

Aus der Neurologischen Klinik

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Prof. Dr. med. K. Faßbender

**Die Bedeutung des angeborenen
Immunrezeptors CD14 in der Pathogenese der
experimentellen Multiplen Sklerose**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2016

vorgelegt von: Ramona Halmer

geboren am 10.03.1986 in Singen (Hohentwiel)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Abkürzungen | IV |
| 1 Zusammenfassung und Summary | 1 |
| 1.1 Zusammenfassung | 1 |
| 1.2 Summary | 3 |
| 2 Einleitung..... | 5 |
| 2.1 Multiple Sklerose | 5 |
| 2.1.1 Epidemiologie | 5 |
| 2.1.2 Klinische Symptomatik..... | 5 |
| 2.1.3 Diagnostik..... | 6 |
| 2.1.4 Ätiologie..... | 8 |
| 2.1.5 Pathogenese | 9 |
| 2.1.6 Therapie | 12 |
| 2.2 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis | 13 |
| 2.3 Blut-Hirn-Schranke..... | 15 |
| 2.4 Einwanderung von Lymphozyten ins Zentralnervensystem | 16 |
| 2.5 T-Zell-Aktivierung durch Antigenpräsentation..... | 20 |
| 2.5.1 Antigen-präsentierende Zellen..... | 20 |
| 2.5.2 Der Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex | 21 |
| 2.5.3 T-Zell-Rezeptor..... | 22 |
| 2.5.4 Kostimulatorische Signalwege | 23 |
| 2.6 Lipopolysaccharid-Rezeptor (CD14)..... | 25 |
| 2.7 Zielsetzung..... | 27 |
| 3 Material und Methoden | 28 |
| 3.1 Geräte..... | 28 |
| 3.2 Chemikalien und Reagenzien..... | 29 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 3.3 | Antikörper | 31 |
| 3.4 | Zellkulturmedien | 31 |
| 3.5 | Puffer und Lösungen | 32 |
| 3.6 | Tierexperimentelle Methoden | 33 |
| 3.6.1 | Induktion der aktiven EAE | 33 |
| 3.6.2 | Herstellung von Einzelzellsuspension aus sekundären Lymphorganen..... | 34 |
| 3.6.3 | Blutentnahme | 34 |
| 3.7 | Zellkultur | 34 |
| 3.7.1 | Kultivierung der Endothelzellen | 34 |
| 3.7.2 | Passagieren von Endothelzellen | 35 |
| 3.7.3 | Bestimmung der Lebendzellzahl..... | 35 |
| 3.7.4 | Auftauen von Endothelzellen | 36 |
| 3.7.5 | Einfrieren von Endothelzellen | 36 |
| 3.8 | Adhäsionsassay | 36 |
| 3.9 | Transmigrationsassay | 38 |
| 3.10 | Durchflusszytometrie | 40 |
| 3.10.1 | Allgemeines Prinzip | 40 |
| 3.10.2 | Bestimmung der Expression von T-Zell-aktivierenden Molekülen und Adhäsionsmolekülen auf Lymphozyten..... | 40 |
| 3.11 | ELISA | 41 |
| 3.11.1 | Allgemeines Prinzip | 41 |
| 3.11.2 | Bestimmung von MMP-2 und MMP-9 in Mausseren | 42 |
| 4 | Ergebnisse | 44 |
| 4.1 | Einfluss der CD14-Defizienz auf den EAE Krankheitsverlauf | 44 |
| 4.2 | Untersuchung des kostimulatorischen Signalweges B7-1/2- CD28/CTLA-4 | 46 |
| 4.2.1 | Expression des T-Zell-aktivierenden Rezeptors CD28 | 46 |
| 4.2.2 | Expression des T-Zell-inhibierenden Rezeptors CTLA-4 | 48 |
| 4.3 | Untersuchung der Adhäsionsmoleküle | 51 |
| 4.4 | Adhäsionsfähigkeit von Lymphozyten bei CD14-Defizienz | 54 |

| | | |
|-----|--|----|
| 4.5 | Transmigrationsfähigkeit von Lymphozyten bei CD14-Defizienz..... | 56 |
| 4.6 | Expression von MMP-2 und MMP-9 am Erkrankungspeak p.i..... | 60 |
| 5 | Diskussion..... | 62 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 68 |
| 7 | Abbildungsverzeichnis | 78 |
| 8 | Tabellenverzeichnis | 80 |
| 9 | Publikationen | 81 |
| 10 | Danksagung | 83 |

Abkürzungen

| | |
|-------|--|
| aEAE | aktive EAE |
| APC | Antigen-presenting cells, Antigen-präsentierende Zellen |
| BHS | Blut-Hirn-Schranke |
| CFA | Complete Freund's Adjuvant, Komplettes Freund-Adjuvans |
| DGN | Deutsche Gesellschaft für Neurologie |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagles Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EAE | Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis |
| EBV | Epstein-Barr-Virus |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| HBSS | Hank's Balanced Salts |
| ICAM | Intercellular adhesion molecule, Interzelluläres Adhäsionsmolekül |
| IFA | Inkomplettes Freund-Adjuvans |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleukin |
| ITAM | Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif Immunrezeptor Tyrosin-basierte aktivierende Motive |
| LBP | Lipopolysaccharid-bindendes Protein |
| LFA | Lymphocyte function-associated antigen |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MBP | Myelin-Basisches Protein |
| MHC | Major Histocompatibility Complex, Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex |
| MMP | Matrix-Metalloproteasen |
| MOG | Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| MS | Multiple Sklerose |

| | |
|------------------|--|
| n.s. | nicht signifikant |
| p.i. | post immunization, nach Immunisierung |
| PLP | Proteolipid-Protein |
| PP-MS | Primary Progressive MS, primär progrediente MS |
| PSGL | P-Selectin-Glykoprotein |
| PTX | Pertussistoxin |
| RR-MS | Relapsing Remitting MS, schubförmig remittierende MS |
| SP-MS | Secondary Progressive MS, sekundär progrediente MS |
| TCR | T cell receptor, T-Zell-Rezeptor |
| TGF | Transforming growth factor, Transformierender Wachstumsfaktor |
| TLR | Toll-like Rezeptor |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| T _{reg} | Regulatorische T-Zellen |
| VCAM | Vascular cell adhesion molecule, Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül |
| VLA | Very late antigen |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

1 Zusammenfassung und Summary

1.1 Zusammenfassung

Die Bedeutung des angeborenen Immunrezeptors CD14 in der Pathogenese der experimentellen Multiplen Sklerose

Die Multiple Sklerose ist die häufigste chronische, neurodegenerative, autoimmun vermittelte Erkrankung des jungen Erwachsenenalters. Sie ist gekennzeichnet durch eine Infiltration autoimmuner Zellen ins Zentralnervensystem, die dort zu einer Inflammation, neuronalen Degeneration und Bildung gliotischer Narben führen.

Ein Großteil der pathophysiologischen Verständnisse der Multiplen Sklerose konnte durch Studien am Tiermodell, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis, gewonnen werden.

Betrachtet man die Pathophysiologie der Erkrankung, so spielen insbesondere die Aktivierung autoimmuner Zellen in der Peripherie und die anschließende Migration über die entzündlich veränderte Blut-Hirn-Schranke eine entscheidende Rolle. Die Einwanderung der Zellen ins Zentralnervensystem folgt hierbei einem komplexen Mechanismus, bei dem Adhäsionsmoleküle der Lymphozyten und des Endothels interagieren. Im Zentralnervensystem bewirken die autoimmunen Zellen letztendlich die weitere Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, die gemeinsam eine Demyelinisierung mit Verlust der saltatorischen Erregungsfortleitung, Axon- und Oligodendrozytenschädigung verursachen.

Obwohl die genaue Pathogenese bisher nicht geklärt ist, geht man bei der Multiplen Sklerose von einer CD4⁺ T-Zell-vermittelten Erkrankung aus. Zwischenzeitlich gibt es jedoch immer mehr Hinweise, dass auch das angeborene Immunsystem bei der Krankheitsentstehung eine wichtige Rolle spielt. Es ist bekannt, dass der Lipopolysaccharidrezeptor CD14, ein Rezeptor des angeborenen Immunsystems, die Pathophysiologie der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis beeinflusst.

CD14-defiziente Mäuse zeigten eine Zunahme der klinischen Symptomatik nach Induktion einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis sowie histopathologisch vermehrte entzündliche Infiltrate in Hirn und Rückenmark. Die pathophysiologischen Schritte dieser Erkenntnisse sind bis jetzt nicht geklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte daher die Untersuchung der Lymphozyten-Aktivierung, insbesondere der kostimulatorischen Moleküle CTLA-4 und CD28, sowie der Zellmigration über die Blut-Hirn-Schranke mit Durchführung von *in vitro* Adhäsions- und Transmigrationstests. In den Ergebnissen sahen wir nach Induktion der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis *in vitro* eine signifikant erhöhte Migration von Lymphozyten aus CD14-defizienten Mäusen gegenüber ihrer Wildtypkontrolle durch Endothelzellen am Peak der Erkrankung. Hingegen zeigte sich im Adhärenzverhalten in den *in vitro* Adhäsionstests kein Unterschied zwischen beiden Gruppen. Auch konnte durchflusszytometrisch eine veränderte Expression der Zellaktivierungsmoleküle TCR/CTLA-4 oder TCR/CD28 sowie der für die Adhäsion und Migration relevanten Integrine LFA-1 und α 4-Integrin auf Lymphozyten von CD14-defizienten Mäusen ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf eine entscheidende Rolle des CD14 Rezeptors bei der Migration von Zellen ins Zentralnervensystem im Rahmen einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis hin und zeigen erneut die Relevanz der angeborenen Immunrezeptoren bei erworbenen Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise der Multiplen Sklerose.

1.2 Summary

The Role of the innate immune receptor CD14 in the pathogenesis of experimental multiple sclerosis

Multiple sclerosis is the most common chronic, autoimmune, neurodegenerative disease in young adults and is characterized by an infiltration of autoimmune cells into the central nervous system, leading to inflammation, subsequent neurodegeneration and formation of gliotic scars.

Most of the pathophysiological understanding has been gained by its animal model experimental autoimmune encephalomyelitis.

Pathophysiologically, the peripheral activation of autoimmune cells and the migration across the inflamed blood-brain barrier are crucial steps in the development of the disease. Migration of cells into the parenchyma of the central nervous system follows a complex multi-step process involving interactions between complementary adhesion molecules on the surfaces of lymphocytes and endothelial cells. Finally, in the central nervous system autoimmune cells provoke secretion of proinflammatory cytokines and chemokines, leading to demyelination with loss of saltatory conduction, axonal and oligodendrocyte damage.

Although the cause of the disease is presently still unknown, multiple sclerosis is considered as a CD4⁺ T cell mediated disease. In the meantime, however, there are several findings that support a disease-promoting role of the innate immune system. It has been described that the lipopolysaccharide receptor CD14, a receptor of the innate immune system, plays a central role in experimental autoimmune encephalomyelitis development. CD14-deficiency resulted in an increased disease severity and enhanced inflammatory infiltration in brain and spinal cord during experimental autoimmune encephalomyelitis. Up to now, the pathophysiological mechanism remains unclear. In the current study, we further investigated the causes of this disease aggravation by CD14-deficiency and examined lymphocyte activation, focusing on the costimulatory molecules CTLA-4 and CD28, and migration capacity over the blood brain barrier by *in vitro* adhesion and transmigration assays.

In the results, we observed a significantly increased migration capability of lymphocytes from CD14-deficient mice compared to wildtype controls, when lymphocytes were isolated in the clinical phase of the experimental autoimmune encephalomyelitis. In contrast, we did not see any differences in adhesion capacity, using *in vitro* adhesion tests, between both groups. Additionally, there were no differences in expression levels of cell activation molecules TCR/CTLA-4 or TCR/CD28 and adhesion molecules LFA-1 und α 4-integrin on lymphocytes from CD14-deficient mice.

The results demonstrate an important role of the CD14 receptor in migration of lymphocytes into the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis and strengthen the importance of innate immune receptors in adaptive autoimmune disorders, such as multiple sclerosis.

2 Einleitung

2.1 Multiple Sklerose

2.1.1 Epidemiologie

Über hundert Jahre sind vergangen seit Carswell, Charcot und Cruveilhier erstmals die klinischen Symptome und pathologischen Merkmale der Multiplen Sklerose (MS) beschrieben (Carswell, 1838; Charcot, Bourneville, 1869; Cruveilhier, 1829). Heute gilt sie als die häufigste chronische, autoimmun vermittelte, neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), charakterisiert durch Inflammation, Demyelinisierung und Axondegeneration (Trapp et al., 1998).

Weltweit sind derzeit mehr als zwei Millionen Menschen an MS erkrankt. Entsprechend epidemiologischer Studien liegt die Prävalenz der MS in Deutschland bei ca. 120 Erkrankten pro 100000 Einwohner. Höchste Prävalenz zeigte sich hierbei in der Altersgruppe von 40 - 59 Jahren (Hein, Hopfenmuller, 2000). Erste Daten des im Jahre 2000 gegründeten MS Registers in Deutschland ergaben, dass 71 % der in Deutschland registrierten Patienten weiblich sind (Flachenecker, Stuke, 2008). Bereits 1970 bestätigten Studien, dass Frauen im Durchschnitt doppelt so häufig von der Erkrankung betroffen sind wie Männer (Acheson, 1977). Typischerweise manifestiert sich die Erkrankung zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, nur selten beginnt sie vor dem 20. oder nach dem 50. Lebensjahr.

2.1.2 Klinische Symptomatik

MS Patienten leiden je nach Lokalisation und Größe der Entmarkungsherde an verschiedenen fokal-neurologischen Defiziten.

Tabelle 1 zeigt die unterschiedlichen Symptome entsprechend des betroffenen Funktionsbereiches im Rahmen der inflammatorischen Schädigung.

Tabelle 1: Unterschiedliche Symptome abhängig von der Lokalisation der Entmarkungsherde

| Lokalisation | Symptome |
|----------------------|---|
| Hirnnerven | Retrobulbärneuritis, Augenmuskelparesen, Internukleäre Ophthalmoplegie, Trigeminusneuralgie, Hemifaziale Myokymie |
| Motorik | Paresen, Spastik, Myoklonien |
| Sensibilität | Parästhesien, Hypästhesien |
| Vegetativum | Blasen-, Mastdarm-, Sexualfunktionsstörungen |
| Psyche und Kognition | Depression, Fatigue |

Zu Beginn der Erkrankung entwickeln die Patienten oftmals zunächst ein isoliertes klinisches Syndrom durch eine einzelne Läsion im ZNS. Manifestationsort ist vor allem die Sehbahn mit dem Symptom der Optikusneuritis (Coles, 2009). Ein Großteil der Patienten zeigt nach gewisser Zeit erneute klinische Symptome, ausgelöst durch sich neu entwickelnde inflammatorische ZNS-Läsionen, und erfüllt somit die Kriterien einer MS.

Abhängig von ihrem klinischen Verlauf werden verschiedene Formen der Erkrankung unterschieden (Lublin, Reingold, 1996). Die häufigste Form mit etwa 80 % der Patienten ist die schubförmige remittierende MS (Relapsing Remitting MS, RR-MS). Sie ist gekennzeichnet durch einzelne Schübe, die sich vollständig oder unvollständig zurückbilden. Zwischen den Schüben schreitet die klinische Symptomatik nicht fort. Im Laufe der Jahre entwickeln unbehandelt 50 % der Patienten mit RR-MS eine sekundär progrediente MS (Secondary Progressive MS, SP-MS) mit kontinuierlicher Verschlechterung. Nur 20 % leidet von Beginn an einer primär progredienten Form (Primary Progressive MS, PP-MS), die durch ein chronisches Fortschreiten ohne Schubsymptomatik gekennzeichnet ist (Noseworthy et al., 2000).

2.1.3 Diagnostik

Seit 2001 gelten die McDonald Kriterien als Goldstandard zur Diagnose der MS (McDonald et al., 2001). Sie wurden 2010 zuletzt aktualisiert, wodurch die Diagnosestellung erleichtert wurde (Polman et al., 2011). Bei der Diagnostik spielen

neben einer neurologischen Untersuchung mit entsprechender Symptomatik und Anzahl der Schübe auch die zerebrale und spinale Magnetresonanztomographie (MRT) eine wichtige Rolle. So lässt sich in der MRT die bei einer akuten Läsion vorübergehende Störung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) durch Anreicherung mit Kontrastmittel nachweisen. Aber auch eine lymphozytäre Pleozytose oder oligoklonale Banden im Liquor sowie verlängerte evozierte Potentiale bei neurophysiologischen Untersuchungen können für eine MS sprechen. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der aktuellen McDonald Kriterien zur Diagnostik der MS.

Tabelle 2: Diagnosekriterien der MS

| Schübe | Objektivierbare klinische Läsion | Weitere erforderliche Kriterien |
|-------------------------------------|---|---|
| 2 oder mehr | 2 oder mehr | <ul style="list-style-type: none"> Keine, klinische Evidenz ausreichend |
| 2 oder mehr | 1 | <ul style="list-style-type: none"> Räumliche Dissemination (MRT) Oder weiterer klinischer Schub |
| 1 | 2 oder mehr | <ul style="list-style-type: none"> Zeitliche Dissemination (MRT) oder zweiter klinischer Schub |
| 1 (monosymptomatische Präsentation) | 1 | <ul style="list-style-type: none"> Räumliche und zeitliche Dissemination (MRT) oder zweiter klinischer Schub |
| 0 (primär progredienter Verlauf) | Kontinuierliche Krankheitsprogression über 1 Jahr | <p>und mindestens zwei der folgenden zusätzlichen Kriterien:</p> <ul style="list-style-type: none"> Räumliche Dissemination (craniale MRT) Räumliche Dissemination (spinale MRT) Positiver Liquorbefund |

Hierbei bedeutet eine räumliche Dissemination das Auftreten von Entzündungsherden an mehr als einem Ort im ZNS und eine zeitliche Dissemination der Nachweis von neuen Entzündungsherden im Verlauf der Erkrankung.

2.1.4 Ätiologie

Obwohl die MS bereits vor einhundert Jahren beschrieben wurde, ist die Ätiologie der Erkrankung bis heute nicht geklärt. Es wird ein Zusammenspiel von genetischer Prädisposition, Umweltfaktoren und Infektionen vermutet (Lincoln, Cook, 2009). So konnten Studien zeigen, dass das Risiko an MS zu erkranken bei Verwandten ersten Grades um 3-5 % im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöht ist (Dyment et al., 1997). Verantwortliche Gene gehören u.a. zu dem humanen leukozytären System. Hier zeigt sich bei den Haplotypen HLA-DR15 und HLA-DQ6 eine Assoziation zu MS (Hillert, Olerup, 1993). Auch Gene für den Interleukin (IL)-2 α - und IL-7 α -Rezeptor spielen wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Erkrankung (Lundmark et al., 2007).

Die geographisch ungleichmäßige Verteilung mit hoher Erkrankungshäufigkeit in den nördlichen und südlichen Breiten sowie verminderter Prävalenz in der äquatorialen Zone lässt des Weiteren vermuten, dass Umweltfaktoren die Krankheitsentstehung beeinflussen. Als mögliche Faktoren, die zu diesem Verteilungsmuster führen können, werden Sonnenlicht, Vitamin D und Epstein-Barr-Virus (EBV) diskutiert (Ascherio, Munger, 2007a, b). Alotaibi et al. zeigten, dass bei 83 % der Kinder mit MS zum Zeitpunkt der Diagnose eine EBV-Infektion vorlag, während nur 42 % in der Kontrollgruppe von EBV betroffen waren (Alotaibi et al., 2004).

Vitamin D wird durch Unterdrückung der Antikörperproduktion, Verstärkung der T_H2-Funktion und Verminderung proinflammatorischer Zytokine als potenter Modulator des Immunsystems angesehen (Holick, 2007). Tatsächlich zeigten epidemiologische Studien, dass auch die Anzahl an MS erkrankter Patienten in Ländern mit geringer Sonneneinstrahlung und somit verminderter Vitamin D Synthese erhöht ist (Van Der Mei et al., 2003). Neben oben genannten Einflüssen werden zahlreiche weitere Faktoren, die eine Bedeutung bei der Entwicklung der MS haben können, diskutiert, u.a. Infektionen mit *Chlamydia pneumoniae* (Sriram et al., 1998), Rauchen (Backhaus et al., 2016) und orale Kontrazeptiva (Hellwig et al., 2016).

2.1.5 Pathogenese

Die MS zählt zu den autoimmun vermittelten, disseminierten, demyelinisierenden Entzündungen des ZNS. Ihr kennzeichnendes pathologisches Merkmal ist im akuten Stadium der Nachweis inflammatorischer Infiltrate, bestehend aus in das ZNS eingewanderten Lymphozyten und Makrophagen, die letztendlich zum Neuronenverlust und zur Ausbildung sogenannter gliotischer Herde führen.

Obwohl die exakten Faktoren für eine Inflammation nicht bekannt sind, geht man von einer CD4⁺ T-Zell-getriggerten Autoimmunantwort gegen das ZNS aus. Zur Induktion dieser autoimmunen T-Zellen präsentieren Antigen-präsentierende Zellen (Antigen-presenting cells, APC) in den sekundären lymphatischen Organen, wie beispielsweise Tonsillen, Wurmfortsatz, Milz oder Lymphknoten, ein körpereigenes myelines Antigen an die naiven T-Zellen. Mit Hilfe kostimulatorischer Signale kommt es zur T-Zell-Aktivierung und -Differenzierung. Die Differenzierung dieser nun autoreaktiven T-Zellen zu CD4⁺ Effektorzellen ist, wie in Abbildung 1 dargestellt, durch die von den APC produzierten Zytokine abhängig (Weiner, 2009).

Frühere Studien postulierten, dass unter den Subtypen die T_H1-Zellen die entscheidenden Mediatoren in der Krankheitsentwicklung sind. Für ihre Entwicklung benötigen sie die von APC produzierten proinflammatorischen Zytokine Interferon (IFN)- γ und IL-12, wobei sie selbst IFN- γ und Tumornekrosefaktor (TNF)- β sezernieren (Balashov et al., 1999; Qin et al., 1998). *In vitro* zeigte sich in Liquor und Blut von MS Patienten eine erhöhte Anzahl IFN- γ sezernierender T_H1-Zellen nach Stimulation mit einem myelinen Protein (Olsson et al., 1990).

Des Weiteren wird den T_H17-Zellen als ein eigenständiger Subtyp von CD4⁺ Zellen, die sich in Zytokinproduktion, Chemokinrezeptoren und Differenzierungsfaktoren von T_H1- und T_H2-Zellen unterscheiden, eine bedeutende krankheitsfördernde Funktion zugeschrieben (Iwakura, Ishigame, 2006).

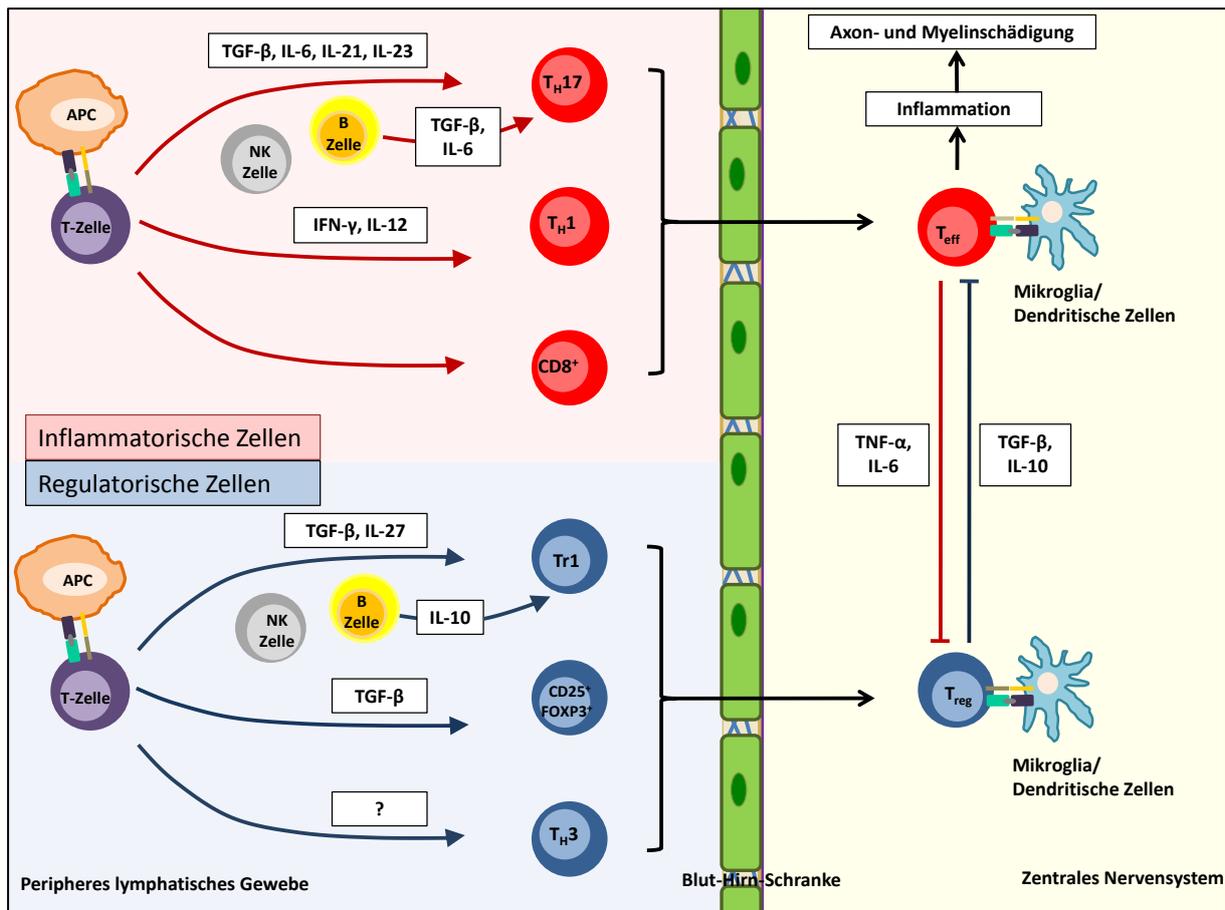


Abbildung 1: Schematische Darstellung der T-Zell-Differenzierung (nach Weiner, 2009)

Nach Aktivierung naiver T-Zellen durch Präsentation eines Antigens differenzieren die Zellen in Anwesenheit von kostimulatorischen Signalwegen, abhängig von den sezernierten Zytokinen, in unterschiedliche Effektorzellen. Die Aktivierung inflammatorischer Effektorzellen wird von regulatorischen Zellen sowohl in der Peripherie als auch im ZNS moduliert (Weiner, 2009).

