± 3 p.i..

Nach durchschnittlich 11 Tagen p.i. ohne klinisch apparente Symptome zeigte sich kein Unterschied im Vergleich der Anzahl adhätierender Zellen der immunisierten $Tlr4^{Lps-d}$ -Tiere und der immunisierten Wildtypen in den Adhäsionsassays (Mittelwert \pm SEM: $Tlr4^{Lps-d}$ $59,7 \pm 16,8$ versus wt $60,8 \pm 19,7$; $p = 0,97$; Abbildung 9). Auch im Vergleich zu den nicht-immunisierten Tieren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an adhätierenden Zellen (Mittelwert \pm SEM: $Tlr4^{Lps-d}$ $40,0 \pm 12,9$; wt $43,3 \pm 14,0$).

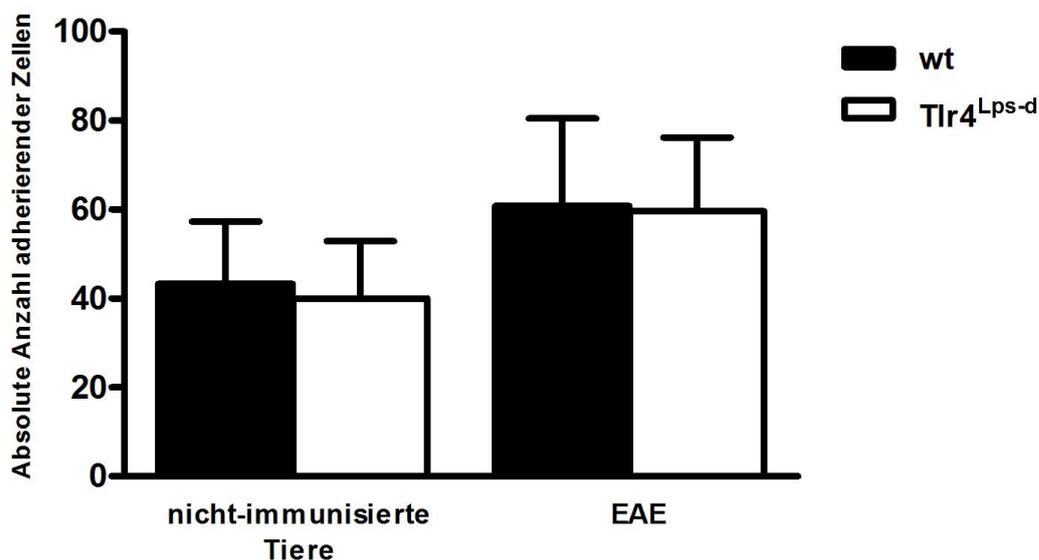


Abbildung 9: Adhäsionsfähigkeit von Zellen immunisierter (EAE) und nicht-immunisierter Tiere in der prä-klinischen Phase

Im Vergleich der Anzahl adhätierender Lymphozyten im Adhäsionsassay von $Tlr4^{Lps-d}$ -Tieren und Wildtypen an Tag 11 ± 1 p.i. zeigte sich weder ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den immunisierten Tieren (EAE) noch im Vergleich zu den nicht-immunisierten Tieren.

In der klinischen Phase, durchschnittlich am 22. Tag p.i., konnte eine signifikant erhöhte Anzahl von adhären den Zellen der immunisierten $Tlr4^{Lps-d}$ -Tiere im Vergleich zu den immunisierten Wildtypen festgestellt werden (Mittelwerte \pm SEM: $Tlr4^{Lps-d}$ $42,7 \pm 6,5$ versus wt $15,4 \pm 3,2$; $p = 0,007$ (**= $p \leq 0,01$; Abbildung 10)).

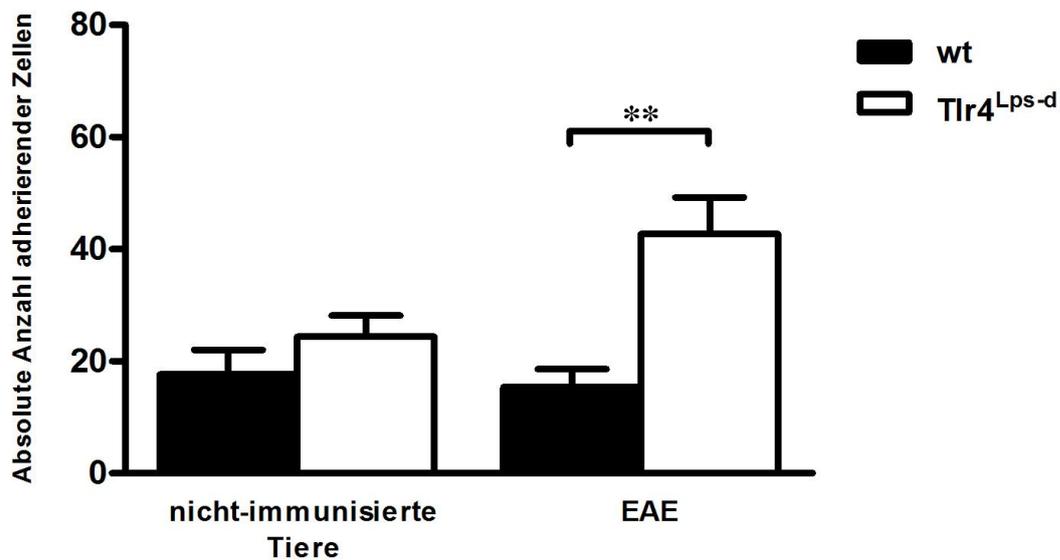


Abbildung 10: Adhäsionsfähigkeit von Lymphknotenzellen immunisierter (EAE) und nicht- immunisierter Tiere in der klinischen Phase

Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Zelladhäsion der Lymphozyten der immunisierten $Tlr4^{Lps-d}$ -Tiere im Vergleich zu den immunisierten Wildtypen an Tag 22 ± 3 p.i. (**= $p \leq 0,01$).