Charakteristisch für sie ist die Produktion von IL-17, IL-6, IL-22, TNF- α und GM-CSF (Langrish et al., 2005). Das exakte Zusammenspiel von TH1- und TH17-Zellen ist noch ungeklärt. TH17-Zellen können sich bei Abwesenheit des transformierenden Wachstumsfaktors (Transforming growth factor, TGF)- β und ausreichender Stimulation mit IL-12 zu TH1-Zellen umwandeln und IFN- γ produzieren (Lee et al., 2009). Bewiesen ist, dass im Tiermodell der MS IL-17-defiziente Mäuse einen signifikant milderen Krankheitsverlauf entwickeln (Komiyama et al., 2006).

Neben inflammatorischen T-Zell-Antworten sind auch physiologische Mechanismen zur Prävention einer Autoimmunantwort essenziell. Eine entscheidende Funktion haben hierfür als weitere Population von CD4⁺ Zellen die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}): Sie tragen durch Suppression von autoreaktiven T-Zellen zur

Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz bei (Kim et al., 2007). Ihre suppressive Funktion üben sie möglicherweise durch Zell-Zell-Kontakt oder durch Produktion der immunsuppressiven Zytokine IL-10 und TGF- β aus (Von Boehmer, 2005). Patienten mit RR-MS weisen eine verminderte Anzahl T_{reg}-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Haas et al., 2007).

Im Anschluss an diese T-Zell-Aktivierung migrieren die T-Effektorzellen über einen komplexen Mechanismus die BHS und treffen im perivaskulären Raum erneut auf die autoantigenen Bestandteile der Myelinscheiden: Die Zellen werden dort reaktiviert und setzen aufgrund einer gesteigerten Immunantwort vermehrt proinflammatorische Zytokine frei, die zu einer Rekrutierung und Aktivierung von weiteren autoreaktiven T-Zellen aus der Peripherie, T-Zell-Proliferation und B-Zell-Aktivierung mit konsekutivem Antikörperanstieg führen. Diese Antikörper können Antigene auf der Oberfläche von Myelinscheiden und Oligodendrozyten direkt angreifen oder zur Aktivierung von Komplement mit darauffolgender Zytolyse führen (Piddlesden et al., 1993). B-Zellen übernehmen somit durch ihre Antikörperproduktion Funktionen des erworbenen Immunsystems, andererseits sind sie auch selbst zur Antigenpräsentation im Sinne des angeborenen Immunsystems fähig (Weiner, 2009). Neben ihnen tragen CD8⁺ T-Zellen sowie aktivierte Makrophagen und Mikroglia durch Produktion proinflammatorischer Zytokine, Aktivierung von Komplementfaktoren, Freisetzung von Stickoxiden und Abgabe von proteolytischen oder lipolytischen Enzymen zur Demyelinisierung mit Verlust der saltatorischen Erregungsfortleitung, Axon- und Oligodendrozytenschädigung und konsekutiven Neuronenverlust bei (Noseworthy et al., 2000).

Betrachtet man die Histopathologie, so zeigen sich äußerst verschiedene Läsionsmuster bei MS Patienten. Abhängig von ihren zellulären Infiltraten, Antikörperablagerungen, Myelinisierung, Komplementaktivierung und Oligodendrozytenverlust werden vier Typen unterschieden (Lucchinetti et al., 2000):

- I. Primär immunologisch induzierte Entmarkung: Makrophagen-/T-Zell-mediert
- II. Primär immunologisch induzierte Entmarkung: Antikörper-/Komplement-mediert
- III. Störung des Oligodendrozytenstoffwechsels: Oligodendrozytenapoptose, Verlust von myelin-assoziiertem Glykoprotein, Hypoxiezeichen

- IV. Störung des Oligodendrozytenstoffwechsels: Untergang von Oligodendrozyten in der periläsionalen weißen Substanz.

2.1.6 Therapie

Die MS Therapie berücksichtigt eine symptomatische Therapie, eine Behandlung des akuten Schubes sowie eine verlaufsmodifizierende Therapie. Ziel der symptomatischen Therapie ist ein Erhalt der Lebensqualität durch Behandlung von Blasenfunktionsstörungen, Tremor, Spastik, Schluck- und Sprechstörungen sowie Depressionen und Fatigue.

Im Falle eines akuten Schubes erfolgt die Therapie zur Immunsuppression gemäß den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) mit einer hochdosierten Methylprednisolon-Pulstherapie (Milligan et al., 1987). Bei Nichtansprechen auf Kortison kann eine Behandlung mittels Plasmapherese (Ruprecht et al., 2004) eingeleitet werden.

Grundlegend für die frühe immunmodulatorische Therapie ist die Erkenntnis, dass besonders zu Beginn der Erkrankung Entzündungsprozesse vorherrschen und irreversible Axonschäden frühzeitig auftreten können (Trapp et al., 1998).

Für diese verlaufsmodifizierende Therapie bei der am häufigsten vorkommenden RR-MS stehen verschiedene Therapeutika für eine milde bis moderate Verlaufsform zur Verfügung, hierzu gehören: β -Interferone (Avonex[®], Betaferon[®], Extavia[®], Rebif[®], Plegridy[®]), Dimethylfumarat (Tecfidera[®]), Glatirameracetat (Copaxone[®]) und Teriflunomid (Aubagio[®]).

Während Interferone zu einer Verminderung der T_H17-vermittelten Reaktion und u.a. auf Zytokine immunmodulatorisch wirken, beeinflusst Glatirameracetat die Antigenpräsentation und T-Zell-Differenzierung als auch die Bildung antiinflammatorisch wirkender T_H2-Zellen (Farina et al., 2005). Mit Teriflunomid besteht seit 2013 zudem eine orale Therapie für die milde bis moderate Verlaufsform, es beeinflusst hierbei vor allem durch Hemmung des Enzyms Dihydroorotat-Dehydrogenase die De-novo-Synthese von Pyrimidin und somit die Proliferation von autoreaktiven T- und B-Zellen (Bruneau et al., 1998). Ebenfalls ist Dimethylfumarat eine weitere orale Immunmodulation, die durch Aktivierung des Nuclear Factor

(Erythroid-Derived 2)-Related Factor 2 (Nrf2) zur Hochregulierung antioxidativer Gene führt und somit oxidativen Stress im ZNS vermindert (Scannevin et al., 2012).

Bei Patienten mit hoher Krankheitsaktivität oder Versagen der oben genannten Immunmodulation kann eine Therapie mit Natalizumab (Tysabri®) eingeleitet werden. Natalizumab blockiert als Antikörper die Bindungsstelle von α 4-Integrin und vermindert dadurch die Migration entzündlicher Zellen über die BHS (Von Andrian, Engelhardt, 2003). Als weitere Substanz in der Eskalationstherapie wurde Fingolimod (Kappos et al., 2010) entwickelt. Besonders aufgrund seiner Zulassung als orales Medikament, das durch Bindung an Sphingosin-1-Phosphat die Auswanderung von Lymphozyten aus lymphatischen Organen ins Blut hemmt, hat Fingolimod (Gilenya®) eine wichtige Bedeutung in der täglichen Behandlung gewonnen (Matloubian et al., 2004). Ebenfalls einen neuen Therapieansatz hat der zuvor für die Behandlung der chronisch lymphatischen Leukämie bekannte humanisierte monoklonale Antikörper Alemtuzumab (Lemtrada®), der selektiv an das Glykoprotein CD52 auf der Oberfläche von B- und T-Lymphozyten bindet und diese so depletiert (Coles et al., 2006), wie auch der gegen den IL-2-Rezeptor gerichtete humanisierte monoklonale Antikörper Daclizumab (Zinbryta®). Daclizumab verhindert hierdurch die Bindung von IL-2 an aktivierte T-Zellen und führt zu einer vermehrten Bildung von natürlichen Killerzellen (CD56^{bright} Zellen), die wiederum selektiv aktivierte T-Zellen zerstören (Gold et al., 2013; Kappos et al., 2015). Daneben stehen insbesondere auch für sekundär chronische Verlaufsformen Mitoxantron (Hartung et al., 2002) und Cyclophosphamid (La Mantia et al., 2007) zur Verfügung.

2.2 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Viele Entdeckungen in der Therapie und Pathogenese der MS wurden zunächst an ihrem Tiermodell, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), erforscht. Die Entstehung der EAE geht bereits bis in das Jahr 1885 zurück: Damals stellte Louis Pasteur fest, dass einige seiner Patienten, die mit einer Injektion aus Kaninchen inaktivierten Tollwutviren behandelt wurden, teilweise tödliche Paresen entwickelten (Stuart, Krikorian, 1928). Spätere Experimente ergaben, dass sich die Symptome durch mehrmalige Injektionen gesunder Kaninchenhirne in Affen

wiederholen ließen. Die histologischen Untersuchungen der Affenhirne zeigten perivaskuläre Infiltrate bestehend aus Lymphozyten und Makrophagen sowie eine Demyelinisierung im Gehirn und Rückenmark, im Sinne einer disseminierten Enzephalomyelitis (Rivers et al., 1933). Mit der Applikation von inaktiviertem *Mycobacterium tuberculosis* gemeinsam mit Hirngewebe konnte erreicht werden, dass nur eine Injektion zur Entwicklung der Symptomatik benötigt wurde (Kabat et al., 1947). Aufgrund der histologisch bewiesenen Demyelinisierung richtete sich das Augenmerk bereits früh auf die myelin-assoziierten Antigene. Laatsch et al. zeigten, dass mit Hilfe des Myelin-Basischen Proteins (MBP), einem Bestandteil der Myelinscheiden, die Induktion der EAE möglich ist (Laatsch et al., 1962).

Neben MBP werden in aktuellen Tierexperimenten zur Induktion einer aktiven EAE (aEAE) Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) und Proteolipid-Protein (PLP) als myeline Autoantigene zusammen mit kompletten Freund-Adjuvans (Complete Freund's Adjuvant, CFA) subkutan injiziert. Besonders MOG hat eine entscheidende Bedeutung: Neben einer T-Zell-medierten Immunantwort führt die Injektion zur Bildung demyelinisierender Autoantikörper und spiegelt folglich die komplexen Mechanismen in der Pathogenese der MS gut wieder (Storch et al., 1998).

Erste Symptome zeigen sich in den meisten EAE Modellen nach 10-20 Tagen mit einer aufsteigenden Lähmung und Gewichtsverlust. Der Krankheitsverlauf ist hierbei von dem verwendeten Tierstamm, eingesetzten Immunogen und der Injektion von Pertussistoxin (PTX) abhängig (Tsunoda et al., 2000). PLP₁₃₉₋₁₅₁ induziert bei SJL-Mäusen eine RR-MS, während MOG₃₅₋₅₅ eine eher chronisch progressive Form auslöst (Gold et al., 2006). PTX erleichtert die Migration von Zellen über die BHS, indem es das Endothel durch vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen aktiviert (Kerfoot et al., 2004), und fördert die klonale Expansion sowie Zytokinproduktion der T-Zellen (Shive et al., 2000). Ein weiterer Meilenstein in der Entdeckung von autoimmunen Reaktionen war 1981, als erstmalig die Induktion einer EAE durch adoptiven Transfer von MBP-spezifischen aktivierten T-Zellen in syngene Empfänger gelang. Bei dieser passiven EAE oder transfer EAE (ist der Grad der Demyelinisierung verringert und nur durch eine zusätzliche Injektion von myelin-spezifischen Antikörpern lässt sich die Demyelinisierung und Symptomatik verstärken (Linnington et al., 1988).

Die Pathogenese der EAE ist der MS sehr ähnlich: Nach aktiver Immunisierung erfolgt zunächst im Rahmen der Induktorphase ein Priming mit Aktivierung und Proliferation

myelin-spezifischer T-Zellen. In der anschließenden Effektorphase migrieren differenzierte Zellen die BHS und werden im ZNS durch erneute Präsentation des Antigens durch APC reaktiviert, um letztendlich eine Inflammation zu initiieren. Histopathologisch zeigt sich bei Immunisierung mit MOG in akuten Läsionen eine vermehrte Ansammlung von Makrophagen, deren Anzahl nahezu mit der Krankheitsschwere korreliert (Berger et al., 1997) und einer Typ I Histologie (siehe Abschnitt 2.1.5) entspricht.

Die Migration der Zellen in der Effektorphase ist ein entscheidender Punkt in der Krankheitsentstehung und wichtiger Schritt für die Experimente in der vorliegenden Arbeit, weshalb ihr Mechanismus in den folgenden Abschnitten näher ausgeführt wird.

2.3 Blut-Hirn-Schranke

Die Beschreibung der BHS als physiologische Barriere zwischen ZNS und Blutgefäßen begann im Jahre 1880. Damals zeigte die Injektion eines Farbstoffes in das Gefäßsystem eine Anfärbung sämtlicher Organe mit Ausnahme des ZNS (Ehrlich, 1885), was auf eine Barriere des Gehirns gegen die Peripherie hindeutete. Erst mit Entwicklung der Elektronenmikroskopie wiesen Reese und Karnovsky nach, dass für die Aufrechterhaltung dieser Barrierefunktion sogenannte Tight Junctions zwischen den Endothelzellen des ZNS essenziell sind (Reese, Karnovsky, 1967). Sie setzen sich aus einem Komplex von transmembranen und zytoplasmatischen Proteinen, gebunden an ein Zytoskelett aus Aktin, zusammen (Wolburg, Lippoldt, 2002). Durch sie wird ein parazellulärer Transport vermieden. Mit im Vergleich zu anderen peripheren Geweben geringen Fenestrierungen und verminderter pinozytischer Aktivität, die einen transzellulären Transport verhindern, bilden diese Strukturen die Barrierefunktion der BHS. Nährstoffe für das ZNS und Stoffwechselabbauprodukte überwinden die BHS mit Hilfe aktiver Transportmechanismen.

Für eine vollständige Barrierefunktion sind weitere komplexe Strukturen notwendig: So tragen Perizyten, in der abluminalen Basalmembran der Endothelzellen eingebettet, durch Sekretion von Wachstumsfaktoren und extrazellulären Matrixkomponenten zur Bildung und Aufrechterhaltung der BHS bei (Balabanov, Dore-Duffy, 1998). Mit Hilfe ihrer N-Cadherin-abhängigen Bindung an Endothelzellen verringern sie die

Permeabilität der BHS und fördern die Reifung der Blutgefäße (Gerhardt et al., 2000). Ausschließlich in Perizyten des ZNS konnte festgestellt werden, dass die Zellen makrozytische Eigenschaften mit der Fähigkeit zur Phagozytose und Antigenpräsentation haben und folglich zur Immunfunktion beitragen (Balabanov, Dore-Duffy, 1998).

Des Weiteren wird nahezu die komplette Kapillaroberfläche von Astrozytenendfüßen umschlossen, die von den Endothelzellen nur durch eine endotheliale und parenchymale Basalmembran getrennt sind (Hawkins, Davis, 2005). Anhand von BHS Modellen konnte gezeigt werden, dass diese Zellen wesentlich zur Differenzierung der Endothelzellen des ZNS in Richtung eines spezifischen BHS Phänotyps beitragen (Janzer, Raff, 1987).

Unter physiologischen Bedingungen ist die Migration von Leukozyten aus der Peripherie durch die BHS ins Hirnparenchym limitiert. Wohingegen bei einer inflammatorischen Erkrankung die Migration aktivierter Leukozyten durch erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen und Sekretion von Chemokinen erleichtert ist (Hickey et al., 1991).

2.4 Einwanderung von Lymphozyten ins Zentralnervensystem

Die Migration der Zellen ins ZNS (Abbildung 2) erfolgt in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten. Erstmals wurde im Multi-Step-Modell 1991 der Eintritt von in der Blutbahn zirkulierenden Lymphozyten in peripheres Gewebe beschrieben (Butcher, 1991).

Im ersten Schritt dieser Migration erfolgt ein initialer Kontakt der Zellen mit dem Endothel. Die Zellen werden in ihrem Fluss verlangsamt und Rollen entlang des Endothels. Es konnte gezeigt werden, dass das sogenannte Rolling an einer entzündlich veränderten BHS durch P-Selectin-Glykoprotein (PSGL)-1 in Verbindung mit seinem endothelialen Liganden P-Selectin vermittelt wird (Battistini et al., 2003; Kerfoot et al., 2006). Allerdings hatte die Blockade oder eine E/P-Selectin-Defizienz bei Mäusen keinen Einfluss auf die Entwicklung einer EAE (Engelhardt et al., 1997). Vajkoczy et al. wiesen durch intravitale Videomikroskopie der weißen Substanz im Rückenmark nach, dass in diesem Bereich des ZNS das vaskuläre

Zelladhäsionsmolekül-1 (Vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) zirkulierende T-Zellen über $\alpha 4\beta 1$ -Integrin (Very late antigen-4, VLA-4) direkt einfängt (Capture) (Vajkoczy et al., 2001). Jedoch beeinträchtigte auch die Blockade von $\alpha 4$ -Integrin oder ein Mangel an $\beta 1$ -Integrin auf myelin-spezifischen Zellen den initialen Kontakt nicht (Coisne et al., 2009). Es sind daher weitere *in vivo* Studien zur Bestimmung des notwendigen Rezeptor-Liganden Paares für diesen ersten Schritt erforderlich.

Im Rahmen der inflammatorischen Entzündung und durch das „Rolling“ wird die Expression von Chemokinen auf der endothelialen Oberfläche hochreguliert. Chemokine binden an ihren entsprechenden G-Protein-gekoppelten Rezeptor auf der T-Zell-Seite und bewirken über ein PTX sensitives Signal eine Konformationsänderung der Integrine (Aktivierung) auf der Leukozytenoberfläche (Piccio et al., 2002). Nach Induktion einer EAE sind besonders die Chemokine CCL19 und CCL21 mit ihrem entsprechenden Liganden CCR7 auf der T-Zell-Seite erhöht (Alt et al., 2002).

Die Aktivierung und Konformationsänderung der Integrine an T-Zellen erhöht ihre Affinität und erleichtert die anschließende Adhäsion ans Endothel (Chigaev et al., 2003). Essenziell für diesen dritten Schritt, der Adhäsion, ist das auf der Oberfläche von T-Zellen exprimierte Molekül $\alpha 4\beta 1$ -Integrin, welches hauptsächlich an VCAM-1 auf dem Endothel bindet. Entsprechend verhindert die Gabe von $\alpha 4$ -Integrin Antikörpern die Entwicklung einer EAE und führt zu einer verminderten Akkumulation inflammatorischer Zellen (Yednock et al., 1992). Interessanterweise ist durch Blockade von VCAM-1 oder $\alpha 4$ -Integrin nur die Adhäsion beeinflusst, eine Transmigration der Zellen ist *in vitro* weiterhin möglich (Laschinger, Engelhardt, 2000). Basierend auf den Erkenntnissen, dass $\alpha 4$ -Integrin wesentlich zur Krankheitsentstehung der EAE beiträgt, erfolgte 2004 mit der Herstellung des humanen monoklonalen $\alpha 4$ -Integrin Antikörpers Natalizumab die Anwendung an MS Patienten.

Nach der Adhäsion kriechen die T-Zellen im nächsten Schritt, hauptsächlich vermittelt durch Bindung von LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen-1) an die interzellulären Adhäsionsmoleküle-1 und -2 (Intercellular adhesion molecule-1 und -2, ICAM-1 und ICAM-2), entgegen des Blutflusses (Crawling) am Endothel entlang, um letztendlich die optimalen Bedingungen zur Transmigration der Endothelzellen zu erreichen (Steiner et al., 2010).

Während $\alpha 4\beta 1$ -Integrine ein wichtiger Faktor in der Adhäsion sind, wird der Bindung von LFA-1 an ihre endothelialen Rezeptoren ICAM-1 und ICAM-2 eine entscheidende

Rolle im vierten Schritt, der endgültigen Transmigration, zugeschrieben. Die Blockade von LFA-1 bewirkt eine signifikant verminderte Migration von T-Zellen über die BHS, während eine Adhäsion an aktiviertes Endothel weiterhin möglich ist (Laschinger et al., 2002).

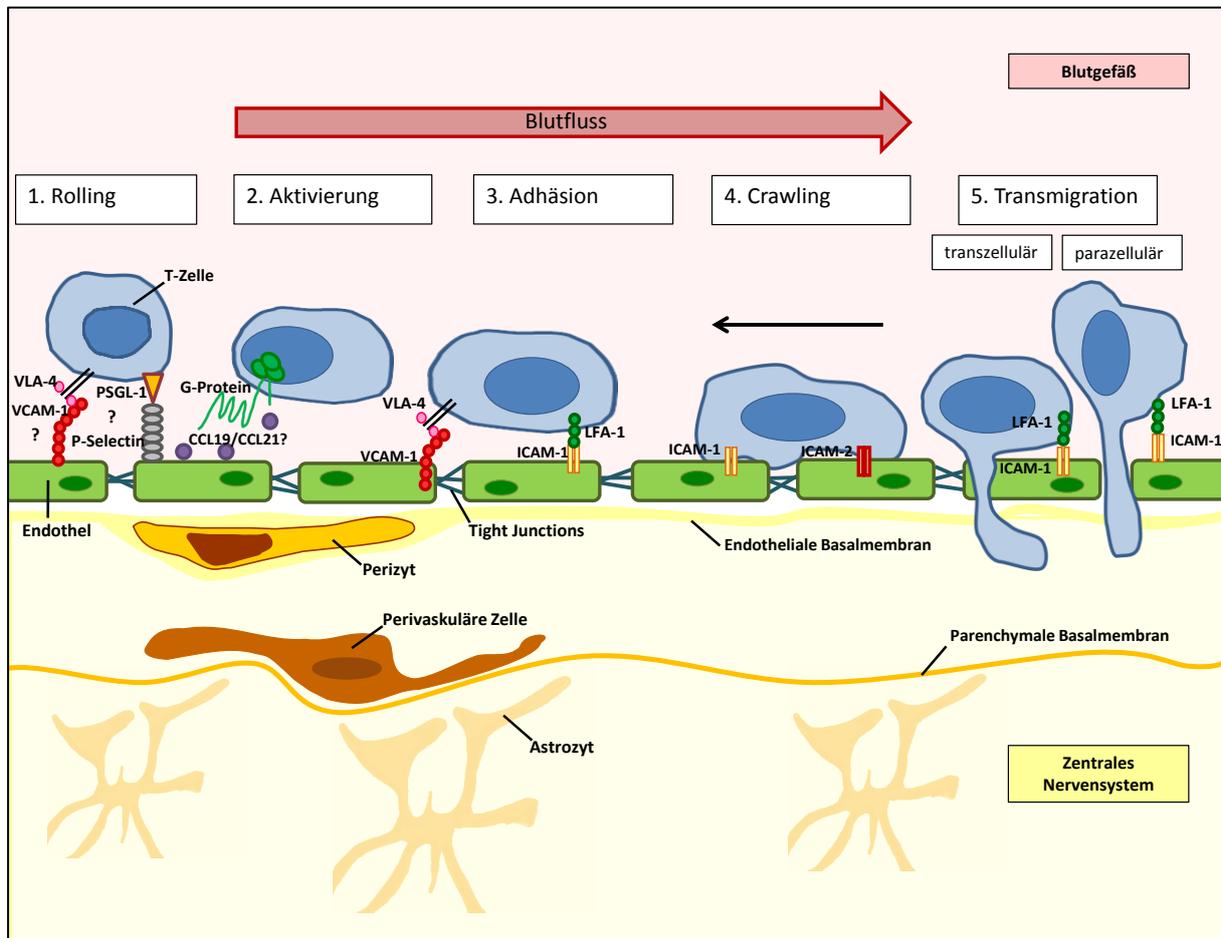


Abbildung 2: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte bei der Migration von T-Zellen über die BHS (nach Engelhardt, Ransohoff, 2012)

Nach einem initialen Rollen und Aktivierung durch Chemokine adhären die Zellen am Endothel, hauptsächlich vermittelt durch VCAM-1 auf Endothelzellsseite und dem auf T-Zellen exprimierten $\alpha 4\beta 1$ -Integrin. Anschließend kriechen die Zellen am Endothel entlang, um letztendlich transzellulär oder parazellulär mit Hilfe von ICAM-1 und LFA-1 migrieren zu können (Engelhardt, Ransohoff, 2012).

Die Bindung der T-Zellen an ICAM-1 löst über dessen zytoplasmatischen Anteil ein RhoA vermitteltes Signal (Thompson et al., 2002) und die Aktivierung regulatorischer Proteine (Etienne et al., 1998) aus, die durch Veränderungen des Zytoskeletts den Zellen eine parazelluläre oder transzelluläre Migration erleichtern (Abadier et al.,

2015). Während der Migration interagieren T-Zellen mit junktionalen Molekülen (u.a. PECAM-1, JAM, VE-Cadherin und CD99), die eine Einwanderung der Zellen ins ZNS regulieren (Del Maschio et al., 1999; Graesser et al., 2002; Hickey, 2015). Weitere Studien werden jedoch benötigt, um den exakten Mechanismus der transzellulären und parazellulären Migration mit ihren notwendigen Molekülen beurteilen zu können.