4.3 Transmigrationsfähigkeit von $Tlr4^{Lps-d}$ -Lymphozyten an bEND.3 Endothelzellen *in vitro*

Die Transmigration von Lymphozyten über die Blut-Hirn Schranke stellt den letzten entscheidenden Schritt im Prozess der Einwanderung von Entzündungszellen ins Hirnparenchym dar. Im Transmigrationsassay wurde untersucht, ob und in wieweit $Tlr4^{Lps-d}$ -Lymphozyten ein verändertes Transmigrationsverhalten durch eine bEND.3 Endothelzell-Schicht im Vergleich zu Wildtypen *in vitro* aufweisen. Hierzu wurden die Lymphozyten in gleicher Weise wie beim Adhäsionsassay aus extrahierten Lymphknoten isoliert. In der prä-klinischen Phase (ohne klinische Symptome) erfolgten die Gewebeentnahme an Tag 11 ± 1 p.i. und in der klinischen Phase an Tag 22 ± 3 p.i.. Im Transmigrationsassay erfolgte die Migration der Zellen durch eine semipermeable Membran. Die transmigrierten Zellen wurden schließlich durch einen FACScan quantifiziert.

Weder in der prä-klinischen (Abbildung 11) noch in der klinischen Phase (Abbildung 12) der aEAE zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Phänotypen beim Vergleich der Anzahl transmigrierter Zellen durch eine semipermeable Membran (Mittelwerte \pm SEM: Tag 11: $Tlr4^{Lps-d}$ 37628 ± 5652 versus wt 34597 ± 5733 ; $p = 0,71$ (Abbildung 11); Tag 22: $Tlr4^{Lps-d}$ 39123 ± 4500 versus wt 44917 ± 6582 ; $p = 0,46$ (Abbildung 12)).

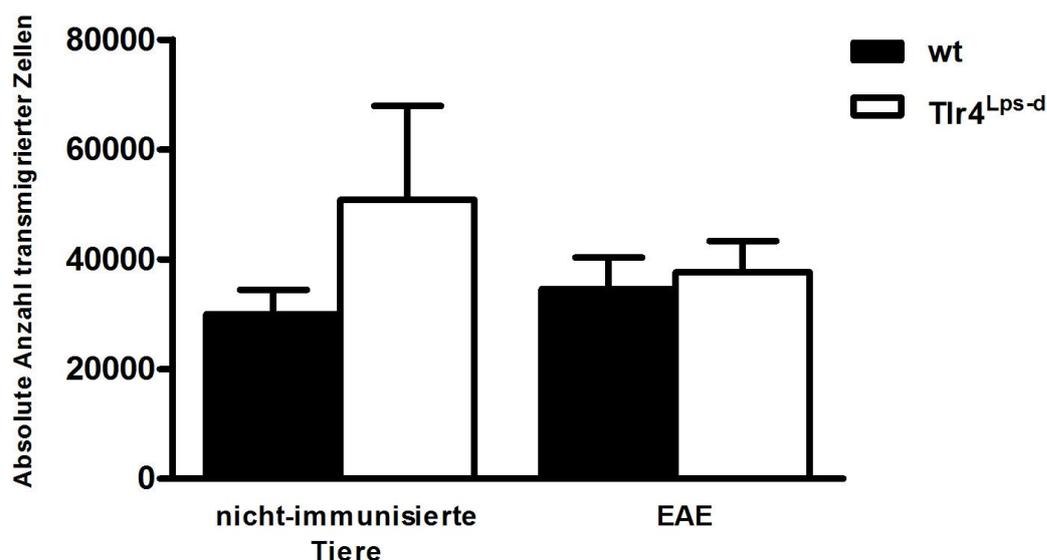


Abbildung 11: Transmigrationsfähigkeit von Lymphozyten immunisierter (EAE) und nicht-immunisierter Tiere in der prä-klinischen Phase

Im Transmigrationsassay an Tag 11 ± 1 p.i. wurde kein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich der Anzahl transmigrierter Zellen von $Tlr4^{Lps-d}$ - und wt-Tieren festgestellt. Die

immunisierten Tieren (EAE) und die nicht-immunisierten Tiere beider Phänotypen wiesen eine ähnliche Transmigrationsfähigkeit auf.

In der klinischen Phase zeigten die immunisierten Tiere beider Phänotypen im Vergleich zu den nicht-immunisierten Tieren einen Trend zu einer erhöhten Zelltransmigration im Rahmen der aEAE (Abbildung. 12). Dieser Trend zeigte sich jedoch nur bei den Wildtypen statistisch signifikant (Mittelwerte \pm SEM: wt immunisiert 44917 ± 6582 versus wt nicht-immunisiert 24906 ± 2198 ; $p=0,042$ ($*=p \leq 0,05$); $Tlr4^{Lps-d}$ immunisiert 39123 ± 4500 versus $Tlr4^{Lps-d}$ nicht-immunisiert 26648 ± 2004 ; $p=0,092$).

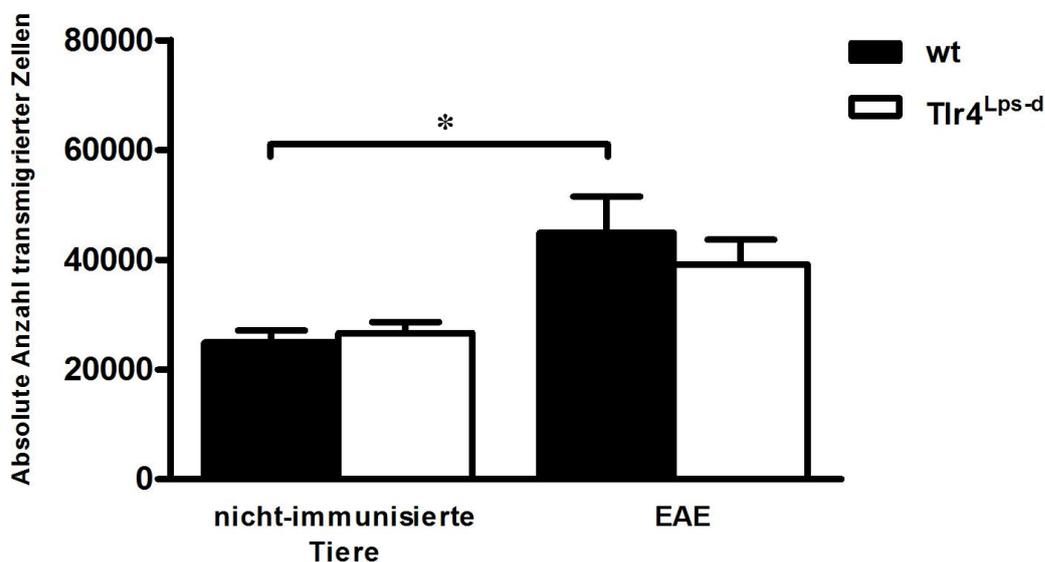


Abbildung 12: Transmigrationsfähigkeit von Lymphozyten immunisierter (EAE) und nicht-immunisierter Tiere in der klinischen Phase

An Tag 22 ± 3 p.i. wurde kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Anzahl transmigrierter Zellen zwischen immunisierten (EAE) $Tlr4^{Lps-d}$ - und wt-Tieren festgestellt. Es zeigte sich eine Trend zu einer erhöhten Anzahl transmigrierter Zellen bei den immunisierten $Tlr4^{Lps-d}$ - und wt-Tieren im Vergleich zu den nicht-immunisierten Tieren, bei den Wildtypen statistisch signifikant ($*=p \leq 0,05$).

5 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, inwiefern Unterschiede im klinischen Verlauf der EAE *in vivo*, sowie im Adhäsions- und Transmigrationsverhalten von extrahierten Lymphozyten *in vitro* zwischen TLR4-defekten und Wildtyp-Tieren bestehen. Die bisher zu diesem Thema veröffentlichten Untersuchungen anderer Forschungsgruppen zeigen uneinheitliche Ergebnisse, insbesondere im Hinblick auf die Erkrankungsmanifestation und den Krankheitsverlauf der EAE.

Die in unseren Untersuchungen gemachten Beobachtungen ergaben im Rahmen der aEAE eine deutlich geringere Erkrankungshäufigkeit der Tiere mit funktionslosem TLR4 gegenüber den Wildtypen (22 % versus 67%). Zudem unterschieden sich die Stämme im durchschnittlichen Erkrankungsbeginn (Tag 16 versus Tag 20) sowie in der Symptompräsentation: die TLR4-defekten Mäuse entwickelten neben den Lähmungserscheinungen keine Gleichgewichtsstörungen im Sinne einer axialen Rotation. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Kerfoot et al. bei TLR4-defizienten C57BL/10ScCr Mäusen. Auch dort wurde eine verminderte Erkrankungshäufigkeit (45% vs. 90%) der TLR4-defizienten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt (Kerfoot et al., 2004). Es wurden jedoch auch gegenteilige Ergebnisse mit einer Zunahme von Symptomen nach Immunisierung von TLR4-defizienten C57Bl/6 Mäusen im Vergleich zu Wildtypen beschrieben (Marta et al., 2008) oder gar eine fehlende Relevanz des TLR4 bei der EAE-Manifestation in C57BL/6 Mäusen (Miranda-Hernandez et al., 2011) postuliert.

Bisher wurden 2 Hauptsymptome im Rahmen der EAE festgestellt: 1. die axiale Rotation als Ausdruck einer Affektion des vestibulären Apparates, des Cerebellums oder des Hirnstammes sowie 2. die ascendierende Parese, welche auf eine Läsion im Rückenmark hindeutet. In einer Publikation von Muller et al. beschreiben die Autoren die Entwicklung einer axialen Rotation bei allen untersuchten C3H/HeJ-Tieren nach EAE-Induktion mit PLP; die Symptome zeigten sich, vergleichbar mit unseren Beobachtungen, bereits zu einem frühen Zeitpunkt (durchschnittlich an Tag 17) mit einem rapiden Krankheitsverlauf innerhalb von 12 Stunden (Muller et al., 2000). Einige Jahre später präsentierte die gleiche Forschungsgruppe jedoch neue Ergebnisse nach EAE-Induktion bei C3H/HeJ-Mäusen, wobei die Tiere beide Symptome (axiale Rotation und ascendierende Parese) entwickelten (Muller et al., 2005). In unseren Untersuchungen stellte sich dies jedoch anders dar: die beiden erkrankten Tlr4^{Lps-d}-Mäuse wurden nur durch eine ascendierende Parese symptomatisch. Der Großteil (83%) der erkrankten Wildtypen zeigte ebenfalls eine ascendierende Parese, nur 50 % der Wildtypen

entwickelten Symptome einer axialen Rotation. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen von Gobel et al., die feststellten, dass 60% der untersuchten C3H/HeJ-Tiere nach EAE-Induktion mit PLP Symptome einer ascendierenden Parese entwickelten. Auch in dieser Studie wurden keine Gleichgewichtsstörungen beschrieben (Gobel et al., 2011).