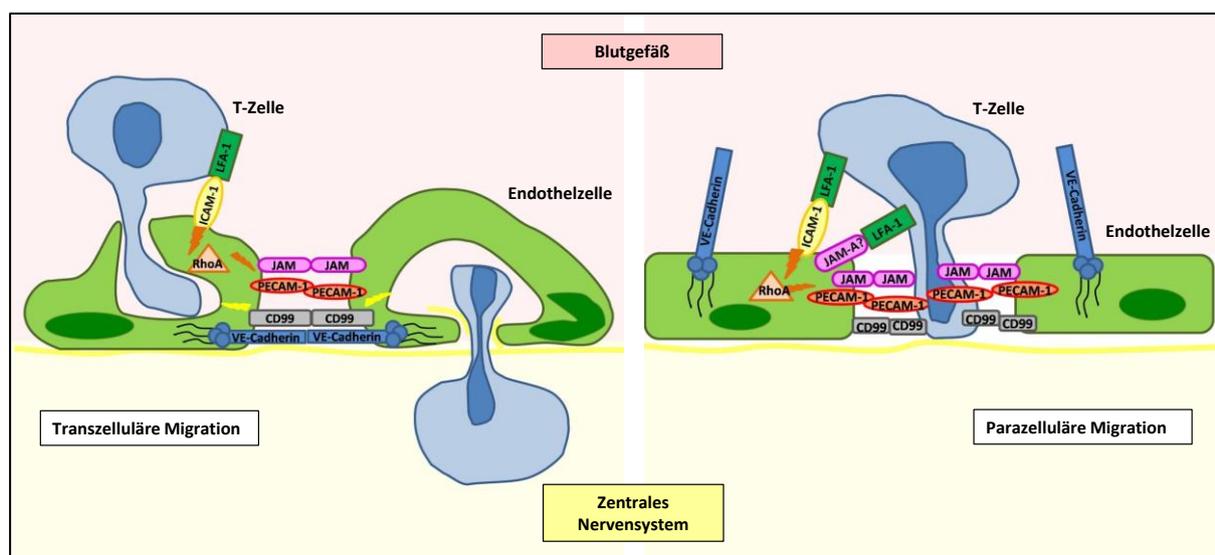


Abbildung 3: Schematische Darstellung der transzellulären oder parazellulären Migration (nach Engelhardt, Wolburg, 2004)

Die Bindung der Zellen an ICAM-1 auf Endothelzelleseite leitet über ein RhoA vermitteltes Signal eine Veränderung des Zytoskeletts der Endothelzellen ein, wodurch eine parazelluläre oder transzelluläre Migration erleichtert wird. Während der Migration gehen die T-Zellen Verbindungen mit junktionalen Molekülen ein, die sie durch die Zelle führen (Engelhardt, Wolburg, 2004).

Die anschließende Migration der anliegenden endothelialen Basalmembran ist hauptsächlich von deren Lamininstruktur abhängig. Diese besteht in zerebralen Gefäßen vor allem aus Laminin $\alpha 4$ und Laminin $\alpha 5$, die zueinander gegensätzlich wirken. Während Laminin $\alpha 4$ eine Chemokin-induzierte Migration von T-Zellen fördert, wird sie durch Laminin $\alpha 5$ verhindert (Wu et al., 2009).

Erst wenn Leukozyten nach ihrer Reaktivierung im perivaskulären Raum die parenchymale Basalmembran überwunden haben, können sie ins ZNS-Parenchym eindringen und Krankheitssymptome auslösen. Für diesen letzten Schritt sind Matrix-Metalloproteasen (MMP) notwendig. MMP sind proteolytische Enzyme, die unter physiologischen Bedingungen u.a. zur Strukturierung der extrazellulären Matrix,

Regulation der synaptischen Plastizität (Agrawal et al., 2008), Reifung und Differenzierung von Oligodendrozyten (Larsen, Yong, 2004) sowie der Ausbildung von Myelin (Larsen et al., 2006) beitragen können.

Im Rahmen der EAE sind MMP-2 und MMP-9 für den Eintritt ins Hirnparenchym von Bedeutung. Sie bewirken eine vermehrte Chemokinfreisetzung und stören durch Bindung an β -Dystroglycan die Verknüpfung zwischen Astrozyten und parenchymaler Basalmembran, wodurch die Migration der Zellen erleichtert wird (Agrawal et al., 2006; Song et al., 2015).

2.5 T-Zell-Aktivierung durch Antigenpräsentation

Bereits zu Beginn der Pathogenese spielt die Aktivierung von naiven T-Zellen eine entscheidende Rolle. Voraussetzung hierfür sind APC (Greter et al., 2005), die zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems führen. Nach Zusammentreffen mit einem myelinen Antigen reifen die APC und wandern in lymphatische Organe, wo sie letztendlich auf naive T-Zellen treffen (Guermónprez et al., 2002). Für die darauffolgende T-Zell-Aktivierung sind zwei Signale notwendig (Bretscher, Cohn, 1970): So ist entscheidend, dass APC das Antigen über Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexe (Major Histocompatibility Complex, MHC) dem spezifischen T-Zell-Rezeptor (T cell receptor, TCR) präsentieren und zudem eine Interaktion kostimulatorischer Signalwege stattfindet. Für eine Reaktivierung der T-Zellen im ZNS sind APC erneut essenziell.

2.5.1 Antigen-präsentierende Zellen

Unter den professionellen APC haben dendritische Zellen die größte Bedeutung. Sie koordinieren das Zusammenspiel von angeborener und adaptiver Immunantwort. Nach ihrer Aktivierung durch einen Kontakt mit pathogen-assoziierten Strukturen oder Zusammentreffen mit ihrem Antigen wandern dendritische Zellen, u.a. durch den Chemokinrezeptor CCR7 gesteuert, in lymphatisches Gewebe (Sozzani et al., 1998). Währenddessen durchlaufen sie einen Reifungsprozess mit ansteigender Expression

von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen, wodurch sie die Fähigkeit erlangen Antigene an naive T-Zellen und Gedächtniszellen zu präsentieren.

Neben dendritischen Zellen spielen Makrophagen sowohl in der Peripherie als auch im ZNS eine Rolle. Eingewanderte Makrophagen im perivaskulären Raum haben aufgrund ihrer Lage zwischen endothelialer und parenchymaler Basalmembran eine wichtige Funktion in der Erkennung von Pathogenen und Regulation des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Ihre Aktivierung ist dabei von T_H1 -Zytokinen, IFN- γ und TNF- α abhängig und führt zur erhöhten Expression von MHC-II, CD80, CD86 und CD40 während einer EAE (Fabriek et al., 2005).

Im ZNS weisen Mikroglia als APC bei einer inflammatorischen Reaktion vermehrt CD45, MHC und kostimulatorische Moleküle auf, sie können selbst Fremdkörper phagozytieren sowie die Proliferation der $CD4^+$ T_H1 - und T_H2 -Zelllinien stimulieren (Aloisi, 2001). Unter ruhenden Bedingungen sind sie für die Aufrechterhaltung der Homöostase im ZNS zuständig (Nimmerjahn et al., 2005). *In vitro* Studien zeigten, dass die Phagozytose von Myelin durch Mikroglia und Makrophagen zu einer erhöhten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Stickoxiden führt, die eine Neuroinflammation bedingen (Van Der Laan et al., 1996). Umgekehrt jedoch, ist die Entfernung von Myelindebris durch Phagozytose für eine anschließende Remyelinisierung essenziell (Kotter et al., 2006).

2.5.2 Der Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex

Der MHC, auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 gelegen, ist eines der am besten untersuchten Gensequenzen des Menschen, insbesondere aufgrund seiner Bedeutung in verschiedenen Bereichen wie beispielsweise Transplantationsmedizin, autoimmunen, inflammatorischen und infektiösen Erkrankungen.

Er kodiert drei unterschiedliche Klassen von MHC-Proteinkomplexen, worunter vor allem Klasse I und Klasse II eine bedeutende Rolle bei der T-Zell-Aktivierung haben. MHC-Moleküle sind Heterodimere, die sich im Falle von MHC-I aus einer membranverankerten schweren Kette und einem löslichen $\beta 2$ -Mikroglobulin sowie einer Proteinuntereinheit zusammensetzen. MHC-I werden auf allen Zellen exprimiert und dienen dem Schutz vor intrazellulären Pathogenen und zellulären Abnormitäten, indem sie vom Proteasom hergestellte Peptide aus körperfremden oder körpereigenen

Proteinen präsentieren. Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen binden über ihren TCR in der Regel nur an MHC-I mit körperfremden Peptiden, wodurch eine ständige Überwachung und Selbsttoleranz des Immunsystems aufrechterhalten wird.

MHC-Moleküle der Klasse II setzen sich aus einer α - und β -Kette zusammen und werden auf APC exprimiert (Madden, 1995). Sie präsentieren den CD4⁺ T-Zellen extrazelluläre Peptide, die in Lysosomen und Endosomen mit Hilfe von Proteasen aus aufgenommenen Proteinen hergestellt wurden.

2.5.3 T-Zell-Rezeptor

T-Lymphozyten erkennen Antigene durch ihren auf der Zelloberfläche exprimierten TCR. Er ist ein transmembranöses Heterodimer (Abbildung 4), bestehend aus zwei Glykoproteinketten (α/β oder γ/δ), die wiederum eine konstante und variable Domäne besitzen und durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Bentley, Mariuzza, 1996). Aufgrund ihres geringen zytoplasmatischen Anteils sind die Ketten nicht fähig durch Antigenpräsentation vermittelte Signale nach intrazellulär zu leiten und sind daher mit den transmembranösen Proteinen CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ sowie mit einem ζ -Homodimer (TCR ζ) verbunden (Wange, Samelson, 1996). CD3 und TCR ζ können über Immunrezeptor Tyrosin-basierte aktivierende Motive (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif, ITAM) in ihrer zytoplasmatischen Domäne Signale fortleiten (Irving et al., 1993).

Die Signalübertragung ist ebenfalls von den Korezeptoren CD4 und CD8 abhängig, die mit MHC auf APC interagieren. CD4 und CD8 bewirken beide eine Stabilisierung des TCR/MHC-Komplexes und erleichtern hierdurch die intrazelluläre Signalkaskade, indem sie die dafür essenzielle Kinase Lck zum TCR rekrutieren (Barber et al., 1989).

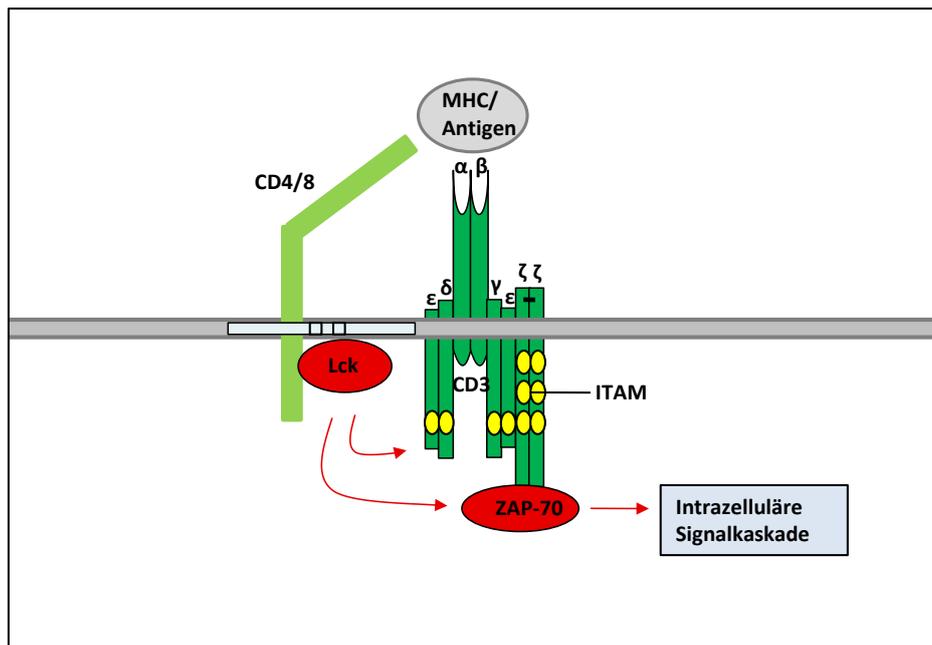


Abbildung 4: Schematischer Aufbau des TCR mit seinem Korezeptor CD4 oder CD8 (nach Razzaq et al., 2004)

Die Glykoproteinketten α/β des TCR sind mit transmembranösen Proteinen verbunden, die eine Signalweiterleitung nach intrazellulär ermöglichen. Korezeptoren wie CD4/CD8 interagieren ebenfalls mit MHC und bewirken durch Rekrutierung von Lck eine Phosphorylierung von ITAM, die wiederum die Aktivierung weiterer Kinasen wie ZAP-70 bedingen und auf diese Weise eine Signalkaskade auslösen (Razzaq et al., 2004).

2.5.4 Kostimulatorische Signalwege

Kostimulatorische Signalwege sind entscheidend für die suffiziente Aktivierung von T-Zellen. Sie können sowohl einen T-Zell-aktivierenden als auch einen T-Zell-inhibierenden Effekt haben. Mittlerweile ist eine Vielzahl von kostimulatorischen Signalwegen bekannt, worunter der B7-1/2-CD28/CTLA-4 Signalweg am besten untersucht ist.

Der CD28 Rezeptor wird auf naiven T-Zellen exprimiert und ist bei Aktivierung hochreguliert (Turka et al., 1990). Er wirkt synergistisch mit dem TCR und stimulierend, indem er die Aktivierung (Viola et al., 1999) und Proliferation der T-Zellen reguliert sowie eine IL-2 Produktion (Jenkins et al., 1991) induziert. Die Abwesenheit von CD28 führt zu einem vermehrten Zelltod (Van Parijs et al., 1996) bzw. leitet die T-Zellen in einen sogenannten anergischen Zustand (Abbildung 5), worunter sie die Fähigkeit der Antigenantwort verlieren (Gimmi et al., 1993).

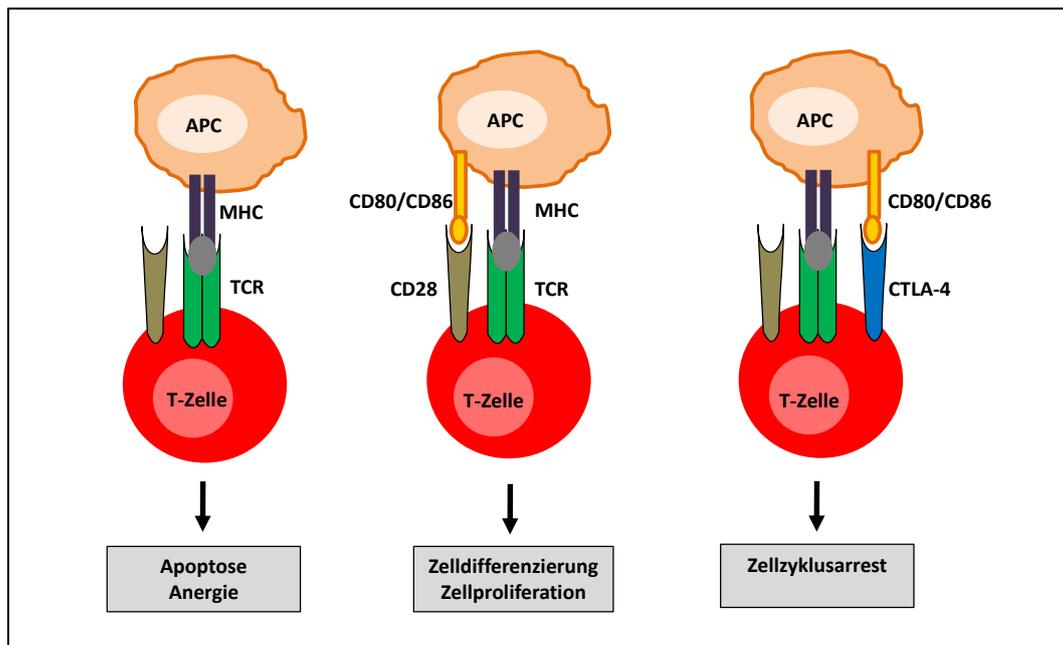


Abbildung 5: Schematische Darstellung des B7-1/2-CD28/CTLA-4-Signalweges (nach Alegre et al., 2001)

Während die Aktivierung von CD28 zu einer Zelldifferenzierung und Zellproliferation führt, bewirkt CTLA-4 als inhibitorischer Korezeptor den Zellzyklusarrest. Das Fehlen von kostimulatorischen Signalen leitet die Zellen in einen anergischen Zustand bzw. führt zu ihrer Apoptose (Alegre et al., 2001).

CTLA-4 hingegen wirkt hauptsächlich inhibitorisch auf eine T-Zell-Aktivierung und wird nur infolge dieser Aktivierung auf den Zellen exprimiert (Linsley et al., 1992). Die Bindung von CTLA-4 geht mit einer erniedrigten IL-2 Expression und Inhibition des Zellzyklus einher (Krummel, Allison, 1996).

Ihre gemeinsamen Liganden B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) gehören zur Immunglobulin-Superfamilie. Sie werden beide auf APC exprimiert, unterscheiden sich jedoch in ihrer Kinetik: B7-2 ist in geringem Level ständig exprimiert und bei Aktivierung hochreguliert, wohingegen B7-1 erst nach Aktivierung nachgewiesen werden konnte. Zahlreiche Studien untersuchten die Rolle des Signalweges im Rahmen einer EAE. Die Expression von CD28 und CTLA-4 nach Induktion der EAE spiegelt hierbei ihre Funktionen wieder: Während die CD28 Expression mit dem Schweregrad der klinischen Symptome korreliert, ist CTLA-4 zum Peak der Erkrankung erniedrigt und im Rahmen der Krankheitsremission erhöht (Issazadeh et al., 1998). Entsprechend bewirkt eine Blockade von CD28 bei Mäusen eine verminderte Symptomatik,

wohingegen sich nach Gabe eines Anti-CTLA-4 Antikörpers die Krankheitsschwere verstärkt (Karandikar et al., 1996).

2.6 Lipopolysaccharid-Rezeptor (CD14)

Das angeborene Immunsystem ist die erste Abwehrreaktion gegen invadierende Pathogene. Sie beginnt vor der erworbenen Immunantwort und wirkt ungerichtet gegen fremde Keime durch zellvermittelte Abwehr in Form von Granulozyten und natürlichen Killerzellen sowie Anwendung von mechanischen bzw. physiologischen Barrieren und Freisetzung von Interleukinen mit Aktivierung des Komplementsystems.

Die Entdeckung, dass Liganden dieses angeborenen Immunsystems die Schwere einer EAE beeinflussen, unterstützt die Theorie, dass das angeborene Immunsystem nicht nur bei akuten Infektionen, sondern auch im Rahmen von autoimmunen Erkrankungen eine entscheidende Funktion hat (Waldner et al., 2004).

Der Lipopolysaccharid (LPS)-Rezeptor CD14 ist ein entscheidender Rezeptor für die inflammatorische Antwort gramnegativer Bakterien durch Erkennung von LPS in der Zellwand.

CD14 ist ein Serumglykoprotein, das sowohl über einen GPI-Anker gebunden an der Zellmembran als auch in löslicher Form vorliegen kann, und hauptsächlich auf Monozyten, Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten exprimiert wird (Pugin et al., 1994). CD14 selbst kann Signale nicht nach intrazellulär leiten, weshalb der Toll-like Rezeptor (TLR)4 als transmembraner Korezeptor in Verbindung mit MD-2 (Abbildung 6) das Immunsystem aktiviert (Jiang et al., 2000).

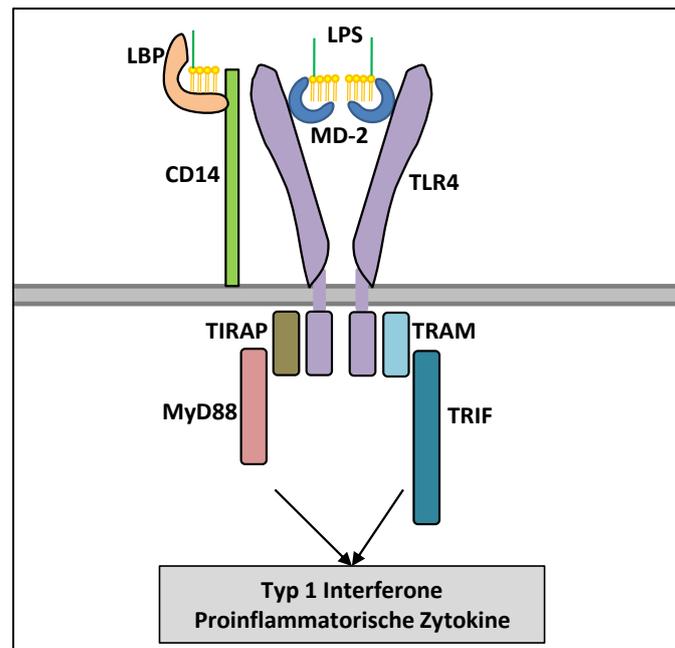


Abbildung 6: Schematischer Aufbau des CD14-Rezeptors (nach Lu et al., 2008)

Nach Erkennung von LPS durch das Lipopolysaccharid-bindende Protein (LBP) und CD14 wird über TLR4/MD-2 ein MyD88-abhängiger oder MyD88-unabhängiger Signalweg eingeleitet, woraufhin letztendlich vermehrt Typ 1 Interferone und proinflammatorische Zytokine produziert werden (Lu et al., 2008).

Ferner ist CD14 an der Erkennung und Phagozytose von apoptotischen Zellen beteiligt (Devitt et al., 1998). Patienten mit akuten oder chronisch inflammatorischen Erkrankungen zeigten eine erhöhte Expression von CD14 auf phagozytotischen Zellen, die sich bei Gabe von Immunsuppressiva erniedrigt (Nockher, Scherberich, 1997). Die lösliche Form von CD14, von Hepatozyten sezerniert, kann als Marker für die Aktivität einer inflammatorischen Erkrankung verwendet werden. Erhöhte CD14-Konzentration sind in Seren von Patienten mit bakteriellen oder viralen Infektionen (Gluck et al., 2001; Nockher et al., 1994), autoimmunen und rheumatischen Erkrankungen (Scherberich, Nockher, 2000) bestätigt. Brettschneider et al. wiesen 2002 erstmals erhöhte Level von löslichem CD14 im Serum von MS Patienten nach (Brettschneider et al., 2002).

Übertragen auf das Tiermodell der MS induziert eine Immunisierung mit MOG einen deutlichen Anstieg der CD14-Transkription (Zekki et al., 2002). CD14-defiziente Mäuse entwickeln im Vergleich zu Wildtypkontrollen eine ausgeprägtere klinische Symptomatik mit vermehrter Anzahl inflammatorischer Infiltrate im ZNS (Walter et al., 2006).

2.7 Zielsetzung

Mit dem Nachweis einer Verstärkung der EAE bei CD14-Defizienz konnte die Bedeutung des CD14-Rezeptors bewiesen werden (Walter et al., 2006). Trotz allem ist bis heute der entsprechende pathophysiologische Mechanismus nicht geklärt. In der vorliegenden Arbeit wird das Migrationsverhalten von T-Zellen aus CD14-defizienten Mäusen am Tiermodell der MS mit folgenden Fragestellungen untersucht:

- Gibt es einen Unterschied in der Expression der Moleküle zur Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung auf T-Zellen von CD14-defizienten Mäusen im Vergleich zur Wildtypkontrolle nach Induktion einer EAE?
- Wie verhalten sich T-Zellen von EAE immunisierten CD14-defizienten Mäusen in der Expression von Adhäsionsmolekülen gegenüber einer Wildtypkontrolle?
- Gibt es *in vitro* einen Unterschied in der Adhäsion von T-Zellen aus EAE immunisierten CD14-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen an bEnd.3 Endothelzellen?
- Unterscheiden sich T-Zellen von EAE immunisierten CD14-defizienten Mäusen in der *in vitro* Transmigration durch bEnd.3 Endothelzellen gegenüber einer Wildtypkontrolle?
- Wie verhalten sich immunisierte CD14-defiziente Mäuse in der Expression von MMP-2 und MMP-9 gegenüber Wildtypkontrollen?