Beim Vergleich unserer Ergebnisse mit den genannten Studien müssen jedoch der immunisierte Tierstamm und die Immunisierungs-Methode (MOG, PLP etc.) berücksichtigt werden: so bestehen beispielsweise große Unterschiede hinsichtlich der Anfälligkeit für eine PLP-induzierte EAE in verschiedenen Mausstämmen, die bereits 1988 von Tuohy et al. beschrieben wurden (Tuohy et al., 1988). Auch Gobel et al. zeigten, dass mit MOG immunisierte C3H/HeJ-Tiere keine Symptome entwickelten, wohingegen bei C57Bl/6-Tieren durch MOG stets eine ascendierende Parese induziert werden konnte (Gobel et al., 2011). Ein direkter Vergleich der Studien mit unseren Ergebnissen ist somit nur eingeschränkt möglich. Man kann natürlich nicht ausschließen, dass bei der klinischen Beobachtung einer größeren Population der TLR4-defekten Tiere doch Symptome einer axialen Rotation festzustellen gewesen wären, dennoch bestätigen die hier aufgeführten Ergebnisse die jüngst publizierten klinischen Beobachtungen der Tiere mit defektem TLR4 und sprechen deutlich für eine relevante Funktion des TLR4 in der EAE- Manifestation.

Die *in vitro* Versuche dienten der Untersuchung, ob sich die Fähigkeit zur Überwindung der experimentellen BHS bei TLR4-defekten Zellen im Vergleich zu den Zellen der Wildtypen unterscheidet, insbesondere in zwei der entscheidenden Schritte gemäß dem Multi-Step Modell, der Adhäsion und Transmigration. Unter normalen Umständen passieren kaum Immunzellen die BHS; im Rahmen der MS oder der EAE kommt es jedoch zur Überwindung der BHS und Einwanderung von aktivierten Lymphozyten ins Hirnparenchym, wo diese eine entzündliche Reaktion mit Demyelinisierung und Zerstörung von Neuronen verursachen.

Unsere Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen in der prä-klinischen Phase ergaben zwar keine Unterschiede hinsichtlich der Anzahl adhärerender oder transmigrierter Zellen zwischen TLR4-defekten und Wildtyp-Tieren, jedoch einen Trend der immunisierten Tiere (TLR4-defekte Tiere und Wildtypen) zu einer erhöhten Adhäsionsfähigkeit im Vergleich zu den Zellen der nur mit PTX behandelten Tiere. Die vermehrte Adhäsion der Lymphozyten könnte Ausdruck einer bereits frühen prä-klinischen Beeinträchtigung der BHS nach EAE-Induktion und die Folge einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen sein. Alvarez et al. zeigten, dass die frühe Phase der Krankheitsentwicklung, noch bevor ZNS-Läsionen histopathologisch nachweisbar sind, mit signifikanten Veränderungen im Mikromilieu der

Bluthirnschranke, wie eine vermehrte Expression von zellulären Adhäsionsmolekülen (ICAM-1 und VCAM-1), eine erhöhte Schrankendurchlässigkeit sowie strukturelle Veränderungen von Verbindungsproteinen, einhergeht. Diesen Veränderungen liegen die periphere Aktivierung der T-Zellen und die damit verbundene Ausschüttung von Signalstoffen (u.a. TNF- α , IL-17, IL-22) zugrunde (Alvarez et al., 2015).

In der klinischen Phasen wiesen die TLR4-defekten-Tiere trotz geringerer Erkrankungshäufigkeit eine signifikant erhöhte Adhäsionsfähigkeit im Vergleich zu den Zellen der Wildtypen auf. Dieses veränderte Adhäsionspotential ging jedoch nicht mit einer erhöhten Transmigrationsfähigkeit einher und führte offensichtlich nicht zu einer vermehrten Erkrankungshäufigkeit. Im Vergleich zu den nicht-immunisierten Tieren wurde bei den immunisierten Tieren (TLR4-defekte Tiere und Wildtypen) ein Trend zur vermehrten Transmigration festgestellt, welcher bei den Wildtypen Signifikanzniveau erreichte. Dieser Trend scheint angesichts der Erkrankungshäufigkeit der Wildtypen plausibel und könnte, gemäß den hier erhobenen Ergebnissen, für die Erkrankungsmanifestation entscheidend sein. Es ist denkbar, dass der Trend bei den TLR4-defekten Tieren ebenfalls Ausdruck einer gewissen Krankheitsaktivität darstellt, wenn gleich diese „klinisch stumm“ blieb. Es kann weiterhin vermutet werden, dass der funktionsuntüchtige TLR4 trotz einer gewissen systemischen Immunreaktion der TLR4-defekten Tiere eine Krankheitsmanifestation wenigstens teilweise verhindert hat. Doch zur Untermauerung dieser Annahme sind weitere Untersuchungen nötig.

Obwohl die für die *in vitro* Experimente angewandte Methode der experimentellen BHS bereits lange gut etabliert ist (Rohnelt et al., 1997; Reiss et al., 1998) und die Möglichkeit bietet im Rahmen der *in vitro* Assays die einzelnen Schritte der Überwindung der BHS zu studieren, ist zu berücksichtigen, dass die physiologische BHS sehr komplex aufgebaut ist und mannigfaltige Faktoren, von denen viele noch unbekannt oder schwer simulierbar sind, dabei beteiligt sind. Zudem ist unklar, ob die *in vitro* erhobenen Ergebnisse mit dem *in vivo* Verhalten der Zellen vergleichbar sind. Es wäre jedoch möglich, das Umfeld der BHS so zu verändern, dass eine systemische Immunreaktion bestmöglich simuliert wird, beispielsweise durch direkte Stimulation der Endothelzellen mit Substanzen wie IL-1 β oder TNF- α , die die Expression von zellulären Adhäsionsmolekülen erhöhen, was zu einer erhöhten Adhäsion und Transmigration der Leukozyten über die BHS führt (Abadier et al., 2015). Diese Option könnte beispielsweise bei zukünftigen Versuchen genutzt werden.

Zusammenfassend scheint dem TLR4 in Anbetracht der hier aufgeführten Ergebnisse in der EAE eine Bedeutung zu zukommen: es konnte gezeigt werden, dass die TLR4-defekten Tiere eine deutlich geringere Erkrankungshäufigkeit aufweisen. Die untersuchten pathophysiologischen Prozesse in den *in vitro* Assays spiegeln die geringere Anfälligkeit der TLR4-Tiere für eine EAE-Induktion zwar nicht eindeutig wider, doch möglicherweise hat der funktionsuntüchtige TLR4, trotz vergleichbarem *in vitro* Potential zur Adhäsion und Transmigration der TLR4-defekten und Wildtyp-Lymphozyten, eine EAE-Manifestation zumindest teilweise verhindert.

In zukünftigen Experimenten mit kontrolliertem Studiendesign sollte zum einen überprüft werden, ob sich die klinischen Beobachtungen und *in vitro* Assays ggf. mit einer größeren zu untersuchenden Population reproduzieren lassen; zum anderen sollte durch histologische Aufarbeitung und immunhistochemische Untersuchungen von Gehirn und Rückenmark erarbeitet werden, ob die geringere Erkrankungshäufigkeit der TLR4-defekten Tiere auch mit einer geringeren Läsionslast und die Symptome mit der Läsionslokalisation korrelieren. Dies könnte zur näheren Einordnung und zum besseren Verständnis der hier erhobenen Ergebnisse beitragen. In jedem Fall ist der TLR4 als Angriffspunkt für weitere Forschung und Entwicklung möglicher therapeutische Strategien in der MS-Behandlung nach wie vor hochinteressant.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abadier M, Haghayegh Jahromi N, Cardoso Alves L, Boscacci R, Vestweber D, Barnum S, Deutsch U, Engelhardt B, Lyck R (2015). Cell surface levels of endothelial ICAM-1 influence the transcellular or paracellular T-cell diapedesis across the blood-brain barrier. *Eur J Immunol* 45:1043-1058.
2. Adelmann M, Wood J, Benzel I, Fiori P, Lassmann H, Matthieu JM, Gardinier MV, Dornmair K, Linington C (1995). The N-terminal domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) induces acute demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Neuroimmunol* 63:17-27.
3. Aderem A, Ulevitch RJ (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406:782-787.
4. Aharoni R, Vainshtein A, Stock A, Eilam R, From R, Shinder V, Arnon R (2011). Distinct pathological patterns in relapsing-remitting and chronic models of experimental autoimmune encephalomyelitis and the neuroprotective effect of glatiramer acetate. *J Autoimmun* 37:228-241.
5. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
6. Alvarez JI, Saint-Laurent O, Godschalk A, Terouz S, Briels C, Larouche S, Bourbonniere L, Larochelle C, Prat A (2015). Focal disturbances in the blood-brain barrier are associated with formation of neuroinflammatory lesions. *Neurobiol Dis* 74:14-24.
7. Anderson KV, Jurgens G, Nusslein-Volhard C (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 42:779-789.
8. Ascherio A, Munger KL (2007). Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol* 61:288-299.
9. Banwell B, Bar-Or A, Arnold DL, Sadovnick D, Narayanan S, McGowan M, O'Mahony J, Magalhaes S, Hanwell H, Vieth R, Tellier R, Vincent T, Disanto G, Ebers G, Wambera K, Connolly MB, Yager J, Mah JK, Booth F, Sebire G, Callen D, Meaney B, Dilenge ME, Lortie A, Pohl D, Doja A, Venketaswaran S, Levin S, Macdonald EA, Meek D, Wood E, Lowry N, Buckley D, Yim C, Awuku M, Cooper P, Grand'maison F, Baird JB, Bhan V, Marrie RA (2011). Clinical, environmental, and genetic determinants of multiple sclerosis in children with acute demyelination: a prospective national cohort study. *Lancet Neurol* 10:436-445.
10. Becher B, Bechmann I, Greter M (2006). Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain. *J Mol Med* 84:532-543.
11. Beg AA (2002). Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol* 23:509-512.