Ziel dieser Arbeit ist es zu prüfen, ob CD14 eine entscheidende Funktion bei der T-Zell-Aktivierung oder Migration über die BHS hat und die CD14-Defizienz letztendlich durch Unterschiede in diesen Schritten zu einer Verstärkung der EAE führt.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Tabelle 3: Aufstellung der verwendeten Geräte

| Bezeichnung | Typ | Hersteller |
|----------------------------|--------------------------------------|--|
| Autoklav | V-150, V-2540EL | Systec GmbH, Wettenberg |
| CO ₂ -Inkubator | HERAcell 150i | Thermo Scientific GmbH, New York, USA |
| Durchflusszytometer | FACS Canto II mit FACS Diva Software | BD Biosciences, Heidelberg |
| Eismaschine | | BRICE Italia S.r.l., Villa Cortese, Italien |
| Kombischüttler | Varishaker ~ Incubator | Dynatech GmbH, Denkendorf |
| Präzisionswaage | CP4202S | Sartorius AG, Göttingen |
| Magnetrührer | IKAMAG KMO-1 | IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen |
| Mikroskop | Axiovert 40 CFL | Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen |
| Mikroskop | Axiovert 25 | Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen |
| pH-Meter | InoLab pH 720 | WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim |
| Sterilbank | HERAsafe | Thermo Scientific GmbH, New York, USA |
| Ultraschallstab | Sonopuls HD 2070 | Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin |
| Vortex-Mixer | Reax top | Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Schwabach |

| | | |
|--------------|---------|---|
| Vortex-Mixer | Genie 2 | Scientific Industries, Inc., New York, USA |
| Wasserbad | | GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel Köttermann GmbH & Co. KG, Hänigsen |
| Wipptisch | Rocky | Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau |
| Zentrifuge | 5810R | Eppendorf AG, Hamburg |
| Zentrifuge | 5415R | Eppendorf AG, Hamburg |
| Zentrifuge | 4K15C | Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz |

3.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Aufstellung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|--|
| Antibiotic-Antimycotic 100 x | Fisher Scientific GmbH, Schwerte |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | MoBiTec GmbH, Göttingen Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze |
| Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) + GlutaMAX™-I | Fisher Scientific GmbH, Schwerte |
| Entellan | Merck KGaA, Darmstadt |
| FACS Clean | BD Biosciences, Heidelberg |
| FACS Flow | BD Biosciences, Heidelberg |
| FACS Shutdown Solution | BD Biosciences, Heidelberg |
| (v/v) Fetales Kälberserum (FKS) | PAN Biotech GmbH, Aidenbach |
| Fibronectin 50 µg/ml | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |

| | |
|---|---|
| Flüssigstickstoff | AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf |
| Formaldehyd 37 % | Merck KGaA, Darmstadt |
| Giamsa's-Azur-Eosin-Methylenblau | Merck KGaA, Darmstadt |
| Glutardialdehyd | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Hank's Balanced Salts (HBSS) | Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze |
| HEPES 1 M | Fisher Scientific GmbH, Schwerte |
| Inkomplettes Freund-Adjuvans (IFA) | BD Biosciences, Heidelberg |
| Isofluran | Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim |
| Kaliumchlorid (KCl) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Laminin | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Mycobacterium tuberculosis, getrocknet und abgetötet | BD Biosciences, Heidelberg |
| MOG | Charité - Universitätsmedizin, Berlin |
| Natriumazid (NaN ₃) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Natriumchlorid (NaCl) | Apotheke Universitätsklinikum, Homburg |
| Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄) | Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze |
| Penicillin-Streptomycin | Fisher Scientific GmbH, Schwerte |
| PTX | Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach |
| Trypanblau 0,4 % | Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze |
| Trypsin-EDTA 0,05 % | Fisher Scientific GmbH, Schwerte |
| TNF- α | BIOMOL GmbH, Hamburg |

3.3 Antikörper

Tabelle 5: Aufstellung der verwendeten Antikörper

| Antikörper | Clone | Isotyp | Hersteller |
|--|--------------|------------------------|---|
| FITC Rat Anti-Mouse CD4 | GK1.5 | IgG2b, κ | BD Biosciences, Heidelberg |
| PerCP Rat Anti-Mouse CD8a | 53-6.7 | IgG2a, κ | BD Biosciences, Heidelberg |
| Pe Rat Anti-Mouse CD11a | 2D7 | IgG2a, κ | BD Biosciences, Heidelberg |
| APC Syrian Hamster Anti-Mouse CD28 | 37.51 | IgG | BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching |
| Biotin-Conjugated Rat Anti-Mouse CD49d | 9C10 | IgG2a, κ | BD Biosciences, Heidelberg |
| Purified Hamster Anti-Mouse CD152 (CTLA-4) | UC10-4F10-11 | Hamster IgG1, κ | BD Biosciences, Heidelberg |
| PE Armenian Hamster Anti-Mouse TCR β Chain | H57-597 | IgG2, λ 1 | BD Biosciences, Heidelberg |
| Cy5 Goat Anti-Armenian Hamster | | IgG | Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk, UK |
| APC Streptavidin | | | BD Biosciences, Heidelberg |

3.4 Zellkulturmedien

Tabelle 6: Aufstellung und Zusammensetzung der verwendeten Medien

| Medium | Substanzen | Menge |
|---|----------------------------------|----------|
| Adhäsionsmedium/Migrationsmedium (500 ml) | DMEM + GlutaMAX TM -I | 457,5 ml |
| | (v/v) FKS | 25 ml |
| | 1M Hepes | 12,5 ml |
| | Penicillin-Streptomycin | 5 ml |

| | | |
|-----------------------------|-----------------------------|--------|
| Einfriermedium (10 ml) | Endotheliomamedium | 3 ml |
| | (v/v) FKS | 5 ml |
| | DMSO | 2 ml |
| Endotheliomamedium (500 ml) | DMEM + GlutaMAX™-I | 445 ml |
| | (v/v) FKS | 50 ml |
| | Antibiotic-Antimycotic 100x | 5 ml |

3.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 7: Aufstellung und Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

| Medium | Substanzen | Menge |
|---------------------------------|----------------------------------|-----------|
| FACS-Puffer (1000 ml) | 10 x PBS | 100 ml |
| | (v/v) FKS | 50 ml |
| | NaN ₃ 2M | 5 ml |
| | Aqua dest. | 845 ml |
| HBSS-Lösung (1000 ml, pH = 7,4) | HBSS | 1 Flasche |
| | NaHCO ₃ | 0,35 g |
| | Aqua dest. | Ad 1 l |
| HBSS-Waschpuffer (500 ml) | HBSS-Lösung | 437,5 ml |
| | (v/v) FKS | 50 ml |
| | Hepes 1M | 12,5 ml |
| Natriumazid 2M (10 ml) | NaN ₃ | 1,3002 g |
| | Aqua dest. | 10 ml |
| PBS 10x | NaCl | 400 g |
| | KCl | 10 g |
| | Na ₂ HPO ₄ | 71 g |
| | NaH ₂ PO ₄ | 69 g |
| | Aqua dest. | Ad 5 l |

3.6 Tierexperimentelle Methoden

3.6.1 Induktion der aktiven EAE

Für die Durchführung der Experimente wurden CD14-defiziente Mäuse (Jackson Laboratory via Charles River, Sulzfeld) und entsprechende Wildtyp-Geschwister (Charles River) im Alter von 8-14 Wochen verwendet. Zur Induktion der EAE wurden jeder Maus in leichter Isoflurannarkose 300 µg MOG, 1:1 emulgiert mit CFA, subkutan axillär und inguinal injiziert. Die Herstellung des CFA erfolgte durch Anreicherung von IFA mit 10 mg/ml inaktiviertem Mycobacterium tuberculosis. Die Paste, folglich bestehend aus MOG und CFA, wurde vor Anwendung in Spritzen angesetzt und mit Ultraschall (3 x 20 s) behandelt. Vor jeder Immunisierung wurde die Paste erneut für 3 x 20 s beschallt. An Tag 0 und 2 nach Immunisierung bekamen alle Mäuse zusätzlich 300 ng PTX intraperitoneal appliziert. Die Tiere wurden täglich gewogen, bezüglich klinischer Symptomatik untersucht und nach folgendem klinischen Score eingeteilt (Engelhardt et al., 1997):

Tabelle 8: Score zur Beurteilung der klinischen Symptome nach Immunisierung

| Score | Klinische Symptome |
|-------|--|
| 0 | Keine Symptome |
| 0,5 | Schlaffer, hängender Schwanz; Aktivitätsminderung; Gewichtsabnahme |
| 1 | Schwäche der Hinterläufe; Gewichtsabnahme |
| 2 | Paraparese der Hinterläufe; zunehmende Gewichtsabnahme |
| 3 | Paraplegie mit Inkontinenz; starke Gewichtsabnahme |
| 4 | Tetraparese |
| 5 | Tod |

Die Tiere wurden unter SPF-Bedingungen gehalten und ab einem klinischen Score von 2 getötet. Erste Krankheitssymptome zeigten sich nach 15-18 Tagen. Sämtliche tierexperimentelle Methoden wurden gemäß Tierschutzgesetz durchgeführt und von der zuständigen Behörde genehmigt.

3.6.2 Herstellung von Einzelzellsuspension aus sekundären Lymphorganen

Für die Gewinnung von Lymphozyten wurden die Mäuse mit einer Überdosis Isofluran getötet, die benötigten aortalen, inguinalen sowie axillären Lymphknoten entnommen und in Falconröhrchen mit Waschpuffer überführt. Mit Hilfe eines Glashomogenisators und durch mehrmaliges Spülen mit Waschpuffer erfolgte die Herstellung der Einzelzellsuspension, die im Anschluss durch ein Nylonsieb mit 70 µm Porengröße (BD Biosciences, Heidelberg) filtriert wurde. Nach Zentrifugation (12 Minuten, 300 x g, 4 °C) und Absaugen des Überstandes konnte die gewonnene Zellsuspension direkt für Experimente verwendet werden.

3.6.3 Blutentnahme

Bei den Mäusen wurde nach Tötung und Eröffnung des Peritoneums eine Blutentnahme aus der Vena cava durchgeführt. Das Blut wurde in 50 µl Reaktionsgefäße überführt, zentrifugiert (5 Minuten, 800 x g, 4 °C) und hierdurch gewonnenes Serum bei -80 °C weggefroren.

3.7 Zellkultur

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden sämtliche zellbiologischen Methoden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Verwendete Materialien wurden autoklaviert bzw. steril filtriert. Die Kultur erfolgte in einem Inkubator bei 37 °C, feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre und 5 % CO₂-Gehalt.

3.7.1 Kultivierung der Endothelzellen

Die kommerziell erworbene Endotheliomazelllinie bEnd.3 (brain endothelioma cells; ATCC, Manassas, USA) entstand durch Infektion mit einem retroviralen Vektor aus BALB/c-Mäusen. Kennzeichnend für sie ist die Expression der Adhäsionsmoleküle MAdCAM-1 (Mucosal addressin cell adhesion molecule-1), ICAM-1 und VCAM-1.

Die Kultivierung der Zelllinie erfolgte in 25 cm²-Zellkulturflaschen (BD Biosciences, Heidelberg) mit 5 ml Endotheliomamedium. Die Zellen wurden, bei zweimal wöchentlichem Mediumwechsel, bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert und alle 8-10 Tage im Verhältnis 1:3-1:5 gesplittet. Für sämtliche Experimente dieser Arbeit wurden Zellen der Passage 5-25 verwendet.

3.7.2 Passagieren von Endothelzellen

Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Endotheliomamedium abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von 3 ml 0,05 % Trypsin-EDTA-Lösung pro Kulturflasche für drei Minuten bei 37 °C abgelöst. Die Reaktion wurde mit 5 ml Endotheliomamedium gestoppt und die Zellen für 12 Minuten mit 300 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgesaugt, die Zellen erneut in Endotheliomamedium gelöst und im gewünschten Verhältnis auf Zellkulturflaschen verteilt.

3.7.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mit Hilfe des Farbstoffes Trypanblau. Trypanblau wird von toten Zellen aufgrund ihrer veränderten Membrandurchlässigkeit aufgenommen, sie werden dadurch blau angefärbt. Vitale Zellen nehmen kein Trypanblau auf. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.7.2 beschrieben abgelöst und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 1 ml Endotheliomamedium resuspendiert. Nach Verdünnung von 10 µl der Zellsuspension mit Trypanblau im Verhältnis 1:10 bzw. 1:100 wurden hiervon 10 µl zwischen Deckglas und Kammerboden einer Neubauerzählkammer (A. Hartenstein GmbH, Würzburg) pipettiert. Mit Hilfe des Lichtmikroskopes konnte im Anschluss die Anzahl lebender Zellen in den vier großen Eckquadraten bestimmt und anhand folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Durchschnittliche Zellzahl der vier Großquadrate} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

3.7.4 Auftauen von Endothelzellen

Die Endothelzellen wurden für kurze Zeit bei -80 °C bzw. längerfristig in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellen in einem 37 °C warmen Wasserbad schnell aufgewärmt, in 7 ml Endotheliomamedium resuspendiert und anschließend mit $300 \times g$ für 12 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit dem restlichen Einfriermedium wurde abgesaugt, die Zellen in Endotheliomamedium aufgenommen und in 25 cm^2 Kulturflaschen ausgesät.

3.7.5 Einfrieren von Endothelzellen

Die adhärennten Zellen wurden zunächst wie in Abschnitt 3.7.2 beschrieben abgelöst und zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und zum Einfrieren in ein Kryoröhrchen überführt. Das Lagern in einer Einfrierbox (Nalgene[®] Mr. Frosty EC18, A. Hartenstein GmbH, Würzburg) über mindestens einen Tag garantierte die langsame Abkühlung auf -80 °C .

3.8 Adhäsionsassay

Mit Hilfe dieses Assays konnte die Adhäsion von Antigen-spezifischen T-Zellen aus CD14-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen an die Endotheliomazelllinie bEnd.3 untersucht werden.

Hierfür erfolgte zunächst eine Beschichtung von 16-Well-Chamberslides (Lab-Tek[®] Chamber Slide System, Thermo Scientific GmbH, New York, USA) mit Fibronectin in PBS (50 µg/ml). Pro Well wurden 50 µl pipettiert und anschließend für 40 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 100 µl PBS wurden pro Well 2×10^4 Endotheliomazellen der Linie bENd.3 ausgesät und für 2 Tage in 200 µl Endotheliomamedium kultiviert (Abbildung 7). Die Zellen wurden täglich auf Wachstum mikroskopisch kontrolliert, gegebenenfalls fand ein Mediumwechsel statt.

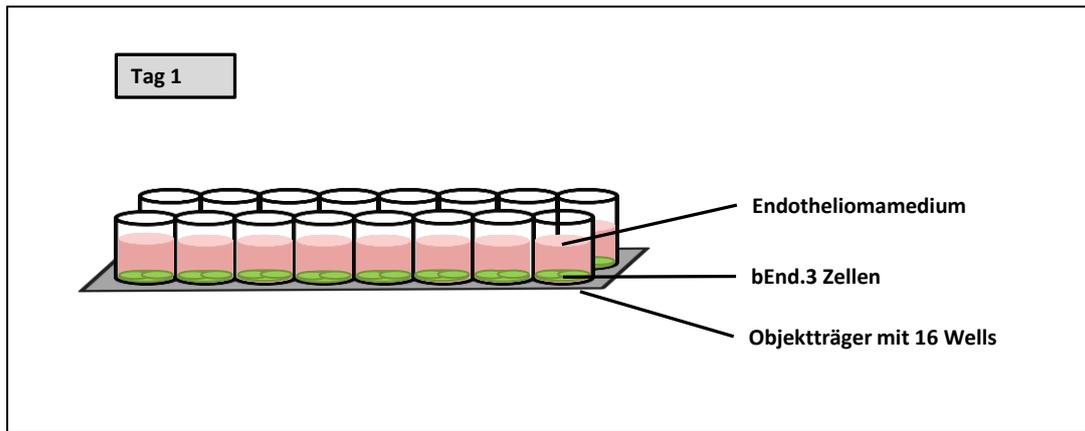


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Adhäsionsassays an Tag 1

Die bEnd.3 Zellen wachsen auf einem mit Fibronektin beschichteten 16-Well-Chamberslide zu einem konfluenten Monolayer.

Nach zwei Tagen Inkubation und Erreichen der Konfluenz wurden die Wells zweimal mit Adhäsionsmedium gewaschen, um anschließend die T-Zellen auszusäen. Die verwendeten T-Zellen an Tag 3 wurden direkt am Versuchstag aus Wildtypmäusen und CD14-defizienten Mäusen gewonnen, zu einer Zellsuspension verarbeitet und in Adhäsionsmedium gezählt. Pro Well wurden daraufhin 3×10^5 T-Zellen in $200 \mu\text{l}$ Adhäsionsmedium ausgesät und für 40 Minuten bei 4°C auf einem Wipptisch inkubiert (Abbildung 8). Zur Sicherstellung einer gleichmäßigen Adhäsion wurde der Assay nach 20 Minuten um 90° gedreht.

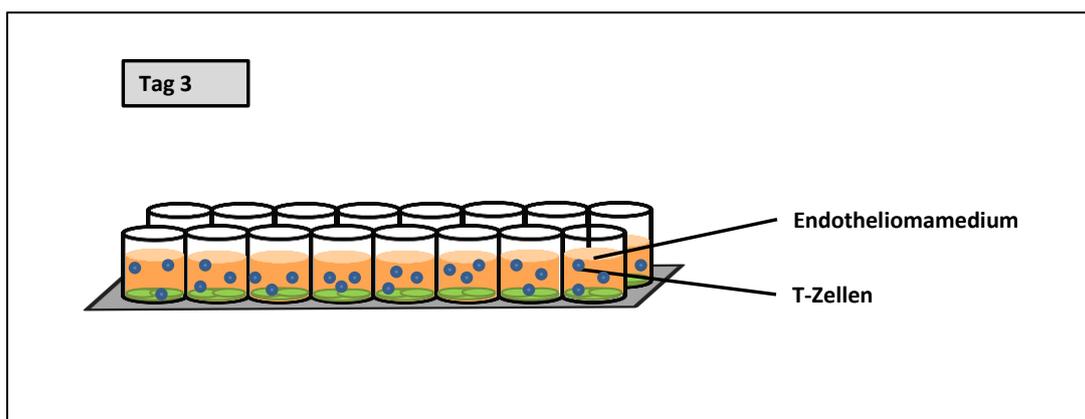


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Adhäsionsassays an Tag 3

Die gewonnenen T-Zellen wurden für 40 Minuten auf dem Endothelzellrasen inkubiert, um dann die Anzahl adhärenter Zellen am Lichtmikroskop zu bestimmen.

Anschließend wurden die Wells vom Glasobjektträger abgebrochen, der Objektträger zweimal in PBS vorsichtig gewaschen und für 2 Stunden in 2,5 % Glutardialdehyd in PBS auf Eis bei 4 °C fixiert. Die Auswertung des Adhäsionsassays erfolgte mit Hilfe eines Zählgitters am Lichtmikroskop.

3.9 Transmigrationsassay

Mit dem Transmigrationsassay konnte die Migration von T-Zellen aus Wildtypmäusen im Vergleich zu T-Zellen von CD14-defizienten Mäusen durch einen bEnd.3 Zellmonolayer untersucht werden. Verwendet wurde hierfür eine Transwellplatte (Corning Life Sciences, Tewksbury, USA), die aus 24 Vertiefungen und 12 Filtereinsätzen (Polycarbonatmembran, 6,5 mm Inserts) mit einer Porengröße von 5 µm besteht. Für das Experiment wurden zunächst an Tag 1 die Filtereinsätze mit jeweils 50 µl Laminin in PBS (50 µg/ml) beschichtet und anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiges Laminin wurde dann abgesaugt und die Inserts für eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Es erfolgte danach das Aussäen der Endotheliomazellen der Linie bEnd.3 mit 5×10^4 Zellen in 200 µl Adhäsionsmedium pro Well (Abbildung 9). Um eine Konfluenz zu gewährleisten wurden die Zellen für 2 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

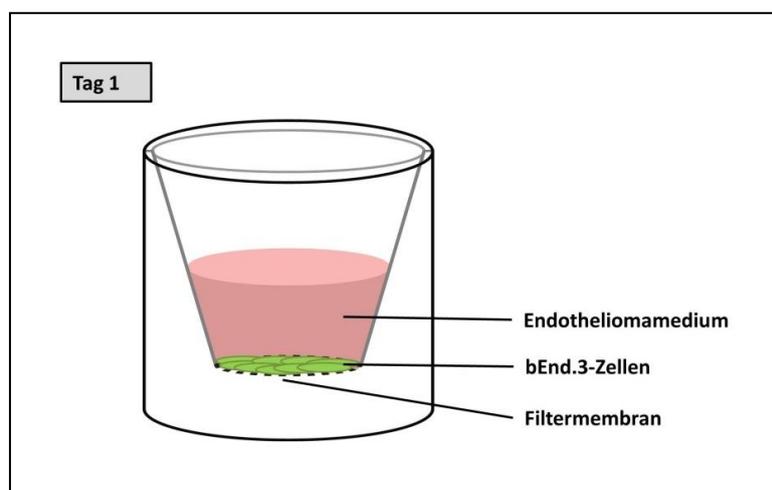


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Transmigrationsassays an Tag 1

Die bEnd.3 Zellen wachsen auf einer mit Laminin beschichteten Filtermembran zu einem konfluenten Monolayer.

An Tag 3 wurde überschüssiges Endotheliomamedium in den Filtereinsätzen vorsichtig abgesaugt und die Filtereinsätze über 12 Vertiefungen mit jeweils 600 µl Medium gehängt. Entsprechend dem Adhäsionstest wurden hier ebenfalls die verwendeten T-Zellen direkt aus Wildtypmäusen und CD14-defizienten Mäusen gewonnen, zu einer Zellsuspension verarbeitet und in Migrationsmedium gezählt. Auf den Endothelzellrasen jedes Filters wurden danach 1×10^6 T-Zellen in 100 µl Migrationsmedium ausgesät und für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert (Abbildung 10). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Filter in leere Vertiefungen zurückgesetzt. Die quantitative Zahl der migrierten Zellen in den Vertiefungen unter den Filtern wurde mit Hilfe von TruCount™ Tubes (BD Biosciences, Heidelberg), Messung am FACS Canto II und anschließender Berechnung nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Migrierte T-Zellen} = \frac{\text{Gemessene Anzahl T-Zellen}}{\text{Gemessene Anzahl Beads}} * \text{Bead-Referenznummer}$$

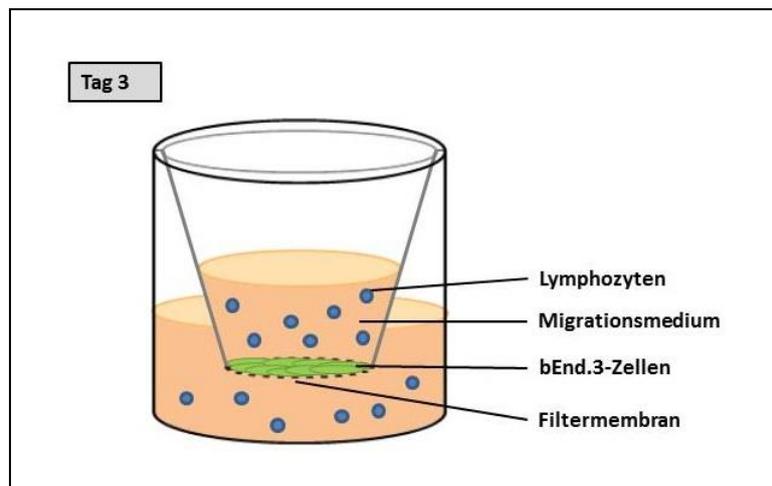


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Transmigrationsassays an Tag 3

Die gewonnenen T-Zellen wurden für vier Stunden auf der Endothelzellschicht inkubiert, um anschließend die durch den Filter migrierten T-Zellen mit Hilfe von TruCount™ Tubes am FACS Canto II zu bestimmen.

Um die Konfluenz des Endothelzellmonolayers zu beurteilen, wurde nach Durchführung des Experiments das restliche Migrationsmedium aus den Filtereinsätzen abpipettiert und die Filtereinsätze mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Dampf fixation mit 37 % Formaldehyd über Nacht. Hierzu wurde jeweils

50 µl Formaldehyd in die Vertiefungen gegeben und die Filtereinsätze eingehängt. Die Filtermembranen wurden am Folgetag mit 2,6 % Giemsa angefärbt, auf Objektträger mit Entellan eingedeckt und mit Hilfe des Lichtmikroskopes beurteilt.

3.10 Durchflusszytometrie

3.10.1 Allgemeines Prinzip

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit Einzelzellen in Suspension während der Bewegung in einem Flüssigkeitsstrom anhand ihrer verschiedenen physikalischen und molekularen Eigenschaften zu unterscheiden und zu analysieren. Die einzelnen Zellen passieren einen Laserstrahl, dabei erzeugtes Streu- und Fluoreszenzlicht wird detektiert und digitalisiert. Basierend auf der Messung von Streulicht und Fluoreszenz lassen sich mit der Durchflusszytometrie folgende Parameter bestimmen:

- Zellgröße
- Zellgranularität
- Zelloberflächenproteine: Sie werden durch die Messung der Fluoreszenz bestimmt. Voraussetzung ist daher, dass die Zellen vor ihrer Messung mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt werden. Für die in der Dissertation durchgeführten Experimente wurden folgende Farbstoffe eingesetzt:
 - Allophycocyanin (APC)
 - Phycoerythrin (PE)
 - Fluoresceinisothiocyanat (FITC)
 - Peridinin Chlorophyll Protein Complex (PerCP)

3.10.2 Bestimmung der Expression von T-Zell-aktivierenden Molekülen und Adhäsionsmolekülen auf Lymphozyten

Zur Messung von T-Zell-aktivierenden Molekülen und Adhäsionsmolekülen mittels Durchflusszytometrie wurden Zellen aus Wildtypmäusen und CD14-defizienten

Mäusen entsprechend Abschnitt 3.6.2 gewonnen, eine Einzelzellsuspension hergestellt und in FACS-Puffer gezählt. Pro Tube wurden 2×10^5 Zellen in 100 μ l FACS-Puffer überführt und mit den gewünschten Antikörpern für 40 Minuten im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Für die Experimente dieser Arbeit wurden die in Tabelle 9 aufgelisteten Vierfachfärbungen durchgeführt.

Tabelle 9: Aufstellung der durchgeführten Antikörperfärbungen für die Durchflusszytometrie

| Bestimmung der Expression von T-Zell-aktivierenden Molekülen | | | | | |
|---|------------|-----|------|-------------|-------|
| Verwendete Antikörper | 1. Färbung | CD4 | CD8a | TCR β | CD28 |
| | 2. Färbung | CD4 | CD8a | TCR β | CD152 |
| Bestimmung der Expression von Adhäsionsmolekülen | | | | | |
| Verwendete Antikörper | 1. Färbung | CD4 | CD8a | CD11a | CD49d |

Als Negativkontrolle galt eine ungefärbte Probe, außerdem wurden Isotypkontrollen der eingesetzten Antikörper genutzt. Die Zellen wurden nach Ablauf der Inkubation mit 500 μ l FACS-Puffer pro Tube gewaschen und jeweils mit 300 x g für 4 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Nicht fluoreszenz-markierte Antikörper wurden mit einem Cy5-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert bzw. biotinylierte Primärantikörper mit APC-konjugiertem Streptavidin gefärbt. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen mit 1 % Formaldehyd in FACS-Puffer fixiert und am FACS Canto II mit Hilfe der FACS Diva Software analysiert.

3.11 ELISA

3.11.1 Allgemeines Prinzip

Der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) kann basierend auf einem enzymatischen Immunadsorptionsverfahren eine Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper nachweisen. Als häufig angewandtes Untersuchungsverfahren dient es somit zur Bestimmung von Proteinen, Hormonen, Viren, Toxinen und Tumormarkern.

Beide in der Dissertation angewandten ELISA beruhen auf der sogenannten Sandwich-Methode. Hierbei ist ein monoklonaler Antikörper an eine 96-Well-Mikroplatte gebunden. Nach Inkubation der Probe bindet das spezifische Antigen an den festen Antikörper der Mikroplatte. Durch Zugabe eines weiteren Antikörpers, der ein anderes Epitop als der Capture-Antikörper erkennt, wird die Probe detektiert. An diesen zweiten Antikörper ist ein Enzym gekoppelt, das nach Zugabe der Detektionslösung eine Farbreaktion auslöst. Durch Anwendung einer Standardreihe und durch die Farbentwicklung können die Proben am Photometer gemessen werden.

3.11.2 Bestimmung von MMP-2 und MMP-9 in Mauseren

Die Bestimmung von MMP-2 und MMP-9 im Serum von CD14-defizienten Tieren und C57BL/6J Tieren am Erkrankungspeak p.i. (post immunization, nach Immunisierung) erfolgte mit Hilfe der Quantikine® ELISA Kits für MMP-2 und MMP-9 (R&D Systems, Minneapolis, USA). Diese enthalten jeweils eine mit dem monoklonalen Antikörper MMP-2 bzw. MMP-9 beschichtete 96-Well-Polystyrolplatte sowie sämtliche für die Durchführung benötigten Lösungen.

MMP-2:

Am Tag der Durchführung wurden die zur Messung bestimmten Seren bei Raumtemperatur aufgetaut und im Verhältnis 1:10 mit der im Kit enthaltenen Lösung Calibrator Diluent RD5-32 verdünnt. Für die benötigte Standardreihe wurde der Standard MMP-2 in 1 ml Aqua dest. gelöst, sodass eine Konzentration von 100 ng/ml vorlag, die für die Reihe weiter verdünnt wurde (50 ng/ml; 25 ng/ml; 12,5 ng/ml; 6,25 ng/ml; 3,12 ng/ml; 1,56 ng/ml; 0,78 ng/ml). 100 µl Assay Diluent RD1-74 und 50 µl des Standards bzw. der Probe wurden pro Well auf der Platte verteilt und anschließend für zwei Stunden auf einem Kombischüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit Waschpuffer (pro Well 400 µl), hergestellt aus 20 ml Waschpufferkonzentrat und 480 ml Aqua dest., erfolgte die Zugabe von 200 µl MMP-2 Konjugat (polyklonaler Antikörper gegen MMP-2, konjugiert mit Meerrettichperoxidase) pro Well. Die Platte wurde erneut für zwei Stunden inkubiert und danach viermal gewaschen, sodass Antikörper, die keine Bindung eingehen konnten, entfernt wurden. Anschließend wurde pro Well 200 µl Substratlösung, bestehend aus

Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin, pipettiert und für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die hierdurch ausgelöste enzymatische Farbreaktion wurde 30 Minuten später durch Zugabe von 50 µl Stop Solution (2N Schwefelsäure) pro Well beendet.

MMP-9:

Für den MMP-9 ELISA erfolgte eine Verdünnung der Seren im Verhältnis 1:100. Durch Lösen des Maus pro-MMP-9 Standards in 2 ml Calibrator Diluent RD5-10 wurde eine Stocklösung mit 2000 pg/ml angesetzt, die zur Herstellung der Standardreihe weiter verdünnt wurde (1000 pg/ml; 500 pg/ml; 250 pg/ml; 125 pg/ml; 62,5 pg/ml; 31,3 pg/ml). 50 µl Assay Diluent RD1-34 und 50 µl des Standards bzw. der Probe wurden pro Well pipettiert und entsprechend des MMP-2 ELISA inkubiert und gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl MMP-9 Konjugat (monoklonaler Antikörper gegen MMP-9, konjugiert mit Meerrettichperoxidase) wurde die Platte erneut bei 4 °C ohne Kombischüttler inkubiert und anschließend gewaschen. Durch Zugabe von 100 µl Substratlösung (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) wurde die Reaktion für 30 Minuten im Dunkeln gestartet und danach mit 100 µl Stop Solution (Salzsäure) beendet.

Der durch die enzymatische Reaktion der Meerrettichperoxidase mit dem chromogenen Substrat entstandene Farbumschlag wurde bei beiden ELISA innerhalb von 30 Minuten am Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Hierdurch konnte die Konzentration von MMP-2 und MMP-9 durch Vergleich mit der Standardkurve berechnet werden.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss der CD14-Defizienz auf den EAE Krankheitsverlauf

Es wurde eine aEAE in CD14-defizienten Mäusen und Wildtypkontrollen induziert. Die Versuchstiere wurden regelmäßig hinsichtlich etwaiger klinischer Symptomatik untersucht, gewogen und mit Hilfe des oben aufgeführten Scores beurteilt. Entsprechend Vorergebnissen von Walter et al. 2006 zeigte sich auch während der Durchführung dieser Experimente, dass CD14-defiziente Tiere nach Induktion einer aEAE eine deutlich ausgeprägtere klinische Symptomatik mit früherem Krankheitsbeginn im Vergleich zu Wildtypmäusen entwickeln (Walter et al., 2006). Ein klinischer Verlauf ist in Abbildung 11 an einer EAE beispielhaft dargestellt.

Für sämtliche aufgeführten Experimente wurden CD14-defiziente Mäuse mit einem durchschnittlichen klinischen Score von $1,70 \pm 0,12$ (Erkrankungspeak p.i.), zusammen mit einer entsprechenden Wildtypkontrolle ($0,73 \pm 0,15$) am gleichen Tag untersucht. Zu diesem Zeitpunkt zeigten C57BL/6J Mäuse eine geringer ausgeprägte Symptomatik. Tabelle 10 fasst die Anzahl verwendeter Tiere für die nachfolgenden Ergebnisse mit ihrer mittleren Erkrankungsschwere zusammen.

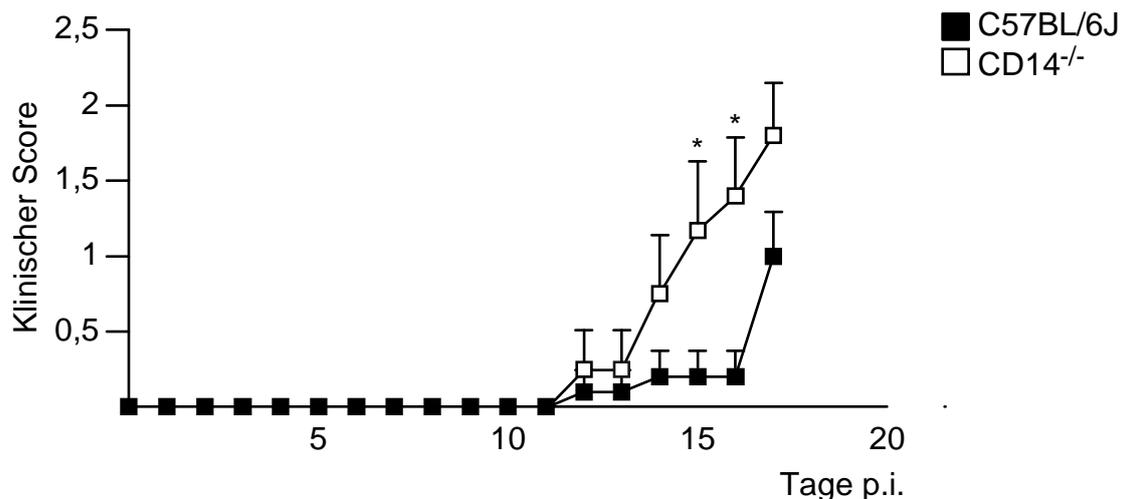


Abbildung 11: Repräsentativer Verlauf der EAE von CD14-defizienten Mäusen und C57BL/6J Tieren

Dargestellt ist der klinische Verlauf mit entsprechenden Scorewerten von einer repräsentativen EAE mit insgesamt 6 CD14-defizienten Mäusen und 5 C57BL/6J Tieren. Bei CD14-defizienten Mäusen war nach Induktion der EAE die Entwicklung stärkerer klinischer Symptome erkennbar.

Tabelle 10: Anzahl der CD14-defizienten Mäuse und C57BL/6J verwendeten Tiere für nachfolgende Ergebnisse

| Erkrankungspeak p.i. | | | | |
|--------------------------|------------------|-------------------|---------------------------------|-----------|
| | Anzahl der Tiere | Durchgeführte EAE | Mittlere Schwere der Erkrankung | |
| C57BL/6J | 20 | 10 | 0,73 ± 0,15 | p < 0,001 |
| CD14 ^{-/-} | 20 | 10 | 1,70 ± 0,12 | |
| Tag 10 p.i. | | | | |
| C57BL/6J | 15 | 8 | 0 | |
| CD14 ^{-/-} | 15 | 8 | 0 | |
| Nicht-immunisierte Tiere | | | | |
| C57BL/6J | 10 | - | 0 | |
| CD14 ^{-/-} | 10 | - | 0 | |

4.2 Untersuchung des kostimulatorischen Signalweges B7-1/2-CD28/CTLA-4

4.2.1 Expression des T-Zell-aktivierenden Rezeptors CD28

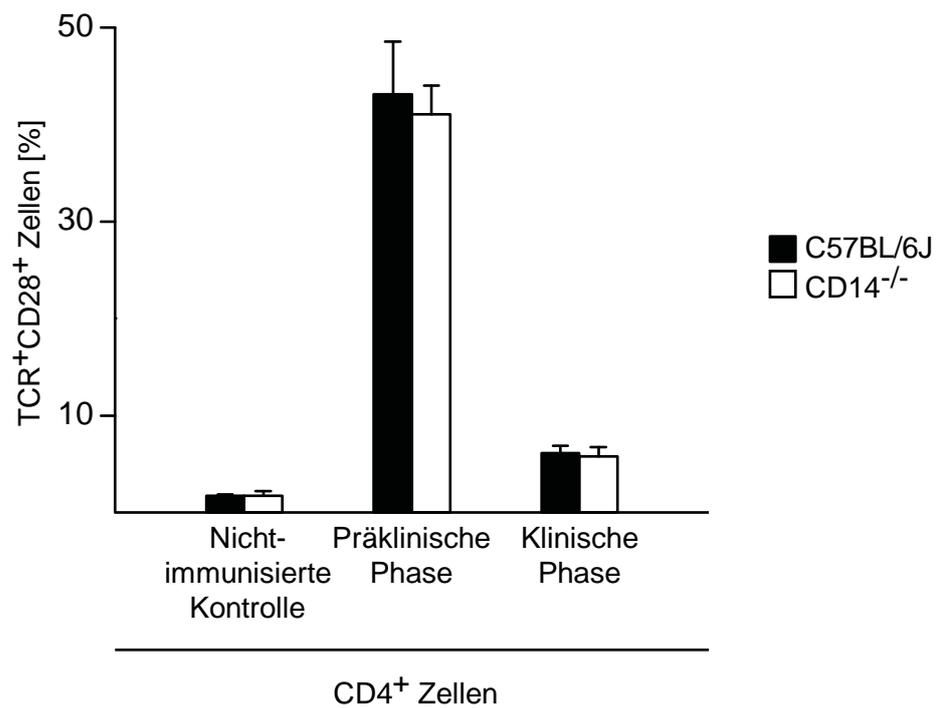
Aufgrund der Beobachtung, dass Wildtypmäuse im Vergleich zu CD14-defizienten Tieren nach Induktion einer EAE eine deutlich mildere Klinik zeigten, sollte mit diesem Experiment die T-Zell-Aktivierung mit ihrem stimulierenden Rezeptor CD28, als Bestandteil des kostimulatorischen Signalweges B7-1/2-CD28/CTLA-4, verglichen werden.

Hierfür wurde in C57BL/6J und CD14-defizienten Mäusen eine aEAE ausgelöst. An Tag 10 p.i. und am Peak der Erkrankung p.i., d.h. bei einem durchschnittlichen klinischen Score von 2 der CD14-defizienten Mäuse, wurden Lymphknoten gewonnen, zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet, mit den Antikörpern CD4/CD8/TCR/CD28 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie die Expression von TCR/CD28 auf CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen bestimmt.

Das Ergebnis, dargestellt in Abbildung 12, zeigt keinen signifikanten Unterschied in der Expression der T-Zell-aktivierenden Moleküle TCR/CD28 auf CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen von CD14-defizienten Mäusen bei nicht-immunisierten, gesunden Tieren, an Tag 10 p.i. und am Peak der Erkrankung p.i. im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen.

Tabelle 11 zeigt, dass die Immunisierung zu einem Anstieg der Expression von TCR/CD28 an Tag 10 p.i. gegenüber den nicht-immunisierten Kontrollen innerhalb einer jeden Gruppe führt.

A)



B)

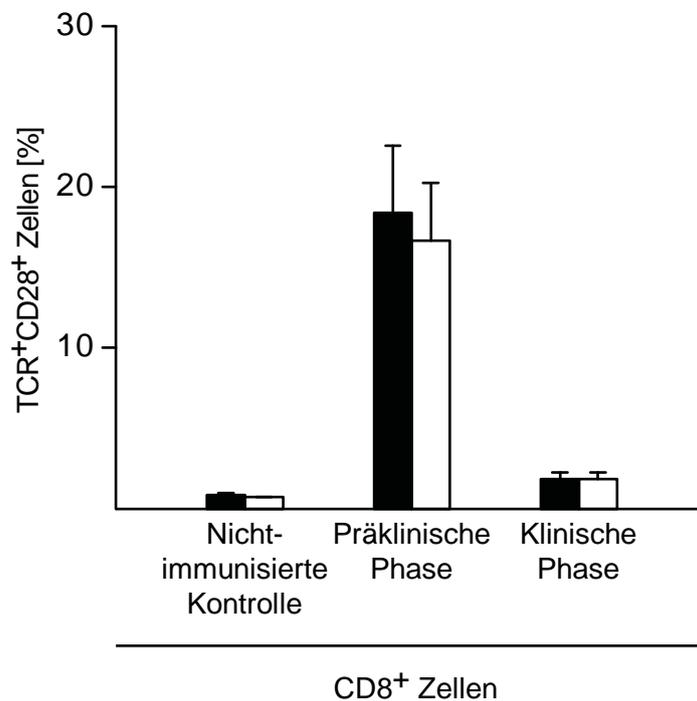


Abbildung 12: Vergleich der Expression des kostimulatorischen Moleküls CD28 auf Lymphozyten von CD14-defizienten Mäusen gegenüber C57BL/6J Mäusen

Die TCR/CD28 Expression auf (A) CD4⁺ Zellen und (B) CD8⁺ Zellen zeigt an den gemessenen Zeitpunkten keinen signifikanten Unterschied zwischen C57BL/6J Mäusen und CD14-defizienten Tieren (Kontrolle: C57BL/6J n = 4, CD14^{-/-} n = 4; Tag 10 p.i.: C57BL/6J n = 5, CD14^{-/-} n = 5; Erkrankungspeak p.i.: C57BL/6J n = 7, CD14^{-/-} n = 5).

Tabelle 11: Expression von TCR/CD28 auf T-Zellen bei gesunden Tieren, Tag 10 p.i., Erkrankungspeak p.i.

| TCR/CD28 positive CD4 Zellen (%) | | | | | | |
|----------------------------------|----------------------|-----------|------------------------|-----------|---------------------------------|-----------|
| | Mittelwert Kontrolle | | Mittelwert Tag 10 p.i. | | Mittelwert Erkrankungspeak p.i. | |
| C57BL/6J | 1,70 ± 0,14 | p = 0,958 | 43,06 ± 5,33 | p = 0,752 | 6,11 ± 0,73 | p = 0,762 |
| CD14 ^{-/-} | 1,73 ± 0,44 | | 41,06 ± 2,97 | | 5,74 ± 0,99 | |
| TCR/CD28 positive CD8 Zellen (%) | | | | | | |
| C57BL/6J | 0,88 ± 0,11 | p = 0,235 | 18,38 ± 4,17 | p = 0,765 | 1,86 ± 0,41 | p = 0,978 |
| CD14 ^{-/-} | 0,73 ± 0,03 | | 16,68 ± 3,58 | | 1,84 ± 0,41 | |

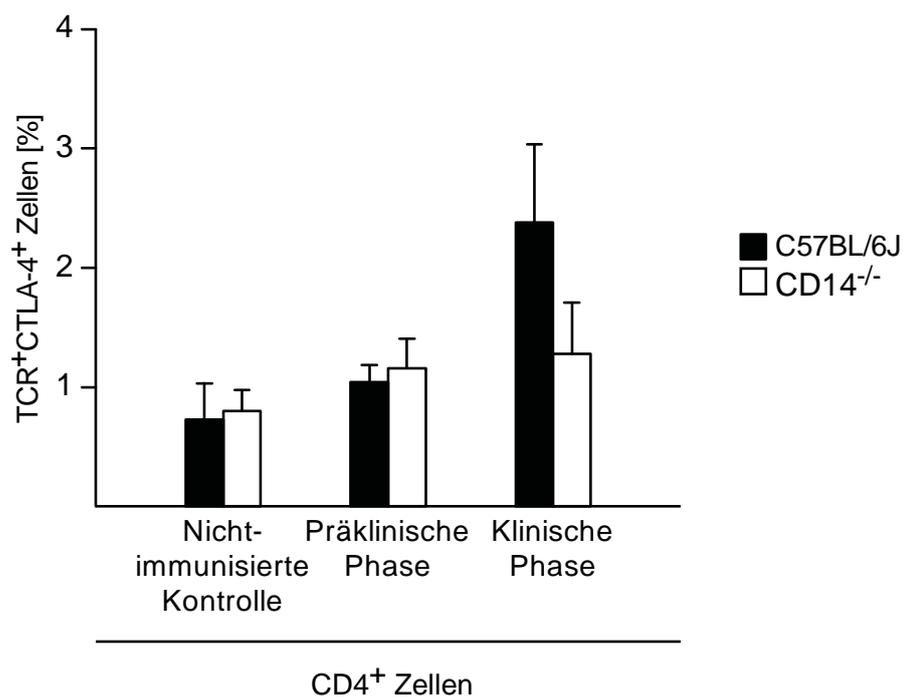
4.2.2 Expression des T-Zell-inhibierenden Rezeptors CTLA-4

Mit der Fragestellung, ob Wildtypmäuse aufgrund des inhibierenden Rezeptors CTLA-4 als Gegenspieler zu CD28 eine verminderte Klinik zeigen, wurde bei CD14-defizienten Mäusen und Wildtypkontrollen die Anzahl CTLA-4 exprimierender T-Zellen mittels Durchflusszytometrie verglichen.

In den Mäusen wurde hierfür eine aEAE induziert, die Lymphknoten an Tag 10 und am Peak der Erkrankung gewonnen und nach Herstellung der Einzelzellsuspension mit den Antikörpern CD4/CD8/TCR/CTLA-4 gefärbt. Als Kontrolle dienten ebenfalls gesunde, nicht-immunisierte Wildtypmäuse und CD14-defiziente Mäuse.

Abbildung 13 zeigt, dass es keinen Unterschied in der CTLA-4 Expression auf CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen von CD14-defizienten Mäusen in der nicht-immunisierten, gesunden Kontrolle und an Tag 10 p.i. im Vergleich zu C57BL/6J Tieren gibt. Jedoch zeigt sich, wie in Tabelle 12 dargestellt, ein Anstieg der CTLA-4 Expression am Erkrankungspeak p.i. im Vergleich zu Tag 10 p.i. bei C57BL/6J Tieren.

A)



B)

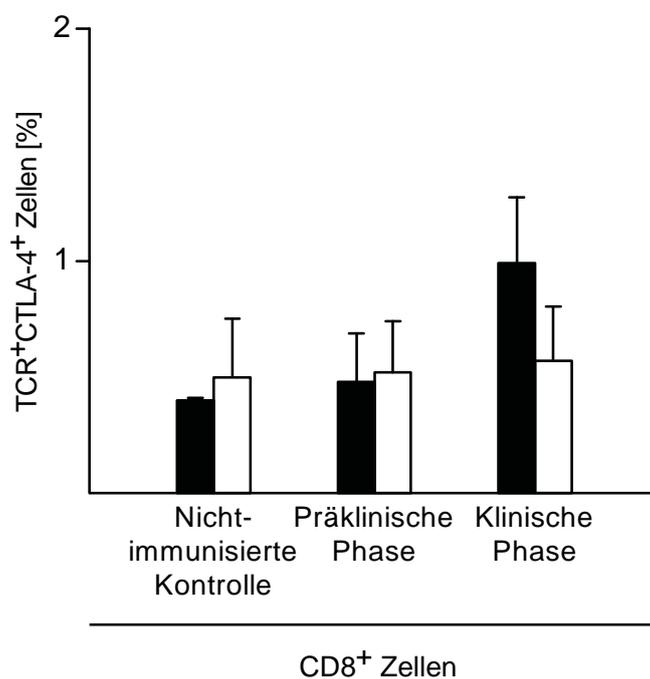


Abbildung 13: Vergleich der Expression des kostimulatorischen Moleküls CTLA-4 auf T-Zellen von CD14-defizienten Mäusen gegenüber C57BL/6J Tieren

Die Expression von TCR/CTLA-4 auf (A) CD4⁺ T-Zellen und (B) CD8⁺ T-Zellen von CD14-defizienten Mäusen bei gesunden Tieren, an Tag 10 p.i. und am Erkrankungspeak p.i. zeigte im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen keinen signifikanten Unterschied (Kontrolle: C57BL/6J n = 3, CD14^{-/-} n = 3; Tag 10 p.i.: C57BL/6J n = 5, CD14^{-/-} n = 5; Erkrankungspeak p.i.: C57BL/6J n = 8, CD14^{-/-} n = 6).

Tabelle 12: Expression von TCR/CTLA-4 auf T-Zellen bei gesunden Tieren, Tag 10 p.i., Erkrankungspeak p.i.

| TCR/CTLA-4 positive CD4 Zellen (%) | | | | | | |
|------------------------------------|----------------------|-----------|------------------------|-----------|---------------------------------|-----------|
| | Mittelwert Kontrolle | | Mittelwert Tag 10 p.i. | | Mittelwert Erkrankungspeak p.i. | |
| C57BL/6J | 0,73 ± 0,30 | p = 0,855 | 1,04 ± 0,13 | p = 0,675 | 2,38 ± 0,65 | p = 0,221 |
| CD14 ^{-/-} | 0,80 ± 0,17 | | 1,16 ± 0,24 | | 1,28 ± 0,43 | |
| TCR/CTLA-4 positive CD8 Zellen (%) | | | | | | |
| C57BL/6J | 0,40 | p = 0,711 | 0,48 ± 0,21 | p = 0,898 | 0,99 ± 0,28 | p = 0,295 |
| CD14 ^{-/-} | 0,50 ± 0,25 | | 0,52 ± 0,22 | | 0,57 ± 0,23 | |

4.3 Untersuchung der Adhäsionsmoleküle

Damit T-Effektorzellen nach deren Aktivierung ins ZNS gelangen können, müssen sie entsprechend des Multi-Step-Modells die BHS überwinden, erst dann können sie eine inflammatorische Schädigung des Hirnparenchyms verursachen.

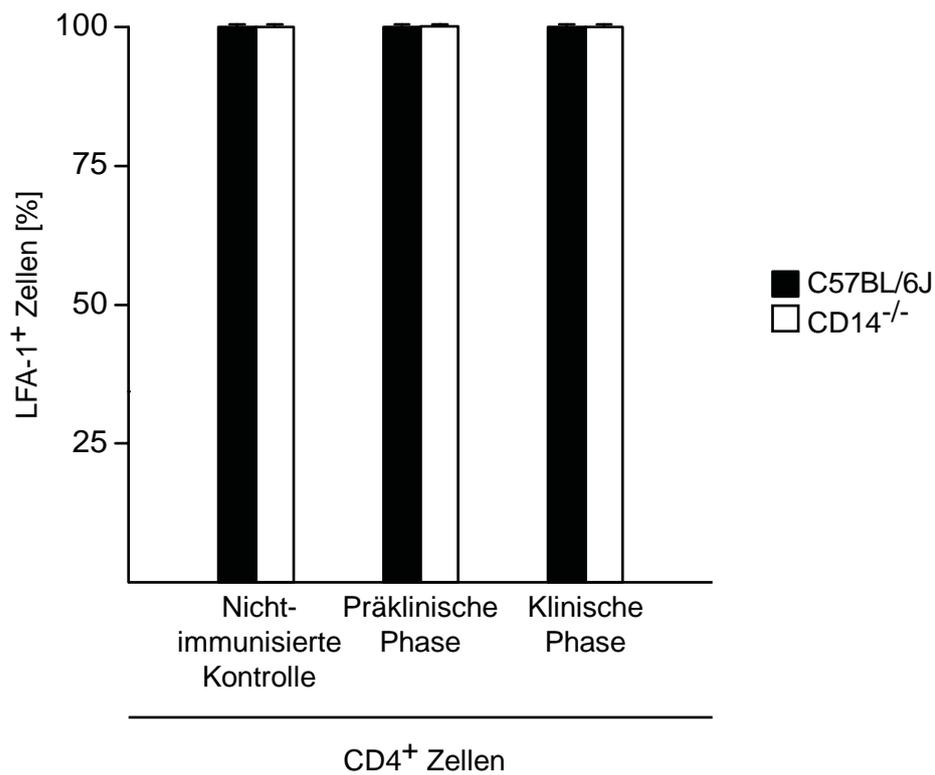
Im Rahmen dieses Versuches sollte daher die Expression der Adhäsionsmoleküle auf T-Zellen von CD14-defizienten Mäusen zur Wildtypkontrolle verglichen werden. Untersucht wurden hierfür CD49d, die Alpha-Untereinheit von $\alpha 4\beta 1$ -Integrin und essenzielles Molekül für die Adhäsion, sowie LFA-1, das für die endgültige Migration der Zellen notwendig ist.

Entsprechend oben aufgeführten Versuchen erfolgte auch hier nach Induktion der EAE die Gewinnung von T-Zellen aus CD14-defizienten Tieren und C57BL/6J Mäusen mit anschließender Antikörperfärbung (CD4/CD8/LFA-1/CD49d).

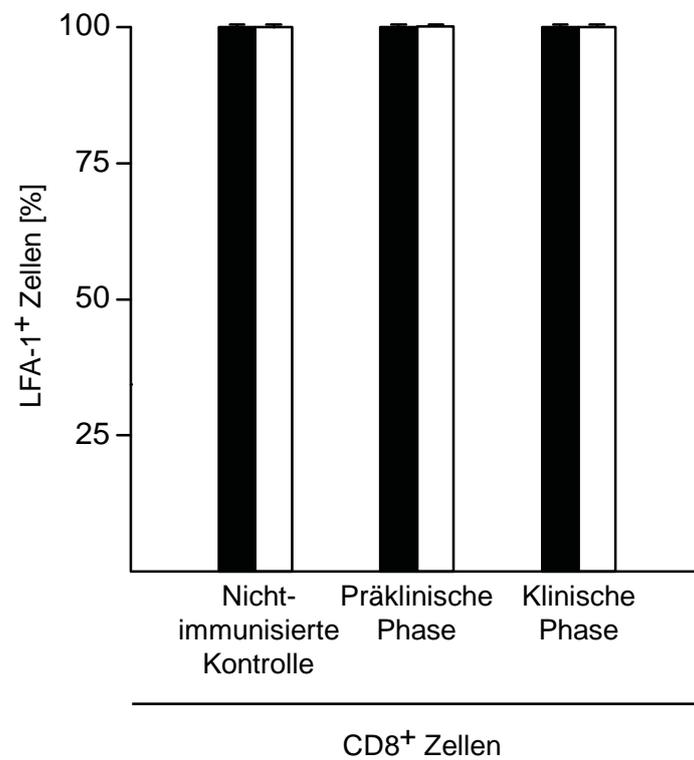
Wie in Abbildung 14 dargestellt zeigt sich in der Expression von LFA-1 auf CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen von CD14-defizienten Mäusen in den nicht-immunisierten Kontrollen, an Tag 10 p.i. und am Erkrankungspik p.i. kein signifikanter Unterschied gegenüber den Wildtyptieren.

Auch die Anzahl CD49d positiver Zellen unterscheidet sich sowohl in der nicht-immunisierten Kontrolle als auch an Tag 10 p.i. und am Erkrankungspik p.i. gegenüber C57BL/6J Tieren nicht.

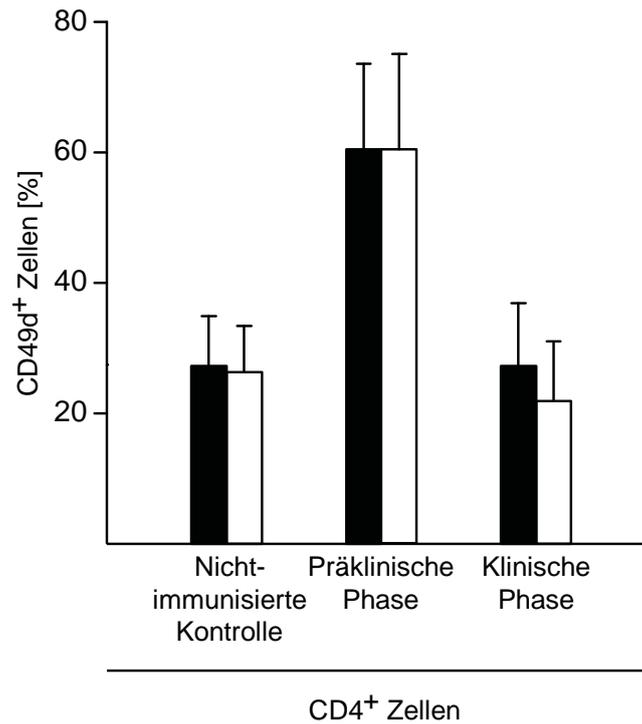
A)



B)



C)



D)

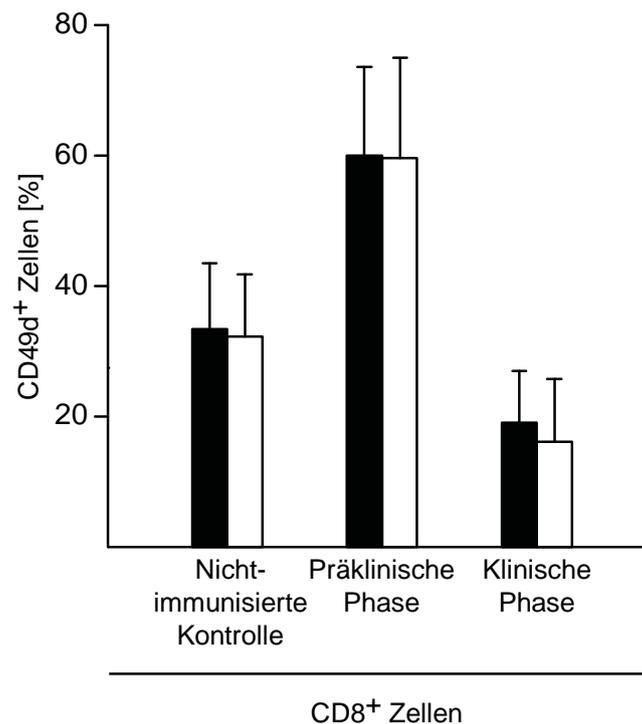


Abbildung 14: Vergleich der Expression von LFA-1 und CD49d auf T-Zellen von CD14-defizienten Mäusen gegenüber C57BL/6J Mäusen

CD14-defiziente Tiere unterscheiden sich in der Expression von LFA-1 auf (A) CD4⁺ T-Zellen und (B) CD8⁺ T-Zellen sowie in der Expression von CD49d auf (C) CD4⁺ T-Zellen und (D) CD8⁺ T-Zellen nicht signifikant von den C57BL/6J Mäusen (Kontrolle: C57BL/6J n = 4, CD14^{-/-} n = 4; Tag 10 p.i.: C57BL/6J n = 5, CD14^{-/-} n = 5; Erkrankungspeak p.i.: C57BL/6J n = 8, CD14^{-/-} n = 6).

4.4 Adhäsionsfähigkeit von Lymphozyten bei CD14-Defizienz

Mit der Fragestellung, ob Lymphozyten aus CD14-defizienten Tieren vermehrt an der BHS adhären und durch die anschließende Migration eine ausgeprägtere klinische Symptomatik verursachen, erfolgte die Untersuchung dieser Zellen an *in vitro* Adhäsionsassays.

Entsprechend wurden hierfür Zellen aus immunisierten Tieren an Tag 10 p.i. sowie am Peak der Erkrankung p.i. gewonnen, zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet und auf einem mit bEnd.3 Zellen beschichteten Chamberslide inkubiert. Als Kontrollen dienten nicht-immunisierte, gesunde Tiere. Zu jedem gemessenen Zeitpunkt wurden die Wildtyptiere als 100 % definiert.

In den Ergebnissen (Abbildung 15) zeigte sich weder in der Adhäsionskapazität der nicht-immunisierten Kontrolle (119,96 % \pm 19,15 %), noch an Tag 10 p.i. (117,05 % \pm 16,24 %) oder am Peak der Erkrankung p.i. (118,78 % \pm 16,31 %) ein signifikanter Unterschied im Adhäsionsverhalten der Zellen von CD14-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyptieren.

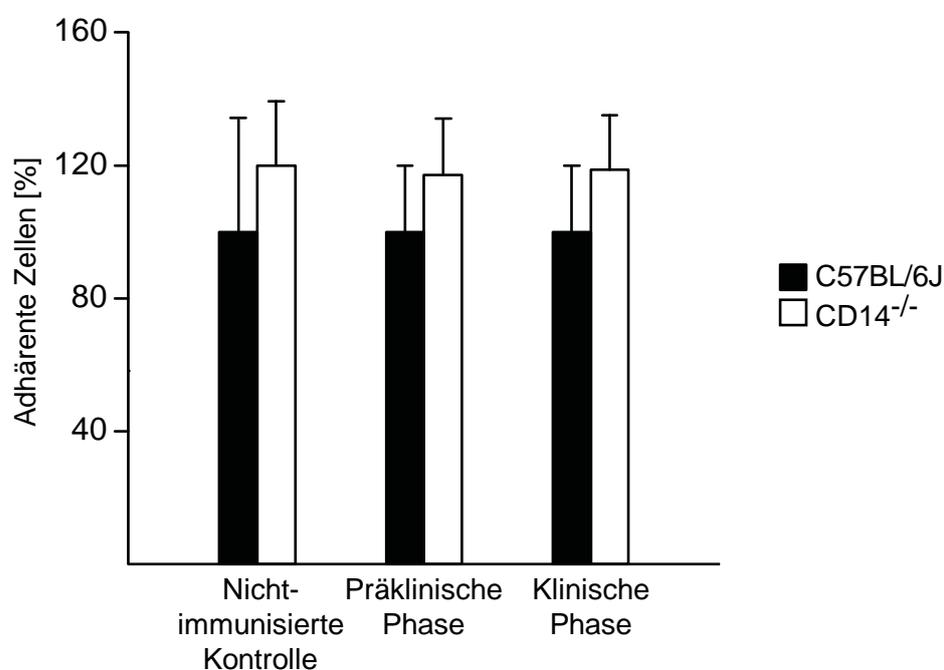


Abbildung 15: Vergleich der Adhäsion von Lymphozyten aus CD14-defizienten Mäusen und C57BL/6J Tieren

Dargestellt ist die prozentuale Anzahl adhärenter Zellen von CD14-defizienten Mäusen und Wildtyptieren (zu den verschiedenen Zeitpunkten als 100 % definiert) auf einem bEnd.3

Zellmonolayer. Es zeigte sich kein Unterschied in der Adhäsion bei der nicht-immunisierten Kontrolle ($p = 0,322$), an Tag 10 p.i. ($p = 0,308$) und am Erkrankungspeak p.i. ($p = 0,287$; Kontrolle: C57BL/6J $n = 6$, CD14^{-/-} $n = 6$; Tag 10 p.i.: C57BL/6J $n = 10$, CD14^{-/-} $n = 10$; Erkrankungspeak p.i.: C57BL/6J $n = 9$, CD14^{-/-} $n = 11$).

Veröffentlichungen von Sikorski et al. zeigten, dass die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM nach Stimulation der bEnd.3 Zellen mit TNF- α ansteigt (Sikorski et al., 1993).

Um den Einfluss von TNF- α auf das Adhäsionsverhalten zu untersuchen, wurde versuchsweise am Erkrankungspeak p.i., wenn eine Entzündung der BHS vorliegt, die Anzahl adhärenter Lymphozyten von CD14-defizienten Tieren und C57BL/6J Mäusen auf stimulierten bEnd.3 Zellen verglichen.

Hierfür erfolgte an Tag 2 des Adhäsionsversuches eine Stimulation des bEnd.3 Zellmonolayers mit TNF- α , anschließend wurden darauf die Lymphozyten, wie in Abschnitt 3.8 beschrieben, inkubiert (Abbildung 16).

Abbildung 17 zeigt, dass sich auch nach Stimulation mit TNF- α kein signifikanter Unterschied im Adhäsionsverhalten von Zellen aus CD14-defizienten Mäusen (129,90 % \pm 20,20 %) gegenüber der Wildtypkontrolle (als 100 % definiert) ergab.

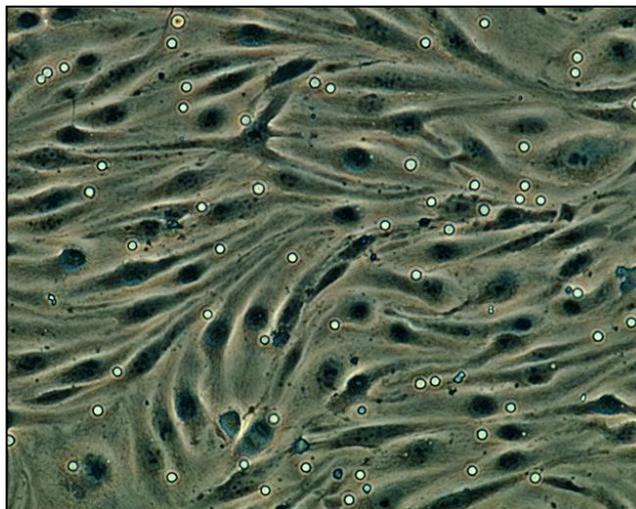


Abbildung 16: Mikroskopische Aufnahme eines Adhäsionsassays

Dargestellt ist ein konfluent bEnd.3 Zellmonolayer mit adhärenter Lymphozyten. Die Auszählung des Assays erfolgte mit Hilfe eines Zählgitters, pro Well wurde die Anzahl adhärenter Zellen in fünf verschiedenen Gesichtsfeldern bestimmt.

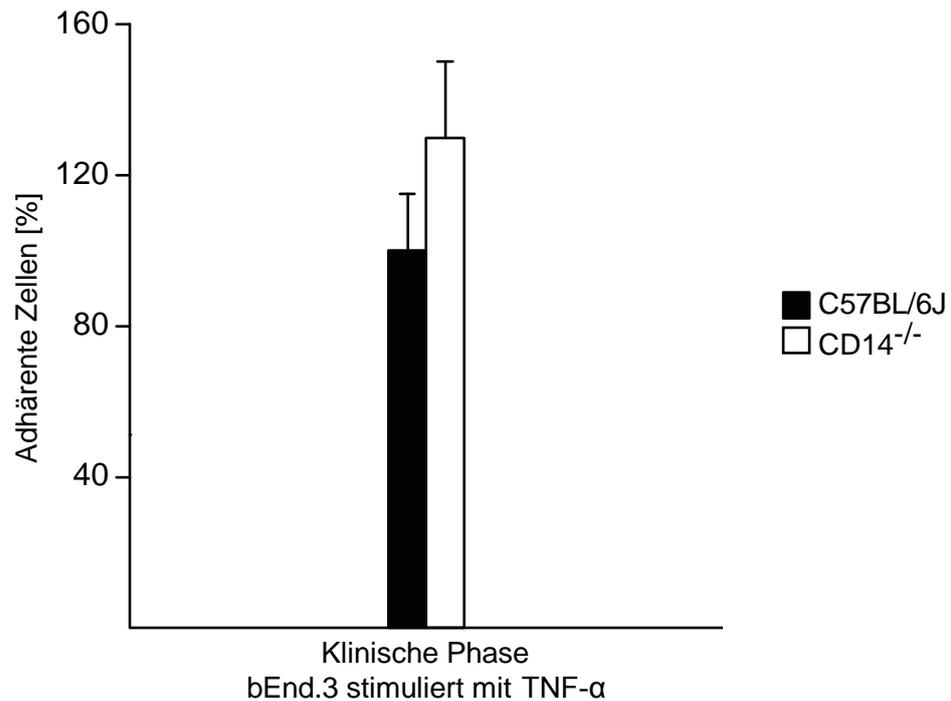


Abbildung 17: Adhäsionsverhalten von Lymphozyten aus CD14-defizienten Mäusen auf einem mit TNF- α stimulierten Zellmonolayer

Dargestellt ist die prozentuale Anzahl adhärenter Zellen von CD14-defizienten Mäusen und Wildtyptieren (als 100 % definiert) auf einem mit TNF- α stimulierten (100 Units/ml, 24 Stunden) bEnd.3 Zellmonolayer. Auch nach Stimulation zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Adhäsion von Lymphozyten aus CD14-defizienten Tieren gegenüber der Wildtypkontrolle ($p = 0,233$; Erkrankungspeak p.i.: C57BL/6J $n = 4$, CD14^{-/-} $n = 5$).

4.5 Transmigrationsfähigkeit von Lymphozyten bei CD14-Defizienz

Um zu untersuchen, ob CD14-defiziente Mäuse aufgrund einer vermehrten Migration über die BHS eine ausgeprägtere klinische Symptomatik zeigen, wurden *in vitro* Transmigrationsassays mit Lymphozyten von CD14-defizienten Tieren und C57BL/6J Mäusen durchgeführt.

Es wurden hierfür Zellen von beiden Gruppen aus nicht-immunisierten, gesunden Tieren, an Tag 10 der EAE und am Erkrankungspeak p.i. auf einem bEnd.3 Zellmonolayer für vier Stunden inkubiert. Die Anzahl transmigrierter Zellen wurde mit Hilfe von TruCount™ Tubes am FACS Canto II, wie in Abbildung 18 dargestellt, bestimmt. Die C57BL/6J Tiere wurden zu jedem gemessenen Zeitpunkt als 100% definiert.

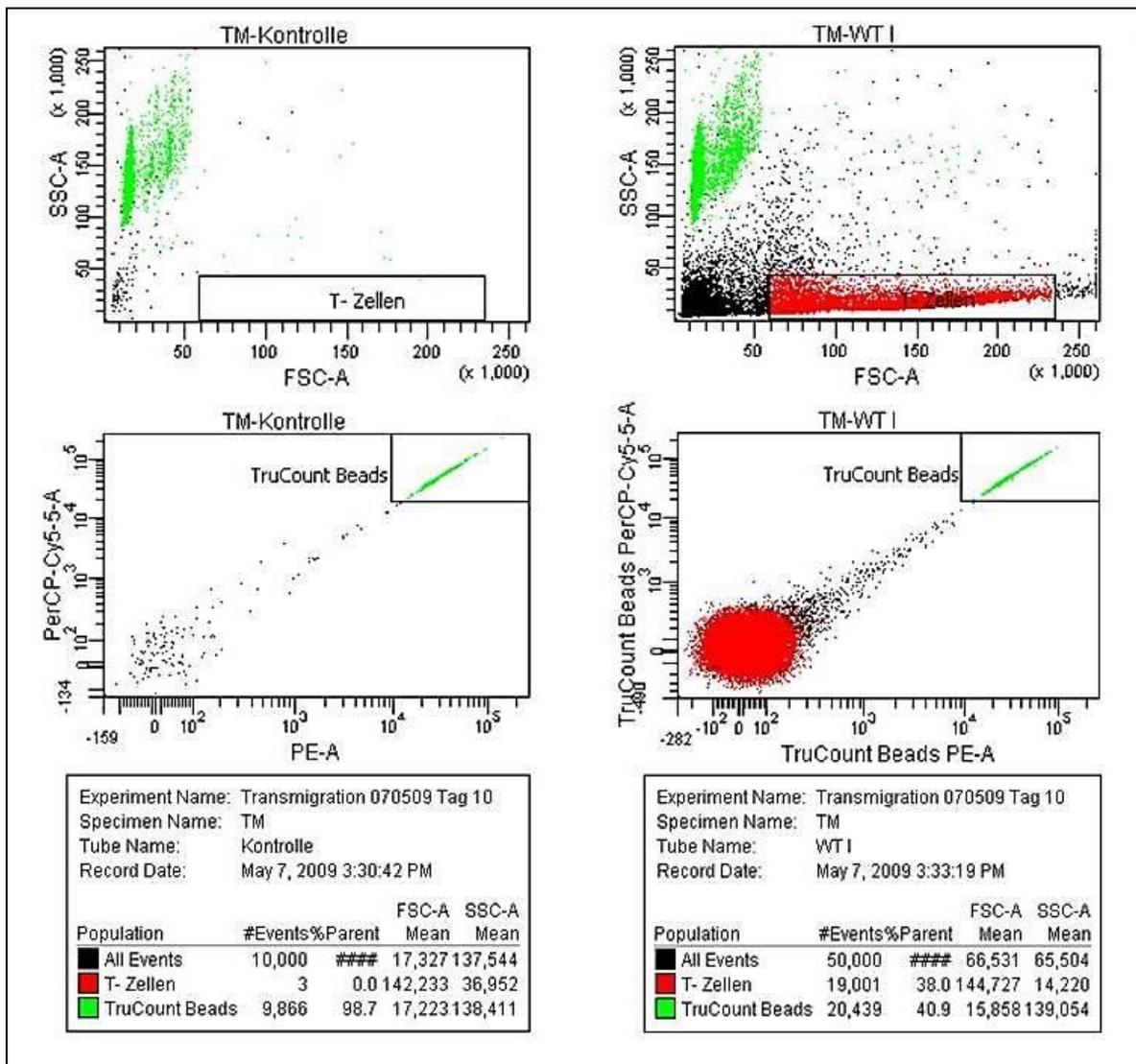


Abbildung 18: Messung der Transmigrationsassays mit Hilfe von TruCount™ Tubes am Durchflusszytometer

Durch Auswahl der T-Zellen sowie der TruCount™ Beads an der FACS Diva Software konnte mit Hilfe der in Abschnitt 3.9 genannten Formel die Anzahl migrierter Zellen berechnet werden.

Entsprechend Abbildung 19 zeigte sich weder in der nicht-immunisierten Kontrolle ($129,16 \% \pm 25,47 \%$), noch an Tag 10 p.i. ($101,01 \% \pm 18,43 \%$) ein signifikanter Unterschied im Migrationsverhalten *in vitro*. Am Erkrankungspeak konnte jedoch nachgewiesen werden, dass signifikant mehr Lymphozyten von CD14-defizienten Mäusen migrieren ($172,10 \% \pm 26,16 \%$).

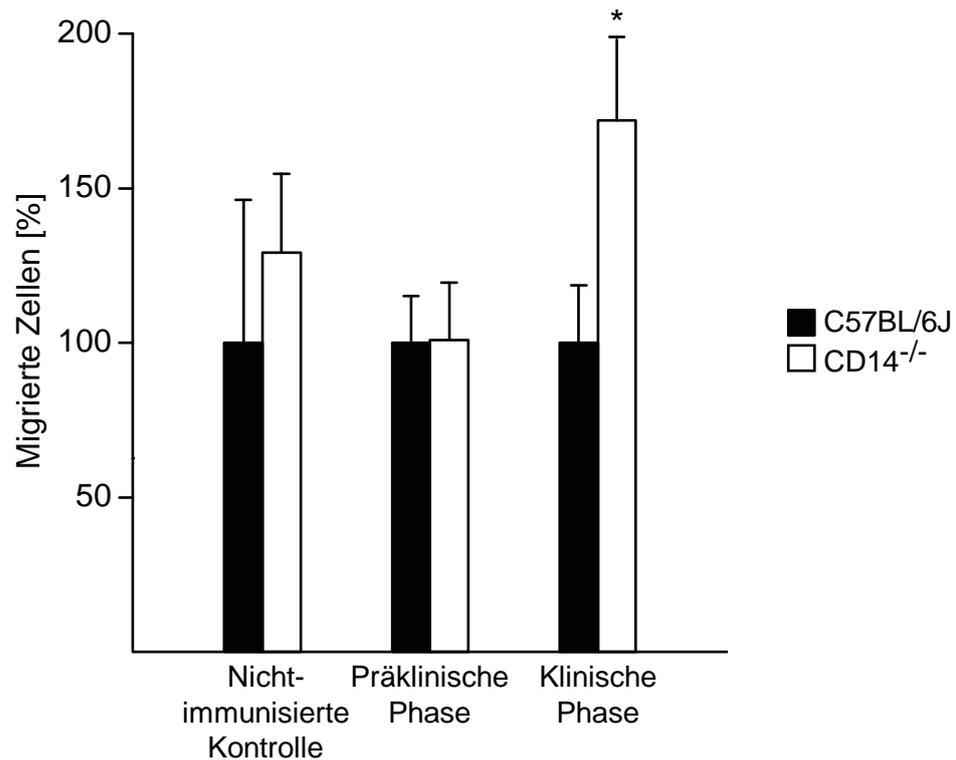


Abbildung 19: Transmigrationsversuche mit Lymphozyten von CD14-defizienten Mäusen und C57BL/6J Tieren

Dargestellt ist die prozentuale Anzahl migrierter Lymphozyten von CD14-defizienten Mäusen gegenüber C57BL/6J Tieren. Am Erkrankungspeak p.i. zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Migration von Zellen aus CD14-defizienten Mäusen gegenüber Wildtyptieren ($p = 0,017$; Kontrolle: C57BL/6J $n = 5$, CD14^{-/-} $n = 5$; Tag 10 p.i.: C57BL/6J $n = 7$, CD14^{-/-} $n = 7$; Erkrankungspeak p.i.: C57BL/6J $n = 13$, CD14^{-/-} $n = 15$).

Um auch bei den Transmigrationsassays den Einfluss von TNF- α auf das Migrationsverhalten zu untersuchen, wurde die Anzahl migrierter Lymphozyten von CD14-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyptieren auf einem stimulierten bEnd.3 Zellmonolayer untersucht.

Abbildung 20 zeigt, dass am Erkrankungspeak p.i. nach Stimulation mit TNF- α kein signifikanter Unterschied in der Anzahl migrierter Lymphozyten von CD14-defizienten Mäusen ($180,31 \% \pm 49,33 \%$) gegenüber der Wildtypkontrolle (als 100% definiert) nachzuweisen war.

Durch Giemsa-Färbung wurde die Filtermembran auf einen konfluenten bEnd.3 Zellmonolayer überprüft (Abbildung 21).

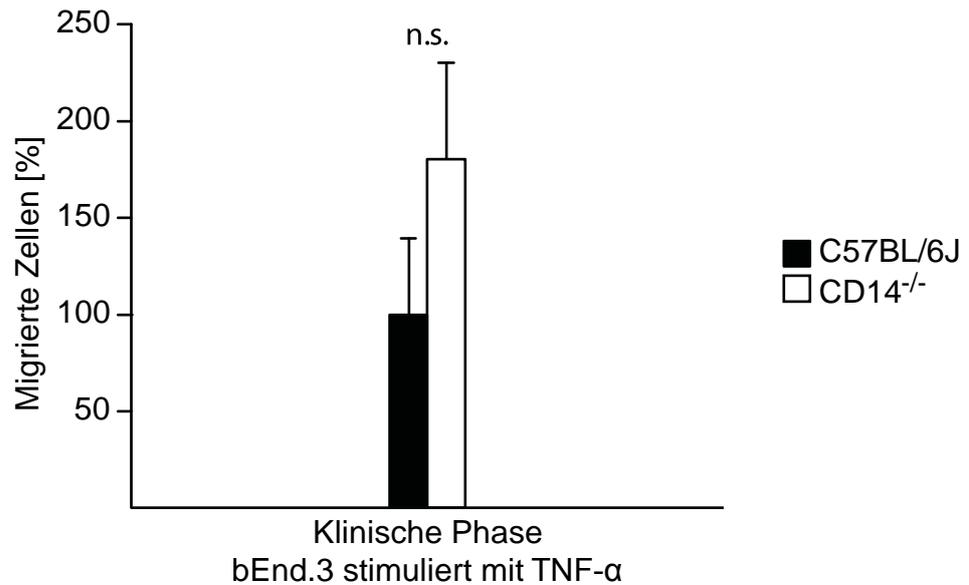


Abbildung 20: Migration von Lymphozyten aus CD14-defizienten Mäusen durch einen stimulierten bEnd.3 Zellmonolayer

Nach Stimulation des bEnd.3 Zellmonolayers mit 100 Units TNF- α /ml für 24 Stunden zeigte sich am Erkrankungspeak p.i. eine vermehrte Migration von Zellen aus CD14-defizienten Mäusen gegenüber der Wildtypkontrolle, jedoch nicht signifikant (n.s.; $p = 0,229$; Erkrankungspeak p.i.: C57BL/6J $n = 4$, CD14^{-/-} $n = 6$).

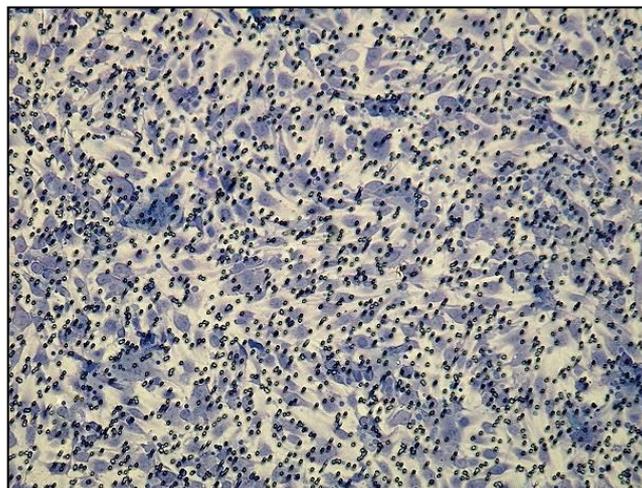


Abbildung 21: Mit Giemsa gefärbter bEnd.3 Zellmonolayer auf einer Filtermembran

Nach Durchführung eines Transmigrationsassays wurden die Filtermembranen mit Giemsa gefärbt und der darauf gewachsene bEnd.3 Zellmonolayer unter dem Lichtmikroskop auf Konfluenz überprüft.

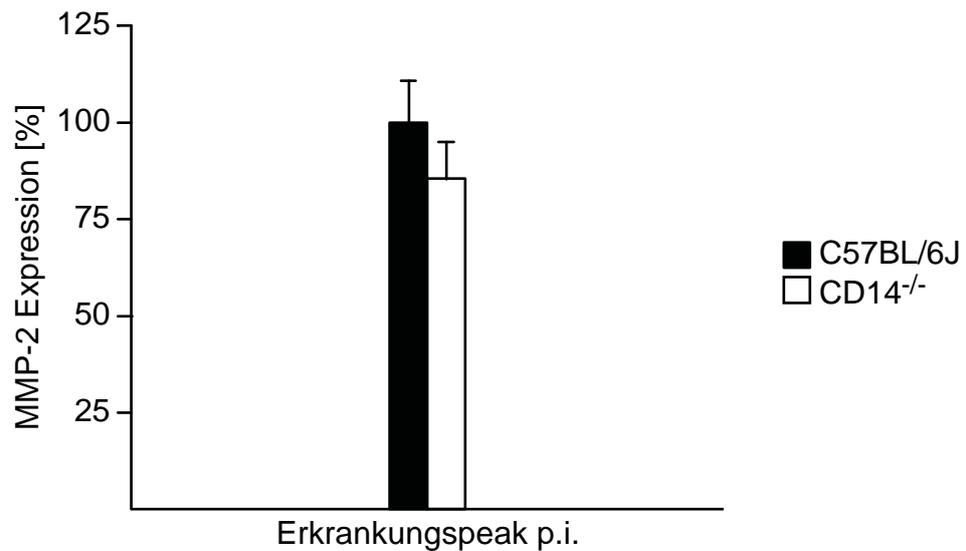
4.6 Expression von MMP-2 und MMP-9 am Erkrankungspeak p.i.

Um zu untersuchen, ob sich CD14-defiziente Mäuse in der Expression von MMP-2 und MMP-9, als wichtige Enzyme für die Migration über die parenchymale Basalmembran, am Erkrankungspeak gegenüber C57BL/6J Tieren unterscheiden wurden für beide Gruppen ELISA durchgeführt.

Hierfür wurde am Peak der Erkrankung post mortem Blut aus der Vena cava entnommen, das Serum weggefroren und erneut zur Durchführung von MMP-2 und MMP-9 ELISA aufgetaut. Die jeweilige Wildtypkontrolle wurde als 100 % definiert.

Wie in Abbildung 22 dargestellt, zeigte sich in der Expression von MMP-2 kein signifikanter Unterschied zwischen CD14-defizienten Tieren und Wildtypkontrollen am Erkrankungspeak p.i., wohingegen MMP-9 bei CD14-defizienten Tieren vermehrt exprimiert wird.

A)



B)

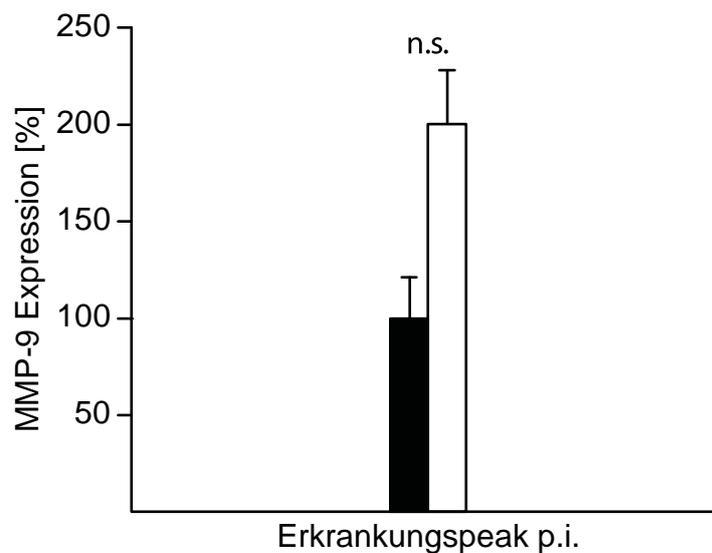


Abbildung 22: Vergleich der MMP-2 und MMP-9 Expression am Erkrankungspeak p.i.

Es wurde in Seren von CD14-defizienten Mäusen und C57BL/6J Tieren die MMP-2 und MMP-9 Expression am Erkrankungspeak p.i. mittels ELISA bestimmt. In der Expression von (A) MMP-2 zeigte sich zwischen beiden Gruppen kein Unterschied ($p = 0,160$), wohingegen (B) MMP-9 vermehrt bei CD14-defizienten Mäusen nachzuweisen war, jedoch nicht signifikant (n.s.; $p = 0,051$; MMP-2 und MMP-9: C57BL/6J $n = 7$, CD14^{-/-} $n = 7$).

5 Diskussion

Durch die Erkennung von mikrobiellen Komponenten sind die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems entscheidend für die körpereigene Abwehr gegen eindringende Mikroorganismen. Jedoch wurde auch eine erkrankungsfördernde Rolle des angeborenen Immunsystems bei der Entwicklung von autoimmunen Prozessen beschrieben (Waldner et al., 2004). Basierend auf der Erkenntnis, dass CD14-defiziente Mäuse eine ausgeprägtere klinische EAE entwickeln, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Funktion des Rezeptors CD14 bei der T-Zell-Aktivierung sowie Migration über die BHS untersucht.

Als mögliche Erklärung für die stärkere Ausbildung der EAE in CD14-defizienten Mäusen konnte in dieser Arbeit eine signifikante erhöhte Transmigrationskapazität von Lymphozyten aus CD14-defizienten EAE Tieren über ein *in vitro* BHS-Endothelmodell nachgewiesen werden (Halmer et al., 2015). Auffällig ist, dass sich dieses Ergebnis nur am Peak der Erkrankung zeigte, in der Kontrolle als auch an Tag 10 p.i. ergab sich kein signifikanter Unterschied. Dies bestätigt, dass bei Auftreten der Symptome eine vermehrte proinflammatorische Aktivität vorhanden ist und hierdurch Zellen erleichtert ins ZNS eindringen können, wo sie letztendlich entsprechende klinische Symptome auslösen (Lopes Pinheiro et al., 2016).

Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde berücksichtigt, dass die Anzahl der migrierten Zellen bei verschiedenen EAE deutlich variierte, jedoch konnte bei jeder EAE kontinuierlich eine erhöhte Migration beim CD14-Phänotyp im Vergleich zu dessen Wildtypkontrolle nachgewiesen werden.

Als Ursache der erhöhten Migration wurde mit durchflusszytometrischen Untersuchungen eine unterschiedliche Expression der für die Adhäsion und Migration relevanten Moleküle LFA-1 und $\alpha 4$ -Integrin auf Lymphozyten von CD14-defizienten Tieren und Wildtypmäusen ausgeschlossen. Interessanterweise zeigte LFA-1 unabhängig davon, ob den Tieren eine EAE induziert wurde, sowohl bei den Knockoutmäusen als auch den Wildtyptieren eine hohe Expression. Dies ist widersprüchlich zu früheren Veröffentlichungen, die einen Anstieg des

Adhäsionsmoleküls mit der Immunisierung und im Krankheitsverlauf nachweisen konnten (Selmaj et al., 1998).

Ebenfalls konnte kein Unterschied in der Expression von $\alpha 4$ -Integrin zwischen beiden Gruppen nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich, dass $\alpha 4$ -Integrin unabhängig vom genetischen Hintergrund in der präklinischen Phase nach Immunisierung angestiegen und erneut nach Entwicklung von Symptomen am Peak der Erkrankung abgefallen ist. Dies ist übereinstimmend mit bisherigen Feststellungen, dass für eine inflammatorische Reaktion im ZNS zunächst eine Adhärenz der Zellen an die BHS erfolgt (Baron et al., 1993). Der fehlende Nachweis eines Unterschiedes in der Expression der Adhäsionsmoleküle von CD14-defizienten Mäusen und Wildtyptieren lässt darauf schließen, dass weitere Faktoren, die zur Migration beitragen, eine Rolle spielen müssen.

Ähnliche Erkenntnisse, welche die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, lassen sich aus den Forschungsergebnissen von Echchannaoui et al. schließen, die einen Unterschied in der Adhäsionsmolekülexpression in einem Tiermodell der Pneumokokkenmeningitis ausgeschlossen haben, obwohl nach Induktion der Erkrankung vermehrt CD14-defiziente Mäuse starben und mehr Leukozyten bei CD14-defizienten Mäusen ins ZNS einwanderten (Echchannaoui et al., 2005).

Damit Zellen ins ZNS eindringen können, müssen sie zusätzlich nach Migration über die BHS die parenchymale Basalmembran überwinden. Insbesondere den MMP-2 und MMP-9, die von aktivierten T-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen freigesetzt werden, wird bei der EAE eine essenzielle Rolle zugeschrieben (Agrawal et al., 2006). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte daher die Messung von MMP-2 und MMP-9 im Serum von immunisierten CD14-defizienten und C57Bl/6J Mäusen am Peak der Erkrankung, an dem eine erhöhte Migrationskapazität der Zellen vorlag. In der vorliegenden Arbeit konnte eine vermehrte Freisetzung von MMP-9 bei CD14-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyptieren nachgewiesen werden, was als weitere Ursache für die verstärkte EAE-Symptomatik in CD14-defizienten Mäusen von Bedeutung sein kann. Limitierend für diese Beobachtung im Rahmen dieser Arbeit ist jedoch, dass nicht alleine der MMP-Spiegel im Serum bei der Migration von Zellen ins ZNS, sondern vor allem die lokale Freisetzung von MMP im perivaskulären Raum an der parenchymalen Basalmembran relevant ist. Ihre Freisetzung ist wiederum vom

Zytokinprofil der einwandernden Leukozyten abhängig, die letztendlich die Chemokinsekretion der Astrozyten und somit auch die Aktivität der MMP regulieren (Song et al., 2015). Zur definitiven Beurteilung der Rolle von MMP in der EAE bei CD14-defizienten Tieren kann eine in situ Untersuchung der MMP-Aktivität im ZNS beispielsweise mit Zymographie weitere Klarheit bringen (Song et al., 2015).

Allerdings zeigten frühere klinische Studien an Patienten mit schubförmig verlaufender MS auch im humanen System erhöhte MMP-9 Serumspiegel bei Kranken im Vergleich zu Gesunden (Lichtinghagen et al., 1999).

Mit durchflusszytometrischen Untersuchungen des TCR wurde zudem die initiale Antigen-spezifische Immunantwort bei CD14-defizienten Mäusen gegenüber der Wildtypkontrolle betrachtet. Autoimmune Zellen werden in der Peripherie aktiviert und nach Eindringen ins ZNS reaktiviert. Hierbei war vor allem die Untersuchung des kostimulatorischen Signalweges B7-1/2-CD28/CTLA-4 als Regulator mit pro- und antiinflammatorischer Reaktion bei beiden Gruppen unerlässlich.

Die Expression von CD28 als stimulierender Faktor zur T-Zell-Aktivierung war an Tag 10 und am Peak der Erkrankung im Vergleich zur Wildtypkontrolle unverändert, sodass eine verstärkte initiale Aktivierung bei CD14-defizienten Mäusen als Grund ausgeschlossen wurde. Unabhängig davon sahen wir jedoch interessanterweise bei Wildtypmäusen und CD14-defizienten Tieren ein Abfall der CD28 Expression auf CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen am Peak der Erkrankung gegenüber der präklinischen Phase. Ursächlich hierfür kann ein vermehrtes Einwandern dieser Zellen ins ZNS mit folglich verminderter Anzahl in den peripheren Lymphknoten diskutiert werden. Unterstützt wird diese Annahme durch frühere Veröffentlichungen, die einen Anstieg von CD28 im ZNS am Erkrankungspeak nachweisen konnten (Issazadeh et al., 1998).

CTLA-4 hingegen wirkt auf die T-Zell-Aktivierung inhibitorisch und korreliert nach aktueller Studienlage mit der Krankheitsschwere einer EAE (Issazadeh et al., 1998). Es wurde daher untersucht, ob CD14-Knockoutmäuse eine verstärkte klinische Symptomatik aufgrund eines Mangels an CTLA-4 haben. In der Tat ergab sich am Erkrankungspeak eine verminderte Expression von CTLA-4 bei CD14-defizienten Tieren im Vergleich zur Wildtypkontrolle, die jedoch keine Signifikanz erreichte.

CD14 als Rezeptor, der über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker mit der Zellmembran verbunden ist und keine transmembrane sowie intrazelluläre Domäne besitzt, kann Signale nicht eigenständig weiterleiten, sondern benötigt zur Auslösung einer Signalkaskade einen Korezeptor (Pugin et al., 1994). Insbesondere dem Korezeptor TLR4 wird hierbei eine entscheidende Rolle zugeschrieben (Jiang et al., 2000).

Dessen Aktivierung bewirkt über den Transkriptionsfaktor NF- κ B eine proinflammatorische Zellantwort mit u.a. Produktion und Ausschüttung von TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8. Diese Zytokine tragen entscheidend zur Differenzierung naiver T-Zellen bei und bewirken vor allem eine Differenzierung zu T_H1- oder T_H17-Zellen.

In den letzten Jahren wurde insbesondere den T_H17-Zellen bei der Pathogenese der EAE und MS eine krankheitsinduzierende und verstärkende Funktion zugeschrieben (Langrish et al., 2005).

Für ihre endgültige Reifung zu aktivierten, autoaggressiven Zellen benötigen sie das von APC produzierte Zytokin IL-23. IL-23 bindet hierfür an einen Rezeptorkomplex und bewirkt über Aktivierung der Januskinase-2 sowie weiterer Phosphorylierung und Dimerisierung des Transkriptionsfaktors STAT3 die Transkription der für T_H17-Zellen typischen proinflammatorischen Zytokine wie IL-17, IL-22 und GM-CSF (Parham et al., 2002). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass eine Defizienz des CD14-Korezeptors TLR4 zu einer verstärkten Produktion von IL-23 führt. Entsprechend konnte in TLR4-defizienten EAE Mäusen eine verstärkte Entwicklung und Reifung von T_H17-Zellen nachgewiesen werden, was mit einer Zunahme der EAE Entwicklung einhergeht (Marta et al., 2008). Als Ursache kann durch fehlende Funktion des TLR4/CD14-Rezeptor-Komplexes eine vermehrte Induktion der EAE über TLR2 in Betracht gezogen werden. Diesbezüglich konnten Reynolds et al. entsprechend nachweisen, dass die MOG-induzierte T-Zell-Aktivierung über TLR2 zu einer vermehrten Bildung von IL-23 und somit autoreaktiven T_H17-Zellen führt (Reynolds et al., 2010).

Ebenso konnte in diesem Zusammenhang kürzlich gezeigt werden, dass in der EAE T_H17-Zellen auch alternative Adhäsionsmoleküle für ihre Migration über die BHS nutzen können. So konnten trotz Blockade von CD49d autoreaktive T_H17-Zellen mit Hilfe des Adhäsionsmoleküls MCAM ins ZNS infiltrieren (Schneider-Hohendorf et al., 2014). T_H17-Zellen schwächen zudem die Integrität der BHS ab, da insbesondere ihr

Zytokin IL-17 eine vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies bedingt. Reaktive Sauerstoffspezies bewirken die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen und führen durch Aktivierung des Zytoskeletts mit Kontraktion der Aktinfilamente sowie Zerstörung bzw. Minderung der Tight Junctions Moleküle ZO-1 und Occludin zu einer erhöhten Permeabilität der BHS (Huppert et al., 2010).

Über diese beschriebenen Mechanismen, schematisch in Abbildung 23 dargestellt, könnte die in dieser Arbeit gesehene verstärkte Migration bei gleichzeitiger unveränderter Expression der klassischen Adhäsionsmoleküle erklärbar sein. Weitere Funktionsuntersuchungen der TLR4 und TLR2 bei CD14-Defizienz im Rahmen der EAE sind hierzu notwendig.

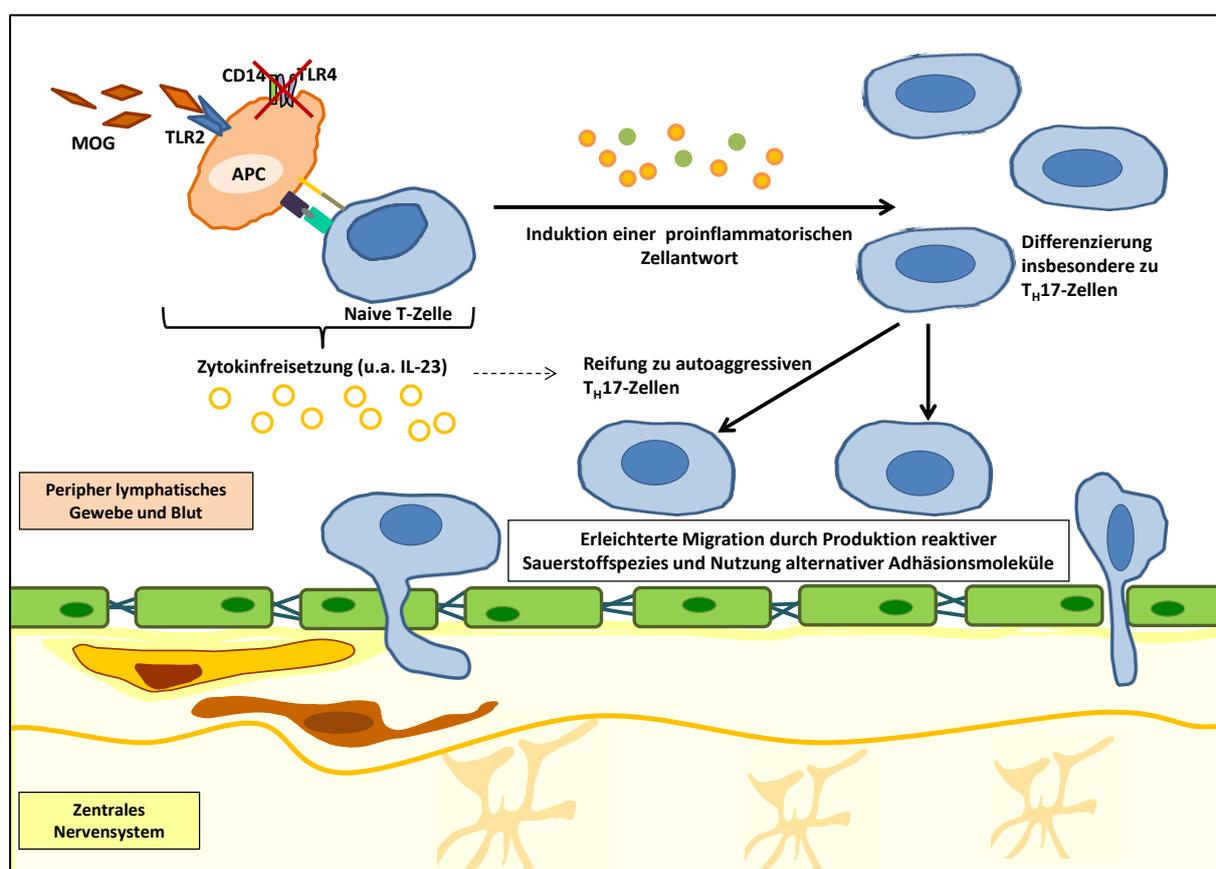


Abbildung 23: Hypothetische Mechanismen der Zellmigration bei CD14-defizienten Mäusen im Rahmen einer EAE

Als Ursache für eine vermehrte Migration von Zellen über die BHS bei CD14-defizienten Tieren mit möglicherweise Funktionsdefekt in dem Rezeptorpaar CD14/TLR4 kann die alternative Aktivierung von TLR2 diskutiert werden. TLR2 bewirkt im Rahmen der proinflammatorischen Zellantwort vor allem eine Differenzierung zu T_H17 -Zellen, die wiederum durch eine vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und Nutzung alternativer Adhäsionsmoleküle ins ZNS eindringen können.

Ungeklärt bleibt, in wie weit die pathophysiologischen Erkenntnisse am Tiermodell auf die MS übertragen werden können. Momentan liegen keine klinischen Ergebnisse vor, die auf eine entscheidende immunmodulatorische Rolle des angeborenen Immunrezeptors CD14 in der Krankheitsentstehung der MS schließen. Humane Studien am CD14-Rezeptor bei MS Patienten sind zudem erschwert, da eine Defizienz zu einer Verschlechterung der Beschwerden im Tiermodell führt. Es bliebe zu prüfen ob eine therapeutische Hochregulation von CD14 praktische Wirkung bei der EAE und MS haben könnte.

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. Acheson ED (1977) Epidemiology of multiple sclerosis. *Br Med Bull* 33:9-14
3. Agrawal S, Anderson P, Durbeej M, van Rooijen N, Ivars F, Opdenakker G, Sorokin LM (2006) Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 203:1007-1019
4. Agrawal SM, Lau L, Yong VW (2008) MMPs in the central nervous system: where the good guys go bad. *Semin Cell Dev Biol* 19:42-51
5. Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB (2001) T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* 1:220-228
6. Aloisi F (2001) Immune function of microglia. *Glia* 36:165-179
7. Alotaibi S, Kennedy J, Tellier R, Stephens D, Banwell B (2004) Epstein-Barr virus in pediatric multiple sclerosis. *JAMA* 291:1875-1879
8. Alt C, Laschinger M, Engelhardt B (2002) Functional expression of the lymphoid chemokines CCL19 (ELC) and CCL 21 (SLC) at the blood-brain barrier suggests their involvement in G-protein-dependent lymphocyte recruitment into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 32:2133-2144
9. Ascherio A, Munger KL (2007a) Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol* 61:288-299
10. Ascherio A, Munger KL (2007b) Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann Neurol* 61:504-513
11. Backhaus I, Mannocci A, Lemmens PH, La Torre G (2016) Smoking as a risk factor for developing Multiple Sclerosis: A meta-analysis of observational studies. *Clin Ter* 167:82-92
12. Balabanov R, Dore-Duffy P (1998) Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier. *J Neurosci Res* 53:637-644
13. Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, Hancock WW (1999) CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6873-6878
14. Barber EK, Dasgupta JD, Schlossman SF, Trevillyan JM, Rudd CE (1989) The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56lck) that phosphorylates the CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:3277-3281
15. Baron JL, Madri JA, Ruddle NH, Hashim G, Janeway CA, Jr. (1993) Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *J Exp Med* 177:57-68

16. Battistini L, Piccio L, Rossi B, Bach S, Galgani S, Gasperini C, Ottoboni L, Ciabini D, Caramia MD, Bernardi G, Laudanna C, Scarpini E, McEver RP, Butcher EC, Borsellino G, Constantin G (2003) CD8⁺ T cells from patients with acute multiple sclerosis display selective increase of adhesiveness in brain venules: a critical role for P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* 101:4775-4782
17. Bentley GA, Mariuzza RA (1996) The structure of the T cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 14:563-590
18. Berger T, Weerth S, Kojima K, Linington C, Wekerle H, Lassmann H (1997) Experimental autoimmune encephalomyelitis: the antigen specificity of T lymphocytes determines the topography of lesions in the central and peripheral nervous system. *Lab Invest* 76:355-364
19. Bretscher P, Cohn M (1970) A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* 169:1042-1049
20. Brettschneider J, Ecker D, Bitsch A, Bahner D, Bogumil T, Dressel A, Elitok E, Kitze B, Poser S, Weber F, Tumani H (2002) The macrophage activity marker sCD14 is increased in patients with multiple sclerosis and upregulated by interferon beta-1b. *J Neuroimmunol* 133:193-197
21. Bruneau JM, Yea CM, Spinella-Jaegle S, Fudali C, Woodward K, Robson PA, Sautes C, Westwood R, Kuo EA, Williamson RA, Ruuth E (1998) Purification of human dihydro-orotate dehydrogenase and its inhibition by A77 1726, the active metabolite of leflunomide. *Biochem J* 336 (Pt 2):299-303
22. Butcher EC (1991) Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67:1033-1036
23. Carswell R (1838) *Pathological anatomy. Illustrations of the elementary forms of disease* (London,, Longman, Orme, Brown, Green and Longman).
24. Charcot J-M, Bourneville DM (1869) *Histologie de la sclérose en plaques, leçon faite à l'hospice de la Salpêtrière par M. Charcot et recueillie par M. Bourneville* (Paris, impr. de L. Poupert-Davyl).
25. Chigaev A, Zwartz G, Graves SW, Dwyer DC, Tsuji H, Foutz TD, Edwards BS, Prossnitz ER, Larson RS, Sklar LA (2003) Alpha4beta1 integrin affinity changes govern cell adhesion. *J Biol Chem* 278:38174-38182
26. Coisne C, Mao W, Engelhardt B (2009) Cutting edge: Natalizumab blocks adhesion but not initial contact of human T cells to the blood-brain barrier in vivo in an animal model of multiple sclerosis. *J Immunol* 182:5909-5913
27. Coles A (2009) Multiple sclerosis. *Pract Neurol* 9:118-126
28. Coles AJ, Cox A, Le Page E, Jones J, Trip SA, Deans J, Seaman S, Miller DH, Hale G, Waldmann H, Compston DA (2006) The window of therapeutic opportunity in multiple sclerosis: evidence from monoclonal antibody therapy. *J Neurol* 253:98-108
29. Cruveilhier J (1829) *Anatomie pathologique du corps humain... par J. Cruveilhier* (Paris, J.-B. Baillière).
30. Del Maschio A, De Luigi A, Martin-Padura I, Brockhaus M, Bartfai T, Fruscella P, Adorini L, Martino G, Furlan R, De Simoni MG, Dejana E (1999) Leukocyte recruitment in the cerebrospinal fluid of mice with experimental meningitis is inhibited by an antibody to junctional adhesion molecule (JAM). *J Exp Med* 190:1351-1356

31. Devitt A, Moffatt OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD (1998) Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392:505-509
32. Dyment DA, Sadovnick AD, Ebers GC (1997) Genetics of multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 6:1693-1698
33. Echchannaoui H, Frei K, Letiembre M, Strieter RM, Adachi Y, Landmann R (2005) CD14 deficiency leads to increased MIP-2 production, CXCR2 expression, neutrophil transmigration, and early death in pneumococcal infection. *J Leukoc Biol* 78:705-715
34. Ehrlich P (1885) *Das Sauerstoff-Bedurfnis des Organismus: eine farbenanalytische Studie*. Hirschwald
35. Engelhardt B, Vestweber D, Hallmann R, Schulz M (1997) E- and P-selectin are not involved in the recruitment of inflammatory cells across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Blood* 90:4459-4472
36. Engelhardt B, Wolburg H (2004) Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol* 34:2955-2963
37. Engelhardt B, Ransohoff RM (2012) Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol* 33:579-589
38. Etienne S, Adamson P, Greenwood J, Strosberg AD, Cazaubon S, Couraud PO (1998) ICAM-1 signaling pathways associated with Rho activation in microvascular brain endothelial cells. *J Immunol* 161:5755-5761
39. Fabriek BO, Van Haastert ES, Galea I, Polfliet MM, Dopp ED, Van Den Heuvel MM, Van Den Berg TK, De Groot CJ, Van Der Valk P, Dijkstra CD (2005) CD163-positive perivascular macrophages in the human CNS express molecules for antigen recognition and presentation. *Glia* 51:297-305
40. Farina C, Weber MS, Meinl E, Wekerle H, Hohlfeld R (2005) Glatiramer acetate in multiple sclerosis: update on potential mechanisms of action. *Lancet Neurol* 4:567-575
41. Flachenecker P, Stuke K (2008) National MS registries. *J Neurol* 255 Suppl 6:102-108
42. Gerhardt H, Wolburg H, Redies C (2000) N-cadherin mediates pericytic-endothelial interaction during brain angiogenesis in the chicken. *Dev Dyn* 218:472-479
43. Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Gray G, Nadler LM (1993) Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6586-6590
44. Gluck T, Silver J, Epstein M, Cao P, Farber B, Goyert SM (2001) Parameters influencing membrane CD14 expression and soluble CD14 levels in sepsis. *Eur J Med Res* 6:351-358
45. Gold R, Lington C, Lassmann H (2006) Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129:1953-1971
46. Gold R, Giovannoni G, Selmaj K, Havrdova E, Montalban X, Radue EW, Stefoski D, Robinson R, Riester K, Rana J, Elkins J, O'Neill G, investigators Ss (2013) Daclizumab high-yield process in relapsing-remitting multiple sclerosis

- (SELECT): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 381:2167-2175
47. Graesser D, Solowiej A, Bruckner M, Osterweil E, Juedes A, Davis S, Ruddle NH, Engelhardt B, Madri JA (2002) Altered vascular permeability and early onset of experimental autoimmune encephalomyelitis in PECAM-1-deficient mice. *J Clin Invest* 109:383-392
 48. Greter M, Heppner FL, Lemos MP, Odermatt BM, Goebels N, Laufer T, Noelle RJ, Becher B (2005) Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat Med* 11:328-334
 49. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S (2002) Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20:621-667
 50. Haas J, Fritzsching B, Trubswetter P, Korporal M, Milkova L, Fritz B, Vobis D, Krammer PH, Suri-Payer E, Wildemann B (2007) Prevalence of newly generated naive regulatory T cells (Treg) is critical for Treg suppressive function and determines Treg dysfunction in multiple sclerosis. *J Immunol* 179:1322-1330
 51. Halmer R, Davies L, Liu Y, Fassbender K, Walter S (2015) The Innate Immune Receptor CD14 Mediates Lymphocyte Migration in EAE. *Cell Physiol Biochem* 37:269-275
 52. Hartung HP, Gonsette R, Konig N, Kwiecinski H, Guseo A, Morrissey SP, Krapf H, Zwingers T, Mitoxantrone in Multiple Sclerosis Study G (2002) Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet* 360:2018-2025
 53. Hawkins BT, Davis TP (2005) The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 57:173-185
 54. Hein T, Hopfenmuller W (2000) [Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany]. *Nervenarzt* 71:288-294
 55. Hellwig K, Chen LH, Stanczyk FZ, Langer-Gould AM (2016) Oral Contraceptives and Multiple Sclerosis/Clinically Isolated Syndrome Susceptibility. *PLoS One* 11:e0149094
 56. Hickey MJ (2015) CD99: An endothelial passport for leukocytes. *J Exp Med* 212:977
 57. Hickey WF, Hsu BL, Kimura H (1991) T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* 28:254-260
 58. Hillert J, Olerup O (1993) Multiple sclerosis is associated with genes within or close to the HLA-DR-DQ subregion on a normal DR15,DQ6,Dw2 haplotype. *Neurology* 43:163-168
 59. Holick MF (2007) Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 357:266-281
 60. Huppert J, Closhen D, Croxford A, White R, Kulig P, Pietrowski E, Bechmann I, Becher B, Luhmann HJ, Waisman A, Kuhlmann CR (2010) Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J* 24:1023-1034
 61. Irving BA, Chan AC, Weiss A (1993) Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor zeta chain. *J Exp Med* 177:1093-1103

62. Issazadeh S, Navikas V, Schaub M, Sayegh M, Khoury S (1998) Kinetics of expression of costimulatory molecules and their ligands in murine relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in vivo. *J Immunol* 161:1104-1112
63. Iwakura Y, Ishigame H (2006) The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 116:1218-1222
64. Janzer RC, Raff MC (1987) Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325:253-257
65. Jenkins MK, Taylor PS, Norton SD, Urdahl KB (1991) CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J Immunol* 147:2461-2466
66. Jiang Q, Akashi S, Miyake K, Petty HR (2000) Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J Immunol* 165:3541-3544
67. Kabat EA, Wolf A, Bezer AE (1947) The Rapid Production of Acute Disseminated Encephalomyelitis in Rhesus Monkeys by Injection of Heterologous and Homologous Brain Tissue with Adjuvants. *J Exp Med* 85:117-130
68. Kappos L, Radue EW, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, Selmaj K, Agoropoulou C, Leyk M, Zhang-Auberson L, Burtin P, Group FS (2010) A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 362:387-401
69. Kappos L, Wiendl H, Selmaj K, Arnold DL, Havrdova E, Boyko A, Kaufman M, Rose J, Greenberg S, Sweetser M, Riester K, O'Neill G, Elkins J (2015) Daclizumab HYP versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 373:1418-1428
70. Karandikar NJ, Vanderlugt CL, Walunas TL, Miller SD, Bluestone JA (1996) CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease. *J Exp Med* 184:783-788
71. 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
72. Kerfoot SM, Norman MU, Lapointe BM, Bonder CS, Zbytnuik L, Kubes P (2006) Reevaluation of P-selectin and alpha 4 integrin as targets for the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 176:6225-6234
73. Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY (2007) Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 8:191-197
74. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y (2006) IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 177:566-573
75. Kotter MR, Li WW, Zhao C, Franklin RJ (2006) Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation. *J Neurosci* 26:328-332
76. Krummel MF, Allison JP (1996) CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med* 183:2533-2540

77. La Mantia L, Milanese C, Mascoli N, D'Amico R, Weinstock-Guttman B (2007) Cyclophosphamide for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev*:CD002819
78. Laatsch RH, Kies MW, Gordon S, Alvord EC, Jr. (1962) The encephalomyelitic activity of myelin isolated by ultracentrifugation. *J Exp Med* 115:777-788
79. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201:233-240
80. Larsen PH, Yong VW (2004) The expression of matrix metalloproteinase-12 by oligodendrocytes regulates their maturation and morphological differentiation. *J Neurosci* 24:7597-7603
81. Larsen PH, DaSilva AG, Conant K, Yong VW (2006) Myelin formation during development of the CNS is delayed in matrix metalloproteinase-9 and -12 null mice. *J Neurosci* 26:2207-2214
82. Laschinger M, Engelhardt B (2000) Interaction of alpha4-integrin with VCAM-1 is involved in adhesion of encephalitogenic T cell blasts to brain endothelium but not in their transendothelial migration in vitro. *J Neuroimmunol* 102:32-43
83. Laschinger M, Vajkoczy P, Engelhardt B (2002) Encephalitogenic T cells use LFA-1 for transendothelial migration but not during capture and initial adhesion strengthening in healthy spinal cord microvessels in vivo. *Eur J Immunol* 32:3598-3606
84. Lee YK, Turner H, Maynard CL, Oliver JR, Chen D, Elson CO, Weaver CT (2009) Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* 30:92-107
85. Lichtinghagen R, Seifert T, Kracke A, Marckmann S, Wurster U, Heidenreich F (1999) Expression of matrix metalloproteinase-9 and its inhibitors in mononuclear blood cells of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 99:19-26
86. Lincoln JA, Cook SD (2009) An overview of gene-epigenetic-environmental contributions to MS causation. *J Neurol Sci* 286:54-57
87. Linington C, Bradl M, Lassmann H, Brunner C, Vass K (1988) Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am J Pathol* 130:443-454
88. Linsley PS, Greene JL, Tan P, Bradshaw J, Ledbetter JA, Anasetti C, Damle NK (1992) Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med* 176:1595-1604
89. Lopes Pinheiro MA, Kooij G, Mizee MR, Kamermans A, Enzmann G, Lyck R, Schwaninger M, Engelhardt B, de Vries HE (2016) Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke. *Biochim Biophys Acta* 1862:461-471
90. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS (2008) LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42:145-151
91. Lublin FD, Reingold SC (1996) Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46:907-911

92. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47:707-717
93. Lundmark F, Duvefelt K, Jacobaeus E, Kockum I, Wallstrom E, Khademi M, Oturai A, Ryder LP, Saarela J, Harbo HF, Celius EG, Salter H, Olsson T, Hillert J (2007) Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis. *Nat Genet* 39:1108-1113
94. Madden DR (1995) The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol* 13:587-622
95. 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
96. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG (2004) Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427:355-360
97. 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
98. Milligan NM, Newcombe R, Compston DA (1987) A double-blind controlled trial of high dose methylprednisolone in patients with multiple sclerosis: 1. Clinical effects. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 50:511-516
99. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314-1318
100. Nockher WA, Bergmann L, Scherberich JE (1994) Increased soluble CD14 serum levels and altered CD14 expression of peripheral blood monocytes in HIV-infected patients. *Clin Exp Immunol* 98:369-374
101. Nockher WA, Scherberich JE (1997) Expression and release of the monocyte lipopolysaccharide receptor antigen CD14 are suppressed by glucocorticoids in vivo and in vitro. *J Immunol* 158:1345-1352
102. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000) Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343:938-952
103. Olsson T, Zhi WW, Hojeberg B, Kostulas V, Jiang YP, Anderson G, Ekre HP, Link H (1990) Autoreactive T lymphocytes in multiple sclerosis determined by antigen-induced secretion of interferon-gamma. *J Clin Invest* 86:981-985
104. Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega F, To W, Wagner J, O'Farrell AM, McClanahan T, Zurawski S, Hannum C, Gorman D, Rennick DM, Kastelein RA, de Waal Malefyt R, Moore KW (2002) A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol* 168:5699-5708
105. Piccio L, Rossi B, Scarpini E, Laudanna C, Giagulli C, Issekutz AC, Vestweber D, Butcher EC, Constantin G (2002) Molecular mechanisms involved in lymphocyte recruitment in inflamed brain microvessels: critical roles for P-

- selectin glycoprotein ligand-1 and heterotrimeric G(i)-linked receptors. *J Immunol* 168:1940-1949
106. Piddlesden SJ, Lassmann H, Zimprich F, Morgan BP, Lington C (1993) The demyelinating potential of antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein is related to their ability to fix complement. *Am J Pathol* 143:555-564
 107. 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
 108. Pugin J, Heumann ID, Tomasz A, Kravchenko VV, Akamatsu Y, Nishijima M, Glauser MP, Tobias PS, Ulevitch RJ (1994) CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity* 1:509-516
 109. Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, Koch AE, Moser B, Mackay CR (1998) The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 101:746-754
 110. Razzaq TM, Ozegbe P, Jury EC, Sembi P, Blackwell NM, Kabouridis PS (2004) Regulation of T-cell receptor signalling by membrane microdomains. *Immunology* 113:413-426
 111. Reese TS, Karnovsky MJ (1967) Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 34:207-217
 112. Reynolds JM, Pappu BP, Peng J, Martinez GJ, Zhang Y, Chung Y, Ma L, Yang XO, Nurieva RI, Tian Q, Dong C (2010) Toll-like receptor 2 signaling in CD4(+) T lymphocytes promotes T helper 17 responses and regulates the pathogenesis of autoimmune disease. *Immunity* 32:692-702
 113. Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP (1933) Observations on Attempts to Produce Acute Disseminated Encephalomyelitis in Monkeys. *J Exp Med* 58:39-53
 114. Ruprecht K, Klinker E, Dintelmann T, Rieckmann P, Gold R (2004) Plasma exchange for severe optic neuritis: treatment of 10 patients. *Neurology* 63:1081-1083
 115. Scannevin RH, Chollate S, Jung MY, Shackett M, Patel H, Bista P, Zeng W, Ryan S, Yamamoto M, Lukashev M, Rhodes KJ (2012) Fumarates promote cytoprotection of central nervous system cells against oxidative stress via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 341:274-284
 116. Scherberich JE, Nockher WA (2000) Blood monocyte phenotypes and soluble endotoxin receptor CD14 in systemic inflammatory diseases and patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 15:574-578
 117. Schneider-Hohendorf T, Rossaint J, Mohan H, Boning D, Breuer J, Kuhlmann T, Gross CC, Flanagan K, Sorokin L, Vestweber D, Zarbock A, Schwab N, Wiendl H (2014) VLA-4 blockade promotes differential routes into human CNS involving PSGL-1 rolling of T cells and MCAM-adhesion of TH17 cells. *J Exp Med* 211:1833-1846
 118. Selmaj K, Walczak A, Mycko M, Berkowicz T, Kohno T, Raine CS (1998) Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis with a TNF binding

- protein (TNFbp) correlates with down-regulation of VCAM-1/VLA-4. *Eur J Immunol* 28:2035-2044
119. Shive CL, Hofstetter H, Arredondo L, Shaw C, Forsthuber TG (2000) The enhanced antigen-specific production of cytokines induced by pertussis toxin is due to clonal expansion of T cells and not to altered effector functions of long-term memory cells. *Eur J Immunol* 30:2422-2431
120. Sikorski EE, Hallmann R, Berg EL, Butcher EC (1993) The Peyer's patch high endothelial receptor for lymphocytes, the mucosal vascular addressin, is induced on a murine endothelial cell line by tumor necrosis factor-alpha and IL-1. *J Immunol* 151:5239-5250
121. Song J, Wu C, Korpos E, Zhang X, Agrawal SM, Wang Y, Faber C, Schafers M, Korner H, Opdenakker G, Hallmann R, Sorokin L (2015) Focal MMP-2 and MMP-9 activity at the blood-brain barrier promotes chemokine-induced leukocyte migration. *Cell Rep* 10:1040-1054
122. Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, Imai T, Yoshie O, Bonecchi R, Mantovani A (1998) Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 161:1083-1086
123. Sriram S, Mitchell W, Stratton C (1998) Multiple sclerosis associated with *Chlamydia pneumoniae* infection of the CNS. *Neurology* 50:571-572
124. Steiner O, Coisne C, Cecchelli R, Boscacci R, Deutsch U, Engelhardt B, Lyck R (2010) Differential roles for endothelial ICAM-1, ICAM-2, and VCAM-1 in shear-resistant T cell arrest, polarization, and directed crawling on blood-brain barrier endothelium. *J Immunol* 185:4846-4855
125. Storch MK, Stefferl A, Brehm U, Weissert R, Wallstrom E, Kerschensteiner M, Olsson T, Linington C, Lassmann H (1998) Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol* 8:681-694
126. Stuart G, Krikorian KS (1928) The neuro-paralytic accidents of anti-rabies treatment. *Ann Trop Med* 22:327-377
127. Thompson PW, Randi AM, Ridley AJ (2002) Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, but not ICAM-2, activates RhoA and stimulates c-fos and rhoA transcription in endothelial cells. *J Immunol* 169:1007-1013
128. 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
129. Tsunoda I, Kuang LQ, Theil DJ, Fujinami RS (2000) Antibody association with a novel model for primary progressive multiple sclerosis: induction of relapsing-remitting and progressive forms of EAE in H2s mouse strains. *Brain Pathol* 10:402-418
130. Turka LA, Ledbetter JA, Lee K, June CH, Thompson CB (1990) CD28 is an inducible T cell surface antigen that transduces a proliferative signal in CD3+ mature thymocytes. *J Immunol* 144:1646-1653
131. Vajkoczy P, Laschinger M, Engelhardt B (2001) Alpha4-integrin-VCAM-1 binding mediates G protein-independent capture of encephalitogenic T cell blasts to CNS white matter microvessels. *J Clin Invest* 108:557-565
132. van der Laan LJ, Ruuls SR, Weber KS, Lodder IJ, Dopp EA, Dijkstra CD (1996) Macrophage phagocytosis of myelin in vitro determined by flow cytometry:

- phagocytosis is mediated by CR3 and induces production of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide. *J Neuroimmunol* 70:145-152
133. van der Mei IA, Ponsonby AL, Dwyer T, Blizzard L, Simmons R, Taylor BV, Butzkueven H, Kilpatrick T (2003) Past exposure to sun, skin phenotype, and risk of multiple sclerosis: case-control study. *BMJ* 327:316
 134. Van Parijs L, Ibraghimov A, Abbas AK (1996) The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. *Immunity* 4:321-328
 135. Viola A, Schroeder S, Sakakibara Y, Lanzavecchia A (1999) T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* 283:680-682
 136. von Andrian UH, Engelhardt B (2003) Alpha4 integrins as therapeutic targets in autoimmune disease. *N Engl J Med* 348:68-72
 137. von Boehmer H (2005) Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 6:338-344
 138. Waldner H, Collins M, Kuchroo VK (2004) Activation of antigen-presenting cells by microbial products breaks self tolerance and induces autoimmune disease. *J Clin Invest* 113:990-997
 139. Walter S, Doering A, Letiembre M, Liu Y, Hao W, Diem R, Bernreuther C, Glatzel M, Engelhardt B, Fassbender K (2006) The LPS receptor, CD14, in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Cell Physiol Biochem* 17:167-172
 140. Wange RL, Samelson LE (1996) Complex complexes: signaling at the TCR. *Immunity* 5:197-205
 141. Weiner HL (2009) The challenge of multiple sclerosis: how do we cure a chronic heterogeneous disease? *Ann Neurol* 65:239-248
 142. Wolburg H, Lippoldt A (2002) Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol* 38:323-337
 143. Wu C, Ivars F, Anderson P, Hallmann R, Vestweber D, Nilsson P, Robenek H, Tryggvason K, Song J, Korpos E, Loser K, Beissert S, Georges-Labouesse E, Sorokin LM (2009) Endothelial basement membrane laminin alpha5 selectively inhibits T lymphocyte extravasation into the brain. *Nat Med* 15:519-527
 144. Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N (1992) Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 356:63-66
 145. 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

7 **Abbildungsverzeichnis**

| | | |
|---------------|--|----|
| Abbildung 1: | Schematische Darstellung der T-Zell-Differenzierung | 10 |
| Abbildung 2: | Schematische Darstellung der einzelnen Schritte bei der Migration von T-Zellen über die BHS..... | 18 |
| Abbildung 3: | Schematische Darstellung der transzellulären oder parazellulären Migration | 19 |
| Abbildung 4: | Schematischer Aufbau des TCR mit seinem Korezeptor CD4 oder CD8..... | 23 |
| Abbildung 5: | Schematische Darstellung des B7-1/2-CD28/CTLA-4-Signalweges | 24 |
| Abbildung 6: | Schematischer Aufbau des CD14-Rezeptors | 26 |
| Abbildung 7: | Schematische Darstellung des Adhäsionsassays an Tag 1..... | 37 |
| Abbildung 8: | Schematische Darstellung des Adhäsionsassays an Tag 3..... | 37 |
| Abbildung 9: | Schematische Darstellung des Transmigrationsassays an Tag 1 | 38 |
| Abbildung 10: | Schematische Darstellung des Transmigrationsassays an Tag 3 | 39 |
| Abbildung 11: | Repräsentativer Verlauf der EAE von CD14-defizienten Mäusen und C57BL/6J Tieren..... | 45 |
| Abbildung 12: | Vergleich der Expression des kostimulatorischen Moleküls CD28 auf Lymphozyten von CD14-defizienten Mäusen gegenüber C57BL/6J Mäusen..... | 47 |
| Abbildung 13: | Vergleich der Expression des kostimulatorischen Moleküls CTLA-4 auf T-Zellen von CD14-defizienten Mäusen gegenüber C57BL/6J Tieren | 49 |
| Abbildung 14: | Vergleich der Expression von LFA-1 und CD49d auf T-Zellen von CD14-defizienten Mäusen gegenüber C57BL/6J Mäusen..... | 53 |
| Abbildung 15: | Vergleich der Adhäsion von Lymphozyten aus CD14-defizienten Mäusen und C57BL/6J Tieren..... | 54 |
| Abbildung 16: | Mikroskopische Aufnahme eines Adhäsionsassays | 55 |
| Abbildung 17: | Adhäsionsverhalten von Lymphozyten aus CD14-defizienten Mäusen auf einem mit TNF- α stimulierten Zellmonolayer | 56 |

| | | |
|---------------|---|----|
| Abbildung 18: | Messung der Transmigrationsassays mit Hilfe von TruCount™ Tubes am Durchflusszytometer..... | 57 |
| Abbildung 19: | Transmigrationsversuche mit Lymphozyten von CD14-defizienten Mäusen und C57BL/6J Tieren..... | 58 |
| Abbildung 20: | Migration von Lymphozyten aus CD14-defizienten Mäusen durch einen stimulierten bEnd.3 Zellmonolayer | 59 |
| Abbildung 21: | Mit Giemsa gefärbter bEnd.3 Zellmonolayer auf einer Filtermembran | 59 |
| Abbildung 22: | Vergleich der MMP-2 und MMP-9 Expression am Erkrankungspeak p.i..... | 61 |
| Abbildung 23: | Hypothetische Mechanismen der Zellmigration bei CD14-defizienten Mäusen im Rahmen einer EAE..... | 66 |

8 Tabellenverzeichnis

| | | |
|-------------|---|----|
| Tabelle 1: | Unterschiedliche Symptome abhängig von der Lokalisation der Entmarkungsherde..... | 6 |
| Tabelle 2: | Diagnosekriterien der MS..... | 7 |
| Tabelle 3: | Aufstellung der verwendeten Geräte..... | 28 |
| Tabelle 4: | Aufstellung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien..... | 29 |
| Tabelle 5: | Aufstellung der verwendeten Antikörper..... | 31 |
| Tabelle 6: | Aufstellung und Zusammensetzung der verwendeten Medien..... | 31 |
| Tabelle 7: | Aufstellung und Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen..... | 32 |
| Tabelle 8: | Score zur Beurteilung der klinischen Symptome nach Immunisierung..... | 33 |
| Tabelle 9: | Aufstellung der durchgeführten Antikörperfärbungen für die Durchflusszytometrie..... | 41 |
| Tabelle 10: | Anzahl der CD14-defizienten Mäuse und C57BL/6J verwendeten Tiere für nachfolgende Ergebnisse..... | 45 |
| Tabelle 11: | Expression von TCR/CD28 auf T-Zellen bei gesunden Tieren, Tag 10 p.i., Erkrankungspeak p.i..... | 48 |
| Tabelle 12: | Expression von TCR/CTLA-4 auf T-Zellen bei gesunden Tieren, Tag 10 p.i., Erkrankungspeak p.i..... | 50 |

9 Publikationen

The Innate Immune Receptor CD14 Mediates Lymphocyte Migration in EAE.

Halmer R, Davies L, Liu Y, Fassbender K, Walter S. Cell Physiol Biochem. 2015;37(1):269-75. doi: 10.1159/000430351.

Comparison of Antiepileptic Approaches in Treatment of Benzodiazepine Nonresponsive Status Epilepticus.

Bachhuber A, Lasrich M, **Halmer R**, Fassbender K, Walter S. CNS Neurosci Ther. 2016 Mar;22(3):178-83. doi: 10.1111/cns.12389.

'Stroke Room': Diagnosis and Treatment at a Single Location for Rapid Intraarterial Stroke Treatment.

Ragoschke-Schumm A, Yilmaz U, Kostopoulos P, Lesmeister M, Manitz M, Walter S, Helwig S, Schwindling L, Fousse M, Haass A, Garner D, Körner H, Roumia S, Grunwald I, Nasreldein A, **Halmer R**, Liu Y, Schlechtriemen T, Reith W, Fassbender K. Cerebrovasc Dis. 2015 Oct 21;40(5-6):251-257.

A central role for the acid sphingomyelinase/ceramide system in neurogenesis and major depression.

Gulbins E, Walter S, Becker KA, **Halmer R**, Liu Y, Reichel M, Edwards MJ, Müller CP, Fassbender K, Kornhuber J. J Neurochem. 2015 Apr 29. doi: 10.1111/jnc.13145

Sphingolipids: important players in multiple sclerosis.

Halmer R, Walter S, Faßbender K. Cell Physiol Biochem. 2014;34(1):111-8. doi: 10.1159/000362988.

Prescription frequency and predictors for the use of novel direct oral anticoagulants for secondary stroke prevention in the first year after their marketing in Europe--a multicentric evaluation.

Luger S, Hohmann C, Kraft P, **Halmer R**, Gunreben I, Neumann-Haefelin T, Kleinschnitz C, Walter S, Haripyan V, Steinmetz H, Foerch C, Pfeilschifter W. *Int J Stroke*. 2014 Jul;9(5):569-75. doi: 10.1111/ijss.12289.

Is reduced myocardial sympathetic innervation associated with clinical symptoms of autonomic impairment in idiopathic Parkinson's disease?

Guidez D, Behnke S, **Halmer R**, Dillmann U, Faßbender K, Kirsch CM, Hellwig D, Spiegel J.

J Neurol. 2014 Jan;261(1):45-51. doi: 10.1007/s00415-013-7135-4.

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen Menschen bedanken, die mich während meiner Dissertation unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Prof. Dr. med. K. Faßbender für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und den exzellenten Möglichkeiten es zu bearbeiten.

Besonders danken möchte ich meiner Betreuerin Frau PD Dr. med. S. Walter, die stets durch ihre unermüdbare Motivation, aufbauenden Worte und Bereitschaft, Ergebnisse zu diskutieren, zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Durch ihre hervorragende Betreuung und die Entwicklung neuer Ideen für weitere Forschungsthemen wurde mein wissenschaftliches Interesse sehr gefördert.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den Mitarbeitern unseres Labors, insbesondere Frau Andrea Schottek, welche mir stets hilfsbereit zur Seite stand und ein offenes Ohr für Probleme hatte.

Nicht vergessen möchte ich die ehemaligen Mitarbeiterinnen des Neurologischen Labors, Frau Nadine Niebergall, Frau Laura Davies und Frau Manuela Gries, die mich in die Geheimnisse der experimentellen Forschung einführten. Danke.

Dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie danke ich für die Zusammenarbeit und Ermöglichung der Tierhaltung in den vergangenen Jahren.

Besonders danken möchte ich meinen Eltern und meinem Bruder Tobias. Sie haben mich immer unterstützt und mir mein Studium sowie diese Dissertation ermöglicht.

Nicht zuletzt danke ich meinem Freund Benjamin Bartl, der mich immer wieder motivierte, Rücksicht und Verständnis in stressigen Zeiten hatte und mir bei Problemen mit Rat und Tat zur Seite stand.