12. Brex PA, Ciccarelli O, O'Riordan JI, Sailer M, Thompson AJ, Miller DH (2002). A longitudinal study of abnormalities on MRI and disability from multiple sclerosis. *N Engl J Med* 346:158-164.
13. Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM (2002). Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:1013-1021.
14. Butcher EC, Williams M, Youngman K, Rott L, Briskin M (1999). Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv Immunol* 72:209-253.
15. Coles AJ, Twyman CL, Arnold DL, Cohen JA, Confavreux C, Fox EJ, Hartung HP, Havrdova E, Selmaj KW, Weiner HL, Miller T, Fisher E, Sandbrink R, Lake SL, Margolin DH, Oyuela P, Panzara MA, Compston DA, investigators C-MI (2012). Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet* 380:1829-1839.
16. Compston A, Coles A (2002). Multiple sclerosis. *Lancet* 359:1221-1231.
17. De Jager PL, Jia X, Wang J, de Bakker PI, Ottoboni L, Aggarwal NT, Piccio L, Raychaudhuri S, Tran D, Aubin C, Briskin R, Romano S, Baranzini SE, McCauley JL, Pericak-Vance MA, Haines JL, Gibson RA, Naeglin Y, Uitdehaag B, Matthews PM, Kappos L, Polman C, McArdle WL, Strachan DP, Evans D, Cross AH, Daly MJ, Compston A, Sawcer SJ, Weiner HL, Hauser SL, Hafler DA, Oksenberg JR (2009). Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nat Genet* 41:776-782.
18. Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD (2004). Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 3:104-110.
19. Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ (1995). A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature* 377:150-151.
20. Engelhardt B (2006). Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J Neural Transm* 113:477-485.
21. Fearon DT, Locksley RM (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272:50-53.
22. Filippi M, Yousry T, Campi A, Kandziora C, Colombo B, Voltz R, Martinelli V, Spuler S, Bressi S, Scotti G, Comi G (1996). Comparison of triple dose versus standard dose gadolinium-DTPA for detection of MRI enhancing lesions in patients with MS. *Neurology* 46:379-384.
23. Flachenecker P (2006). Epidemiology of neuroimmunological diseases. *J Neurol* 253 Suppl 5:V2-8.
24. Flachenecker P, Kumpfel T, Kallmann B, Gottschalk M, Grauer O, Rieckmann P, Trenkwalder C, Toyka KV (2002). Fatigue in multiple sclerosis: a comparison of different rating scales and correlation to clinical parameters. *Mult Scler* 8:523-526.
25. Floris S, Blezer EL, Schreibelt G, Dopp E, van der Pol SM, Schadee-Eestermans IL, Nicolay K, Dijkstra CD, de Vries HE (2004). Blood-brain barrier permeability and

- monocyte infiltration in experimental allergic encephalomyelitis: a quantitative MRI study. *Brain* 127:616-627.
26. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, Ohman S, Racke MK, Sharief M, Sindic CJ, Sellebjerg F, Tourtellotte WW (2005). Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol* 62:865-870.
 27. Frohman EM, Fujimoto JG, Frohman TC, Calabresi PA, Cutter G, Balcer LJ (2008). Optical coherence tomography: a window into the mechanisms of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol* 4:664-675.
 28. Frohman EM, Racke MK, Raine CS (2006). Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 354:942-955.
 29. Gale CR, Martyn CN (1995). Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol* 47:425-448.
 30. Gobel K, Bittner S, Ruck T, Budde T, Wischmeyer E, Doring F, Wiendl H, Meuth SG (2011). Active immunization with proteolipid protein (190-209) induces ascending paralyzing experimental autoimmune encephalomyelitis in C3H/HeJ mice. *J Immunol Methods* 367:27-32.
 31. Gold R, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Giovannoni G, Selmaj K, Tornatore C, Sweetser MT, Yang M, Sheikh SI, Dawson KT, Investigators DS (2012). Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 367:1098-1107.
 32. Goodman AD, Brown TR, Edwards KR, Krupp LB, Schapiro RT, Cohen R, Marinucci LN, Blight AR, Investigators MSF (2010). A phase 3 trial of extended release oral dalfampridine in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 68:494-502.
 33. Greenwood J, Heasman SJ, Alvarez JI, Prat A, Lyck R, Engelhardt B (2011). Review: leucocyte-endothelial cell crosstalk at the blood-brain barrier: a prerequisite for successful immune cell entry to the brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 37:24-39.
 34. Greer JM, Sobel RA, Sette A, Southwood S, Lees MB, Kuchroo VK (1996). Immunogenic and encephalitogenic epitope clusters of myelin proteolipid protein. *J Immunol* 156:371-379.
 35. Hammond SR, English DR, McLeod JG (2000). The age-range of risk of developing multiple sclerosis: evidence from a migrant population in Australia. *Brain* 123 (Pt 5):968-974.
 36. Hawkins BT, Davis TP (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 57:173-185.
 37. Hickey WF (1991). Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol* 1:97-105.
 38. Horng T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R (2002). The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 420:329-333.

39. Janeway CA, Jr., Medzhitov R (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
40. Kallmann BA, Wagner S, Hummel V, Buttmann M, Bayas A, Tonn JC, Rieckmann P (2002). Characteristic gene expression profile of primary human cerebral endothelial cells. *FASEB J* 16:589-591.
41. Kasper LH, Shoemaker J (2010). Multiple sclerosis immunology: The healthy immune system vs the MS immune system. *Neurology* 74 Suppl 1:S2-8.
42. Kawai T, Akira S (2006). TLR signaling. *Cell Death Differ* 13:816-825.
43. Kawai T, Akira S (2007). Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13:460-469.
44. Kawai T, Akira S (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373-384.
45. Kerfoot SM, Long EM, Hickey MJ, Andonegui G, Lapointe BM, Zanardo RC, Bonder C, James WG, Robbins SM, Kubes P (2004). TLR4 contributes to disease-inducing mechanisms resulting in central nervous system autoimmune disease. *J Immunol* 173:7070-7077.
46. Kojima K, Wekerle H, Lassmann H, Berger T, Linington C (1997). Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4+ T cells specific for an astrocyte protein, S100 beta. *J Neural Transm Suppl* 49:43-51.
47. Kurtzke JF (1983). Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33:1444-1452.
48. Kurtzke JF (1993). Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clin Microbiol Rev* 6:382-427.
49. Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, Lefebvre S, Follett PL, Jensen FE, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T (2002). The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci* 22:2478-2486.
50. Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T (2003). Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8514-8519.
51. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.
52. Linthicum DS, Munoz JJ, Blaskett A (1982). Acute experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. I. Adjuvant action of *Bordetella pertussis* is due to vasoactive amine sensitization and increased vascular permeability of the central nervous system. *Cell Immunol* 73:299-310.

53. Maezawa I, Maeda N, Montine TJ, Montine KS (2006). Apolipoprotein E-specific innate immune response in astrocytes from targeted replacement mice. *J Neuroinflammation* 3:10.
54. Margaritella N, Mendozzi L, Garegnani M, Colicino E, Gilardi E, Deleonardis L, Tronci F, Pugnetti L (2011). Sensory evoked potentials to predict short-term progression of disability in multiple sclerosis. *Neurol Sci*.
55. Marshak-Rothstein A (2006). Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 6:823-835.
56. Marta M, Andersson A, Isaksson M, Kampe O, Lobell A (2008). Unexpected regulatory roles of TLR4 and TLR9 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 38:565-575.
57. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS (2001). Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50:121-127.
58. McLeod JG, Hammond SR, Kurtzke JF (2012). Migration and multiple sclerosis in United Kingdom and Ireland immigrants to Australia: a reassessment. II. Characteristics of early (pre-1947) compared to later migrants. *J Neurol* 259:684-693.
59. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 9:4-9.
60. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
61. Miller DH, Weinshenker BG, Filippi M, Banwell BL, Cohen JA, Freedman MS, Galetta SL, Hutchinson M, Johnson RT, Kappos L, Kira J, Lublin FD, McFarland HF, Montalban X, Panitch H, Richert JR, Reingold SC, Polman CH (2008). Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Mult Scler* 14:1157-1174.
62. Miranda-Hernandez S, Gerlach N, Fletcher JM, Biros E, Mack M, Korner H, Baxter AG (2011). Role for MyD88, TLR2 and TLR9 but not TLR1, TLR4 or TLR6 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 187:791-804.
63. Montalban X, Tintore M, Swanton J, Barkhof F, Fazekas F, Filippi M, Frederiksen J, Kappos L, Palace J, Polman C, Rovaris M, de Stefano N, Thompson A, Yousry T, Rovira A, Miller DH (2010). MRI criteria for MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology* 74:427-434.
64. Muller DM, Pender MP, Greer JM (2000). A neuropathological analysis of experimental autoimmune encephalomyelitis with predominant brain stem and cerebellar involvement and differences between active and passive induction. *Acta Neuropathol* 100:174-182.
65. Muller DM, Pender MP, Greer JM (2005). Blood-brain barrier disruption and lesion localisation in experimental autoimmune encephalomyelitis with predominant cerebellar and brainstem involvement. *J Neuroimmunol* 160:162-169.

66. Muller WA (2009). Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes. *Circ Res* 105:223-230.
67. Muzio M, Polentarutti N, Bosisio D, Prahlanan MK, Mantovani A (2000). Toll-like receptors: a growing family of immune receptors that are differentially expressed and regulated by different leukocytes. *J Leukoc Biol* 67:450-456.
68. O'Connor P, Wolinsky JS, Confavreux C, Comi G, Kappos L, Olsson TP, Benzerdjeb H, Truffinet P, Wang L, Miller A, Freedman MS, Group TT (2011). Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 365:1293-1303.
69. Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 164:558-561.
70. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69:292-302.
71. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Weinshenker BG, Wolinsky JS (2005). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 58:840-846.
72. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088.
73. Poltorak A, Ricciardi-Castagnoli P, Citterio S, Beutler B (2000). Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2163-2167.
74. Poser CM (1994). The epidemiology of multiple sclerosis: a general overview. *Ann Neurol* 36 Suppl 2:S180-193.
75. Praksova P, Stourac P, Bednarik J, Vlckova E, Mikulkova Z, Michalek J (2012). Immunoregulatory T cells in multiple sclerosis and the effect of interferon beta and glatiramer acetate treatment on T cell subpopulations. *J Neurol Sci* 319:18-23.
76. Prat A, Antel J (2005). Pathogenesis of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 18:225-230.
77. Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G (2010). Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *Lancet Neurol* 9:727-739.
78. Ramgolam VS, Sha Y, Jin J, Zhang X, Markovic-Plese S (2009). IFN-beta inhibits human Th17 cell differentiation. *J Immunol* 183:5418-5427.
79. Reese TS, Karnovsky MJ (1967). Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 34:207-217.

80. Reiss Y, Hoch G, Deutsch U, Engelhardt B (1998). T cell interaction with ICAM-1-deficient endothelium *in vitro*: essential role for ICAM-1 and ICAM-2 in transendothelial migration of T cells. *Eur J Immunol* 28:3086-3099.
81. Reynolds JM, Martinez GJ, Chung Y, Dong C (2012). Toll-like receptor 4 signaling in T cells promotes autoimmune inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:13064-13069.
82. Roach JC, Glusman G, Rowen L, Kaur A, Purcell MK, Smith KD, Hood LE, Aderem A (2005). The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9577-9582.
83. Rohnelt RK, Hoch G, Reiss Y, Engelhardt B (1997). Immunosurveillance modelled *in vitro*: naive and memory T cells spontaneously migrate across unstimulated microvascular endothelium. *Int Immunol* 9:435-450.
84. Rothhammer V, Heink S, Petermann F, Srivastava R, Claussen MC, Hemmer B, Korn T (2011). Th17 lymphocytes traffic to the central nervous system independently of alpha4 integrin expression during EAE. *J Exp Med* 208:2465-2476.
85. Rovira A, Swanton J, Tintore M, Huerga E, Barkhof F, Filippi M, Frederiksen JL, Langkilde A, Miszkiel K, Polman C, Rovaris M, Sastre-Garriga J, Miller D, Montalban X (2009). A single, early magnetic resonance imaging study in the diagnosis of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 66:587-592.
86. Rubartelli A, Lotze MT (2007). Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol* 28:429-436.
87. Runia TF, Hop WC, de Rijke YB, Buljevac D, Hintzen RQ (2012). Lower serum vitamin D levels are associated with a higher relapse risk in multiple sclerosis. *Neurology* 79:261-266.
88. Sadovnick AD, Ebers GC (1993). Epidemiology of multiple sclerosis: a critical overview. *Can J Neurol Sci* 20:17-29.
89. Schlaeger R, D'Souza M, Schindler C, Grize L, Kappos L, Fuhr P (2012). Combined evoked potentials as markers and predictors of disability in early multiple sclerosis. *Clin Neurophysiol* 123:406-410.
90. Sellebjerg F, Barnes D, Filippini G, Midgard R, Montalban X, Rieckmann P, Selmaj K, Visser LH, Sorensen PS (2005). EFNS guideline on treatment of multiple sclerosis relapses: report of an EFNS task force on treatment of multiple sclerosis relapses. *Eur J Neurol* 12:939-946.
91. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189:1777-1782.
92. Swanborg RH (1995). Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease. *Clin Immunol Immunopathol* 77:4-13.
93. Swanton JK, Fernando KT, Dalton CM, Miszkiel KA, Altmann DR, Plant GT, Thompson AJ, Miller DH (2009). Early MRI in optic neuritis: the risk for disability. *Neurology* 72:542-550.

94. Swanton JK, Rovira A, Tintore M, Altmann DR, Barkhof F, Filippi M, Huerga E, Miszkiel KA, Plant GT, Polman C, Rovaris M, Thompson AJ, Montalban X, Miller DH (2007). MRI criteria for multiple sclerosis in patients presenting with clinically isolated syndromes: a multicentre retrospective study. *Lancet Neurol* 6:677-686.
95. Takeda K, Akira S (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17:1-14.
96. Takeshita Y, Ransohoff RM (2012). Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier: chemokine regulation and in vitro models. *Immunol Rev* 248:228-239.
97. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L (1998). Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 338:278-285.
98. Tuohy VK, Sobel RA, Lees MB (1988). Myelin proteolipid protein-induced experimental allergic encephalomyelitis. Variations of disease expression in different strains of mice. *J Immunol* 140:1868-1873.
99. Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, Yang BG, Jung YJ, Nishiyama M, Sato S, Tsujimura T, Yamamoto M, Yokota Y, Kiyono H, Miyasaka M, Ishii KJ, Akira S (2008). Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol* 9:769-776.
100. Weinstock-Guttman B, Mehta BK, Ramanathan M, Karmon Y, Henson LJ, Halper J, Riskind P (2012). Vitamin D and multiple sclerosis. *Neurologist* 18:179-183.
101. Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J, Lassmann H, Linington C (1994). Animal models. *Ann Neurol* 36 Suppl:S47-53.
102. Wekerle H, Schwab M, Linington C, Meyermann R (1986). Antigen presentation in the peripheral nervous system: Schwann cells present endogenous myelin autoantigens to lymphocytes. *Eur J Immunol* 16:1551-1557.
103. Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z (1997). MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 7:837-847.
104. Wing K, Sakaguchi S (2010). Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* 11:7-13.
105. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249:1431-1433.
106. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, Akira S (2002). Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420:324-329.
107. Zekki H, Feinstein DL, 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* 12:308-319.

108. Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh S (2004). A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303:1522-1526.
109. Zhang G, Ghosh S (2001). Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* 107:13-19.

7 DANKSAGUNG

Mein herzlichster Dank geht an erster Stellen an meine Betreuerin Frau Priv.-Doz. Dr. med. Silke Walter für die hervorragende Hilfe, kompetente Beratung, endlose Geduld und freundschaftliche Unterstützung, die sie mir, trotz ihrer Belastung in Klinik und Forschung, entgegenbrachte.

Herrn Prof. Dr. med. Klaus Faßbender danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten.

Hervorzuheben ist auch die außerordentlich gute Zusammenarbeit mit meinen Mitdoktoranden und allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts. Diese Arbeit wäre ohne ihre Hilfe nicht durchführbar gewesen.

Ich danke zudem all meinen Freunden und Kollegen, die mich auf meinem Weg begleitet haben, mit denen ich mich stets austauschen konnte und die mich immer wieder motiviert haben.

Besonderer Dank gilt meinem Ehemann, der mir stets Mut zugesprochen und mich in meiner Arbeit immer bestärkt hat. Ohne seine Bereitschaft mich zu entlasten und zu unterstützen, wäre meine Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Und nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben.