



Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik für Neurologie



Die Rolle der MAPKAP Kinase 2 bei der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis

Dissertation

vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Vorgelegte Dissertation von
Diplom-Biologin

Silvia Martina Tietz
(geb. Csacsko)
geboren am 12.02.1983 in Reutlingen

2011

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Michael Martin
Fachbereich 08 - Biologie und Chemie
Professur für Immunologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Koreferent: PD Dr. med. Martin Berghoff
Fachbereich 11 - Medizin
Klinik für Neurologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der Promotion:

*„Wenn sie nur kann, wird die
Natur dich dreist beligen“*

(Charles Darwin)

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und alle benutzen Hilfsmittel, sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen, vollständig angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Die vorliegende Arbeit wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit eingereicht.

Gießen, den

S. Tietz

ZUSAMMENFASSUNG

Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist eine entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems, die als Tiermodell der Multiplen Sklerose (MS) anerkannt ist. Die Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein-induzierte EAE spiegelt die essentiellen Merkmale der humanen MS wider: chronischer, relapsierender klinischer Verlauf, pathophysiologisches Trias aus Inflammation, reaktiver Gliose und der Bildung demyelinisierter Stellen, die sich topographisch ebenso wie die der humanen MS manifestieren. Die Mitogen-aktivierten Proteinkinase 2 (MAPKAPK2 oder kurz MK2) spielt eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen und wurde in dieser Arbeit bei der EAE untersucht. Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass MK2 den Verlauf einer EAE beeinflusst. Neben einem schwereren klinischen Verlauf in MK2 *knockout* (MK2^{-/-}) Mäusen wurde eine erhöhte Zahl an Leukozyten im zentralen Nervensystem von MK2^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Wildtyp (WT) Kontrolltieren gefunden. Anschließende Analysen zur Charakteristik der Integrität der Blut-Hirn-Schranke und der Entzündungsreaktion ergaben, dass das Adhäsionsverbindungsprotein β -Catenin verstärkt bei MK2^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT exprimiert, und die Konzentration des Entzündungsmediators Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) α bei MK2^{-/-} Tieren im Serum im Vergleich zu WT vermindert war, was einen milderen Verlauf der Erkrankung bewirken sollte. Untersuchungen zum TNF Rezeptor 1 Signalweg ergaben, dass an Tag 8 nach der Immunisierung mehr mRNA des Transkriptionsfaktors NF κ B in Leukozyten aus der Milz von MK2^{-/-} Tieren exprimiert war. Außerdem war der Apoptoseinhibitor cFLIP an Tag 24 nach EAE-Induktion verstärkt exprimiert. Beide Marker lassen auf eine gesteigerte Aktivierung MK2-defizienter Leukozyten schließen. Da MK2 die Biosynthese von TNF α reguliert, könnte der durch den MK2-*knockout* bedingte Mangel des Entzündungsmediators den Verlauf der EAE, durch eine veränderte Signaltransduktionskaskade des TNF Rezeptor 1, und somit verändertes Apoptoseverhalten autoreaktiver Zellen im ZNS beeinflussen. Vergleichende Studien zur Bindungscharakteristik von murinen Leukozyten an humanen Endothelzellen aus der Blut-Hirn-Schranke machten deutlich, dass MK2 eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion spielt. Während CD3- und CD14- positive Zellen, die aus der Milz von WT isoliert wurden, nach Stimulation verstärkt an Endothelzellen banden, blieb die Adhäsion von Leukozyten aus MK2^{-/-} Mäusen nach Stimulation unbeeinflusst. Darüber hinaus zeigten *in vitro* Studien mit monozytären U937 Zellen, dass MK2 vermutlich bei der Expression des Adhäsionsmoleküls VLA-4 eine Rolle spielt, jedoch nicht der Hauptregulator des Proteins zu sein scheint. Die Ergebnisse der Studien machen deutlich, dass MK2 eine zentrale Rolle bei Inflammation aufgrund unterschiedlicher Faktoren spielt.

SUMMARY

The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is an inflammatory disease of the central nervous system and widely accepted as an animal model for human multiple sclerosis (MS). The characteristics of MS are reflected by Myelin-Oligodendrocyte-Glycoprotein (MOG)-induced EAE: the chronic, relapsing clinical course of the disease, and the pathophysiological triad of inflammation, reactive gliosis, and formation of demyelinating plaques with a topographical distribution similar to that in human MS. The role of the mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 (MAPKAPK2; short MK2) is important in inflammation. In this study the role of the MK2 was investigated in EAE. The results showed a contribution of MK2 in EAE. MK2 knockout (MK2^{-/-}) mice showed signs of more severe disease correlating with an increased number of leukocytes in the central nervous system compared to wildtype (WT) control. The subsequent analysis of the integrity of the blood-brain-barrier as well as the analysis of inflammation demonstrated that one protein of adherens junction, the β -catenin, was increased in MK2^{-/-} mice. Moreover, the concentration of the inflammation mediator tumor necrosis factor (TNF) α was decreased in serum of MK2^{-/-} mice compared to WT controls, indicating a milder course of the disease. The investigation of the TNF receptor 1 signalling demonstrated an increased expression of NF κ B mRNA in leukocytes isolated from spleen from MK2^{-/-} mice at day 8 after immunization. In addition, the inhibitor of apoptosis cFLIP was increased at day 24 after EAE-induction in MK2^{-/-} animals. Both, the marker NF κ B and cFLIP indicate an increased activation of MK2-deficient leukocytes. Because of the regulatory function of the MK2 in the biosynthesis of TNF α the MK2 is involved in the disease course. The reduced level of TNF α in *knockout* mice might change the TNF receptor 1 signalling and therefore alter the characteristics of apoptosis in autoreactive cells in the CNS. Moreover, comparative studies about the binding of leukocytes indicate the importance of the MK2. CD3 positive as well as CD14 positive cells isolated from WT animals showed an increased binding to endothelial cells after stimulation whereas the adhesion of MK2-deficient leukocytes was unaffected by stimulation. Furthermore, *in vitro* studies using the U937 monocytic cell line indicated an involvement of MK2 in the expression of the adhesion molecule VLA-4. However, MK2 seems to be involved in the regulation but is not the main regulator of VLA-4. These results suggest a central role of MK2 in inflammation.

INHALTSVERZEICHNIS

Erklärung	I
Zusammenfassung.....	II
Summary	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Monozyten.....	2
1.1.2 T-Lymphozyten.....	2
1.1.3 B-Lymphozyten.....	4
1.2 Autoimmunität.....	5
1.3 Das Gehirn	6
1.3.1 Blut-Hirn-Schranke	7
1.3.2 Neuroinflammation	8
1.4 Multiple Sklerose.....	10
1.4.1 Pathogenese, Symptomatik und Therapie.....	11
1.4.2 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis	14
1.5 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK).....	15
1.5.1 p38-Signalweg.....	16
1.5.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinase aktivierte-Proteinkinase 2	17
1.5.3 MK2 bei der Pathogenese von Erkrankungen	19
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	21
2. Material & Methoden.....	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Tiere	22
2.1.2 Zelllinien	22
2.1.3 Antikörper	22
2.1.4 Streptavidin (SA).....	24
2.1.5 Primer	24
2.1.6 Kits	26
2.1.7 Marker	26
2.1.8 Geräte	27
2.1.9 Chemikalien	27
2.1.10 Lösungen	29
2.1.11 Verbrauchsmaterialien.....	30

2.1.12 Puffer.....	30
2.1.13 Fertig Kulturmedien und Spezialmedien.....	32
2.2 Methoden.....	33
2.2.1 Tierexperimentelle Arbeiten.....	33
2.2.1.1 Mäuse - Genotypen.....	33
2.2.1.2 Genotypisierung.....	33
2.2.1.3 Präparation genomischer DNA aus Mausschwänzen.....	33
2.2.1.4 Identifikation von MK2-/- Mäusen.....	33
2.2.1.5 Narkose der Tiere.....	34
2.2.1.6 Tötung der Tiere.....	35
2.2.1.6.1 Euthanasie mittels CO ₂	35
2.2.1.6.2 Perfussion der Tiere.....	35
2.2.1.7 Materialgewinnung und Lagerung.....	35
2.2.1.8 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis.....	36
2.2.1.8.1 Etablierung der EAE.....	36
2.2.1.8.2 Immunisierung.....	37
2.2.1.8.3 Emulsionsherstellung.....	37
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	38
2.2.2.1 RNA-Isolierung.....	38
2.2.2.1.1 RNA-Isolierung mit QIAamp™ RNA Blood Mini Kit.....	38
2.2.2.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	38
2.2.2.2 Reverse Transkription.....	39
2.2.2.3 Relative Real Time-PCR.....	40
2.2.2.4 Standardisierung neuer Primer.....	40
2.2.2.4.1 Herstellung von Standardkurven.....	41
2.2.2.5 Relative Quantifizierung.....	43
2.2.2.6 mRNA Stabilitäts-Assay.....	44
2.2.2.7 Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	44
2.2.2.7.1 Photometrische Bestimmung mittels BCA-Kit.....	44
2.2.2.7.2 Photometrische Bestimmung mittels Bardford-Reagenz.....	45
2.2.2.8 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	45
2.2.2.8.1 IGF-1 Konzentrationsbestimmung mit Quantikine® murine IGF-1 ELISA-Kit.....	45
2.2.2.8.2 TNFα Konzentrationsbestimmung mit Quantikine® murine TNFα ELISA-Kit.....	46
2.2.2.9 NO-Assay.....	47
2.2.2.9.1 NO-Assay mittels QuantiChrom™ Nitric Oxide Assay Kit.....	47
2.2.2.9.2 NO Bestimmung mittels Griess Reagenz.....	48
2.2.3 Zellbiologische Methoden.....	48
2.2.3.1 Histologie.....	48
2.2.3.1.1 Herstellung von Paraffinschnitten.....	48
2.2.3.1.2 Luxol-Fast-Blue-/Kresylviolett-Färbung.....	49
2.2.3.1.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	50
2.2.3.1.4 CD4- und CD8-Färbung.....	51
2.2.3.2 Zellkultur.....	51
2.2.3.2.1 Langzeit-Lagerung von Säugerzellen.....	52
2.2.3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Säuger-Zelllinien.....	52
2.2.3.2.3 Mediumwechsel und Zellpassage.....	52
2.2.3.2.4 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer.....	53
2.2.3.2.5 Stimulation von Säugerzellen.....	54
2.2.3.2.6 Inhibition von p38 durch SB203580 <i>in vitro</i>	54
2.2.3.2.7 Transfektion von Säugerzellen.....	54
2.2.3.2.7.1 MK2 <i>Gen-Silencing</i> mittels HVJ-Envelope Vector Kit (GenomONE™-Neo EX).....	54
2.2.3.3 Isolierung von Primärzellen.....	55
2.2.3.3.1 Isolierung von murinen Milzzellen.....	55
2.2.3.3.2 Isolierung von murinen Zellen aus dem ZNS.....	55

2.2.3.4 Durchflusszytometrie.....	56
2.2.3.5 Adhäsions-Assay.....	58
2.2.4 Biochemische Methoden	59
2.2.4.1 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)	59
2.2.4.2 Western Blot Analyse	59
2.2.4.3 Biotinylierung von Antikörpern.....	60
2.2.5 Statistische Auswertung.....	60
3. Ergebnisse	61
3.1 Teil 1: Die Rolle Der MK2 bei der EAE	61
3.1.1 MK2 ^{-/-} Mäuse zeigen einen schwereren EAE-Verlauf als Wildtyp-Kontrolltiere.....	61
3.1.2 Histologisch unterscheiden sich Wildtyp und MK2 ^{-/-} Mäuse	62
3.1.3 Die Zellzahl von Leukozyten im ZNS ist bei MK2 ^{-/-} Mäusen erhöht	64
3.1.4 β -Catenin im ZNS ist bei MK2 ^{-/-} Mäusen erhöht.....	65
3.1.5 Im ZNS ist kein Stickstoffmonoxid nachweisbar.....	66
3.1.6 MK2 ^{-/-} Mäuse weisen mehr Leukozyten in der Milz auf	66
3.1.7 MK2 ^{-/-} Mäuse produzieren weniger TNF α	71
3.1.8 Die IGF-1-Konzentration im Blut ist während der EAE unbeeinflusst	72
3.1.9 Die mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine ist verändert	73
3.1.10 Proteine der TNFR1 Signalkaskade	76
3.1.11 Die mRNA-Expression von Adaptern der TNFR1 Signalkaskade ist verändert	78
3.1.12 Leukozyten von MK2 ^{-/-} Tieren binden schwach an Endothelzellen.....	81
3.1.13 mRNA-Expression von Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten	82
3.2 Ergebnisse Teil 2: Die Rolle der MK2 bei der Regulation von VLA-4	85
3.2.1 Die VLA-4 mRNA-Expression ist in Abhängigkeit von SB203580 reduziert.....	85
3.2.2 Actinomycin D beeinflusst die VLA-4 mRNA nicht	86
3.2.3 Die Proteinexpression von VLA-4 ist in Abhängigkeit des p38-Inhibitors SB203580 vermindert.....	87
3.2.4 Das Oberflächenprotein-VLA-4 bleibt von SB203580 unbeeinflusst.....	87
3.2.5 Die Adhäsion Natalizumab behandelter Zellen ist stark reduziert	88
3.2.6 siRNA-Transfektion - <i>knockdown</i> von MK2.....	90
3.2.7 Die Oberflächenexpression von VLA-4 bleibt durch MK2- <i>knockdown</i> unbeeinflusst	90
3.2.8 MK2- <i>knockdown</i> unterbindet die Adhäsion an Endothelzellen nicht.....	91
3.2.9 Natalizumab wird von der Oberfläche aktivierter U937 Zellen nicht entfernt	93
4. Diskussion.....	94
4.1 Die Rolle von MK2 bei Immunreaktionen	94
4.2 Immunisierung - die Rolle von Pertussis Toxin	97
4.3 MK2 ist wichtig für die Migration von Leukozyten	98
4.4 Die Rolle des TNFR-Signalwegs.....	99
4.5 TNFα und IGF-1 bei Neurodegeneration	104

4.6 NO und Neurodegeneration.....	105
4.7 Die Rolle der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und VLA-4	106
4.8 Die Problematik des Zellkulturmodells U937	108
5. Schlussfolgerung	110
6. Literaturverzeichnis	111
Anhang.....	- 1 -
Abbildungsverzeichnis	- 1 -
Tabellenverzeichnis.....	- 3 -
Danksagungen	- 4 -
Publikationsliste	- 5 -
Lebenslauf.....	- 6 -

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAK1	<i>adaptor-associated kinase 1</i>	GM-CSF	Granulozyten-Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor
AP2	<i>adaptor protein 2</i>		
APC	antigenpräsentierende Zelle	h	Stunde
ATF	<i>activating transcription factor</i>	HCl	Salzsäure
BCR	B-Zell-Rezeptor	HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
BSA	Rinderserumalbumin	ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>	IFN	Interferon
cFLIP	<i>cellular caspase-8 (FLICE)-like inhibitory protein</i>	IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
CHOP	<i>homologous protein</i>	IGFBP	<i>Insulin-like growth factor binding protein</i>
COX	Cyclooxygenase	IL	Interleukin
CREB	<i>cyclic AMP response element binding protein</i>	l	Liter
DMSO	Dimethylsulfoxid	JNK	c-Jun N-terminale Kinase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	kDa	Kilodalton
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (<i>experimental autoimmune encephalomyelitis</i>)	LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>	LPS	Lipopolysaccharid
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>	M	Mol/l
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>	mA	Milliampere
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>	MBP	<i>myelin basic protein</i>
FOXO3	<i>Forkhead box O3</i>	M-CSF	Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor
g	Gramm	µg	Mikrogramm
Gly	Glycin	MAPKK	Mitogen aktivierte Protein Kinase-Kinase
		min.	Minute
		MIP1α	<i>macrophage inflammatory protein 1α</i>
		MKKK	Mitogen-aktivierte protein Kinase Kinase Kinase
		(MAP3K MEKK)	

MK2	Mitogen-aktivierte Proteinkinase aktivierte- Proteinkinase 2	SOCS3	<i>ribonucleinacid</i> <i>suppressor of cytokine</i> <i>signaling 3</i>
ml	Milliliter	TACE	<i>TNF alpha converting enzyme</i>
MLK	<i>mixed lineage kinase</i>	TAK	TGF-aktivierte Kinase
MNK	MAPK-interagierende Kinase	TBS	<i>tris buffered saline</i>
MSK	Mitogen- und stressaktivierte Kinase	TBST	<i>tris buffered saline</i> mit Tween20
µl	Mikroliter	TCR	T-Zell-Rezeptor
MOG	Myelin-Oligodendrozyten- Glykoprotein	TEMED	Tetramethylethylendiamin
MS	Multiple Sklerose	Thr	Threonin
NES	Nukleus-Exportsignal	TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
ng	Nanogramm	TNFR1	TNF-Rezeptor 1
NLS	Nukleus-Lokalisationssignal	TTP	Tristetraprolin
OD	optische Dichte	TRADD	<i>Tumor necrosis factor</i> <i>receptor type 1-associated</i> <i>death domain protein</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>	TRAF2	<i>TNF receptor-associated</i> <i>factor 2</i>
PFA	Paraformaldehyd	Tyr	Tyrosin
pg	Pikogramm	uPA	<i>urokinase plasminogen</i> <i>activator</i>
PLP	Proteolipidprotein	V	Volt
PRD	Prolinreiche Domäne	VCAM-1	<i>vascular cell adhesion</i> <i>molecule 1</i>
RIP1	<i>receptor interacting protein 1</i>	VLA-4	<i>very late antigen 4</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>	WB	Western Blot
RSK	p90 ribosomal S6 Kinase	x g	x Gravitation
RT	Raumtemperatur	ZNS	zentrales Nervensystem
SA	Streptavidin		
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>		
SH3	Src-Homologie 3		
siRNA	<i>small-interfering</i>		

1. EINLEITUNG

1.1 DAS IMMUNSYSTEM

Das Immunsystem stellt ein komplexes System zur Abwehr eindringender pathogener Mikroorganismen dar. Gegen Krankheitserreger werden wirkungsvolle Abwehrmechanismen eingesetzt, die gleichzeitig eine übermäßige Schädigung des Körpers durch die Abwehrmechanismen vermeiden. In der Regel besteht gegen eindringende Erreger eine Immunität (Definition (*medizinisch*): biologischer Zustand, in dem der Organismus durch unspezifische und spezifische Abwehrmechanismen gegenüber Angriffen durch Pathogene geschützt ist), gegen körpereigenes Gewebe besteht hingegen eine immunologische Toleranz (Goodnow 1997).

Man unterscheidet das angeborene (*innate*) und das erworbene (*adaptive*) Immunsystem. Das angeborene Immunsystem ist gekennzeichnet durch das Erkennen allgemeiner, repetitiver Strukturen auf Mikroorganismen, die *pathogen associated molecular pattern* (PAMP) (Janeway and Medzhitov 2002). Durch das Erkennen dieser Strukturen wird eine Immunreaktion bzw. Abwehr ohne vorausgegangenen Erregerkontakt ausgelöst. Hierbei spielen Makrophagen und neutrophile Granulozyten, die Bakterien phagozytieren oder abtöten können, sowie das Komplementsystem, dessen Komponenten sich auf mikrobiellen Oberflächen anlagern und diese zerstören können oder Pathogene opsonieren, eine entscheidende Rolle (Rabinovitch 1995; Li, Sacks et al. 2008; Mukhopadhyay, Pluddemann et al. 2009). Gleichzeitig werden zahlreiche Mediatoren wie z.B. TNF α produziert, die eine Entzündungsreaktion fördern und eine Immunantwort in Gang setzen (Underhill, Ozinsky et al. 1999). Das angeborene Immunsystem reicht jedoch zur Bekämpfung spezieller Erreger oft nicht aus. Darüber hinaus entwickelte sich in Vertebraten das evolutionär jüngere adaptive Immunsystem.

Zentraler Bestandteil des adaptiven Immunsystems ist eine enorme Diversität an Lymphozyten (B- und T-Zellen), welche hochspezifisch bestimmte Antigene erkennen. Charakteristisch ist, dass gegen Erreger spezifische Lymphozyten erst Antigen-spezifisch aktiviert und dann selektiv vermehrt werden (klonale Proliferation), um eine Abwehrreaktion zu generieren (Ferrari, Penna et al. 1986). Das adaptive Immunsystem bringt außerdem spezialisierte Lymphozyten (Gedächtniszellen) hervor, die bei erneutem

Kontakt mit einem Antigen innerhalb weniger Stunde eine Immunreaktion auslösen können (immunologisches Gedächtnis) (Weigle 1966).

1.1.1 MONOZYTEN

Monozyten sind im Blut zirkulierende Zellen der myeloiden Reihe, die aus einer Progenitorzelle des Knochenmarks hervorgehen (Janeway 2002). Durch den Einfluss der Wachstumsfaktoren Granulozyten-Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) und Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF) entwickeln sich aus den hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark Monoblasten, die zu Monozyten differenzieren und in den Blutkreislauf übergehen (Nicola and Peterson 1986). Dort können Monozyten körperfremde Strukturen aufnehmen, prozessieren und präsentieren und somit die adaptive Immunantwort initiieren (Nathan 1987; Aderem and Underhill 1999). Des Weiteren sind Monozyten dazu befähigt in Gewebe einzuwandern und dort zu Makrophagen zu differenzieren. Dies geschieht auch unter nicht-pathologischen Bedingungen (Mamputu and Renier 1999). In vielen Organen des menschlichen Körpers lassen sich Klassen spezialisierter Gewebemakrophagen abgrenzen, wie z.B. die Makrophagen des Zentralen Nervensystems - die Mikroglia (van Furth and Cohn 1968). Monozyten werden durch bakterielle, mykogene und virale Substanzen aktiviert. Die Bindung eines solchen Stimulus aktiviert Monozyten über Mustereerkennungsrezeptoren wie Toll-like Rezeptoren (TLR), und löst somit eine Entzündungsreaktion aus (Ozinsky, Underhill et al. 2000). Monozyten produzieren dann unter anderem proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF α , was zur Rekrutierung von Granulozyten und weiteren Makrophagen führt (Miller, Pietras et al. 2007).

1.1.2 T-LYMPHOZYTEN

T-Zellen, B-Lymphozyten und NK-Zellen entstammen einer gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzelle (lymphoide Reihe) (Janeway 2002). Die Reifung zur T-Zelle aus dieser Progenitorzelle findet im Thymus statt. Bei ihrer Reifung wird eine beachtliche Variabilität des T-Zell-Rezeptors (TCR) durch zufällige Rekombination der codierenden DNA erzielt und somit ein enormes Repertoire an spezifischen Einzelzellen erzeugt, die gegen bestimmte Antigene reagieren (Bassing, Tillman et al. 2003; Mostoslavsky, Alt et al. 2004). T-Lymphozyten werden anhand ihrer unterschiedlichen Korezeptoren in CD4

positive (CD4+) und CD8 positive (CD8+) T-Zellen unterteilt (Shiku, Kisielow et al. 1975). CD4+ Zellen (T-Helferzellen) erkennen aufgenommene (körperfremde) Antigene, die als Peptidfragmente von MHC-II-Molekülen präsentiert werden (Fukui, Ishimoto et al. 1997; Huang, Yachou et al. 1997). Die Population der CD4+ Zellen gestaltet sich heterogen. Nach ihrer Reifung (positive und negative Selektion; 1.2 Autoimmunität) verlassen die Zellen als T-Helferzellen (T_H0-Zelle) den Thymus. Im sekundären lymphatischen Organ differenzieren diese T_H0-Zellen nach Antigen-Kontakt durch Einfluss unterschiedlicher Mediatoren zu spezialisierten T_H1-, T_H2-, T_H17- oder regulatorische T-Zellen (Sad and Mosmann 1994; Elson, Nutman et al. 1995; Harrington, Hatton et al. 2005; Bettelli, Carrier et al. 2006).

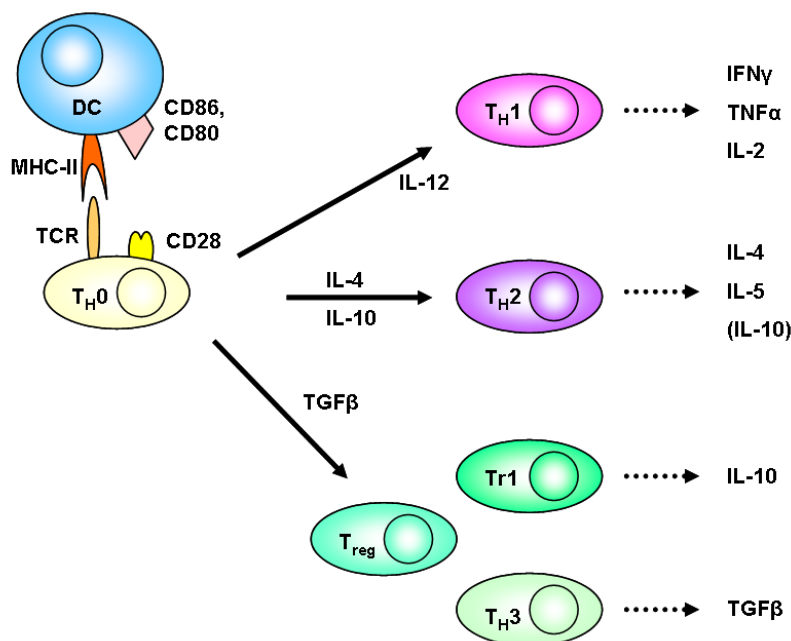


Abbildung 1: Schematische Darstellung der T-Zell-Differenzierung

Nach Antigen-TCR-Erkennung werden T_H0 Zellen aktiviert und differenzieren durch Einfluss unterschiedlicher Zytokine zu spezialisierten Effektorzellen. Durch Einfluss von IL-12 entwickeln sich T_H1-Zellen, die proinflammatorische Zytokine produzieren. Durch die Anwesenheit von IL-4 und IL-10 differenzieren T_H0-Zellen zu T_H2-Zellen, die überwiegend IL-4, -5 und -10 sezernieren. Durch den Einfluss von TGFβ entwickeln sich regulatorische T-Zellen. (modifiziert aus **Weaver et al.**, *Immunity*, June 2006; (Weaver, Harrington et al. 2006))

T_H1-Zellen produzieren vor allem IFN γ , TNF α und IL-2. Sie aktivieren Makrophagen und veranlassen B-Lymphozyten dazu opsonierende Antikörper zu produzieren. T_H2-Zellen hingegen produzieren vor allem IL-4 und IL-5. Diese Mediatoren aktivieren B-Zellen, die neutralisierende Antikörper (IgG und IgE) produzieren. T_H1- und T_H2-Antworten können sich gegenseitig hemmen und so eine Immunreaktion kontrollieren (Mosmann, Cherwinski

et al. 1986; Romagnani 1995). Bei der Regulation des Immunsystems spielen regulatorische T-Zellen (CD4+CD25+) eine zentrale Rolle. Regulatorische T-Zellen (Treg) haben entscheidende Funktion bei der Entstehung der peripheren Toleranz gegenüber „harmlosen“ Fremdartigen, wie beispielsweise Bestandteilen aus der Nahrung. Außerdem halten sie Entzündungsreaktionen unter Kontrolle, um eine Schädigung eigener Zellen zu vermindern (Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008).

CD8+ Zellen (zytotoxische T-Zellen) sind im Gegensatz zu CD4+ Zellen darauf spezialisiert Antigene zu erkennen, die auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden. Bei Peptiden, die auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden, handelt es sich um Peptide zytosolischen Ursprungs von z.B. infizierten körpereigener Zellen, Tumorzellen oder auch allogene transplantierte Zellen. CD8+ Zellen sind nach erkennen dieser Antigene in der Lage, diese fremden bzw. infizierten Zellen zu lysieren und somit zu eliminieren (Wong and Pamer 2003).

1.1.3 B-LYMPHOZYTEN

B-Lymphozyten (B-Zellen) gehören ebenfalls der lymphoiden Linie an. Die Differenzierung zur B-Zelle aus der Progenitorzelle findet im Knochenmark statt. Dort entwickelt sich ausgehend von dieser Progenitorzelle über die Stadien der Pro-B-Zelle und Prä-B-Zelle eine unreife B-Zelle, die im Laufe ihrer Reifung einen spezifischen Antikörper (B-Zell-Rezeptor; BCR) auf ihrer Oberfläche exprimiert. Die Spezifität des Antikörpers, den die Zelle produziert, entsteht dabei durch zufällige somatische Rekombination (V(D)J-Rekombination) und alternatives Spleißen der mRNA und weist bei jeder B-Zelle eine andere Antigen-Bindungsdomäne auf (Rajewsky 1996). Nach negativer Selektion, bei der unreife B-Lymphozyten eliminiert werden, die keinen funktionstüchtigen BCR exprimieren bzw. Immunglobulin-Moleküle produzieren, die gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind (Rolink, Melchers et al. 1999), werden diese als naive B-Zellen in die Peripherie entlassen. Die naiven B-Lymphozyten zirkulieren im Blut zu sekundären lymphatischen Organen (Lymphknoten und Milz), wo sie durch Erkennen ihres spezifischen Antigens und Interaktion mit T-Helferzellen zu reifen B-Zellen differenzieren. Dabei kommt es zu einer somatischen Hypermutation des BCR, die zu einer gesteigerten Antigen-Affinität (Isotypenwechsel) des spezifischen Antikörpers führt. Im Frühstadium einer Antikörperreaktion produziert eine reife B-Zelle überwiegend IgM- sowie IgD-

Antikörper später dann spezifischere IgG- und IgA-Antikörper. In geringem Maße werden wird auch der IgE-Isotyp sezerniert (Stavnezer 1996).

Naive B-Zellen zirkulieren im Blut. Werden sie aktiviert beginnen sie zu proliferieren, um eine effektive Abwehr zu gewährleisten (Andersson, Coutinho et al. 1977; Liu, Zhang et al. 1991; Parker 1993). Die Nachkommen der aktivierten B-Zelle differenzieren zu Effektorzellen (Plasma- und Gedächtniszellen) (Coico, Bhogal et al. 1983; Takahashi, Dutta et al. 1998). Gedächtniszellen werden bei erneutem Kontakt mit ihrem Antigen sofort aktiviert und können innerhalb kurzer Zeit eine Immunantwort auslösen und somit das Ausbrechen einer Infektion verhindern (Kruetzmann, Rosado et al. 2003).

1.2 AUTOIMMUNITÄT

Als Autoimmunreaktion werden Reaktionen des Immunsystems bezeichnet, die sich irrtümlicherweise gegen körpereigenes Gewebe richten. Dabei kommt es zu Entzündungsreaktionen, die den betroffenen Organismus erheblich schädigen können.

Wie Autoimmunreaktionen entstehen ist bisher weitgehend unbekannt. Man geht davon aus, dass sowohl eine genetische Disposition als auch eine fehlgeschlagene T-Zell-Selektion ursächlich an autoimmunen Reaktionen beteiligt sein können (Ermann and Fathman 2001).

Bestimmte genetische Varianten der MHC-Moleküle bestimmen, welches Peptid eines Erregers bei der Prozessierung auf die Oberfläche gelangt und den T-Zellen präsentiert wird. Einige Varianten fördern scheinbar Strukturen zu Tage, die körpereigenen Antigenen extrem ähnlich sind (molekulares Mimikry), und somit autoimmune Reaktionen auslösen können (Wucherpfennig and Strominger 1995; Oldstone 1998).

Während ihrer Reifung im Thymus durchlaufen T-Zellen eine Prüfung. Dabei werden den T-Zellen praktisch alle denkbaren körpereigene Antigene mittels spezialisierter antigenpräsentierenden Zellen (APC) präsentiert. Interagiert der TCR einer unreifen Zellen nur schwach mit den körpereigenen Peptidantigen im MHC, wird dieser ein Überlebenssignal vermittelt - sie werden positiv selektiert (Kisielow, Teh et al. 1988). Interagieren solche T-Zellen stark mit den körpereigenen Antigen im MHC wird in ihnen Zelltod durch Apoptose ausgelöst - sie werden negativ selektiert (Zuniga-Pflucker, Jones et al. 1989). Zusammenfassend wird dieses Geschehen als immunologische oder zentrale Toleranz bezeichnet (Lederberg 1959). Bei fehlgeschlagenem Selektionsprozess kann es

vorkommen, dass autoreaktive T-Zellen der Kontrolle entgehen und in den Organismus entlassen werden. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass im Thymus Autoantigene präsentiert werden, die fälschlicherweise als körperfremd klassifiziert werden (Wekerle, Bradl et al. 1996).

Im Gegensatz zur zentralen Toleranz steht die periphere Toleranz, die von reifen Lymphozyten in den peripheren Organen generiert wird. Hierbei werden beim Gesunden autoreaktive T-Zellen durch Antigen-Kontakt in den Zustand der Anergie versetzt, wenn das Antigen ohne kostimulatorisches Signal Kontakt hat. Diese Interaktion führt ebenfalls zu Deletion, also zum Zelltod durch Apoptose (Schwartz 1996).

Wird bei einem Autoantigen-Kontakt das kostimulatorische Signal ausgelöst, kann es zur Ausprägung einer Autoimmunerkrankung kommen. Diese Entzündungsreaktion verläuft wie die Abwehr eines Fremdkörpers. Proinflammatorische Zytokine werden ausgeschüttet, die immer mehr Immunzellen zum Entzündungsherd rekrutieren (Antony, Godbey et al. 1993; Ward 1997), aber das Gewebe auch direkt schädigen. B-Lymphozyten differenzieren zu Plasmazellen und beginnen mit der Produktion von Antikörpern/Autoantikörpern. Diese Antikörper opsonieren die „fremden“ Zellen, die anschließend von CD8-T-Zellen und Makrophagen beseitigt werden. Um eine Autoimmunerkrankung zu diagnostizieren, können diese Autoantikörper als Marker ermittelt werden (Hassfeld, Steiner et al. 1993).

1.3 DAS GEHIRN

Das Gehirn als übergeordnete Schaltzentrale ist neben dem Rückenmark Teil des ZNS. Es verarbeitet differenziert Sinneseindrücke und koordiniert physiologische Prozesse im Körper. Mikroskopisch können mit den Neuronen und Gliazellen im ZNS grob zwei Zelltypen unterschieden werden. Neurone sind für die Erregungsbildung, Erregungsleitung sowie die Informationsverarbeitung zuständig und stellen strukturell die kleinste Einheit des Nervensystems dar. Gliazellen haben hingegen andere Aufgaben. Zu den Gliazellen gehören Astrozyten, Mikroglia, Oligodendrozyten, Ependymzellen und Zellen des *Plexus choroideus* (Kandel 1995). Mikrogliazellen sind Teil des mononukleären phagozytischen Systems und sind auf Antigenverarbeitung und Sezernierung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren spezialisiert (Frei, Siepl et al. 1987; Woodroffe, Sarna et al. 1991; Ledebor, Breve et al. 2000). Die Zellen des *Plexus choroideus* sezernieren hauptsächlich Liquor (Dohrmann 1970).

Astrozyten, Oligodendrozyten und Ependymzellen werden im ZNS als Makrogliazellen zusammengefasst. Diese Zellen haben vor allem Hüll- bzw. Stützfunktion. Astrozyten halten im ZNS das innere Milieu konstant (Ernährungsfunktion), sie sind Bestandteile der Blut-Hirn-Schranke, sie phagozytieren (al-Ali and al-Hussain 1996) und sind an der Narbenbildung nach Hirninfarkten oder bei Multipler Sklerose beteiligt (Ridet, Malhotra et al. 1997; Lassmann, Raine et al. 1998; Pardridge 2003). Oligodendrozyten bilden die Myelinscheiden des Gehirns. Die axonummantelnden Myelinscheiden bestehen zu 30 % aus Protein und 70 % aus Lipiden (Jackman, Ishii et al. 2009). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Proteinbestandteile des Myelins (*myelin basic protein* (MBP), Proteolipoprotein (PLP), Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) und andere) als Autoantigene in Betracht kommen (Poduslo 1978; Holz, Bielekova et al. 2000; Kaye, Kerlero de Rosbo et al. 2000). Die Ependymzellen kleiden Hohlräume im ZNS aus.

1.3.1 BLUT-HIRN-SCHRANKE

Die Blut-Hirn-Schranke ist eine selektive Barriere zwischen Blutkreislauf und ZNS, die das Gehirn als zentral steuerndes Organ vor beispielsweise im Blut befindlichen Pathogenen schützt. Die Existenz dieser Barriere wurde erstmals 1885 beschrieben (Ehrlich 1885). In einem Experiment wurde Ratten intravenös der Farbstoff Anilin appliziert, um so das „Sauerstoffbedürfnis“ der Organe zu spezifizieren. Dabei stellte man fest, dass sich periphere Organe anfärben ließen, das Gehirn aber nicht. Heute weiß man, dass die Blut-Hirn-Schranke von einem nicht-fenestrierten Endothel (kontinuierliches Endothel) gebildet wird, in welchem die Zellen durch *tight junctions* (Zonula occludens) fest verbunden sind (Muir and Peters 1962; Bradbury 1985). Den Endothelzellen sind Perizyten aufgelagert, die mit ihren Fortsätzen die Endothelzellen umspannen und so die Kapillarstruktur stabilisieren (Farrell, Stewart et al. 1987). Als weiterer wesentlicher Bestandteil sind Astrozytenfortsätze an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt (Lassmann, Zimprich et al. 1991).

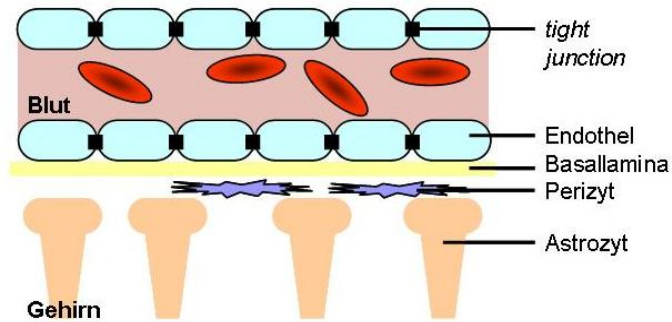


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus der Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke wird von einem nicht-fenestrierten Endothel gebildet, dessen Zellen fest über *tight junctions* verknüpft sind. Der Endothelschicht ist eine Basallamina aufgelagert, die die Endothelzellen umspannen und so für die Stabilität der Blutkapillare sorgen. Als weiterer Bestandteil sind Astrozytenfortsätze an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt (modifiziert nach: Expert Reviews in Molecular Medicine© 2003 Cambridge University Press; Vol. 5).

Im Wesentlichen wird die Schrankenfunktion der Blut-Hirn-Schranke durch die *tight junctions* bedingt. Die festen Zell-Zell-Verbindungen zwischen Endothelzellen erlauben annähernd keinen parazellulären Transport (Newton 2006), so dass der Stoffaustausch zum Gehirn hauptsächlich transzellulär durch die Endothelzellen erfolgen muss (Fagerholm 2007). Durch *tight junctions* hindurch diffundieren nur Moleküle mit einem Durchmesser von etwa 0,2 nm wie Wasser, Glycerin und Harnstoff (Brightman and Reese 1969).

1.3.2 NEUROINFLAMMATION

Unter Neuroinflammation versteht man im Allgemeinen eine chronische Immunantwort im ZNS. Neuroinflammation tritt bei einer Vielzahl von Erkrankungen wie Multipler Sklerose oder auch Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson auf. Vermutlich spielen hierbei Mikroglia eine zentrale Rolle im zerstörten oder infizierten Gewebe (Streit 2006). Bisher ist der Prozess der Neuroinflammation jedoch unzureichend charakterisiert. Aufgrund der enormen Stabilität der Blut-Hirn-Schranke sowie der Toleranz gegenüber transplantiertem Gewebe (Shirai 1921) wurde das ZNS immunologisch lange als benachteiligt angesehen (McGeer and McGeer 1998). Bekannt ist, dass nekrotische Endothel- und Epithelzellen proinflammatorische Zytokine wie IL-6, IL-1 und TNF α ausschütten, die Mikroglia aktivieren und rekrutieren (Gehrmann, Matsumoto et al. 1995). Auch andere Substanzen wie z.B. das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS) können Mikroglia aktivieren (Bronstein, Perez-Otano et al. 1995). Die Aktivität der Mikrogliazellen variiert innerhalb unterschiedlicher Hirnregionen. So sind Mikroglia der grauen Substanz dazu in der Lage, zelluläre Reste zu phagozytieren und Antigene zu präsentieren, wohingegen Mikroglia der

weißen Substanz lediglich extrazelluläre Abfallprodukte eliminieren (Dissing-Olesen, Ladeby et al. 2007). Charakteristisch für viele neurodegenerative Erkrankungen ist ein positiver Rückkopplungsmechanismus, bei dem es zu mehr und mehr Neurodegeneration durch toxische Substanzen kommt. Aktivierte Mikrogliazellen phagozytieren toxische Substanzen. Dabei sezernieren sie zelluläre Stoffe und Myelin, die weitere Mikrogliazellen aktivieren können (Gehrmann, Matsumoto et al. 1995).

Neben der Aktivität der Mikroglia und damit verbundener Neurodegeneration durch Substanzen wie Interleukine, $\text{TNF}\alpha$, Prostaglandine (PG), Stickstoffmonoxid (NO) und reaktive Sauerstoffradikale (ROS), die in erhöhter Konzentration bei Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen nachgewiesen werden konnten (van Horssen, Schreibelt et al. 2008), können Neurotoxine auch direkt Neurone schädigen (Liu and Hong 2003) (Abbildung 3).

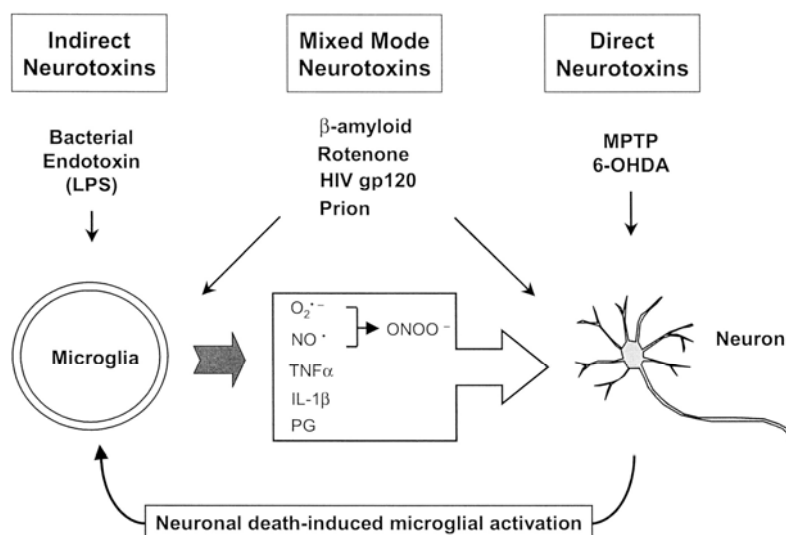


Abbildung 3: Übersicht indirekter, direkter und gemischter Neurotoxine

Indirekte, direkte und „gemischte“ Neurotoxine können Neurone schädigen. Indirekte und „gemischte“ Neurotoxine aktivieren Mikrogliazellen, die proinflammatorische Zytokine und reaktive Sauerstoffmoleküle produzieren, die Neurone abtöten. Gemischte Neurotoxine können wie direkte Neurotoxine Neurone direkt zerstören. Durch neuronalen Tod können Mikroglia ebenfalls aktiviert werden (aus Liu et al. *The Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics*, 2003 (Liu and Hong 2003)).

Produzenten von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen im ZNS sind neben Gliazellen auch die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke selbst (Vadeboncoeur, Segura et al. 2003), wodurch Effektorzellen des peripheren Immunsystems ins ZNS rekrutiert werden. Neben Chemoattraktanten sind Adhäsionsmoleküle maßgeblich an der

Einwanderung von inflammatorischen Zellen ins ZNS beteiligt (Dopp, Breneman et al. 1994). Das Zelladhäsionsmolekül *vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1 dirigiert diese Rekrutierung im Wesentlichen durch die Bindung von $\alpha 4\beta 1$ Integrin (*very late antigen* (VLA)-4) (Dopp, Breneman et al. 1994; Wong, Prameya et al. 1999; Laschinger and Engelhardt 2000), das konstitutiv von den meisten mononukleären Leukozyten exprimiert wird (Foster 1996). Studien konnten zeigen, dass VCAM-1 von gesundem Hirngewebe nicht gebildet wird (Brosnan, Cannella et al. 1995). Im Gegensatz dazu konnte VCAM-1 in chronisch-aktiven Läsionen bzw. auf Endothel- und Mikrogliazellen bei Multipler Sklerose nachgewiesen werden (Cannella and Raine 1995). Außerdem konnte gezeigt werden, dass VLA-4 defiziente Antigen-spezifische T-Zellen nicht in der Lage sind die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Baron, Madri et al. 1993; Kuchroo, Martin et al. 1993). Neben der Interaktion von VCAM-1 und VLA-4 vermittelt auch das Adhäsionsmolekül *intracellular adhesion molecule* (ICAM)-1 durch die Bindung mit *Lymphocyte function-associated antigen* (LFA) 1, das auf aktivierten T-Zellen zu finden ist, die Adhäsion an Endothelzellen (Sligh, Ballantyne et al. 1993). Anders als VCAM-1 wird ICAM-1 in geringer Zahl von Endothelzellen der Blutgefäße auch im gesunden ZNS exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass sich eine erhöhte Zahl ICAM-1 in akuten Läsionen bei Multipler Sklerose nachweisen ließ (Sobel 1990), die sowohl topographisch als auch zeitlich mit der Infiltration von Leukozyten korreliert werden konnte (Washington, Burton et al. 1994).

1.4 MULTIPLE SKLEROSE

Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste neurologische Erkrankung im jungen Erwachsenenalter (Sanders and De Keyser 2007). Es handelt sich um eine chronische, inflammatorische, demyelinisierende und neurodegenerative Erkrankung bei der es zur Ausprägung multipler sklerotischer Plaques im ZNS kommt, die der Erkrankung ihren Namen gaben. Trotz intensiver Forschungsarbeiten ist die Ätiologie der MS bis heute weitgehend unbekannt. Seit einiger Zeit geht man davon aus, dass es sich um eine autoimmune Reaktion handelt (McFarlin and Lachmann 1989), bei der es zur Einwanderung von Leukozyten in Gehirn und Rückenmark und konsekutiver Zerstörung von Myelinscheiden und neuroaxonaler Schädigung kommt (Stohl and Gonatas 1978).

Der Krankheitsverlauf bei einzelnen Patienten ist heterogen und nicht vorhersehbar (Lucchinetti, Bruck et al. 1996; Lassmann, Bruck et al. 2001). Im Wesentlichen werden drei Verlaufsformen unterschieden (Lublin and Reingold 1996).

I. schubförmiger Verlauf (*relapsing-remitting*): gekennzeichnet durch klare Schübe mit vollständiger Remission oder verbleibenden Residuen, wobei zwischen den Schüben keine Progression der Erkrankung festzustellen ist

II. primär chronisch-progredienter Verlauf: zunehmende Verschlechterung von Krankheitsbeginn an, wobei einzelne Plateauphasen und geringfügige Verbesserungen möglich sind.

III. sekundär chronisch-progredienter Verlauf: Übergang der schubförmigen MS in eine Phase progredienter Verschlechterung, in der teilweise noch Schübe auftreten sowie geringfügige Remissionen oder Plateaus.

1.4.1 PATHOGENESE, SYMPTOMATIK UND THERAPIE

Derzeit wird davon ausgegangen, dass die Krankheitsgenese der MS multifaktoriell bedingt ist, bei der genetische als auch umweltbedingte Faktoren eine Rolle spielen. Die Prädisposition der Haplotypen HLA-DR2 und HLA-A3 konnten eindeutig für MS nachgewiesen werden (Bertrams and Kuwert 1976; Hillert, Kall et al. 1994). Außerdem zeigten Studien mit monozygoten Zwillingen eine 20-30 %ige Konkordanz an MS zu erkranken (Ebers, Bulman et al. 1986; Willer, Dymment et al. 2003). Umweltfaktoren konnten bislang nicht eindeutig identifiziert werden. Diskutiert werden Infektionskrankheiten mit mikrobiellen Pathogenen (Casetta and Granieri 2000), die durch molekulares Mimikry die Immunantwort effektiv beeinflussen. Aufgrund der Ähnlichkeit antigener Bestandteile von Infektionserregern und Zellen des eigenen Organismus kann es zur Bildung von Autoantikörpern und autoaggressiver T-Zellen kommen (Benoist and Mathis 2001). In diesem Zusammenhang werden meist Viren (Wekerle 1998; Meinl 1999) wie z.B. das Masernvirus (Burgoon, Owens et al. 1999) oder das Epstein-Barr-Virus (Bray, Bloomer et al. 1983) genannt.

Statistisch belegt ist, dass die Prävalenz in der äquatorialen Ebene sehr gering ist, in Europa und Nordamerika hingegen 20-100 Menschen von 100.000 an MS erkrankt sind (Ebers and Sadovnick 1993).

MS wird als Autoimmunerkrankung klassifiziert, wobei der Auslöser für die Immunreaktion bisher nicht bekannt ist. Die wesentlichen Merkmale der MS sind scharf begrenzte Demyelinisierungen, die mit Entzündung, astrozytärer Gliose und Neurodegeneration einhergehen (Silber and Sharief 1999; Bitsch, Schuchardt et al. 2000). Myelinreaktive T-Zellen, die in der Peripherie aktiviert werden, durchwandern beim Patienten die Blut-Hirn-Schranke, zerstören Parenchymzellen und sezernieren proinflammatorische Zytokine wie IL-2, Interferon- (IFN) γ und TNF α (Cannella and Raine 1995), welche andere Zellen des Immunsystems über einen chemischen Gradienten anlocken, aktivieren und zum Zusammenbrechen der Blut-Hirn-Schranke führen (Martino and Hartung 1999) (Abb.4).

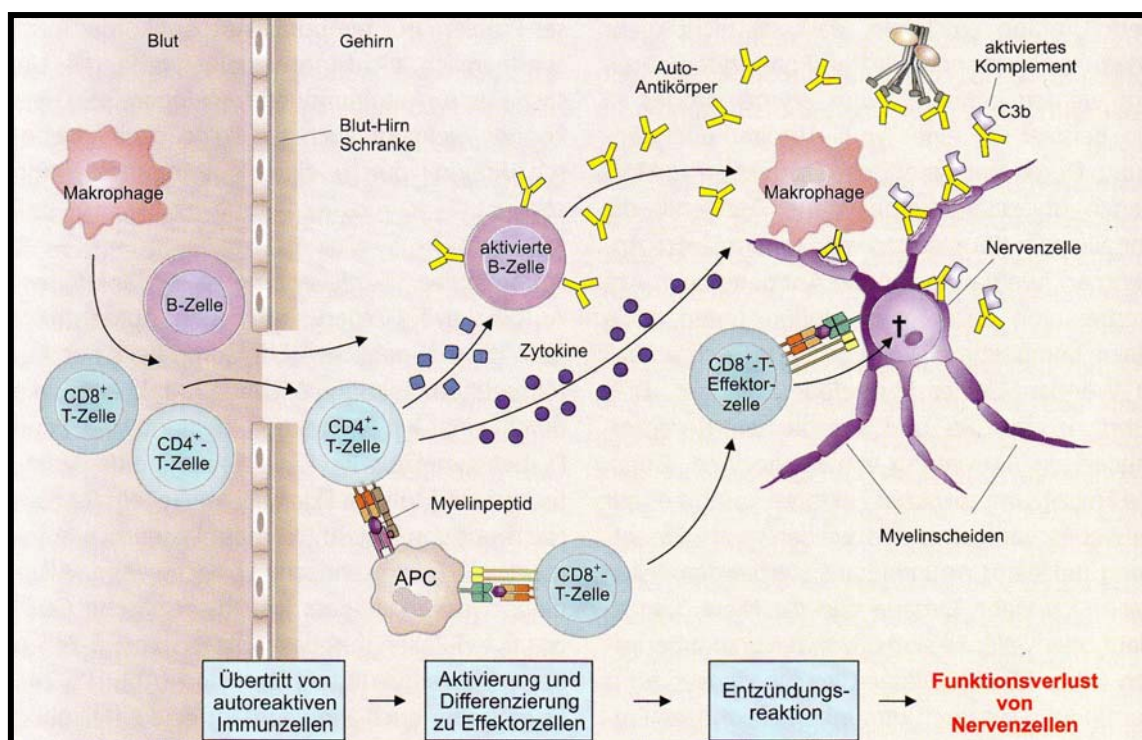


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Immunreaktion bei Multipler Sklerose

Nach Antigen-Kontakt überqueren autoreaktive T-Zellen die Blut-Hirn-Schranke und gelangen ins ZNS, wo sie nach Differenzierung zur Effektorzellen nach erneutem Antigen-Kontakt Zytokine sezernieren. Die Ausschüttung der Zytokine führt zum Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke und lockt weitere Effektorzellen des Immunsystems (Makrophagen, Granulozyten, NK-Zellen und B-Lymphozyten) ins ZNS. Die Aktivität der eingewanderten Effektorzellen führt letztendlich zu Demyelinisierung und Neurodegeneration (aus Immunologie - Grundlagen und Wirkstoffe: Vollmar, A. Wissenschaftliche Verlagsges. 2005).

Durch die stark erniedrigte Integrität der Blut-Hirn-Schranke können Makrophagen, Granulozyten, B-Zellen und NK-Zellen ins ZNS einwandern und zur fortschreitenden

Zerstörung der Myelinscheiden durch proinflammatorische Zytokine (Rieckmann, Albrecht et al. 1995), Antikörper (Berger, Rubner et al. 2003), freigesetzte Sauerstoffradikale (Bagasra, Michaels et al. 1995; Steinman 1996) und Aktivierung des Komplementsystems (Storch, Piddlesden et al. 1998) beitragen. Zytotoxischen CD8-T-Zellen wird ebenfalls eine zentrale Rolle beim Pathomechanismus der MS zugeschrieben (Bitsch, Schuchardt et al. 2000). CD8-T-Zellen können indirekt oder direkt Gewebeschäden verursachen (Jurewicz, Biddison et al. 1998) und vermehren sich klonal in ZNS-Läsionen (Jacobsen, Cepok et al. 2002).

Symptomatisch äußert sich die Entzündungsreaktion mit einhergehender Neurodegeneration bei MS durch Sensibilitätsstörungen vor allem in den unteren Extremitäten (Poser 1980; Silber and Sharief 1999). Bei vielen Patienten mit schubförmiger MS kommt es häufig zu einer Retrobulbärneuritis oder einer Optikusneuritis, was zu einer Verminderung der Sehschärfe führt. Aufgrund entstehender entzündlicher Plaques im Hirnstamm kann es zu Störung der Augenmotorik (Auftreten von Doppelbildern) kommen, sowie Störungen der Augenmotilität (Nystagmus). Ebenfalls können bei Hirnstammschädigungen Schwindelgefühl oder Gleichgewichtsstörungen auftreten, sowie Trigeminasneuralgien oder Fazialisparesen. 75 % aller Patienten leiden unter zerebellären Symptomen wie Ataxie, Intentionstremor, Dysdiadochokinese oder Sprachstörungen. Bei Plaquebildung im Rückenmark kommt es zu so genannten Pyramidenbahnsymptomen und/oder -paresen (motorische Störungen, erhöhter Muskeltonus und Spastik). Viele Patienten leiden auch unter Blasen- und Mastdarmstörungen sowie unter psychischen Erkrankungen (Poser 1980).

Therapeutisch werden meist Immunsuppressiva wie Mitoxantron (Gonsette 1996) oder immunmodulatorisch Substanzen (pathophysiologisch ansetzende Therapie) wie Glatirameracetat (Abramsky, Teitelbaum et al. 1977) und Interferon- β (Mendes and Sa) gegeben. Neuere Therapieansätze zielen unter anderem auf die Transmigration von Leukozyten in ZNS mittels VLA-4-Hemmung durch Antikörper (Natalizumab) ab (Miller, Khan et al. 2003) bzw. hindern Leukozyten daran aus den lymphatischen Organen ins Blut zu wandern (Fingolimod) (Brinkmann, Davis et al. 2002).

1.4.2 EXPERIMENTELLE AUTOIMMUNE ENZEPHALOMYELITIS

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist das anerkannte Tiermodell im Bereich der MS-Forschung (Sospedra and Martin 2005). Der Ursprung dieses Tiermodells ist auf Forschungsarbeiten von Thomas River 1933 zurückzuführen, der entzündetes ZNS-Homogenat von Patienten in Primaten transferierte, um unerwünschte Begleiterscheinungen (Lähmungen) bei der Vakzinierung gegen Tollwut zu untersuchen (Baxter 2007).

EAE kann heute in einer Vielzahl von Tierarten, wie Maus, Ratte, Hamster, Meerschweinchen und Affe mittels aktiver Immunisierung ausgelöst werden. Hierzu wird der jeweiligen Spezies ein rekombinantes Myelin-Peptid injiziert (Panitch and Ciccone 1981; Yoshimura, Kunishita et al. 1985; Ben-Nun, Mendel et al. 1996), welches dem Immunsystem über MHC-II präsentiert wird.



Abbildung 5: bildlicher Vergleich zweier Mäuse (EAE/gesund)

Das Foto zeigt zwei Mäuse im Vergleich. Links: EAE induzierte Maus mit Symptomen. Rechts: gesunde Maus (aus: Immunologie: Janeway, CA. Spektrum Akademischer Verlag 2002).

Je nach Wahl des Antigens können unterschiedliche Verlaufsformen der MS imitiert werden. Eine durch MBP ausgelöste EAE verläuft meist akut monophasisch, wohingegen eine PLP-induzierte EAE einen schubförmigen Verlauf zeigt (Abb. 5). Als weiteres Autoantigen wird das MOG verwendet, welches einen chronischen Krankheitsverlauf verursacht (Gold, Linington et al. 2006; Stromnes and Goverman 2006). Untersuchungen haben gezeigt, dass eine durch MOG ausgelöste EAE annähernd alle Merkmale der humanen MS-Pathologie widerspiegelt (Storch, Stefferl et al. 1998). In C57Bl/6 Mäusen, bei denen EAE mittels MOG₃₅₋₅₅-Peptid ausgelöst wurde, entwickelte sich eine chronische Erkrankung, mit sich überlagernden Schüben (Mendel, Kerlero de Rosbo et al. 1995) und zellulären Infiltraten, Demyelinisierung und axonalen Schädigungen, belegt durch

histologische Schnitte (Sakuma, Kohyama et al. 2004). Neben des Selbst-Antigens sind zum Auslösen der EAE zwei Adjuvantien nötig: Komplettes Freundsches Adjuvans und Pertussis Toxin. Das Freundsches Adjuvans bewirkt vermutlich, dass Zellen (v. a. des angeborenen Immunsystems) zur Präsentation der Selbst-Peptide anregt werden (Yang, Strong et al.). Die Rolle von Pertussis Toxin hingegen ist unklar. Es wird davon ausgegangen, dass Pertussis Toxin die Blut-Hirn-Schranke für Leukozyten durchlässig macht. So können autoreaktive Zellen in ZNS einwandern und eine Autoimmunreaktion hervorrufen. Allerdings hat Pertussis Toxin auch eine direkte Wirkung auf Leukozyten. So scheint die Gabe von Pertussis Toxin das *homing*-Verhalten der Leukozyten zu verändern (Taub, Rosett et al. 1972).

Die EAE kann auch durch den Transfer autoreaktiver, myelinspezifischer T-Zellen (adoptiver Transfer) von kranken in naive Mäuse oder Ratten (Pettinelli and McFarlin 1981) ausgelöst werden. Derzeit existieren Modelle die auf einem CD4+- und auf einem CD8+-vermittelten Mechanismus beruhen (Huseby, Liggitt et al. 2001; Stromnes and Goverman 2006).

1.5 MITOGEN-AKTIVIERTE PROTEINKINASEN (MAPK)

Zellen reagieren permanent auf Signale aus ihrer Umwelt. Diese Signale lösen festgelegte Programme (Signalkaskaden) innerhalb einer Zelle aus und aktivieren diese somit. Durch Einwirken von äußeren Einflüssen wie zellulärer Stress (Hitzeschock, UV-Licht, Zytokine, osmotischer Druck), Wachstumsfaktoren oder mitogene Stimuli werden spezifisch die intrazellulären Signalkaskaden der MAPKs aktiviert (Pearson, Robinson et al. 2001). MAPKs sind konservierte Protein-Serin/Threonin-Kinasen, die nach Stimulation unzählige zelluläre Prozesse regulieren. Den MAPKs werden drei Hauptmitglieder zugeordnet: die Extrazellulär-Signal regulierte Kinase 1 und 2 (ERK 1/2), die cJun-NH₂-terminalen Kinasen 1, 2 und 3 (JNK 1/2/3) und p38 (Liu, Guyton et al. 1996; Kyriakis and Avruch 2001).

Wird in Folge eines Stimulus die Signalkaskade einer MAPK aktiviert (ERK1/2 meist mitogene Stimuli und Wachstumsfaktoren, p38 und JNK 1/2/3 bevorzugt durch zellulären Stress), wird zunächst eine MAPKKK phosphoryliert, oder diese interagiert mit GTP-bindenden Proteinen der Ras/Rho Superfamilie (Kolch 2000; Dan, Watanabe et al. 2001; Pearson, Robinson et al. 2001). Die MAPKKK phosphoryliert anschließend eine MAPKK,

die daraufhin ERK 1/2, JNK 1/2/3 oder p38 an einem Threonin- und Tyrosinrest (TXY-Motiv) phosphoryliert (Abb. 6). Diese zweifache Phosphorylierung bewirkt eine Konformationsänderung des Enzyms, wodurch die enzymatische Aktivität sowie die Substratbindung gesteigert werden (Brancho, Tanaka et al. 2003; Wood, Thornton et al. 2009). Die Intensität und Dauer der MAPK-Aktivierung wird über einen negativen Rückkopplungsmechanismus über dual-spezifische Phosphatasen, welche die MAPKs dephosphorylieren kontrolliert (Farooq and Zhou 2004).

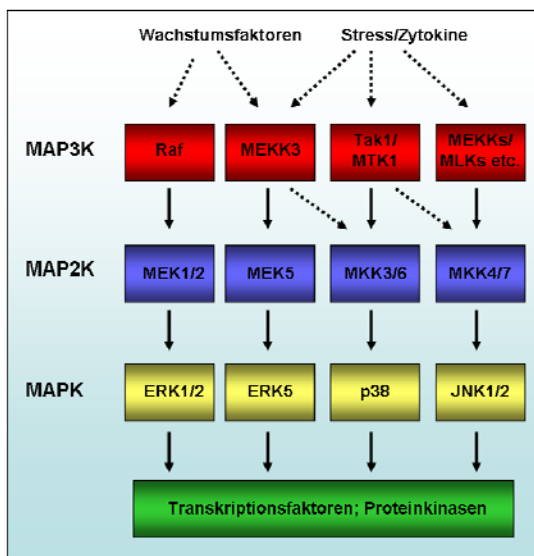


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Signalkaskade der MAP Kinasen

Die MAP Kinasen p38, JNK und ERK werden durch externe Stimuli aktiviert (MAPKKK-MAPKK-MPAK (p38/JNK/ERK)). Die MAP Kinasen phosphorylieren anschließend die 5 Untergruppen der MKs (MAPK-MK), die zelluläre Prozesse regulieren (modifiziert aus **Wilkinson et al.** FASEB Journal, 2000, (Wilkinson and Millar 2000)).

1.5.1 p38-SIGNALWEG

Die MAPK p38 steht seit 1994, als Lee und Mitarbeiter zeigen konnten, dass p38 eine Schlüsselrolle bei der TNF α -Biosynthese spielt (Lee, Laydon et al. 1994), im Interesse medizinischer Forschung. Derzeit kennt man vier p38-Isoformen (p38 α /MAPK14, p38 β /MAPK11, p38 γ /MAPK13, p38 δ /MAPK14), die teilweise unterschiedlich in Geweben exprimiert werden. Während man Transkripte von p38 α und β ubiquitär in allen Geweben findet, wird p38 γ stark in Muskelgewebe und p38 δ vermehrt in Niere und Lunge exprimiert (Jiang, Gram et al. 1997; Wang, Diener et al. 1997). Gemeinsames strukturelles Merkmal dieser Isoformen ist ein Thr-Gly-Tyr-Motiv, worüber diese durch Phosphorylierung an Threonin und Tyrosin als Antwort auf äußere Stressreize oder bei

Entzündung durch MAPKK3 und MAPKK6 aktiviert werden (Raingeaud, Gupta et al. 1995; Widmann, Gibson et al. 1999; Kyriakis and Avruch 2001).

Die MAPK p38 ist an vielen zellulären Prozessen beteiligt. Dies spiegelt sich sowohl in der Zahl ihrer Aktivatoren, als auch in der Zahl ihrer Substrate wider und zeigt gleichzeitig die Komplexität der intrazellulären Verarbeitung äußerer Einflüsse. Am besten charakterisierte Aktivatoren (Regulatoren) *upstream* von p38 sind die TGF-aktivierende Kinase (TAK) 1 (Yamaguchi, Shirakabe et al. 1995), die Proteinkinasen MEKK1-4 (Blank, 1996; Gerwins 1997; Lange-Carter 1994) und die *mixed lineage kinase* (MLK) 2/3 (Dorow 1995). Diese Regulatoren können jedoch auch andere MAPK-Signalwege (JNKs und ERKs) aktivieren.

Die MAPK p38 besitzt sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Substrate. Die zytoplasmatischen Substrate (hauptsächlich Enzyme) werden hier nicht weiter erörtert. Zu den nukleären Substraten zählen zahlreiche Transkriptionsfaktoren aber auch Kinasen, die durch p38 phosphoryliert werden. Die p38 aktiviert stressinduziert z.B. die Transkriptionsfaktoren *activating transcription factor* (ATF) 2 (Lee, Bahn et al.; Raingeaud, Gupta et al. 1995) und *homologous protein* (CHOP) (Wang and Ron 1996). Des Weiteren aktiviert p38 die *mitogen- and stress-activated kinases* (MSK) welche ihrerseits den Transkriptionsfaktor *cyclic AMP response element binding protein* (CREB) phosphoryliert (Kaiser, Wiggin et al. 2007). Neben MSK 1 und 2 interagiert p38 auch mit anderen sich im Nukleus befindenden Kinasen wie der Mitogen-aktivierten Proteinkinase aktivierten-Proteinkinasen (MAPKAPK oder kurz MK) 2 und 3 (Stokoe, Engel et al. 1992; McLaughlin, Kumar et al. 1996).

1.5.2 MITOGEN-AKTIVIERTE PROTEINKINASE AKTIVIERTE-PROTEINKINASE 2

Die Proteinkinase MK2 wird zur Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen-aktivierten Proteinkinasen gezählt. Weitere Mitglieder dieser Familie sind die phylogenetisch verwandten MK3 und MK5 sowie die p90 ribosomalen S6 Kinasen (RSKs) 1-4, die Mitogen- und stressaktivierten Kinasen (MSKs) 1-2 und die MAPK-interagierenden Kinasen (MNKs) 1-2 (Gaestel 2006). Diese Proteinkinasen werden spezifischen entweder von ERKs oder p38 aktiviert (Gaestel 2008). MK2 ist eine direkte Zielkinase von p38MAPK p38 α und p38 β und wird von diesen phosphoryliert. Das MK2-Gen ist im humanen Genom auf Chromosom 1 lokalisiert und kodiert für zwei alternative

Transkripte (MK2A und MK2B; Abb. 7) (Chevalier and Allen 2000; Kervinen, Ma et al. 2006). Das Transkript MK2A kodiert für ein 370 Aminosäure großes Protein, das hauptsächlich im Zytoplasma einer Zelle zu finden ist. Die Isoform MK2B kodiert hingegen für ein 400 Aminosäure großes Protein, welches am C-Terminus ein Nukleus-Lokalisationssignal (NLS) aufweist und hauptsächlich im Nukleus nicht aktivierter Zellen zu finden ist (Engel, Kotlyarov et al. 1998).

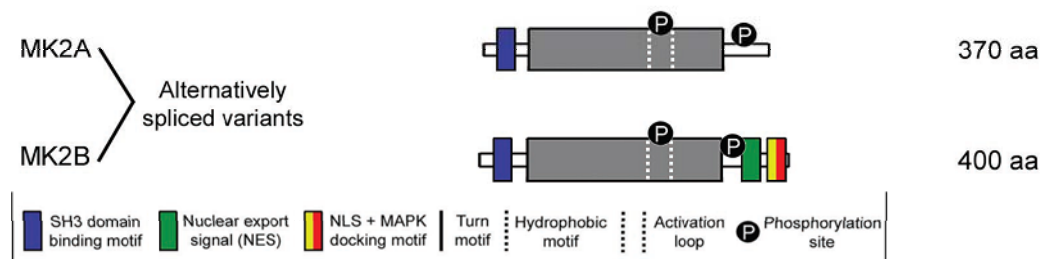


Abbildung 7: Schematische Darstellung der alternativen Splicingvarianten von MK2

MK2 besitzt zwei alternative Splicingvarianten (MK2A und MK2B), die für unterschiedliche Proteinprodukte kodieren. MK2A fördert ein Protein mit 370 Aminosäuren zu Tage, MK2B eines mit 400 Aminosäuren. Beide Varianten können doppelt phosphoryliert werden und besitzen ein SH3-Bindungsmotiv. MK2B besitzt im Gegensatz zu MK2A ein NES- sowie ein NLS-Signal (aus **Roux et al. *Microbiology and Molecular Biology Review*, June 2004, p. 320-344 (Roux and Blenis 2004)**).

Das NLS von MK2 weist eine D-Domäne auf, über die die Interaktion mit p38 vermittelt wird (Smith, Poteet-Smith et al. 2000). Nach Aktivierung einer Zelle wird MK2 aus dem Nukleus ins Zytosol transloziert und dient demnach unter anderem als „Shuttle“ um p38 aus dem Nukleus zu exportieren (Ben-Levy, Hooper et al. 1998). Man geht davon aus, dass dieser Prozess zum einen über die Bindung von p38 an MK2 und dadurch bedingte Maskierung der NLS, und zum anderen über das N-terminal der NLS gelegene Nukleus-Exportsignal (NES), welches durch Phosphorylierung aktiviert wird, gesteuert wird (Seternes, Johansen et al. 2002). N-terminal am MK2-Protein befindet sich eine Prolinreiche-Domäne (PRD), die zwei Src-Homologie 3 (SH3) Bindungsdomänen aufweist, zwischen denen die Phosphorylierungsstelle Thr25 liegt, die möglicherweise regulatorische Funktion bei der Protein-Protein-Interaktion von MK2 hat (Plath, Engel et al. 1994; Ben-Levy, Leighton et al. 1995). Neben der Thr25 kann MK2 an den Positionen Thr222, Ser272 und Thr334 phosphoryliert werden (Ben-Levy, Leighton et al. 1995). Essentielle Phosphorylierungsstellen für die Aktivität von MK2 sind vor allem die Threonin-Reste der Positionen 222 und 334. Der Threonin-Rest an Stelle (Thr222) liegt

innerhalb einer Calcium/Kalmodulin (CaM)-ähnlichen katalytischen Domäne von MK2, der Threonin-Rest 334 zwischen der katalytischen Domäne und dem NLS (Stokoe, Campbell et al. 1992; Ben-Levy, Leighton et al. 1995; Engel, Schultz et al. 1995).

MK2 wird ubiquitär exprimiert, ist jedoch in Magen, Herz, Skelettmuskel und Niere in größerer Menge zu finden (Stokoe, Campbell et al. 1992). Im Gehirn wird MK2 stark in Mikrogliazellen exprimiert (Culbert, Skaper et al. 2006). Neben der Funktion die Lokalisierung von p38 innerhalb der Zelle zu bestimmen, spielt MK2 eine zentrale Rolle bei vielen zellulären Prozessen und wird deshalb als Schlüsselkomponente in der Signalvermittlung innerhalb einer Zelle angesehen (Kotlyarov, Neininger et al. 1999; Kotlyarov, Yannoni et al. 2002). In Experimenten mit MK2-defizienten Tieren konnte gezeigt werden, dass die LPS-induzierte Synthese der proinflammatorischen Zytokinen TNF α , IL-1 β , IL-6 und IFN γ stark vermindert war, ebenso wie das Zytokin IL-10 (Kotlyarov, Neininger et al. 1999). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass MK2 bei der Produktion von COX-2 (Subbaramaiah, Marmo et al. 2003), IL-8 und GM-CSF (Winzen, Kracht et al. 1999), uPA (Han, Leng et al. 2002), MIP1 α (Culbert, Skaper et al. 2006) und SOCS3 (Ehrling, Lai et al. 2007) beteiligt ist. Bei der Regulation der Proteinproduktion nimmt MK2 durch post-transkriptionelle mRNA-Stabilisierung über Adenin-Uracil-reiche Elemente in der 3'-untranslatierten Region Einfluss auf die entsprechende Proteinsynthese (Neininger, Kontoyiannis et al. 2002). Dies geschieht auf indirektem Wege durch Phosphorylierung von Substraten, die eine RNA-bindende Domäne besitzen, wie z.B. Tristetraprolin (TTP) (Hitti, Iakovleva et al. 2006). Die MK2 ist auch bei der Migration humaner neutrophiler Granulozyten (Krump, Sanghera et al. 1997), sowie der Formierung des Aktin-Zytoskeletts (Lambert, Charette et al. 1999; Kotlyarov, Yannoni et al. 2002), neuronalen Funktionsstörungen (Thomas, Timmer et al. 2008) oder der Zell-Zyklus-Kontrolle (Manke, Nguyen et al. 2005) beteiligt.

1.5.3 MK2 BEI DER PATHOGENESE VON ERKRANKUNGEN

MK2 wird eine zentrale Rolle bei verschiedenen humanen Erkrankungen zugesprochen. Untersuchungen im Tiermodell konnten zeigen, dass MK2^{-/-} Mäuse im Vergleich zu WT Tieren weniger TNF α , IFN γ und IL-1 β als Antwort auf eine LPS-Behandlung produzieren und deshalb resistenter gegenüber endotoxischem Schock sind (Kotlyarov, Neininger et al. 1999). Die verminderte Produktion an proinflammatorischen Zytokinen in MK2^{-/-} führte

auch im Mausmodell für rheumatische Arthritis zu einem milderem Verlauf der Erkrankung (Hegen, Gaestel et al. 2006). Neben der Regulation proinflammatorischer Zytokine spielt MK2 auch bei der Expression von Adhäsionsmolekülen und β -Catenin, einem essentiellen Protein für die Integrität von *adherense junctions*, eine Rolle. Gorska und Mitarbeiter konnten zeigen, dass im Ovalbumin-induzierten Tiermodell für Asthma weniger VCAM-1 auf Endothelzellen der Lunge von MK2^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden konnte. Außerdem war die Expression von β -Catenin erhöht. Gorska und Mitarbeiter schlossen aus der Veränderten β -Catenin-Expression, dass die Stabilität der Blut-Lungen-Schranke im Vergleich zu WT erhöht war, was zu einem reduzierten Einwandern von T-Lymphozyten ins Gewebe führte. MK2^{-/-} Tiere zeigten deshalb verringerte Krankheitssymptomen (Gorska, Liang et al. 2007). Im experimentellen MPTP (*1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin*) -Modell für Parkinson konnte gezeigt werden, dass MK2-defiziente Tiere weniger Neuroinflammation und weniger Neurodegeneration der dopaminergen Neurone der *Substantia nigra*, aufgrund verminderte Produktion neurotoxischer Substanzen wie z.B. NO aufwiesen (Thomas, Timmer et al. 2008). Ebenso konnte im Tiermodell für Hirn-Ischämie gezeigt werden, dass das Fehlen von MK2 zu einer reduzierten Infarkt-Größe und weniger neurologischen Ausfällen führte (Wang, Xu et al. 2002). Überdies konnten Ghasemlou und Mitarbeiter demonstrieren, dass MK2 eine entscheidende Rolle bei Rückenmarksverletzungen spielt. Im Vergleich von WT und MK2^{-/-} Mäusen konnte bei MK2^{-/-} Tieren eine verbesserte Lokomotion nach Rückenmarksverletzung festgestellt werden. MK2^{-/-} Tiere wiesen außerdem weniger proinflammatorische Zytokine und nitrosylierte Proteine im verletzten Rückenmark auf, sowie weniger Neurodegeneration und weniger Demyelinisierung (Ghasemlou, Lopez-Vales et al.).

Basierend auf diesen Beobachtungen zur Funktion von MK2 bei Entzündungsreaktionen könnte MK2 eine Rolle bei MS bzw. dem Tiermodell EAE und der damit verbundenen Immunantwort und Neurodegeneration spielen.

1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Aufgrund vieler Hinweise, dass der p38-Signalweg bzw. die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-aktivierte Proteinkinase 2, das Substrat von p38 eine entscheidende Rolle bei Entzündungs- und Autoimmunreaktionen spielt, bestand das Ziel dieser Arbeit darin, die Rolle der Mitogen-aktivierten Proteinkinase aktivierten-Proteinkinase 2 bei der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis zu charakterisieren. Diese Untersuchung sollte Erkenntnis darüber liefern, ob Mitogen-aktivierte Proteinkinase aktivierte-Proteinkinase 2 ein potentiell Ziel zur Entwicklung neuer Therapieansätze bei Multipler Sklerose sein könnte.

Um diese Untersuchung durchführen zu können, sollte zunächst das Tiermodell experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis etabliert und der Verlauf der Erkrankung von Mitogen-aktivierte Proteinkinase aktivierte-Proteinkinase 2 *knockout* und Wildtyp Mäusen differenziert werden.

In einem nächsten Schritt sollten Untersuchungen zur Charakteristik der Entzündungsreaktion und Neurodegeneration tiefere Einblicke in die Beteiligung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen-aktivierten Proteinkinase 2 bei experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis geben.

Neben der histologischen bzw. immunhistochemischen Analyse sollte die Entzündungsreaktion auch molekularbiologisch untersucht werden. Die molekularbiologischen Untersuchungen sollten sich dabei maßgeblich auf den Entzündungsmediator Tumor-Nekrose-Faktor α und die Signaltransduktionskaskade des Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptors 1 konzentrieren.

2. MATERIAL & METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 TIERE

C57Bl/6 JOlaHsd (Wildtyp)	Harlan Winkelmann
C57Bl/6 JOlaHsd Mapkap2 ^{-/-} (<i>knockout</i>)	MH Hannover; AG Prof. Dr. M. Gästel

2.1.2 ZELLINIEN

hCMEC/D3	Labratories of Dr. Pierre-Olivier Couraud, Unit 567 INSERM
U937	AG Prof. K. T. Preissner, Biochemie des FB 11 Medizin der JLU

2.1.3 ANTIKÖRPER

<i>Antigen</i>	<i>reaktiv für u.a.</i>	<i>Konjugat</i>	<i>Firma</i>	<i>Artikel-Nr.</i>	<i>Methode</i>
CD3	Maus	FITC	ebioscience, San Diego, USA	11-0031	FACS
CD4	Maus	FITC	ebioscience, San Diego, USA	11-0043	FACS
CD8	Maus	FITC	ebioscience, San Diego, USA	11-0081	FACS
CD14	Maus	FITC	ebioscience, San Diego, USA	11-0141	FACS
CD19	Maus	FITC	ebioscience, San Diego, USA	11-0191	FACS
CD14	Mensch	PerCP Cy 5.5	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland	561116	FACS

CD49d	Mensch	Biotin	ebioscience, San Diego, USA	13-0499	FACS
α 4-Integrin	Mensch	-	Cell Signaling, NEB, Frankfurt, Deutschland	#4600	WB
Caspase 8	Maus	-	Cell Signaling, NEB, Frankfurt, Deutschland	#4927	WB
cFLIP	Maus	-	Cell Signaling, NEB, Frankfurt, Deutschland	#3210	WB
MK2	Maus Mensch	-	Cell Signaling, NEB, Frankfurt, Deutschland	#3042	WB
RIPK1	Maus	-	Cell Signaling, NEB, Frankfurt, Deutschland	#4926	WB
GAPDH	Maus Mensch	-	Cell Signaling, NEB, Frankfurt, Deutschland	#2118	WB
β -Aktin	Maus Mensch	-	Cell Signaling, NEB, Frankfurt, Deutschland	#4967	WB
Rabbit IgG	Maus Mensch	HRP	Cell Signaling, NEB, Frankfurt, Deutschland	#7074	WB
CD4	Maus	-	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland	AP20210PU-N	Immunhisto- chemie

CD8	Maus	-	LifeSpan Bioscience, Inc. (LSBio), Seattle, USA	LS-B3638	Immunhistochemie
goat anti-rabbit	Hase	Alexa 488	Invitrogen, Carlsbad, USA	A11029	Immunhistochemie
donkey anti-rat	Ratte	Cy 3	Dianove GmbH, Hamburg, Deutschland	712-165-150	Immunhistochemie

2.1.4 STREPTAVIDIN (SA)

SA	FITC	ebioscience, San Diego, USA
SA	PerCP Cy 5.5	ebioscience, San Diego, USA

2.1.5 PRIMER

<i>Human</i>		Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
		5' → 3'
VLA-4	vorwärts	GGCGATTTACAGATGCAG
	rückwärts	TTCCAAACAAGTGTTCCAC
GAPDH	vorwärts	CCACATCGCTCAGACACCAT
	rückwärts	GGCAACAATATCCACTTTACCAGA
<i>Maus</i>		Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
		5' → 3'
TNFR1	vorwärts	TGTGAAAAGGGCACCTTTACGGC
	rückwärts	GGCTGCAGTCCACGCACTGG
TNF α	vorwärts	CTTCTCATTCTGCTTGTG
	rückwärts	ACTTGGTGGTTTGCTACG

RIP Kinase	vorwärts	GACCCAGATAGATGTCCC
	rückwärts	CCTTAGTCAGTTTGCTCCA
cFLIP	vorwärts	ACAGGCAGAGGCAAGATAGC
	rückwärts	CAATTTTGGGAGCGAAGC
Caspase 8	vorwärts	GGCCTCCATCTATGACCTGA
	rückwärts	GCAGAAAGTCTGCCTCATCC
ICAM-1	vorwärts	CGCTGTGCTTTGAGAACTGT
	rückwärts	GGTGAGGTCCTTGCCTACTT
VCAM-1	vorwärts	GAACCCAAACAGAGGCAGAG
	rückwärts	GGTATCCCATCACTTGAGCAG
VLA-4	vorwärts	ACTGGCACCGTCTTTGTCTA
	rückwärts	CTCTTCCTTCCTCCCTGATG
IL-2	vorwärts	GAGTGCCAATTCGATGATGAG
	rückwärts	AGGGCTTGTTGAGATGATGC
IL-6	vorwärts	ACCACGGCCTTCCTACTTC
	rückwärts	CTCATTTCCACGATTTCCCAG
NFκB	vorwärts	GGATGGCTACTATGAGGCTGAC
	rückwärts	TTCGCTGGCTAATGGCTTG
GAPDH	vorwärts	TGACGTGCCGCCTGGAGAAA
	rückwärts	AGTGTAGCCCAAGATGCCCTTCAG

Maus	
Genotypisierung	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
	5' → 3'
MK2 200rc	CCCTCTCTACCTCTTTCTGTGAATGCC
TMK2 dl	CATGCCATGATGAGGTGCCTCTGC
Tneore	CTGTTGTGCCAGTCATAGCCG

2.1.6 KITS

BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific (Pierce), Langenselbold, Deutschland
EZ-Link® NHS-PEO ₄ -Biotinylation Kit	Thermo Scientific (Pierce), Langenselbold, Deutschland
QIAamp™ RNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
DirectPCR Lysis Reagent (Tail)	Viagen Biotech, Inc., Los Angeles, USA
GenomONE™ Neo EX HVJ Envelope Transfection Kit	Cosmobio Co., Ltd., Tokyo, Japan
QuantiChrom™ Nitric Oxide Assay Kit	BioAssay Systems, Hayward, USA
Quanti Fast SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Quantikine® murine TNFα ELISA-Kit	R&D Systems, WI-Nordenstadt, Deutschland
Quantikine® murine IGF-1 ELISA-Kit	R&D Systems, WI-Nordenstadt, Deutschland
RevertAid™ cDNA Synthesis Kit	Fermentas, Invitrogen, Carlsbad, USA

2.1.7 MARKER

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, Invitrogen, Carlsbad, USA
Fluorescent Long Range DNA Ladder	Jena Bioscience, Jena, Deutschland

2.1.8 GERÄTE

ELISA-Reader Multiscan EX	Thermo electron corporation, Langensfeld, Deutschland
Fusion FX7	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Light Cycler 1.5	Roche, Mannheim, Deutschland
Mikroskop (<i>Axioplan 2 fluorescence microscope</i>)	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Mini-PROTEAN® Tetra System	BIO RAD, München, Deutschland
Nalgene™ Cryo 1 °C Einfrierbox	Nunc GmbH, Langensfeld, Deutschland
Neubauer <i>improved</i> Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
SmartSpec™ Plus Spectrophotometer	BIO RAD, München, Deutschland
TissueRuptor	Qiagen, Hilden, Deutschland
Trans-Blot® SD Semi-dry transfer cell	BIO RAD, München, Deutschland

2.1.9 CHEMIKALIEN

Actinomycin D	Sigma Aldrich, Tachfkirchen, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bovine Serum Albumine, Fraction V (BSA)	Sigma Aldrich, Tachfkirchen, Deutschland
Bromphenolblau	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Citronensäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
DNase	Qiagen, Hilden, Deutschland
Glyzin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Interferon γ (IFN γ)	Relia Tech, Wolfenbüttel, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland

Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kollagenase IV	GIBCO (Invitrogen Corporation), Carlsbad, USA
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma Aldrich, Tachfkirchen, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma Aldrich, Tachfkirchen, Deutschland
MAPKAPK2 (h) siRNA	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
MOG ₃₅₋₅₅	Charité Berlin, Berlin, Deutschland
Mycobakterium tuberculosis (H37RA)	Difco Microbiology, Kansas City, USA
<i>non-fat</i> Milchpulver	Cell Signaling, NEB, Frankfurt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich, Tachfkirchen, Deutschland
Pertussis Toxin	Calbiochem (Merck4Bioscience), Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Taq Polymerase	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
TNF α (rhTNF α und rmTNF α)	Relia Tech, Wolfenbüttel, Deutschland

Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.10 LÖSUNGEN

β -Mercaptoethanol	Fluka, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Destilliertes Wasser (Ecotrain®)	Braun, Melsungen, Deutschland
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 100 %	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
FBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Glyzerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Griess Reagenz	Sigma Aldrich, Tachfkirchen, Deutschland
Hämalaun	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Luxol-Fast-Blue	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
10x PBS für Zellkultur (DPBS) steril	Lonza, Köln, Deutschland
Percoll	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Rotiphorese Gel 30 (30 % Acrylamid-Mix)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SB203580 (p38-Inhibitor <i>in solution</i>)	Calbiochem (Merck4Bioscience), Darmstadt, Deutschland
Trypsin (2,5g/l)	GIBCO (Invitrogen Corporation), Carlsbad, USA
Tween20	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.11 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Hybond ECL (Nitrocellulosemembran)	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
FACS-Röhrchen (0,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Küvette zur Quantifizierung von RNA (trUView Cuvette)	BIO RAD, München, Deutschland
Polycarbonatkapillaren für PCR	Genaxxon, Ulm, Deutschland
1,5 ml, 2 ml Eppendorfcups	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
15 ml, 50 ml BD Falcon™	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
6-Well-Platten, 96-Well-Platten (Cellstar®)	GreinerBioOne, Frickenhausen, Deutschland

2.1.12 PUFFER

10x Laufpuffer für SDS-PAGE	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland (Rotiphorese® 10x SDS-PAGE)
Lysepuffer für Erythrozyten	Qiagen, Hilden, Deutschland
FACS-Puffer (1 Liter)	0,5 % BSA 0,02 % NaN ₃ in 1x PBS
10x PBS (1 Liter)	80 g NaCl 2 g KH ₂ CO ₄ 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KCl pH 7,4

10x TBS (1 Liter)	24,6 g Tris 80 g NaCl pH 7,6
1x TBST (1 Liter)	100 ml 10 TBS 900 ml Ecotrain® Aqua (Aqua dest.) 0,01 % Tween 20
Lysierpuffer (250 ml) Zelllysepuffer für Proteinisolation	150 mM NaCl 20 mM Tris pH 7,4 1 mM EDTA 10 % Glyzerin 1 % NP40 0,01 % NaN ₃ (20 % β-Mercaptoethanol)
6x Ladepuffer (10 ml) Probenpuffer für Western Blot	375 mM Tris pH 6,8 55 % Glyzerin 12 % SDS 500 mM β-Mercaptoethanol 0,002 % Bromphenolblau
„Stripping-Buffer“ (100 ml)	0,76 g Tris 2 g SDS 700 µl β-Mercaptoethanol pH 6,8

2.1.13 FERTIG KULTURMEDIEN UND SPEZIALMEDIEN

RPMI 1640	PAN Biotech, Aldenbach, Deutschland
DEMED	GIBCO (Invitrogen Corporation), Carlsbad, USA
<i>microvascular endothelial growth medium</i>	ProVibro, Berlin, Deutschland
Einfriermedium	FBS 10 % DMSO
Verdaumedium (Isolation von Leukozyten aus dem ZNS)	DEMEM 1 mg/ml Kollagenase IV 30 U DNase
Medien (Gradient A und B) für die Isolierung von Leukozyten über ein Percoll-Kissen	Gradient A: 2,5 ml Percoll + 0,92 ml 1x PBS Gradient B: 0,75 ml Percoll + 2,5 ml DMEM- Medium

2.2 METHODEN

2.2.1 TIEREXPERIMENTELLE ARBEITEN

2.2.1.1 MÄUSE - GENOTYPEN

In dieser Arbeit wurden Mäuse der Genotypen C57Bl/6 J OlaHsd (Wildtyp; WT) und C57Bl/6 J OlaHsd MAPKAPK2^{-/-} (MAPKAPK2 *knockout*; MK2^{-/-}) verwendet. Die WT wurden von Harlan Winkelmann, die *knockout*-Tiere von der MH Hannover (AG Prof. Dr. Gästel) bezogen und in eigener Zucht im zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität in der konventionellen Tierhaltung vermehrt.

2.2.1.2 GENOTYPISIERUNG

Um eine Zuchtdepression aufgrund einer zu kleinen Population von MK2^{-/-} Mäuse zu vermeiden, wurden gelegentlich ein Wildtypier in die Linie gekreuzt. Aufgrund dessen mussten einige Tiere genotypisiert werden.

Bei Verpaarung homozygoter Elterntiere wurden die Nachkommen nur stichprobenartig genotypisiert.

2.2.1.3 PRÄPARATION GENOMISCHER DNA AUS MAUSSCHWÄNZEN

Für die Genotypisierung von MK2^{-/-} Mäusen wurde genomische DNA aus Schwanzspitzenbiopsien mittels des DirectPCR Lysis Reagent (Tail) der Firma Viagen Biotech, Inc. isoliert. Hierfür wurden zunächst 0,5 cm von der Schwanzspitze der Tiere abgenommen und diese in 200 µl DirectPCR Lysis Reagent (Tail), dem 0,3 mg/ml Proteinase K zugesetzt waren bei 55 °C über Nacht im rotierenden Thermoshaker inkubiert. Anschließend wurde das Lysat 45 min. bei 85 °C im Thermoshaker inkubiert, die nicht lysierten Reste (Haare) 10 sec. abzentrifugiert und 1 µl der Lösung für die Identifizierung von *knockout* Tieren in einen Reaktionsansatz für eine SYBR green basierte PCR eingesetzt.

2.2.1.4 IDENTIFIKATION VON MK2^{-/-} MÄUSEN

Knockout Tiere, Heterozygote und Wildtypiere wurden in dieser Arbeit mittels PCR und Verwendung des SYBR Green Mastermix von Qiagen und anschließender

Gelelektrophorese identifiziert. Aufgrund der Verwendung des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green konnte das Ergebnis der Gelelektrophorese fluoreszenzbasiert mittels Geldokumentationssystem analysiert werden.

Ansatz pro Probe:	10 µl Mastermix (Quanti Fast SYBR Green PCR Kit)
	6 µl H ₂ O
	1 µl TMK2 dl
	1 µl Tneorc
	1 µl MK2 200rc
	1 µl genomische DNA (Mausschwanz)
	<hr/>
	20 µl

Die PCR erfolgte unter folgenden Bedingungen:

	Vorgang	Dauer	Temperatur
<i>Hot start</i>	Denaturierung	15 min.	96 °C
34 Zyklen	Denaturierung	30 sec.	95 °C
	<i>Annealing</i>	45 sec.	64 °C
	Elongation	30 sec.	72 °C
		7 min.	72 °C
Kühlung	Kühlung	∞	4 °C

2.2.1.5 NARKOSE DER TIERE

Alle Tiere wurden vor einer Behandlung mit Isofluran betäubt. Hierzu wurde ein Papiertuch mit Isofluran getränkt und in einen Glasbehälter mit einsetzbarem Zwischenboden aus perforiertem Metall gelegt. Für die Narkose der Mäuse, wurden diese auf den Zwischenboden gesetzt, damit sie die narkotisierenden Isoflurandämpfe einatmeten.

2.2.1.6 TÖTUNG DER TIERE

Die Tiere wurden in verschiedenen Stadien der Erkrankung getötet, um immunologische und biochemische Untersuchungen zum Pathomechanismus der EAE durchführen zu können.

2.2.1.6.1 EUTHANASIE MITTELS CO₂

Für die Euthanasie mittels CO₂ wurden die Tiere in einen Plastikbehälter gesetzt. In diesen Behälter wurden 6 l CO₂ pro Minute eingeleitet.

2.2.1.6.2 PERFUSION DER TIERE

Die Tiere mussten perfundiert werden, um Gewebeschnitte für die Immunhistochemie anfertigen zu können. Hierzu wurden die Tiere mit einer Überdosis Isofluran getötet. Anschließend wurde ihnen der Brustkorb eröffnet und die Tiere an einen externen Kreislauf angeschlossen. Ihnen wurde eine Kanüle (0,45 mm x 200 mm) in den rechten Ventrikel geschoben und das linke Atrium durch einen Schnitt geöffnet. Die Tiere wurden unmittelbar mit ca. 10 ml 1x PBS gespült und anschließend mit ca. 10 ml 4 % PFA-Lösung fixiert.

2.2.1.7 MATERIALGEWINNUNG UND LAGERUNG

Um die Experimente für diese Arbeit durchführen zu können, wurde den Tieren nach ihrem Tod verschiedene Organe entnommen und für den Fortlauf der Versuche präpariert.

Um den Grad der Neurodegeneration im Gehirn der Mäuse zu untersuchen, wurde diesen nach Perfusion (siehe 2.2.1.6.2) Gehirn und Rückenmark entnommen. Sowohl Gehirn als auch Rückenmark wurden 24 h in 4 % PFA-Lösung nachfixiert und anschließend in 1x PBS bei 4 °C bis zur Einbettung in Paraffin gelagert.

Für die Gewinnung von Serum wurde den Mäusen durch Punktion der *Aorta abdominalis* ca. 400 µl Blut entnommen und in 1,5 ml Eppendorfcups für 2 h bei Raumtemperatur (RT) gelagert, um das Blut gerinnen zu lassen. Anschließend wurde das Blut 20 min. bei 14.000 rpm zentrifugiert, wobei sich der Blutklot (geronnene Bestandteile des Blutes) absetzte. Das Serum wurde abgenommen und bei -20 °C gelagert.

Andere Organe, deren Zellen für die relative Real Time-PCR, Durchflusszytometrie oder Proteinaufreinigung benötigt wurden, wurden nativ entnommen und in 1x PBS bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis kalt gestellt.

2.2.1.8 EXPERIMENTELLE AUTOIMMUNE ENZEPHALOMYELITIS

Die EAE ist anerkanntes Tiermodell zur Erforschung der MS. Um die Rolle von MK2 beim Pathomechanismus der EAE zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die EAE durch Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅-Peptid ausgelöst.

Typischerweise zeigt eine mit MOG₃₅₋₅₅-Peptid induzierte EAE einen chronischen Verlauf. Um die Schwere der Erkrankung bzw. den Verlauf zu quantifizieren, wurde ein klinischer *Score* (ähnlich dem EDSS beim Menschen) benutzt. Hierbei wird anhand des Grads der Behinderung eine Zahl zugeordnet, über die später quantifiziert werden kann. In dieser Arbeit wurde folgender Score verwendet:

Tabelle 1: klinischer Score zur Quantifizierung der EAE-Symptome

Score	Behinderung
0	gesund (keine Symptome)
1	Schwanzplegie
2	Hinterlaufschwäche bzw. -parese
3	Hinterlaufplegie
4	Hinterlaufplegie und Vorderlaufschwäche (Tetraparese)
5	<i>moribund</i> (Tod)

2.2.1.8.1 ETABLIERUNG DER EAE

Da das Tiermodell EAE nicht etabliert war, musste dies zunächst erfolgen. Hierzu wurden MOG-Peptide verschiedener Hersteller getestet, sowie unterschiedliche Konzentrationen der einzelnen Komponenten bei der Immunisierung.

2.2.1.8.2 IMMUNISIERUNG

Zur Untersuchung von EAE in C57Bl/6 J OlaHsd Wildtyp und MK2-/- *knockout* Tieren wurden ausschließlich Weibchen im Alter von 9-12 Wochen verwendet. Vor Beginn der Immunisierung wurden die Tiere narkotisiert (siehe 2.2.1.5). Dann wurde ihnen insgesamt 200 μ l Emulsion subkutan in Achseln und Leisten gespritzt (50 μ l pro Einstich). Außerdem wurde den Tieren am Tag der Immunisierung 300 ng Pertussis Toxin (PTx) injiziert. Zwei Tage später wurde die PTx-Gabe wiederholt.

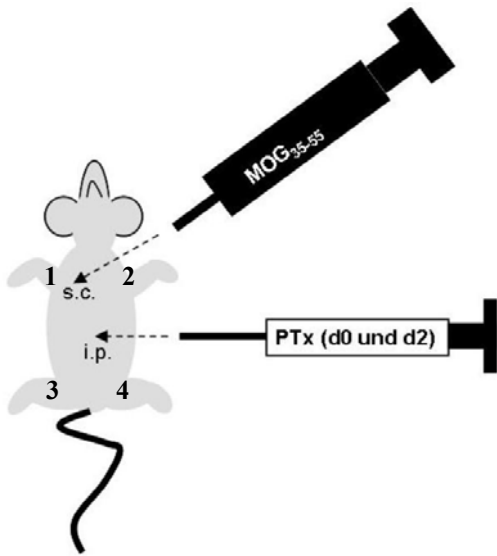


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Immunisierung von Mäusen

Bei der Immunisierung von Mäusen bekommen diese in die vier Flanken (1-4) subkutan 50 μ l Emulsion aus Selbst-Antigen (MOG₃₅₋₅₅) und inkomplettes Freundschem Adjuvans mit *Mykobakterium tuberculosis* appliziert, sowie 100 μ l Pertussis Toxin-Lösung intraperitoneal injiziert (d0). Die Injektion von 100 μ l des Pertussis Toxins-Lösung wird an Tag 2 (d2) nach der Immunisierung mit der Emulsion wiederholt.

2.2.1.8.3 EMULSIONSHERSTELLUNG

Für die Herstellung der Emulsion für die Immunisierung wurden 200 μ g MOG₃₅₋₅₅-Peptid in 1x PBS gelöst. Außerdem wurden 10 mg/ml abgetötete Mykobakterien (*Mycobakterium tuberculosis*) in inkomplettes Freundsches Adjuvans gegeben. Diese beiden Komponenten (ölige und wässrige Phase) wurden zu einer Emulsion vermischt.

2.2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.2.1 RNA-ISOLIERUNG

Um eine quantitative Aussage über die Expression der mRNA eines bestimmten Gens treffen zu können, kann die mRNA in der Real Time-PCR bestimmt werden. Hierfür wird Gesamt-RNA isoliert, zu cDNA revers transkribiert und exponentiell in einer PCR vervielfältigt. Um eine effiziente RNA-Isolation zu erzielen, wurde das QIAampTM RNA Blood Mini Kit verwendet.

2.2.2.1.1 RNA-ISOLIERUNG MIT QIAAMPTM RNA BLOOD MINI KIT

Nach Zellernte (Zellkultur) bzw. Zellisolation aus Gewebe (murine Primärzellen) wurden die Zellen 3 min. bei 1.600 rpm zentrifugiert und nach Herstellerprotokoll mit 350 µl RLT-Puffer lysiert. Anschließend wurde das Lysat über ein Säulchensystem mehrfach gewaschen und letztlich die aufgereinigte RNA mit 50 µl RNase/DNase freiem Wasser eluiert.

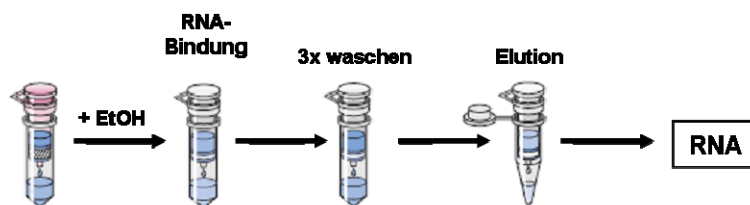


Abbildung 9: Schematische Darstellung der RNA-Isolation (nach QIAGEN)

Nach „Shreddern“ der Probe über ein QIAamp *shredder* Säulchen wurde die RNA-Lösung mit 70 % Ethanol gefällt und an die Membran eines QIAamp Säulchens gebunden. Nach drei Waschschritten mit unterschiedlichen Puffern (RW1 und RPE) und Trocknung des Säulchens, wurde die reine RNA mit RNase/DNase freiem Wasser eluiert. (modifiziert aus: QIAamp Blood Mini Kit Handbook; QIAGEN, Hilden, Deutschland)

2.2.2.1.2 PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN

Um die Konzentration und Reinheit der gewonnenen Nukleinsäurelösung zu bestimmen, wurde eine photometrische Messung mittels Spectrophotometer durchgeführt. Das Absorptionsvermögen der Nukleinsäuren wurde hierbei bei A_{260/280} nm bestimmt. Der Quotient aus A₂₆₀/A₂₈₀ reiner RNA-Proben liegt bei 1,9. Werte abweichend von diesem Wert weisen auf eine Kontamination der Probe hin. Die aufgereinigte Nukleinsäurelösung

wurde 1:10 verdünnt. 50 µl dieser Verdünnung wurden in eine Küvette eingesetzt und gegen Wasser gemessen.

Anschließend wurde aus der gewonnenen RNA unmittelbar cDNA synthetisiert.

2.2.2.2 REVERSE TRANSKRIPTION

Für die Synthese von cDNA aus der RNA-Matrize wurde das RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit verwendet.

Hierbei wurde das maximale Volumen (11,5 µl pro Ansatz) der RNA-Lösung (aus 2.2.2.1.1) für die Transkription eingesetzt. In einem ersten Schritt wurden dann Oligo (dT) Primer 5 min. bei 70 °C annealt.

11,5 µl RNA-Lösung	
1 µl Oligo (dT) Primer (0,5 ng/µl)	
<hr/>	
Σ 12,5 µl	

Nach Beendigung des ersten Schritts wurde die RNA auf 4 °C abgekühlt und folgende Reagenzien zugegeben:

4 µl 5x Reaktionspuffer	
0,5 µl RiboLock TM Ribonuklease Inhibitor	
2 µl dNTP Mix (10 mM)	
<hr/>	
Σ 19 µl	

Der Reaktionsansatz wurde 5 min. bei 37 °C inkubiert und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Dann wurde im finalen Schritt 1 µl RevertAidTM M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/µl) zugegeben (Endvolumen = 20 µl) und der Ansatz 1 h bei 42 °C inkubiert. Durch Erhitzen auf 70 °C für 10 min. wurde die Reaktion anschließend gestoppt und die fertig synthetisierte cDNA bei 4 °C gelagert. Für die Langzeit-Lagerung wurde die cDNA bei -20 °C eingefroren.

2.2.2.3 RELATIVE REAL TIME-PCR

Die Real Time-PCR ist ebenso wie die konventionelle reverse Polymerase Ketten Reaktion eine Methode zur exponentiellen Vervielfältigung eines Ausgangsprodukts. Bei der Real Time-PCR kann jedoch durch Einlagerung eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs eine Quantifizierung während der Reaktion erfolgen. Die Quantifizierung der PCR basiert dabei auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes (*Threshold Cycle* oder Ct-Wert). Der Ct-Wert gibt jenen PCR-Zyklus an, der die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt.

Im Lightcycler wurde eine Real Time-PCR mit verschiedenen Primern durchgeführt. Für neue Parameter wurden Primer entwickelt und Annealingtemperaturen ermittelt.

Bei der Durchführung der Real Time-PCR wurden alle Proben in Doppelwerten gemessen wobei immer der niedrigere Ct-Wert für die Auswertung benutzt wurde.

Ansatz pro Probe:	10 µl Mastermix (Quanti Fast SYBR Green PCR Kit)
	7 µl H ₂ O
	1 µl Vorwärtsprimer
	1 µl Rückwärtsprimer
	1 µl cDNA
	<hr/>
	20 µl

2.2.2.4 STANDARDISIERUNG NEUER PRIMER

Für die noch nicht standardisierte Messung der mRNA-Expression spezifischer Zielsequenzen wurden Primerpaare mit der *PrimerPremier* Software gebildet, die ein Produkt von > 200 bp der Zielsequenz in der Real Time-PCR ergaben. Die neuen Primer wurden mit artspezifischer cDNA in Vorversuchen getestet und die Bindung durch schrittweise Veränderung der Annealingtemperatur und -zeiten optimiert.

Tabelle 2: Zusammenfassung neu standardisierter Primerpaare für die Real Time-PCR

neu etablierte Primerpaare	<i>Annealing-Temperatur</i>	Amplifikationszeiten Denaturierung/Annealing/Extension
murines VLA-4	60 °C	10 / 15 / 20 sec.
murines ICAM-1	60 °C	10 / 15 / 20 sec.
murines VCAM-1	60 °C	10 / 15 / 20 sec.
murines IL-2	60 °C	10 / 15 / 20 sec.
murines IL-6	60 °C	10 / 15 / 20 sec.
murines TNF α	56 °C	30 / 30 / 60 sec.
murines NF κ B	60 °C	10 / 20 / 20 sec.

2.2.2.4.1 HERSTELLUNG VON STANDARDKURVEN

Um eine Aussage über die relative Veränderung der mRNA-Expression in Zellen treffen zu können, wurden Standardkurven der jeweiligen Zielsequenz erzeugt. Hierfür wurde zunächst eine hochkonzentrierte cDNA Probe mit der Zielsequenz als Ausgangsmaterial mittels Reverse-Transkriptase PCR hergestellt.

Ansatz pro Probe:	13 μ l H ₂ O
	2 μ l Puffer
	1 μ l dNTP Mix
	1 μ l Vorwärtsprimer
	1 μ l Rückwärtsprimer
	1 μ l cDNA
	1 μ l Taq Polymerase
	<hr/>
	20 μ l

Die PCR erfolgte unter folgenden Bedingungen:

	Vorgang	Dauer	Temperatur
<i>Hot start</i>	Denaturierung	5 min.	95 °C
30 Zyklen	Denaturierung	30 sec.	95 °C
	Annealing	30 sec.	56 °C bzw. 60 °C
	Elongation	60 sec.	72 °C
		5 min.	72 °C
Kühlung	Kühlung	∞	4 °C

Aus der gewonnenen hochkonzentrierten Zielsequenz wurde anschließend eine Verdünnungsreihe erstellt. Angenommen wurde, dass 1 μ l der cDNA 1×10^{10} Kopien der Zielsequenz enthielt. Das Ausgangsmaterial wurde in \log_{10} -Schritten bis 10^1 verdünnt (10^{10} - 10^1). Der Ct der zehn entstanden Proben wurden anschließend mittels Real Time-PCR in Dreifachwerten bestimmt, um anschließend eine Standardkurve zu berechnen.

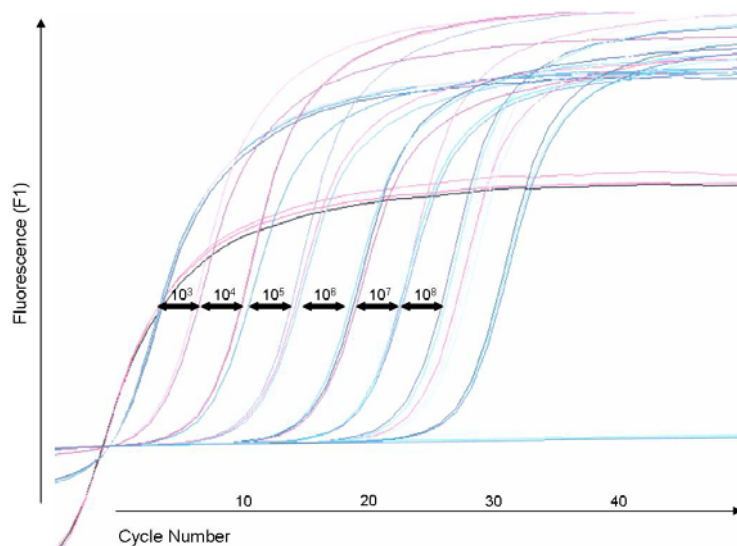


Abbildung 10: Beispiel einer Standardkurve

In der Reverse Transkriptase-PCR aufkonzentrierte Proben wurden logarithmisch verdünnt und in der Real Time-PCR gemessen, um die Steigung einer Standardgeraden zu ermitteln.

2.2.2.5 RELATIVE QUANTIFIZIERUNG

Um einen Unterschied in der Expression bestimmter mRNA-Level in zwei Gruppen von Tieren festzustellen, wurde relativ quantifiziert, da hierfür nicht die Ermittlung der exakten Kopienzahl in der Probe, sondern nur das Verhältnis der Gruppen zueinander ausschlaggebend ist. Entsprechend wurde ähnlich der „delta-delta Ct“-Methode (Ermittlung des relativen Expressionsunterschieds einer Probe; normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe) ausgewertet. Hierbei wird der Ct-Wert eines Zielgens auf den Ct-Wert eines Referenzgens (nicht reguliertes, konstant exprimiertes *housekeeping gene*: hier GAPDH) bezogen.

Zunächst wurde durch die jeweiligen Mittelwerte der einzelnen Verdünnungen eine Gerade (dekadischer Logarithmus) gelegt und deren Steigung wie folgt berechnet:

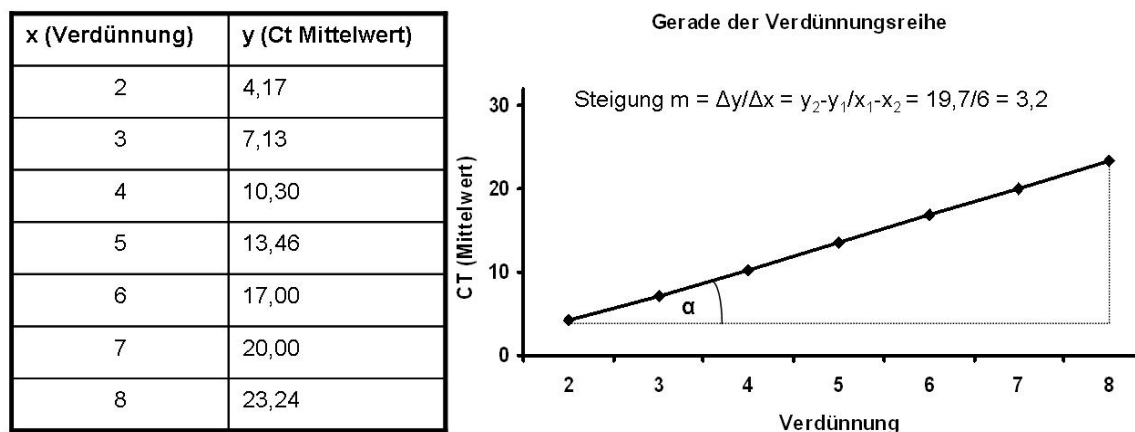


Abbildung 11: Beispiel einer Standardgeraden

Die Ct-Werte aus der Real Time-PCR der unterschiedlichen Verdünnungen der aufkonzentrierten Zielsequenz wurden als Gerade dargestellt, und deren Steigung berechnet, um darüber die Proben relativ zu quantifizieren.

Aus der Steigung und den Ct-Werten der Verdünnungsreihe wurde anschließend die Formel zur Berechnung von „Referenzen“ abgeleitet.

Formel zur Berechnung der „Referenz“ (Beispiel):

$$\text{„Ct Referenz“} = (\Sigma y + (\text{Steigung} \times \Sigma x)) / n \quad n = \text{Anzahl der Werte von } x$$

$$= 29,6208214$$

Nach Ermittlung des „Ct der Referenz“ wurde ein „Absolutwert“ der Probe errechnet.

„Absolutwert“ = $10^{(Ct_{\text{Probe}} - Ct_{\text{Referenz}})/(-\text{Steigung})}$

Für die Quantifizierung wurde schließlich ein Quotient aus dem Absolutwert der Probe und dem Absolutwert des *Housekeepers* GAPDH errechnet.

2.2.2.6 MRNA STABILITÄTS-ASSAY

Als Beweis für Veränderungen des mRNA-Niveaus innerhalb einer Zelle, kann ein mRNA-Stabilitäts-Assay durchgeführt werden. Spezifische Erhöhungen oder Reduktionen der mRNA Expression, aufgrund von zellaktivierenden Stimuli oder pharmakologischer Reagenzien können mittels des Assays untersucht werden. Das Chemotherapeutikum Actinomycin D, welches die Transkription aller Gene hemmt, die bestehenden Transkripte jedoch nicht beeinflusst, eignet sich als Reagenz um die Stabilität von mRNA zu untersuchen. Da bestehende Transkripte unbeeinflusst bleiben, kann somit die Wirkung spezifischer Inhibitoren bzw. Stimulatoren, die entweder post-transkriptionell oder transkriptionell Einfluss nehmen, untersucht werden.

Um die Spezifität eines Inhibitors zu testen, wurde ein mRNA-Stabilitäts-Assay in U937 Zellen durchgeführt. Hierzu wurden 2×10^5 Zellen in eine 6-Well-Platte ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 50 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D zugegeben. Nach 1 h, 3 h und 6 h wurden die Zellen pelletiert und RNA isoliert (Kapitel 2.2.2.1.1). Nachfolgend wurde cDNA synthetisiert und diese mittels Real Time-PCR analysiert.

2.2.2.7 BESTIMMUNG VON PROTEINKONZENTRATIONEN

Die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe kann auf mehreren Wegen erfolgen. In dieser Arbeit wurden zwei Methoden angewandt, um die Proteinmenge zu ermitteln. Je nach Anzahl der Proben wurde entweder die BCA- oder die Bradford-Methode verwendet.

2.2.2.7.1 PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG MITTELS BCA-KIT

Die Proteinmengenbestimmung nach der BCA-Methode beruht auf einer Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch Proteine in alkalischem Milieu und Hilfe von Bicinchoninsäure. Bei dieser Kupferreduktion entsteht ein lila Produkt, dessen Farbintensität photometrisch bei 540-590 nm gemessen werden kann. Die Intensität der Farbe wird mit einer

Albuminstandard-Verdünnungsreihe korreliert, wodurch eine quantitative Aussage über die Menge an Protein in der Probe getroffen werden kann.

Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe des Standards (Stocklösung 2 mg/ml) nach Angaben des Herstellers erstellt, alle Proben 1:10 verdünnt und je 25 µl von Probe und Standard in eine 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden 200 µl Reaktionsreagenz pro Well zugegeben und der Ansatz 30 min. bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die Platte auf RT gekühlt und bei 540 nm im ELISA-Reader gemessen.

2.2.2.7.2 PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG MITTELS BARDFORD-REAGENZ

Die Proteinmengenbestimmung nach Bradford beruht ebenfalls auf der Grundlage einer chemischen Reaktion, bei der es zum Farbumschlag des Reagenz kommt. Der Triphenylmethanfarbstoff bildet in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe. Durch die Komplexbildung verschiebt sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffs von 470 nm (rot) nach 595 nm (blau).

Für die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Reagenz wurde zunächst eine BSA-Standardreihe mit definierter Proteinkonzentration hergestellt. Hierfür wurde eine 1,35 mg/ml BSA-Stocklösung mit Wasser verdünnt (Proteinkonzentrationen der Standards: 0,1 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,6 mg/ml). Anschließend wurde das Bradford-Reagenz 1:5 verdünnt und je 1 ml dieser Verdünnung in eine Küvette gegeben. Dann wurden 20 µl Wasser (Blank), Standard oder Probe zugegeben, gemixt, 10 min. bei RT inkubiert und im Spektrophotometer gemessen.

2.2.2.8 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest wurde zur quantitativen Konzentrationsbestimmung von IGF-1 und die von TNF α im Serum von Mäusen verwendet. Der enzymatische Substratumsatz wurde im ELISA-Reader gemessen.

2.2.2.8.1 IGF-1 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG MIT QUANTIKINE® MURINE IGF-1 ELISA-KIT

Um die Konzentration von IGF-1 in Serum von Mäusen zu bestimmen, wurde das Quantikine® murine IGF-1 ELISA-Kit von R&D Systems verwendet. Das Kit beruht auf der Methode eines quantitativen Sandwich-ELISAs, bei dem auf eine mit monoklonalem

Antikörper beschichteten Platte Proben gegeben und inkubiert werden. Das lösliche Protein von Interesse wird an den immobilisierten Antikörper gebunden und kann somit durch Waschen isoliert werden. Im Folgenden wird ein zweiter Antikörper gegen IGF-1 auf die Platte gegeben, welcher enzymgekoppelt ist. Durch anschließende Inkubation mit einer Substratlösung wird eine enzymatische Reaktion ausgelöst, die zu einem Farbumschlag der Probe führt. Nach abstoppen der Enzymreaktion kann der Substratumsatz kolorimetrisch bestimmt werden. Anhand einer Standardreihe kann somit die Proteinkonzentration der Probe errechnet werden.

Für die Konzentrationsbestimmung von IGF-1 aus murinem Serum wurden zunächst alle Lösungen (Standardreihe, Kontrolle und Waschpuffen) nach Angaben des Herstellers erzeugt. Das murine Serum wurde folgend 1:500 mit Calibratur Diluent RD5-38 verdünnt. In die im Kit enthaltene *gecoatete* 96-Well-Platte wurden 50 µl Calibrator Diluent RD5-38 vorgelegt und anschließend 50 µl Standard, Kontrolle oder Probe in Doppelwerten zugegeben. Die Platte wurde 2 h bei 300 rpm auf dem ROTAMAX-Shaker bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte fünfmal mit 400 µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 100 µl Konjugat in jedes Well gegeben und dieses 2 h bei RT auf dem Shaker inkubiert. Es folgten fünf weitere Waschschrte mit 400 µl Waschpuffer. Anschließend wurde das Substrat nach Herstellerprotokoll aus Lösung A und Lösung B gemischt und 30 min. lichtgeschützt bei RT inkubiert. Die Enzymreaktion wurde nach Ablauf der 30 min. durch Zugabe der Stop-Solution gestoppt. Der Farbumschlag für die Quantifizierung wurde anschließend mit dem Multiscan ELISA-Reader bei 450 nm gemessen.

2.2.2.8.2 TNF α KONZENTRATIONSBESTIMMUNG MIT QUANTIKINE® MURINE TNF α ELISA-KIT

Um die Konzentration von IGF-1 in Serum von Mäusen zu bestimmen, wurde das Quantikine® murine TNF α ELISA-Kit von R&D Systems verwendet. Zunächst wurden alle Lösungen (Standardreihe, Kontrolle und Waschpuffen) nach Angaben des Herstellers erzeugt. In die Wells der im Kit enthaltenen *gecoateten* 96-Well-Platte wurden 50 µl des Assay Diluent RD1W vorgelegt und anschließend 50 µl Standard, Kontrolle oder Probe in Doppelwerten zugegeben. Die Platte wurde 2 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte fünfmal mit 400 µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 100 µl

Konjugat in jedes Well gegeben und dieses 2 h bei RT inkubiert. Es folgten fünf weitere Waschschritte mit 400 µl Waschpuffer. Anschließend wurde das Substrat nach Herstellerprotokoll aus Lösung A und Lösung B gemischt und 30 min. lichtgeschützt bei RT inkubiert. Die Enzymreaktion wurde nach Ablauf der 30 min. durch Zugabe der Stop-Solution gestoppt. Der Farbumschlag für die Quantifizierung wurde anschließend mit dem Multiscan ELISA-Reader bei 450 nm gemessen.

2.2.2.9 NO-ASSAY

Um NO quantitativ zu bestimmen, wurde in dieser Arbeit sowohl das QuantiChrom™ Nitric Oxide Assay Kit, als auch das Griess Reagenz verwendet. NO ist ein flüchtiges Radikal, das schnell zu Nitrit (NO₂) oxidiert. Deshalb erfolgt eine Quantifizierung von NO meist über die Messung von NO₂⁻/NO₃⁻ kolometrisch bei 540 nm.

2.2.2.9.1 NO-ASSAY MITTES QUANTICHROM™ NITRIC OXIDE ASSAY KIT

Um die Konzentration von NO im ZNS von EAE-kranken Tieren zu bestimmen, wurde der QuantiChrom™ Nitric Oxide Assay Kit verwendet. MK2^{-/-} und WT Tiere (n = 3 pro Gruppe) wurden an Tag 24 nach Immunisierung getötet und das ZNS nativ präpariert. Anschließend wurde das ZNS in 1 ml 1x PBS mittels TissueRuptor homogenisiert.

Nach Angaben des Herstellers wurde für das Assay zunächst eine Standardreihe ausgehend von einer 1 mM Stocklösung hergestellt. Anschließend wurden die Proben deproteiniert. Hierfür wurden 100 µl des ZNS-Homogenats mit 80 µl 75 mM ZnSO₄ in einem 1,5 ml Tube gemischt und 5 min. bei 14.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Eppendorfcup, in dem 120 µl 55 mM NaOH vorgelegt waren überführt. Die Protein-Präzipitate wurden erneut 5 min. bei 14.000 rpm pelletiert, 210 µl des Überstands in ein neues 1,5 ml Tube überführt und mit 70 µl Glycin-Puffer gemischt.

Nach der Deproteinierung der Proben wurde das Cadmium-Granulat aktiviert. Pro Probe wurden n x 3 Cadmium-Granulate in ein 50 ml Falcon gegeben und dreimal mit Wasser gewaschen. Anschließend wurden 200 µl 1x Aktivierungs-Puffer pro Granulat in das Falcon gegeben und 5 min. unter schütteln bei RT inkubiert. Nach der Aktivierung wurden die Granulate dreimal mit Wasser gewaschen und auf einem Filterpapier getrocknet. Drei aktivierte Granulate wurden anschließend zu jeder Probe gegeben und diese schüttelnd 15

min. bei RT inkubiert, um das enthaltene Nitrat der Probe zu reduzieren. Nach der Nitratreduktion wurden 2 x 100 µl (Doppelwerte) in eine 96-Well-Platte gegeben.

Für die Bestimmung des NO-Gehalts der Probe wurden anschließend 50 µl Reagenz A pro Well zu den Proben und dem Standard in die Platte gegeben und diese kurz geschüttelt. Danach wurden 50 µl Reagenz B pro Well zugegeben und das Gemisch 5 min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde die OD der Proben bei 540 nm im Spektrophotometer gemessen.

2.2.2.9.2 NO BESTIMMUNG MITTELS GRIESS REAGENZ

Zur Überprüfung der Ergebnisse der NO-Bestimmung mittels des QuantiChrom™ Kits wurde die NO-Mengenbestimmung mittels Griess Reagenz verwendet.

Für den kolorimetrischen Nachweis von NO als NO₂-Akkumulation wurden gleiche Volumina (50 µl) Probe und Reagenz gemischt und 10 min. bei RT in einer 96-Well-Platte inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Proben bei 540 nm im Spektrophotometer gemessen.

2.2.3 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.3.1 HISTOLOGIE

Die Histologie ist die Wissenschaft von biologischen Geweben. Morphologisch untersucht werden Gewebeproben und -schnitte. In dieser Arbeit wurden Färbetechniken zur Beurteilung der Leukozyteninfiltration ins ZNS und der Demyelinisierung verwendet.

Des Weiteren wurden die T-Zell-Subpopulationen der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen immunhistochemisch gefärbt und beurteilt.

2.2.3.1.1 HERSTELLUNG VON PARAFFINSCHNITTEN

Zur Herstellung von Dünnschnitten des ZNS von Mäusen, wurden diese mit 4 % PFA perfundiert (siehe Kapitel 2.2.1.6.2), das ZNS entnommen und 24 h bei 4 °C in 4 % PFA nachfixiert. Anschließend wurde das fixierte Gewebe in 1x PBS überführt und in Paraffin eingebettet. Die Paraffinierung des Gewebes erfolgte automatisiert mit einem Einbettungsautomaten der Neuropathologie Giessen.

Anschließend wurden 7 µm (H&E- und LFB-Färbung) bzw. 4 µm (CD4 und CD8) dicke Schnitte hergestellt und zur Analyse des Grades der Neurodegeneration und der Infiltration von Leukozyten wie folgt gefärbt.

2.2.3.1.2 LUXOL-FAST-BLUE-/KRESYLVIOLETT-FÄRBUNG

Die Luxol-Fast-Blue (LFB) -Färbung wird eingesetzt um Myelin anzufärben. Der LFB-Farbstoff ist das alkohollösliche Gegenstück des wasserlöslichen Alizanblaus. Die Färbung mittels LFB beruht auf einer Säure-Basen-Reaktion, bei der das LFB mit den basischen Komponenten des Myelins (Lipoproteinen) reagiert, was zu einem Farbumschlag führt. Durch die LFB-Färbung erscheint das Myelin blau. Kombination einer LFB-Färbung mit einer Nissl-Färbung, mit einem Farbstoffe wie Kresylviolett, der die Zellkörper gesunder Neurone anfärbt, indem der Farbstoff mit den basophilen Verbindungen (DNA, RNA) interagiert, und diese violett erscheinen lässt, macht es möglich die Pathologie von Nervengewebe darzustellen.

In dieser Arbeit wurde die LFB-Kresylviolett-Färbung angewendet, um in histologischen Schnitten aus dem ZNS EAE-kranker Mäuse den Grad der Neurodegeneration bzw. der Demyelinisierung zu charakterisieren. Hierfür wurden zunächst folgende Lösungen hergestellt.

0,1 % Luxol-Fast-Blue Lösung

Luxol-Fast-Blue, MBS	0,1 g
Ethanol (95 %)	100 ml
Eisessig	0,5 ml

0,1 % Kresylviolettlösung

Kresylviolett (<i>cresyl fast violet</i>)	0,1 g
Aqua dest.	100 ml
Eisessig	10 Tropfen
	anschließend filtrieren

0,05 % Lithiumcarbonatlösung

Lithiumcarbonat	0,05 g
Aqua dest.	100 ml

Die Schnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe deparaffiniert. Hierfür wurden die Objektträger in Glasgefäße mit unterschiedlichen Alkoholverdünnungen getaucht.

10 min.	10 min.	10 min.	10 min.	10 min.	10 min.	10 min.
Xylol →	Xylol →	100 % → Ethanol	90 % → Ethanol	80 % → Ethanol	70 % → Ethanol	50 % Ethanol

Anschließend wurden die Schnitte in 95 % Ethanol überführt, dann in die LFB-Lösung getaucht und bei 56 °C über Nacht inkubiert. Nach waschen in 95 % Ethanol und in Aqua dest., wurden die Schnitte 30 sec. in Lithiumcarbonat-Lösung und 30 sec. in 70 % Ethanol differenziert. Nach der Differenzierung wurden die Schnitte 30 sec. in der Kresylviolettlösung gefärbt, mit Wasser gespült und in 95 % Ethanol 5 min. inkubiert. Anschließend wurden sie zweimal 5 min. in 100 % Ethanol und zweimal 5 min. in Xylol gegeben und danach mit Entellan eingedeckt.

2.2.3.1.3 HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wird verwendet, um Gewebeschnitte morphologische durch zwei Einzelfärbungen zu untersuchen. In der Pathologie können durch diese Übersichtsfärbung krankhafte Veränderungen in Geweben charakterisiert werden. Um die färbenden Eigenschaften von Hämatoxylin zu entwickeln, wird der Farbstoff zu Hämalan aufbereitet. Hämalan färbt alle basophilen Strukturen (Strukturen des Zellkerns) blau. Eosin interagiert mit azidophilen Strukturen (Zellmembranproteine) und färbt diese rot. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde in dieser Arbeit verwendet, um eine Übersicht über entzündliche Infiltrate im ZNS zu erhalten - blaue Kernansammlungen um Blutgefäße herum zu charakterisieren. Hierzu wurden die Schnitte ebenfalls in einer absteigenden Alkoholreihe deparaffiniert.

10 min.	10 min.	10 min.	10 min.	10 min.	10 min.	10 min.
Xylol →	Xylol →	100 % → Ethanol	90 % → Ethanol	80 % → Ethanol	70 % → Ethanol	50 % Ethanol

Anschließend wurden die deparaffinierten Schnitte in 70 % Ethanol getaucht und mit Aqua dest. gespült. Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden die Schnitte dann 5 min. in Hämalan inkubiert und unter laufendem Leitungswasser gewaschen. Im Folgenden wurden die Schnitte 5 min. in Eosin-Lösung inkubiert und anschließend einer

aufsteigenden Alkoholreihe (96 % Ethanol → 100 % Ethanol → Xylol 1 → Xylol 2) gewaschen und mit Medium eingedeckt.

2.2.3.1.4 CD4- UND CD8-FÄRBUNG

Für die Beurteilung der infiltrierten Zellen (T-Helferzellen, CD4; und zytotoxische T-Zellen, CD8) im ZNS EAE-kranker WT und MK2^{-/-} Tiere wurden die Schnitte zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe deparaffiniert

10 min.	10 min.	10 min.	10 min.	10 min.	10 min.	10 min.
Xylol →	Xylol →	100 % → Ethanol	90 % → Ethanol	80 % → Ethanol	70 % → Ethanol	50 % Ethanol

und anschließend dreimal 5 min. in 1x PBS (pH 7,4) gewaschen. In einem ersten Schritt wurde dann die Primärfärbung durchgeführt. Hierfür wurden die Schnitte in Antikörperlösung (anti-CD4: 1:100 in 1x PBS + *goat*-Serum) über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend dreimal 5 min. in 1x PBS (pH 7,4) gewaschen. In einem zweiten Schritt folgte die Sekundärfärbung. Hierfür wurden die primär gefärbten Schnitte in anti-*rabbit*-Alexa 488-Antikörperlösung (1:800 in 1x PBS) 1 h in der feuchten Kammer inkubiert und anschließend gewaschen.

Für die CD8-Färbung wurden die Schnitte zunächst demaskiert (Mikrowelle). Hierzu wurde das Paraffin in einer absteigenden Alkoholreihe entfernt und die Schnitte anschließend gewaschen. Nach zweimal 5 min. kochen in Citronensäure (10 mM, pH 6) und dreimal spülen mit 1x PBS wurden die Schnitte mit anti-CD8 (1:100) über Nacht gefärbt. Für die Sekundärfärbung wurde ein *donkey* anti-*rat* Cy 3-Antikörper (1:1000) benutzt. Danach wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckt und mikroskopisch beurteilt.

2.2.3.2 ZELLKULTUR

In dieser Arbeit wurden sowohl Primärkulturen, immortalisierte adhärenente Zellen als auch in Suspension lebende Tumorzelllinien verwendet. Alle Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Für die Kultivierung wurden folgende Medien verwendet:

U937	RPMI 1640 + 10 % FBS + 1 % Pen./Strep.
HCMEC	<i>Microvasculare endothelial growth medium</i> + <i>Supplement Mix</i>
Primärkultur	RPMI 1640 + 10 % FBS + 1 % Pen./Strep.

Die Zellen, mit Ausnahme der Primärkultur, wurden in 75 cm² Kulturflaschen kultiviert und dreimal pro Woche gesplittet. Die Primärkulturen wurden bis zum Beginn des Experiments in 6-Well-Platten kultiviert.

2.2.3.2.1 LANGZEIT-LAGERUNG VON SÄUGERZELLEN

Um immortalisierte Zellen und Tumorzelllinien für längere Zeit aufzubewahren, wurden Zellen niedriger Passagen bei -80 °C bzw. bei -196 °C gelagert.

2.2.3.2.2 EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON SÄUGER-ZELLINIEN

Für die Langzeit-Lagerung bzw. das Einfrieren von Zellen möglichst niederer Passagen, wurden diese bis zu einer 90 %igen Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde bei den adhärennten hCMEC/D3 Zellen das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit 10 ml 1x PBS gewaschen und 2 min. mit 3 ml 1x Trypsin bei 37 °C inkubiert. Nachdem sich die Zellen vom Flaschenboden abgelöst hatten, wurden 7 ml Kulturmedium zugegeben, um die Wirkung des Trypsins durch das enthaltene FBS zu inhibieren. Anschließend wurden die Zellen in ein 15 ml Falcon überführt und 4 min. bei 1.200 rpm zentrifugiert. In Suspension lebende U937 Zellen wurden direkt in ein 15 ml Falcon überführt und ebenfalls 4 min. bei 1.200 rpm zentrifugiert. Die Zellpellets wurden im Folgenden mit 1 ml Einfriermedium (Kapitel 2.1.13) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden in einer mit 4 °C kaltem Isopropanol gefüllten Einfrierbox langsam auf -80 °C abgekühlt. Teilweise wurden die Zellen anschließend in flüssigen Stickstoff transferiert.

Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese bei 37 °C im Wasserbad schnell aufgetaut und in ein 15 ml Falcon mit 9 ml vorgewärmtem Medium gegeben. Anschließend wurde die Lösung 4 min. bei 1.200 rpm zentrifugiert. Das Medium wurde nachfolgend abgesaugt und das Pellet in 12 ml warmem Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt. Am Tag nach dem Auftauen wurde ein Mediumwechsel vollzogen, um mögliche DMSO-Rückstände zu entfernen. Alle Versuche wurden erst nach der zweiten Passage nach dem Auftauen durchgeführt.

2.2.3.2.3 MEDIUMWECHSEL UND ZELLPASSAGE

Um einen Mediumwechsel bei adhärennten hCMEC/D3 Zellen durchzuführen, wurde das alte Medium abgesaugt und 12 ml angewärmtes Medium zugegeben. Beim

Mediumwechsel der Suspensionskultur wurde diese in ein 15 ml Falcon überführt und 4 min. bei 1.200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und das Zellpellet in 12 ml Medium resuspendiert und in die Kulturflasche zurückgeführt.

Alle Zelllinien wurden bei einer 90 %igen Konfluenz passagiert (ein- bis dreimal pro Woche). Für die Passage der hCMC/D3 Zellen wurde das Medium aus der Flasche gesaut, die Zellen einmal mit 10 ml 1x PBS gewaschen und anschließend 2 min. mit 3 ml 1x Trypsin bei 37 °C inkubiert. Nachdem sich alle Zellen von Boden abgelöst hatten wurde die Population 1:3 gesplittet. Hierzu wurden 2 ml Trypsin-Zelllösung entfernt und 11 ml vorgewärmtes Medium zugegeben.

Suspensionszellen wurden dreimal pro Woche 1:6 passagiert. Aus der Kultur wurden 10 ml Suspension entfernt und diese durch angewärmtes Medium ersetzt.

2.2.3.2.4 ZELLZAHLBESTIMMUNG MITTELS NEUBAUER-ZÄHLKAMMER

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer benutzt. Bei dieser Methode wird ein definierter Raum von $0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \mu\text{l}$ pro Großquadrat geschaffen, indem ein Deckglas auf die Kammer gesetzt wird. Durch kapillare Kräfte können die Zellen in die Kammer eingebracht und durch Verwendung einer 10-fachen Vergrößerung die Zellzahl bestimmt werden.

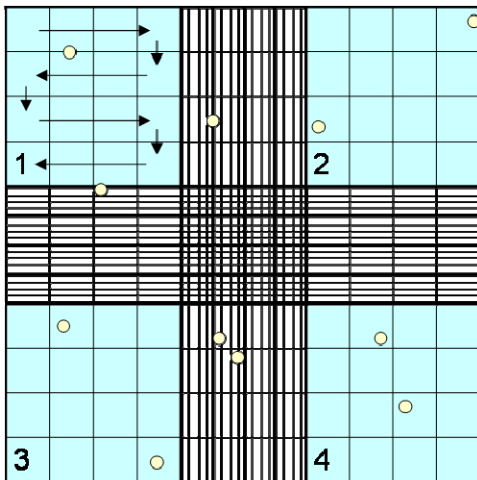


Abbildung 12: Neubauer Zählkammer

Die Neubauer Zählkammer besteht aus vier Großquadranten (blau), die einem Raum von $0,1 \text{ mm}^3$ ($0,1 \mu\text{l}$) entsprechen. Mindestens zwei (oben links (1) unten rechts (4)) Großquadrate (16 Kleinquadrate) werden ausgezählt um die Zellzahl einer Probe pro ml zu bestimmen: Zellzahl = Zahl der Zellen im Quadranten x Verdünnung der Probe (10^4) x ml Probe.

Alle vier Großquadrate (4 x 16 Kleinquadrate) der Neubauer-Zählkammer wurden ausgezählt und der Mittelwert errechnet. Durch Einbeziehen der Verdünnung ergibt sich schließlich die Zellzahl pro 0,1 µl – pro ml, also $\times 10^4$.

2.2.3.2.5 STIMULATION VON SÄUGERZELLEN

Um Zellen zu stimulieren, wurden pro Well 2 x 10⁵ Zellen in eine 6-Well-Platte ausgesät und mit 50 ng/ml TNF α , 1 µg/ml IFN γ und 1 µg/ml LPS 24 h bzw. 48 h stimuliert.

2.2.3.2.6 INHIBITION VON P38 DURCH SB203580 *IN VITRO*

SB203580 ist ein spezifischer, membrangängiger Inhibitor, der kompetitiv die Übertragung einer Phosphatgruppe von p38 auf MK2 verhindert.

Um eine Inhibition von p38 zu erzeugen, wurde 1 µg/ml SB203580 1 h vor Versuchsbeginn auf die Zellen gegeben.

2.2.3.2.7 TRANSFEKTION VON SÄUGERZELLEN

Um einen *knockdown* von MK2 in humanen Zellen zu generieren, wurden diese mit siRNA transfiziert. Nach dem Einschleusen der siRNA kommt es durch Interaktion mit einem komplementären Nukleinsäurestrang (mRNA) zu dessen Abbau, oder aber zu einer selektiven Hemmung der Translation und damit zur „Genstilllegung“.

Für die Generierung eines effizienten *knockdowns* wurden unterschiedliche Methoden und Reagenzien getestet. Die Transfektion mittels HVJ-Envelope Vektor Kit führte schließlich zum Erfolg. Hierbei wird in den HVJ-Envelope Vektor die zu transferierende siRNA inkorporiert, welcher die siRNA in ein Ziel transferiert.

2.2.3.2.7.1 MK2 *GEN-SILENCING* MITTELS HVJ-ENVELOPE VECTOR KIT (GENOMONETM-NEO EX)

Für den *knockdown* von MK2 wurde siRNA in humane U937 Zellen mittels des HVJ-Envelope Vektor geschleust. Hierzu wurde das Herstellerprotokoll für Suspensionszellen benutzt. 10 µl der HVJ-Envelope Suspension wurden in ein 1,5 ml Eppendorfcup gegeben und 1 µg (h) MAPKAPK2 siRNA zugegeben. Anschließend wurden 2 µl des Reagenz B zugegeben, um die siRNA in den Vektor zu transferieren. Das Gemisch wurde bei 11.000 rpm für 5 min. bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und

verworfen. Das Pellet wurde in 30 µl Puffer resuspendiert und 5 µl Reagenz C zugegeben. Dieser Reaktionsansatz wurde zu 5×10^5 Zellen in 500 µl normales Wachstumsmedium pipettiert. Die Suspension wurde bei 2.000 rpm bei RT für 20 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen, das Pellet in 2 ml Medium resuspendiert und 48 h in einer 6-Well-Platte bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.3.3 ISOLIERUNG VON PRIMÄRZELLEN

Um potentiell veränderte zelluläre Prozesse im Verlauf der EAE ermitteln und quantifizieren zu können, wurden primäre Zellen aus unterschiedlichen Organen isoliert.

2.2.3.3.1 ISOLIERUNG VON MURINEN MILZZELLEN

Für die Isolierung von Zellen aus der Milz wurden die Tiere mittels CO₂ getötet, deren Bauchhöhle eröffnet und die Milz entnommen. Anschließend wurde die Milz durch ein Zellsieb (Porengröße 40 µm) gestrichen, welches mit 5 ml 1x PBS gespült wurde, um alle Zellen auszuwaschen. Die Zell-PSB-Suspension wurde anschließend 5 min. bei 1.600 rpm zentrifugiert und das Pellet in 3 ml Lysierpuffer, um Erythrozyten zu lysieren, resuspendiert. Für die nachfolgende Erythrozyten-Lyse wurde das Falcon 5 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 5 ml 1x PBS zugegeben und die Suspension 5 min. bei 1.600 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde im Anschluss in 10 ml 1x PBS resuspendiert und erneut 5 min. bei 1.600 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen für nachfolgende Untersuchungen präpariert.

2.2.3.3.2 ISOLIERUNG VON MURINEN ZELLEN AUS DEM ZNS

Um einen Vergleich zwischen Immunzellen der Peripherie und des ZNS anstellen zu können, wurden „autoreaktive“ Zellen mittels Zentrifugation über ein Percoll-Kissen isoliert.

Hierzu wurde das ZNS euthanasierter Mäuse nativ entnommen und zweimal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurde das ZNS zerkleinert und 1 h bei 37 °C im Wasserbad mit Verdaumedium (Kapitel 2.1.13) inkubiert. Nachfolgend wurden die ZNS-Stücke durch ein Zellsieb (Porengröße 40 µm) gestrichen und durch Zugabe von 5 ml 1x PBS und anschließender Zentrifugation für 5 min. bei 1.600 rpm zweimal gewaschen.

Das ZNS-Homogenat wurde dann mit 3 ml Gradient-A-Lösung (2.1.13) resuspendiert und in ein frisches 15 ml Falcon überführt. Das Gradient-A-Homogenatgemisch wurde anschließend mit 3 ml Gradient-B-Lösung (2.1.13) unterschichtet (Abb. 13).

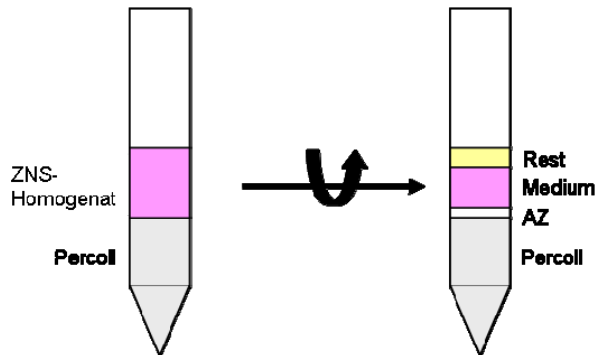


Abbildung 13: Zentrifugation über ein Percoll-Kissen (schematische Darstellung)

Zur Isolation von Leukozyten aus dem ZNS EAE-kranker Tiere wurde eine Auftrennung über ein Percoll-Kissen angewendet. Nach der Auftrennung (Falcon rechts) schwimmt auf den Lösungen ein Fettfilm (Myelin; hier Rest). Zellen des Immunsystems (u.a. autoreaktive Zellen, AZ) lagern sich direkt auf dem Percoll ab.

Es folgte die Zentrifugation über ein Percoll-Kissen bei 2.500 rpm für 30 min. Nach Ablauf der Zeit wurde der Rotor der Zentrifuge nicht gebremst, um die durch den Gradienten entstandene Schichtung der einzelnen Bestandteile nicht zu zerstören.

Die isolierten Zellen wurden dann aus dem Falcon in ein neues Tube überführt, mit 10 ml 1x PBS verdünnt und 5 min. bei 2.500 rpm abzentrifugiert. Es folgte ein zweiter Waschschrift, bei dem die Zellen erneut mit 10 ml 1x PBS resuspendiert und bei 1.600 rpm 5 min. zentrifugiert wurden. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Zellen für anschließende Untersuchungen präpariert.

2.2.3.4 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen einzelner lebender Zellen in Suspension durch fluoreszenzmarkierte Antikörper. Vereinzelt Zellen passieren in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl (Trägerflüssigkeit, *hydrodynamische Fokussierung*) einen Laserstrahl, dessen Licht die Einzelzellen streuen. Je nach Größe und Granularität wird das Licht des Laserstrahls unterschiedlich emittiert. Der *forward scatter* (FSC; Vorwärtsstreulicht) ist Maß für das Streulicht im flachen Winkel und gibt Aufschluss über

das Volumen der Zelle, wohingegen der *sidewards scatter* (SSC; Seitwärtsstreulicht) Maß für die Lichtbeugung im rechten Winkel ist, und Aufschluss über die Komplexität der Zelle gibt. Ist eine Zelle mit einem fluoreszenzgekoppelten Antikörper markiert, werden die Elektronen des gekoppelten Farbstoffs angeregt, bevor sie die absorbierte Energie in Form von Licht einer anderen Wellenlänge wieder freigeben. Die Veränderungen des Lichts werden über einen Detektor detektiert (Abb. 14).

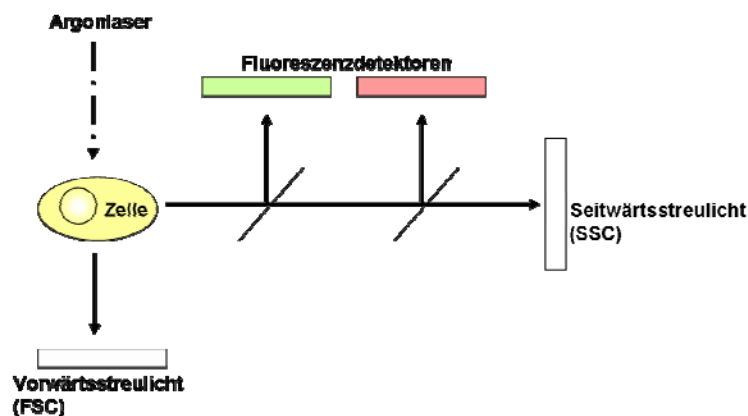


Abbildung 14: Schematische Darstellung einer durchflusszytometrischen Messung

Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung von Zellen, werden diese mit einem Argonlaser bestrahlt und das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht zur Ermittlung von Größe und Granularität der Zellen detektiert. Durch fluoreszenzmarkierte Antikörper können spezifische Oberflächenantigene und intrazelluläre Proteine analysiert werden. Die Fluorochrome der Antikörper emittieren spezifische Lichtwellenlängen, die von Fluoreszenzdetektoren detektiert werden (modifiziert aus: Jan Leuthold, 2003; <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/leuthold-jan-2003-01-16/HTML/leuthold-ch2.html>).

Durch Markierung mit unterschiedlichen spezifischen Antikörpern und Farbstoffen, welche bei gleicher Wellenlänge angeregt werden, aber unterschiedliche charakteristische Emissionsspektren aufweisen ist es möglich, in oder auf einer Zelle mehrere Antigene quantitativ zu untersuchen.

Flourochrom	Absorptionsmaximum	Emmissionsmaximum
FITC (Fluoresceinisothioyanat)	495 nm	519 nm
PerCP (Peridiniumchlorophyll-Protein)	490 nm	675 nm
-Cy5.5	488 nm	695 nm

Die Durchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit verwendet, um Monozyten aus einem Monozyten-hCMEC/D3-Gemisch nach Kokultur zu identifizieren, das Oberflächenantigen

CD49d (VLA-4) zu quantifizieren und primärisolierte Milzzellen aus Mäusen quantitativ nach CD3+, CD4+, CD8+, CD14+ und CD19+ Zellen zu untersuchen. Des Weiteren wurde die Bindung des monoklonalen Antikörpers Natalizumab auf Zellen bestimmt.

Für die quantitative Untersuchung dieser Marker wurden die Zellen in 50 µl FACS-Puffer (2.1.13) resuspendiert und für 30 min. mit dem jeweiligen fluoreszenzmarkierten Antikörper bei 4 °C inkubiert. Nach zwei Waschschritten wurden die gefärbten Zellen in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch im FACSCalibur-Durchflusszytometer gemessen.

Antikörper die nicht primär mit Fluoreszenzfarbstoffen substituiert waren, wie beispielsweise biotinyliertes Natalizumab (anti-VLA-4 Antikörper), wurden mittels Streptavidin (SA) –PerCP Cy 5.5 gefärbt. Nach Inkubation des biotinylierten Erstantikörpers wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend SA-PerCP Cy 5.5 (1:100) zugegeben. Das SA-PerCP Cy 5.5 wurde 20 min. bei 4 °C inkubiert. Nach zwei Waschschritten wurden die gefärbten Zellen in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch im FACSCalibur-Durchflusszytometer gemessen.

2.2.3.5 ADHÄSIONS-ASSAY

Zur Untersuchung der Adhäsionseigenschaften von Immunzellen an Zellen der Blut-Hirn-Schranke wurde ein Adhäsions-Assay durchgeführt. Hierzu wurden Zellkulturen (hCMEC/D3-Zellen, U937 oder primärisolierte Zellen aus der Milz von Mäusen) verwendet, die in Reinkulturen stimuliert wurden. Nach spezifischer Modifizierung der Reinkulturen (Stimulation, Inhibition von p38 oder siRNA-Transfektion) wurden die Leukozyten für 30 min. in Kokultur mit den Endothelzellen inkubiert (Abb. 15). Anschließend wurde das Kulturmedium abgesaugt und der Zellrasen der Endothelzellen zweimal mit 1x PBS gewaschen, um nicht adhärenente Immunzellen zu entfernen. Im Folgenden wurden die Endothelzellen mit den adhärenenten Immunzellen mit 1x Trypsin abgelöst und in 50 µl FACS-Puffer resuspendiert. Quantifiziert wurden die adhärenenten Zellen durchflusszytometrisch durch Färbung spezifischer Oberflächenmarkern der Immunzellen (CD3 und CD14).

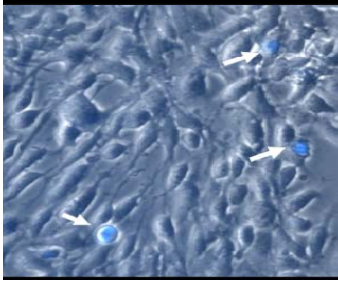


Abbildung 15: Adhärenzte Leukozyten auf Endothelzellen

Die Adhäsion von Zellen des Immunsystems an Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (hCMEC/D3) wurde mikroskopisch überprüft. U937 Zellen wurden mit DAPI gefärbt und anschließend auf hCMEC/D3 gegeben. Im Mikroskop konnten adhärenzte U937 (weiße Pfeile) an hCMEC/D3 nachgewiesen werden.

2.2.4 BIOCHEMISCHE METHODEN

2.2.4.1 ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON PROTEINEN (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE ist eine Methode zur Trennung einzelner Proteine aus einem Gemisch. Hierbei werden Proteine durch Zufuhr von Chemikalien (SDS und z.B. β -Mercaptoethanol) und Hitze zunächst linearisiert, meist reduziert und negativ geladen und anschließend über eine Trägersubstanz elektrophoretisch, entsprechend ihrer Größe (Molekulargewicht) aufgetrennt.

2.2.4.2 WESTERN BLOT ANALYSE

Der Western Blot (WB) ist eine Methode zur Übertragung von Proteinen aus einer Trägermatrix (meist SDS-PAGE, aber auch native-PAGE, isoelektrische Fokussierung oder 2D-Gelelektrophorese) auf eine Trägermembran. Anschließend können einzelne Proteine aus einem Proteingemisch identifiziert werden.

Beim Blotten einer SDS-PAGE wird senkrecht zum Polyacrylamid-Gel ein elektrisches Feld angelegt, wodurch Proteine entlang des elektrischen Flusses aus dem Gel auf eine Membran (Nitrocellulose, Nylon oder Polyvinylidendifluorid (PVDF)) wandern. Aufgrund hydrophober Wechselwirkung bleiben die Proteine an der Membran haften, wobei das ursprüngliche Auftrennungsmuster erhalten bleibt.

Anschließend können die Proteine auf der Membran mittels Immundetektion sichtbar gemacht werden. Ein Antigen-spezifischer Erstantikörper wird auf die Membran gegeben, welcher durch einen mit einem Enzym gekoppelten Zweitantikörper gebunden wird. Durch

Zugabe eines Substrats wird eine durch das Enzym vermittelte Farb- oder Chemilumineszenzreaktion katalysiert.

2.2.4.3 BIOTINYLIERUNG VON ANTIKÖRPERN

Um einen ungefärbten Antikörper für z.B. die Durchflusszytometrie „direkt“ sichtbar zu machen, kann dieser markiert werden. Zum einen können direkt Fluoreszenzfarbstoffen kovalent gekoppelt werden, zum anderen magnetische Kügelchen oder auch Biotin. Durch eine Kopplung von Biotin kann der Antikörper mittels Streptavidin (SA)-Reagenzien, z.B. Fluoreszenzfarbstoff-Kombinationen sichtbar gemacht werden.

Um genauere Untersuchungen zur Bindung von Natalizumab auf Zellen anzustellen, wurde in dieser Arbeit der monoklonale, zur Therapie eingesetzte Antikörper Natalizumab biotinyliert. Für die Biotinylierung wurde das EZ-Link® NHS-PEO₄-Biotinylation Kit der Firma Thermo Scientific verwendet. Zunächst wurden nach Angaben des Herstellers 2 mg/ml Natalizumab in BupTM PBS verdünnt. Anschließend wurde eine 20 mM NHS-PEO₄-Biotin-Lösung durch Zugabe von 170 µl Wasser hergestellt. 13,3 µl dieser 20 mM Biotin-Lösung wurde anschließend zur IgG-Lösung gegeben und das Gemisch 60 min. bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde das überschüssige Biotin entfernt. Hierzu wurde ein ZebaTM Desalt Spin Säulchen verwendet, das wie folgt für den Gebrauch vorbereitet wurde: Das Säulchen wurde in ein 15 ml Falcon gegeben und bei 1.000 x g für 2 min. zentrifugiert. Anschließend wurden 2,5 ml PBS zugegeben und das Säulchen erneut bei 1.000 x g für 2 min. zentrifugiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt.

Nach 60 min. Inkubation der Natalizumab-NHS-PEO₄-Biotinlösung wurde diese auf das Säulchen gegeben und gewartet, bis die Probe im der Granulat des Säulchens eingesickert war. Anschließend wurde das Säulchen für 2 min. bei 1.000 x g zentrifugiert.

2.2.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Statistisch ausgewertet wurden die Daten mittels der GraphPad Prism4 Software. Abhängig von den zu vergleichenden Werten wurde entweder ein ungepaarter *t*-Test oder eine one-way-ANOVA mit anschließendem Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1 TEIL 1: DIE ROLLE DER MK2 BEI DER EAE

3.1.1 MK2^{-/-} MÄUSE ZEIGEN EINEN SCHWEREREN EAE-VERLAUF ALS WILDTYPE KONTROLLTIERE

MK2 spielt bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle. Bisher wurde die Rolle der MK2 allerdings nicht beim Verlauf der EAE untersucht. Um die Auswirkung eines MK2 *knockout* auf den Verlauf der EAE zu charakterisieren und mögliche Unterschiede festzustellen, wurden WT und MK2^{-/-} Mäusen mit MOG₃₅₋₅₅ immunisiert und 24 Tage beobachtet (n = 9; 3 Tiere pro Genotyp x 3 Experimente). MK2^{-/-} Tiere zeigten einen schwereren Verlauf der Erkrankung (weiße Quadrate). Beide Genotypen zeigten zwischen Tag 9 und Tag 12 nach der Immunisierung erste Krankheitssymptome. Im weiteren Verlauf der EAE entwickelten die Tiere Paresen in der akuten Phase der EAE.

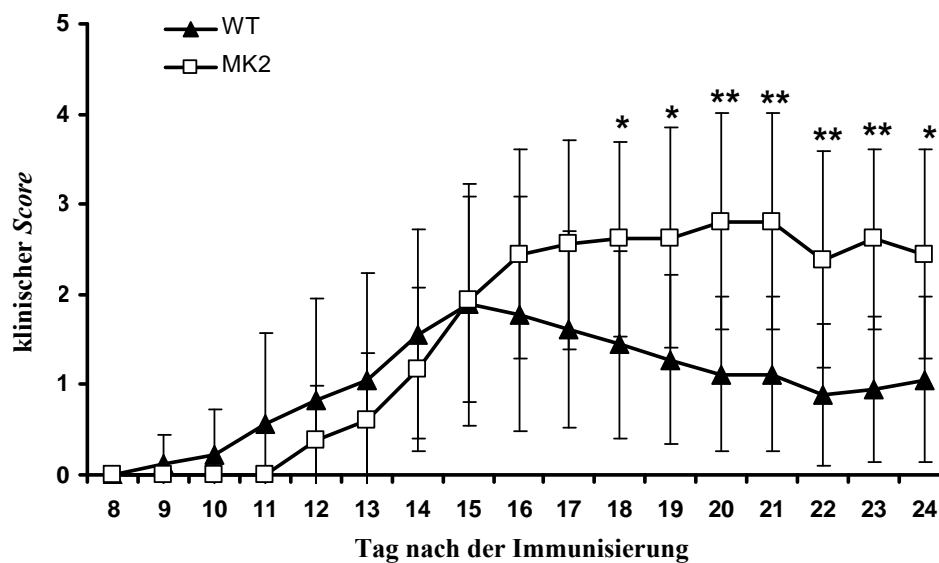


Abbildung 16: Verlauf der EAE in MK2^{-/-} und WT Mäusen, die mit MOG₃₅₋₅₅ immunisiert wurden
 Abbildung 16 zeigt den klinischen Verlauf EAE-kranker MK2^{-/-} Tiere (weiße Quadrate) im Vergleich zu WT (schwarze Dreiecke). Es wurden 3 Tiere pro Gruppe in 3 Experimenten (n = 9) Mäuse beobachtet und der klinische *Score* täglich ermittelt: 0: keine Symptome; 1: Schwanzlähmung; 2: Hinterlaufschwäche; 3: Hinterlaufschwäche; 4: Hinterlaufschwäche und Vorderlaufschwäche; 5: Moribund. Die Quadrate/Dreiecke zeigen die Mittelwerte der klinischen *Scores*, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD). Ab Tag 18 nach der Immunisierung (Tag 0) zeigen die MK2^{-/-} Tiere einen schwereren Verlauf der Erkrankung. (statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software; studentische t-Verteilung).

Im Folgenden ab Tag 18 nach der Immunisierung wurde einen schwereren Verlauf (mittleren *Score*) der Erkrankung bei MK2^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT Tieren (schwarze Dreiecke) (Tag 18: $p = 0,0334$; Tag 19: $p = 0,0205$; Tag 20: $p = 0,0039$; Tag 21: $p = 0,0039$; Tag 22: $p = 0,0061$; Tag 23: $p = 0,0013$; Tag 24: $p = 0,0123$) beobachtet.

Die *knockout* Tiere zeigten stärkere Bewegungseinschränkungen bzw. Behinderungen im Vergleich zu WT, die nach der akuten Phase (Tag 16) zu remittieren begannen. In der chronischen Phase der EAE (ab Tag 19) wiesen WT einem „mittleren *Score*“ um 1 (Schwanzlähmung) auf, wohingegen MK2^{-/-} eine verlängerte akute Phase mit Paresen der Hinterläufe aufwies (Abb. 16).

3.1.2 HISTOLOGISCH UNTERSCHIEDEN SICH WILDTYP UND MK2^{-/-} MÄUSE

Um die Entzündungsreaktion am Peak der MOG-induzierten EAE-Erkrankung zwischen WT und MK2^{-/-} Mäusen zu vergleichen, wurden histologische Schnitte an Tag 16 nach der Immunisierung angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt, um zelluläre Infiltrate zu detektieren, mit Luxol-Fast-Blue gefärbt, um die Demyelinisierung sichtbar zu machen und mit CD4- und CD8-gefärbt, um eine Aussage über den Phänotyp der infiltrierten Zellen treffen zu können ($n = 3$ pro Gruppe). Zwischen WT und MK2^{-/-} Tiere war betreffend der Läsionslast bzw. der Demyelinisierung kein Unterschied erkennbar. Beide Genotypen wiesen Läsionen in denselben Regionen des ZNS auf (Abb. 17). Auch die Menge der infiltrierten Zellen an demyelinisierten Stellen schien in der Hämatoxylin und Eosin Färbungen gleich zu sein. Im Gegensatz zu WT Mäusen war es bei MK2^{-/-} Tieren schwer, klare zelluläre Infiltrate zu erkennen. Im Vergleich zu WT Tieren schienen MK2^{-/-} Mäuse mehr CD4⁺ und CD8⁺ Zellen in den Läsionen aufzuweisen (Abb. 17E-H). Schnitte vom ZNS von MK2^{-/-} Mäusen wiesen im Vergleich zu WT deutlich stärkere Anfärbungen auf. Zu beachten ist, dass die Färbung mit anti-CD4-Antikörper auch aktivierte Mikrogliazellen detektiert. Diese scheinen vor allem in Abb. 17F sichtbar. Die dort angefarbten Zellen weisen zum Teil für Mikroglia typische Ausläufer auf.

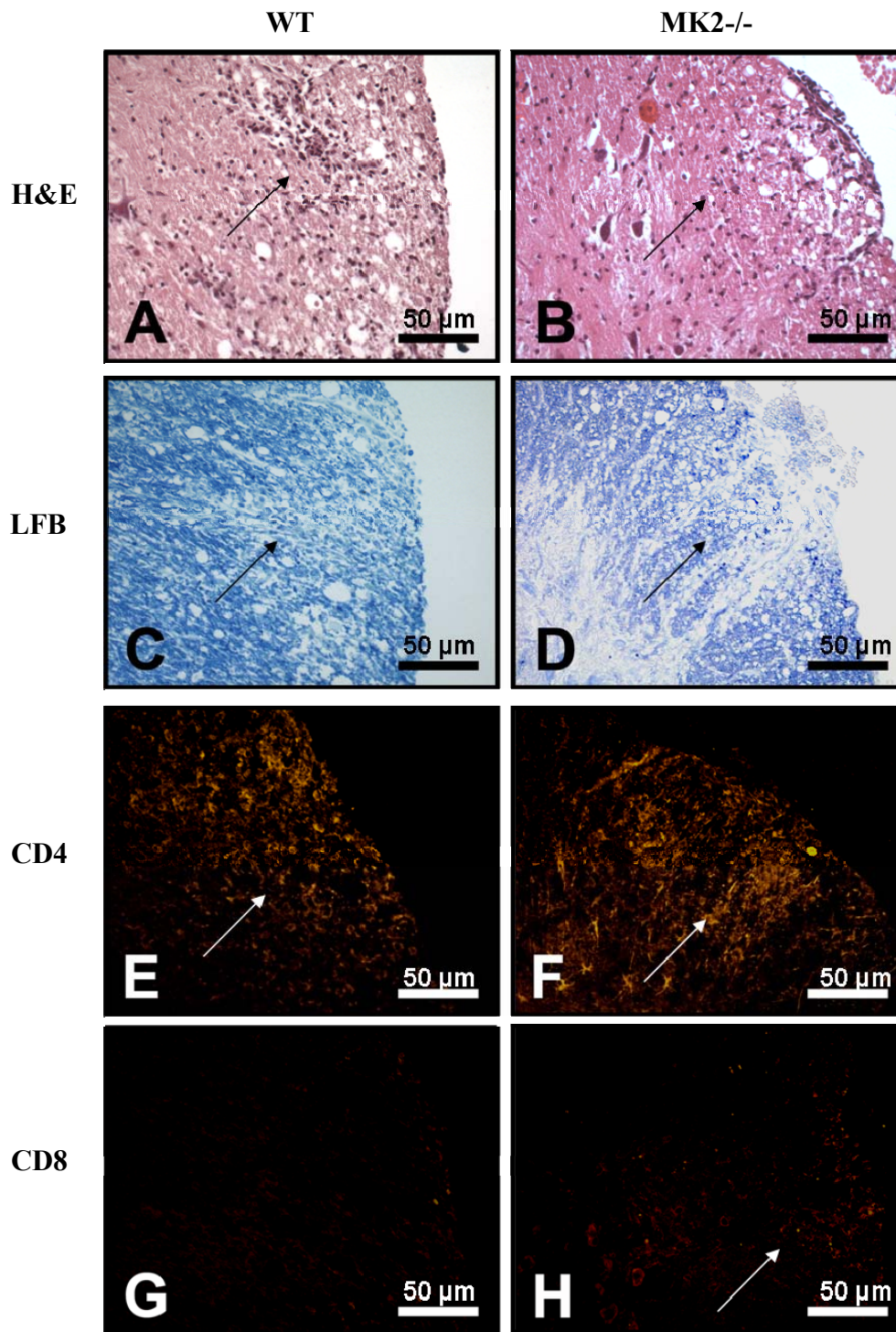


Abbildung 17: Mikroskopische Darstellung zellulärer Infiltrate und der Demyelinisierung bei MOG-induzierten MK2^{-/-} und WT Mäusen an Tag 16 der EAE

An Tag 16 nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ wurden Paraffinschnitte vom ZNS von MK2^{-/-} und WT Mäusen angefertigt und immunhistochemisch mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) (A und B), mit Luxol-Fast-Blue (LFB) (C und D), mit anti-CD4 (T-Helferzellen) (E und F) und mit anti-CD8 (zytotoxische T-Zellen) (G und H) gefärbt. Beide Genotypen wiesen Läsionen in denselben Regionen des ZNS auf. Die zellulären Infiltrate und die Demyelinisierung schienen zwischen den beiden Mausstämmen nicht verändert. Allerdings weisen MK2^{-/-} Mäuse mehr CD4 und CD8 positive Zellen auf (E-H) (Ausschnitt lumbaler Teil des Rückenmarks)

3.1.3 DIE ZELLZAHL VON LEUKOZYTEN IM ZNS IST BEI MK2^{-/-} MÄUSEN ERHÖHT

Charakteristisch für die Entzündungsreaktion bei EAE ist die Infiltration von Leukozyten ins ZNS, die dort eine Entzündungsreaktion auslösen. Zur Charakterisierung dieser Entzündungsreaktion wurden Leukozyten über ein Percoll-Kissen aus dem ZNS kranker Tiere isoliert und durch Zählen mit der Neubauer-Zählkammer quantifiziert. Analysiert wurden 6 Tiere pro Genotyp pro Zeitpunkt. An Tag 8 nach der Immunisierung waren keine klinischen Symptome der Erkrankung sichtbar. Im ZNS dieser an Tag 8 getöteten Tiere fanden sich sowohl bei WT als auch bei MK2^{-/-} Mäusen zirka 1 Million Zellen (Abb. 18A).

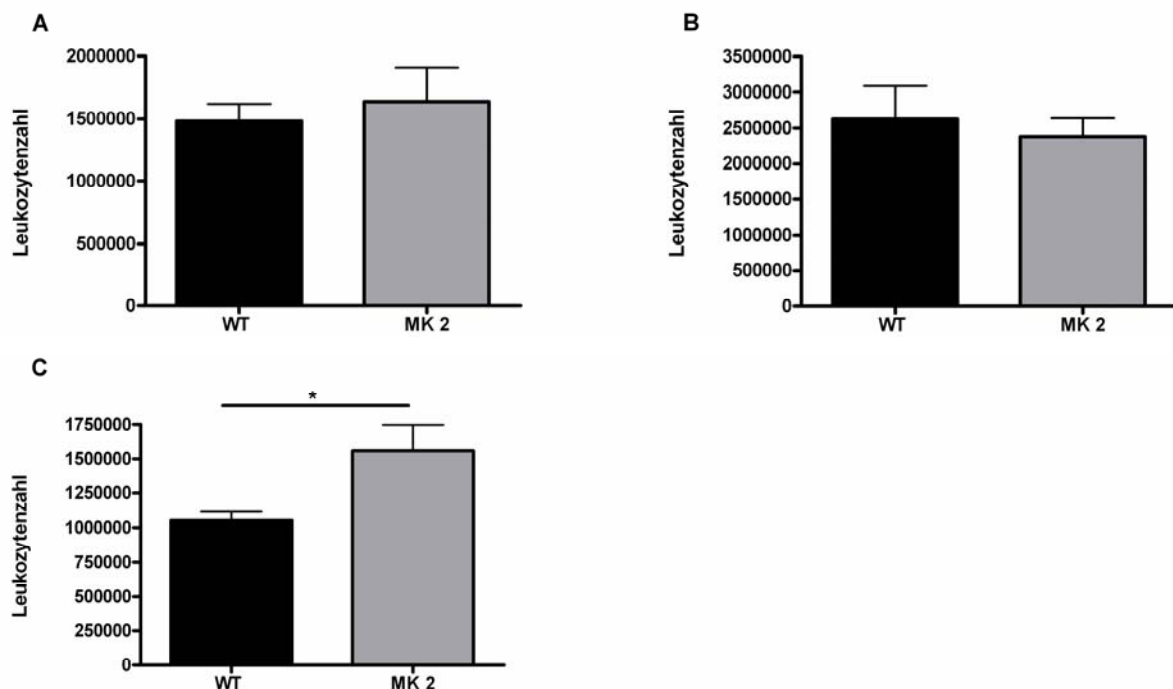


Abbildung 18: Zellzahl isolierter Leukozyten aus dem ZNS von MOG-immunisierten WT und MK2^{-/-} Mäusen in unterschiedlichen Phasen der Erkrankung

Abbildung 18 zeigt die Zellzahl von Leukozyten, die in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung aus dem ZNS von WT und MK2^{-/-} Mäusen mittels Percoll-Kissen isoliert wurden. A) Tag 8 nach Immunisierung. B) Tag 16 nach Immunisierung. C) Tag 24 nach Immunisierung. (n = 6 pro Gruppe; statistische Auswertung: GraphPad Prims4 Software, studentische t-Verteilung; Fehlerbalken zeigen die SD). An Tag 24 nach der Immunisierung konnten mehr Leukozyten im ZNS von MK2^{-/-} Tieren nachgewiesen werden (C).

An Tag 16, in der akuten Phase der Erkrankung, fanden sich zirka 2 Millionen Leukozyten im ZNS von WT und auch von MK2^{-/-} Mäusen (Abb. 18B). In der Remission bzw. chronischen Phase der EAE an Tag 24 konnte ein Unterschied in der Zahl der Zellen im ZNS detektiert werden ($p = 0,0291$). Während bei WT zirka 1 Million Zellen gefunden

wurden, konnten bei MK2^{-/-} Mäusen zirka 1,5 Millionen Zellen gezählt werden (Abb. 18C).

MK2^{-/-} Mäuse zeigten einen schwereren Verlauf der MOG-induzierten EAE. Im Vergleich zu WT-Artgenossen, die nach der akuten Phase der Erkrankung zu remittieren begannen, wiesen MK2^{-/-} Mäuse keine verbesserte Lokomotion an Tag 18 nach der Immunisierung auf. Zu dieser Tatsache passend, konnten an Tag 24, in der chronischen Phase der EAE-Erkrankung, mehr Leukozyten aus dem ZNS von MK2-defizienten Mäusen isoliert werden. Um zu klären, ob die erhöhte Zellzahl mit einer Veränderung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zusammenhing, wurde im nächsten Schritt die Expression des Proteins β -Catenin, einem essentieller Bestandteil von Adhäsionsverbindungen gemessen.

3.1.4 β -CATENIN IM ZNS IST BEI MK2^{-/-} MÄUSEN ERHÖHT

Gorska et al. konnten 2007 zeigen, dass die essentielle Komponente der *Zonula adherens*, *Fascia adherens* und *Punctum adherens* (Adhäsionsverbindungen) β -Catenin in MK2^{-/-} Mäusen verstärkt exprimiert wird und dadurch die Permeabilität der Blut-Lungen-Schranke vermindert ist (Gorska, Liang et al. 2007). Um zu klären, ob eine veränderte β -Catenin auch im Gehirn von MK2^{-/-} Mäusen zu finden ist, wurden Proteinlysate von WT und MK2^{-/-} Tiere (n = 1 pro Gruppe), die in der akuten Phase (Tag 16 nach Immunisierung) der EAE getötet wurden, über SDS-PAGE aufgetrennt und die β -Catenin-Expression durch einen anti- β -Catenin-Antikörper nachgewiesen.

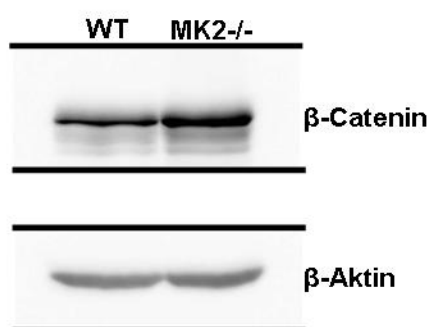


Abbildung 19: Expression von β -Catenin im Gehirn von MOG₃₅₋₅₅ immunisierten WT und MK2^{-/-} Mäusen

Das Molekül β -Catenin wurde durch Auftrennung von Proteinproben aus dem Gehirn durch SDS-PAGE und Immunoblotten mit anti- β -Catenin-Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde das *housekeeping gene* β -Aktin nachgewiesen. Das MK2^{-/-} Tier (rechte Bande) zeigten eine stärkere Expression an β -Catenin im Vergleich zu WT (linke Bande); (n = 1 pro Gruppe).

Im Gehirn der EAE-kranken MK2^{-/-} Maus war tendenziell eine erhöhte Expression von β -Catenin im Vergleich zu WT nachzuweisen (Abb. 19). Die Analyse der Bandenintensität ergab, dass β -Catenin in Proteinlysaten des ZNS vom MK2^{-/-} Tier um 10 % erhöht war. Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde eine Verdünnungsreihe der ZNS-Proteinlysate im WB aufgetragen und die β -Catenin-Expression erneut detektiert. In allen Verdünnungen war β -Catenin bei MK2^{-/-} verstärkt exprimiert (*Daten nicht gezeigt*). Im Gegensatz zur Studie von Gorska und Mitarbeiter waren im ZNS MK2-difizienter Tiere an Tag 24 nach der Immunisierung mehr Leukozyten zu finden. Im Folgenden sollte nun die Aktivität dieser eingewanderten Leukozyten untersucht werden.

3.1.5 IM ZNS IST KEIN STICKSTOFFMONOXID NACHWEISBAR

NO ist eine Substanz, die im ZNS als Neurotransmitter wirken kann, aber auch von immunkompetenten Zellen produziert wird, um Pathogene abzutöten. NO kann dabei auch als Neurotoxin Neurone direkt schädigen (Liu and Hong 2003). MK2^{-/-} Mäuse wiesen an Tag 24 nach der Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ mehr Leukozyten im ZNS auf als WT Kontrolltiere. Um die Frage zu beantworten, ob diese Leukozyten mehr Neurodegeneration bei MK2^{-/-} Tieren als bei WT Mäusen verursachten, wurde NO als Nitrit im Überstand von ZNS-Homogenaten gemessen. Durch die Anwesenheit von Leukozyten werden im ZNS immunkompetente Gliazellen aktiviert, die toxisches NO produzieren, das bei EAE Neurodegeneration bewirken. WT und MK2^{-/-} Tiere wurden mit MOG-EAE induziert und an Tag 24, in der chronischen Phase der Erkrankung getötet (n = 3 pro Genotyp). NO war bei keinem der Tiere nachweisbar (*Daten nicht gezeigt*). Dies könnte aufgrund einer zu geringen Konzentration bzw. einem nicht ausreichend sensitiven Messverfahren bedingt sein. Es könnte aber auch darauf hindeuten, dass NO als flüchtiges Radikal sehr schnell Proteine nitrolysiert und deshalb nicht nachgewiesen werden konnte.

3.1.6 MK2^{-/-} MÄUSE WEISEN MEHR LEUKOZYTEN IN DER MILZ AUF

Die Milz spiegelt als peripheres lymphatisches Organ im weitesten Sinne die Immunantwort im Blut wider. In unterschiedlichen Stadien der EAE wurde die Milz von WT und MK2^{-/-} Mäusen (n = 6 pro Genotyp) entnommen und durchflusszytometrisch analysiert. Die Leukozytensubpopulationen CD4⁺ T-Helferzellen, CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen, CD14⁺ Monozyten und CD19⁺ B-Zellen wurden untersucht, die maßgeblich an der

Ausprägung der EAE beteiligt sind, und peripher aktiviert werden, differenzieren und proliferieren.

Die durchflusszytometrische Untersuchung von Zellen aus der Milz gesunder Mäuse ergab, dass MK2^{-/-} Tiere per se prozentual mehr CD4⁺ (Abb. 20 oben links), CD8⁺ (Abb. 20 oben rechts) und CD14⁺ (Abb. 20 unten rechts) Zellen in der Milz besitzen.

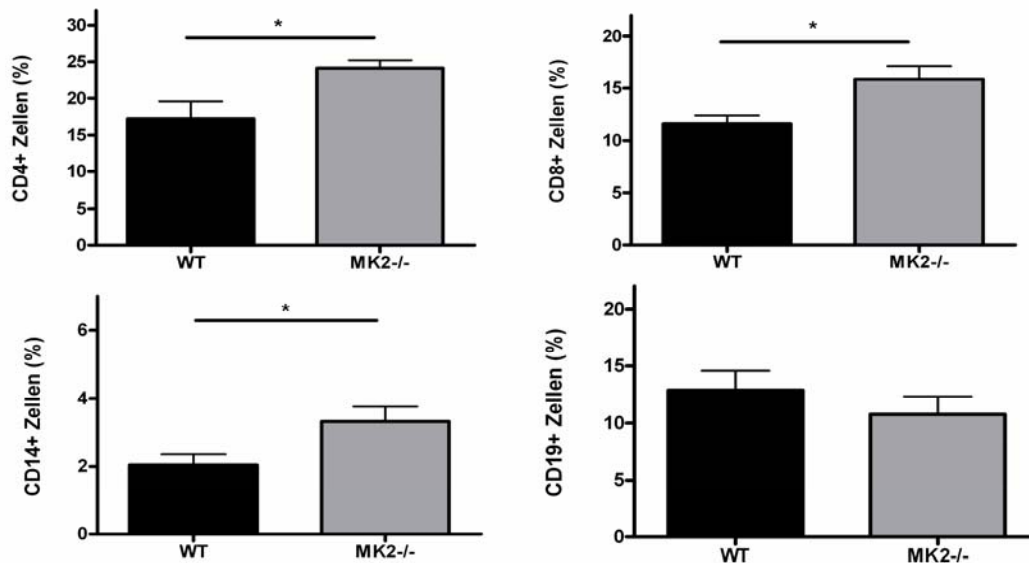


Abbildung 20: Vergleich der Leukozytensubpopulationen in der Milz von gesunden WT und MK2^{-/-} Mäusen

Zellsuspensionen von primär isolierten Leukozyten aus der Milz gesunder MK2^{-/-} (grau) Tieren und WT (schwarz) wurden durchflusszytometrisch untersucht, um die Verhältnisse der Leukozytensubpopulationen (T-Zellen, B-Zellen, Monozyten) zu bestimmen. Mit anti-CD4-, anti-CD8-, anti-CD14- und anti-CD19-Antikörper wurden n = 6 Proben pro Genotyp untersucht. MK2^{-/-} Mäuse zeigten eine erhöhte Zahl an CD4⁺ T-Helferzellen (oben links), CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (oben rechts) und CD14⁺ Monozyten (unten links) im Vergleich zu WT (Balken zeigen den Mittelwert der Proben; Fehlerbalken zeigen die SD; statistische Auswertung: GraphPad Prism4, studentische t-Verteilung).

Während WT Tiere zirka 17 % CD4⁺ Zellen aufwiesen, waren bei MK2^{-/-} zirka 25 % der Zellen positiv für CD4 ($p = 0,0244$). Zirka 12 % der analysierten Milzzellen aus WT waren positiv für CD8, wohingegen zirka 15 % CD8⁺ Zellen bei MK2^{-/-} Tieren detektiert werden konnten ($p = 0,0172$). Die Analyse zeigte auch, dass 2 % der Zellen von WT Tieren und zirka 3 % der Zellen von MK2^{-/-} Tieren zur CD14⁺ Population gehörten ($p = 0,0388$).

An Tag 8 nach der Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ konnte ebenfalls ein prozentualer Unterschied der CD4⁺ (Abb. 21 oben links) und CD8⁺ (Abb. 21 oben rechts) Population bei WT im Vergleich zu MK2^{-/-} Tieren festgestellt werden.

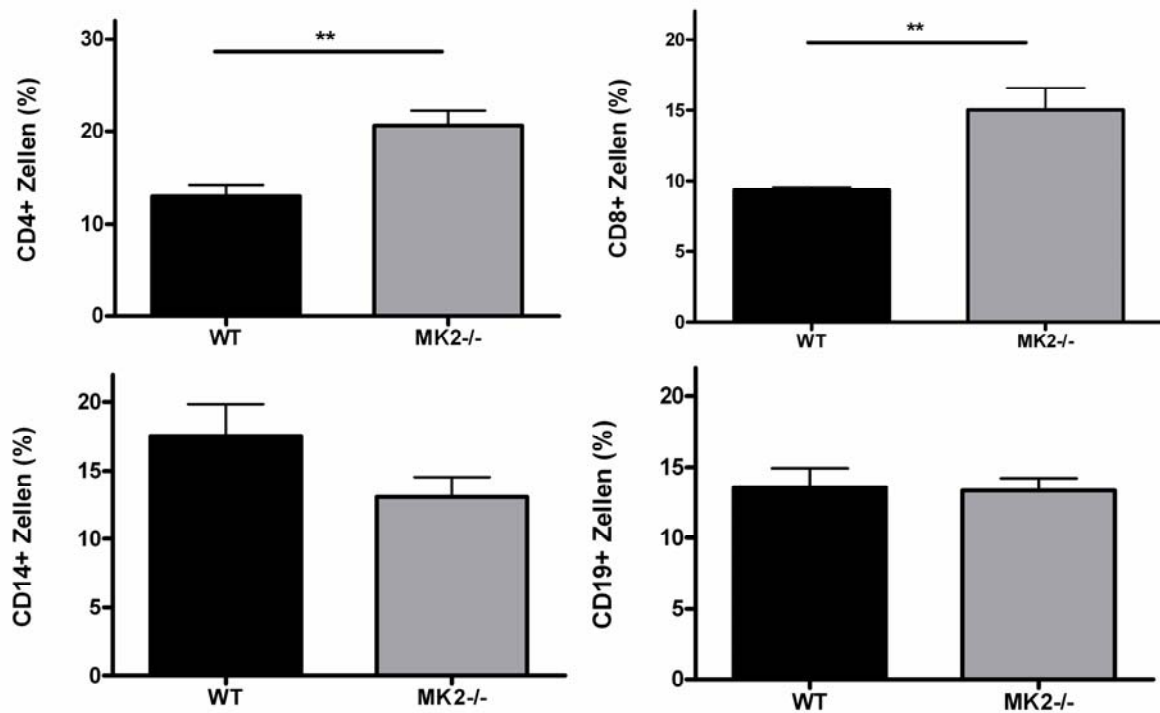


Abbildung 21: Vergleich der Leukozytensubpopulationen in der Milz von EAE-induzierten Tieren an Tag 8 nach der Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅

Zellsuspensionen von primär isolierten Leukozyten aus der Milz EAE-induzierter MK2^{-/-} (grau) Tieren und WT (schwarz) wurden durchflusszytometrisch untersucht, um die Verhältnisse der Leukozytensubpopulationen (T-Zellen, B-Zellen, Monozyten) zu bestimmen. Mit anti-CD4-, anti-CD8-, anti-CD14- und anti-CD19-Antikörper wurden n = 6 Proben pro Genotyp untersucht. MK2^{-/-} Mäuse zeigten eine erhöhte Zahl an CD4⁺ T-Helferzellen (oben links) und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (oben rechts) im Vergleich zu WT (Balken zeigen den Mittelwert der Proben; Fehlerbalken zeigen die SD; statistische Auswertung: GraphPad Prism4, studentische t-Verteilung).

Die Milz von WT Tieren beinhaltetete 12 % CD4⁺ Zellen im Unterschied zu MK2^{-/-} Mäusen, bei denen 20 % CD4⁺ Zellen gefunden wurden ($p = 0,0037$). Bei MK2^{-/-} Mäusen konnten ebenfalls mehr CD8⁺ Zellen detektiert werden. 15 % der Zellen waren positiv für CD8, wohingegen nur 9 % der WT-Milzzellen den zytotoxischen T-Zellen zugeordnet werden konnten ($p = 0,0051$).

Milzzellen, die von Mäusen in der akuten Phase der Erkrankung (Tag 16 nach Immunisierung) isoliert wurden, zeigten einen Unterschied in der prozentualen Verteilung der CD4⁺ Zellen ($p = 0,0121$). Während bei WT 15 % der Zellen CD4⁺ waren, konnten bei MK2^{-/-} Mäusen 20 % CD4⁺ Zellen detektiert werden (Abb. 22 oben links).

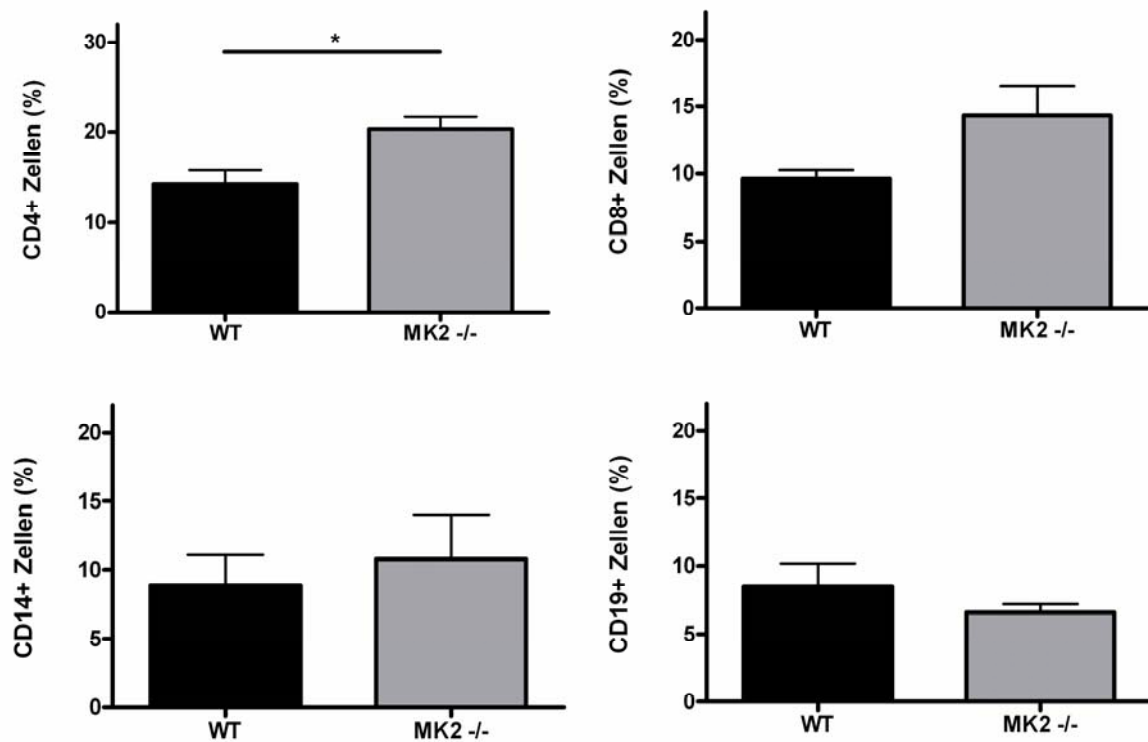


Abbildung 22: Vergleich der Leukozytensubpopulationen in der Milz von EAE-induzierten Tieren an Tag 16 nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅

Zellsuspensionen von primär isolierten Leukozyten aus der Milz EAE-induzierter MK2^{-/-} (grau) Tieren und WT (schwarz) wurden durchflusszytometrisch untersucht, um die Verhältnisse der Leukozytensubpopulationen (T-Zellen, B-Zellen, Monozyten) zu bestimmen. Mit anti-CD4-, anti-CD8-, anti-CD14- und anti-CD19-Antikörper wurden n = 6 Proben pro Genotyp untersucht. MK2^{-/-} Mäuse zeigten eine erhöhte Zahl an CD4+ T-Helferzellen (oben links) im Vergleich zu WT (Balken zeigen den Mittelwert der Proben; Fehlerbalken zeigen die SD; statistische Auswertung: GraphPad Prism4, studentische t-Verteilung).

Die Analyse von Milzzellen, die in der chronischen Phase der EAE (Tag 24 nach Immunisierung) isoliert wurden, zeigten Unterschiede in der CD4+ (Abb. 23 oben links) und CD14+ (Abb. 23 unten links) Population. Während bei WT Tieren 15 % der Zellen positiv für CD4 waren, waren bei MK2^{-/-} Mäusen 18 % CD4+ Zellen zu finden ($p = 0,0022$). CD14+ Zellen waren ebenfalls bei MK2^{-/-} Tieren erhöht. 12 % der Milzzellen aus MK2^{-/-} Tieren waren positiv für CD14, hingegen nur 6 % bei WT ($p = 0,0343$).

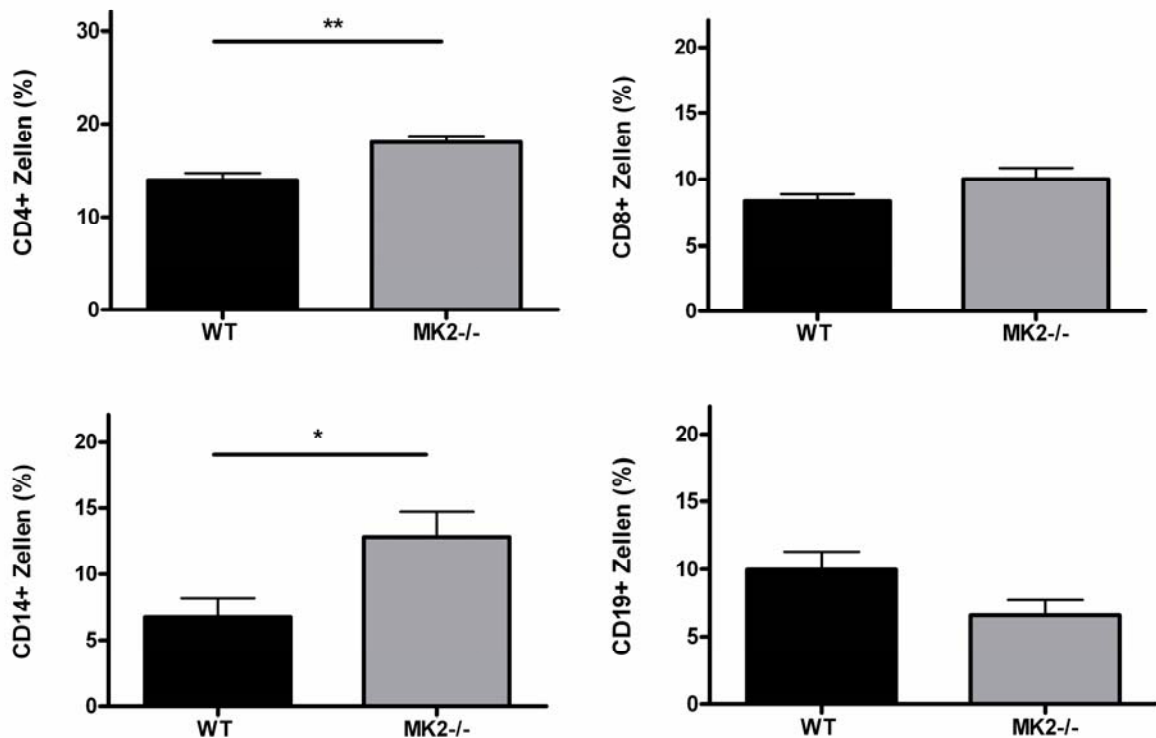


Abbildung 23: Vergleich der Leukozytensubpopulationen in der Milz von EAE-induzierter Tiere an Tag 24 nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅

Zellsuspensionen von primär isolierten Leukozyten aus der Milz EAE-induzierter MK2^{-/-} (grau) Tieren und WT (schwarz) wurden durchflusszytometrisch untersucht, um die Verhältnisse der Leukozytensubpopulationen (T-Zellen, B-Zellen, Monozyten) zu bestimmen. Mit anti-CD4-, anti-CD8-, anti-CD14- und anti-CD19-Antikörper wurden n = 6 Proben pro Genotyp untersucht. MK2^{-/-} Mäuse zeigten eine erhöhte Zahl an CD4+ T-Helferzellen (oben links) und CD14+ Monozyten (unten links) im Vergleich zu WT (Balken zeigen den Mittelwert der Proben; Fehlerbalken zeigen die SD; statistische Auswertung: GraphPad Prism4, studentische t-Verteilung).

Neben dem Vergleich der Leukozytenpopulationen von WT im Vergleich zu MK2^{-/-} Mäusen wurden die T-Zell-Populationen auch genotypspezifisch quantifiziert. Die Analyse ergab, dass bei WT eine Erniedrigung der CD8+ Population (zytotoxische T-Zellen) in der Milz an Tag 24 zu finden war (Abb. 24A), bei MK2^{-/-} Tieren hingegen eine Erniedrigung der CD4+ T-Helferzellen (Abb. 24B) im Vergleich zur gesunden Kontrolle.

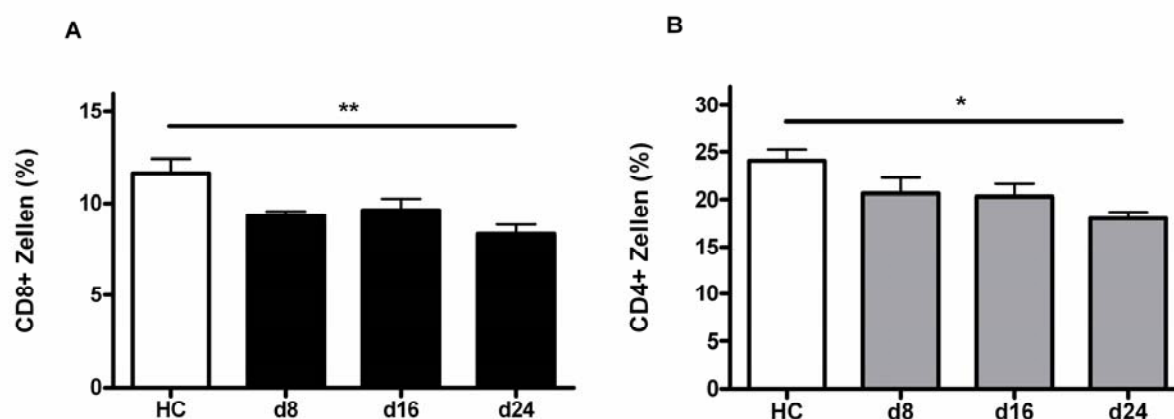


Abbildung 24: T-Zell-Verteilung in der Milz bei WT und MK2^{-/-} Mäusen im Verlauf der MOG-induzierten EAE

Zellsuspensionen von primär isolierten Leukozyten aus der Milz EAE-induzierter Tieren wurden durchflusszytometrisch untersucht, um die Verhältnisse der T-Zell-Populationen genotypspezifisch zu analysieren (n = 6 Proben pro Genotyp). WT Mäuse wiesen eine verminderte Zahl an CD8⁺ Zellen (zytotoxische T-Zellen) an Tag 24 nach Immunisierung auf (A), MK2^{-/-} Mäuse zeigten eine erniedrigte Zahl an CD4⁺ T-Helferzellen an Tag 24 im Vergleich zur gesunden Kontrolle (B); (Balken zeigen den Mittelwert der Proben; Fehlerbalken zeigen die SEM; statistische Auswertung: GraphPad Prism4, one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test).

3.1.7 MK2^{-/-} MÄUSE PRODUZIEREN WENIGER TNF α

MK2 ist essentiell für die LPS-induzierte TNF α -Biosynthese (Kotlyarov, Neininger et al. 1999). Kotlyarov et al. konnten zeigen, dass MK2 defiziente Mäuse zirka 90 % weniger TNF α produzieren und deshalb mehr stressresistent sind. MK2 scheint daher ein wichtiges Schlüsselmolekül bei der Regulation von Entzündungsreaktionen zu sein. TNF α kann seinerseits neurotoxische Wirkung haben (Harry, Lefebvre d'Hellencourt et al. 2008). Für die Charakterisierung der Entzündungsreaktion in unterschiedlichen Stadien der MOG-induzierten EAE wurde die TNF α -Konzentration im Serum von WT und MK2^{-/-} Mäusen bestimmt (n = 9 pro Gruppe). Tabelle 3 zeigt eine Zusammenfassung der TNF α -Messung (positiv getesteten Tiere).

Tabelle 3: Übersicht der Resultate aus der TNF α -Messung im Serum EAE-kranker WT und MK2^{-/-} Mäuse

	HC	d8	d16	d24
WT	2 (9) [*]	1 (9)	5 (9)	2 (9)
MK2	0 (9)	1 (9)	2 (9)	1 (9)

^{*}2(9): bei zwei von neun Tieren konnte TNF α im Serum nachgewiesen werden

In der gesunden Kontrolle konnte bei zwei WT Tieren TNF α nachgewiesen werden, bei MK2 $^{-/-}$ hingegen waren alle Tiere negativ. An Tag 8 nach der Immunisierung konnte pro Genotyp bei je einem Tier TNF α im Serum detektiert werden. In der akuten Phase der Erkrankung an Tag 16 nach EAE-Induktion wurden bei WT fünf, bei MK2 $^{-/-}$ Mäusen zwei Tiere positiv getestet. In der chronischen Phase der EAE an Tag 24 waren zwei von neun WT Tiere und eines von neun MK2 $^{-/-}$ Tieren positiv für TNF α im Serum.

Tabelle 4 zeigt die Konzentration im Serum, die in den einzelnen positiven Tieren gemessen wurden.

Tabelle 4: Übersicht über die TNF α -Konzentrationen (pg/ml) im Serum von EAE-kranken WT und MK2 $^{-/-}$ Mäusen

	HC		d8	d16		d24	
WT	1	0,029	280,84	1	0,12	1	0,039
	2	66,46		2	0,09		
				3	0,01		
				4	0,07		
				5	30,78		
MK2			0,011	1	0,039		0,17
				2	0,008		

3.1.8 DIE IGF-1-KONZENTRATION IM BLUT IST WÄHREND DER EAE UNBEEINFLUSST

Inulin-like growth factor (IGF) - 1 ist ein Wachstumsfaktor, der im ZNS lokal von Mikrogliazellen ausgeschüttet wird und die Remyelinisierung fördert (Beilharz, Russo et al. 1998). Seit einiger Zeit gibt es Hinweise, dass IGF-1 und TNF α miteinander interagieren und dieser *crossstalk* ein wichtiger Mechanismus bei der Neurodegeneration zu sein scheint (Loddick and Rothwell 1999). IGF-1 wurde im Serum und im Überstand von ZNS-Homogenat bei WT Tieren und MK2 $^{-/-}$ Mäusen (n = 9 pro Genotyp) gemessen. Im Serum konnten in der gesunden Kontrolle (Abb. 25A) 500 pg/ml IGF-1 in beiden Genotypen gemessen werden. Nach Induktion der EAE sank an Tag 8 der IGF-1-Spiegel in MK2 $^{-/-}$ Mäusen tendenziell leicht ab (Abb. 25B). Sowohl an Tag 16 (Abb. 25C) als auch an Tag 24 (Abb. 25D) waren die Spiegel unverändert im Vergleich zur gesunden Kontrolle. Zwischen den beiden Genotypen war kein Unterschied zu messen (Abb. 25). Ebenso ergab die Bestimmung des IGF-1 im Überstand von ZNS-Homogenat keinen Unterschied (*Daten nicht gezeigt*).

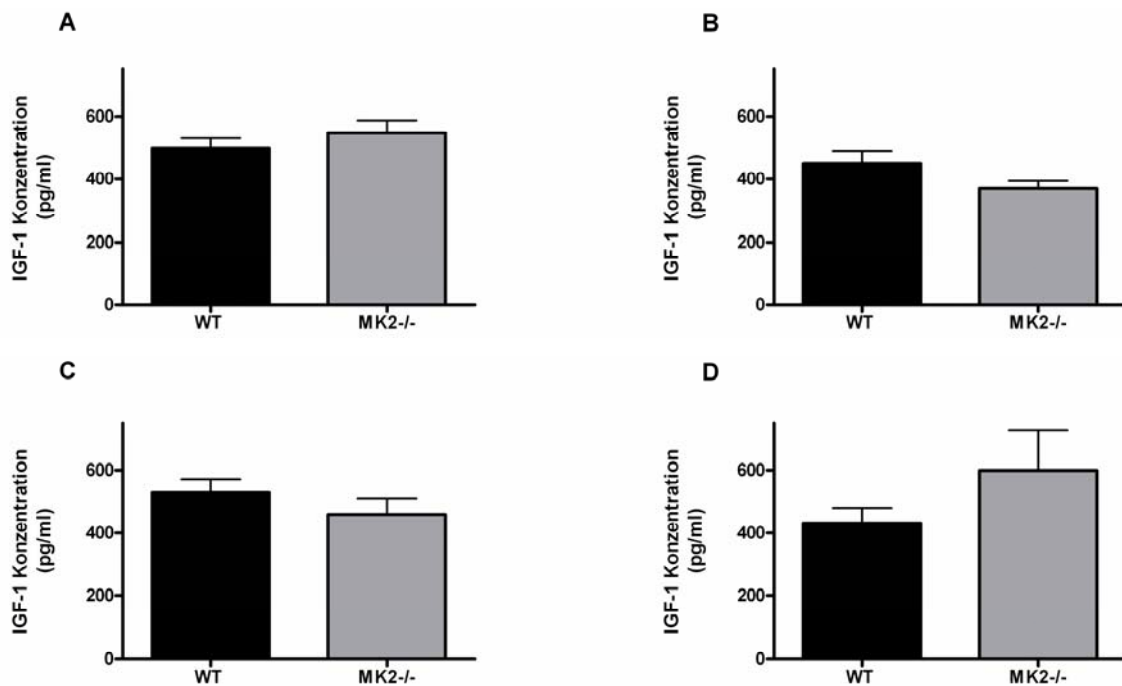


Abbildung 25: IGF-1-Konzentration im Serum von MK2^{-/-} und WT Mäusen in unterschiedlichen Stadien der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE

Die IGF-1-Konzentration im Serum EAE-kranker Tiere wurde in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung mittels ELISA untersucht. A) gesunde Kontrolle, B) Tag 8 nach Immunisierung, C) Tag 16 nach Immunisierung, D) Tag 24 nach Immunisierung. Zu keinem Zeitpunkt der Erkrankung und in der gesunden Kontrolle konnte ein Unterschied der IGF-1-Konzentration bei WT (schwarz) im Vergleich zu MK2^{-/-} (grau) Tiere festgestellt werden; (n = 9 pro Gruppe; statistische Auswertung: GraphPad Prims4 Software, studentische t-Verteilung; Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SEM)).

3.1.9 DIE mRNA-EXPRESSION PROINFLAMMATORISCHER ZYTOKINE IST VERÄNDERT

Zur Untersuchung der Aktivität der Leukozyten, die aus dem ZNS bzw. der Milz isoliert wurden, wurde die mRNA-Expression verschiedener entzündungsrelevanter Zytokine in der Real Time-PCR gemessen. Zunächst wurde die Expression von IL-2 gemessen. IL-2 wird auch als T-Zell-Wachstumsfaktor bezeichnet und fördert die Proliferation, Differenzierung und regt die Interferon- und TNF-Produktion an (Smith 1988).

In primär isolierten Leukozyten aus der Milz von Mäusen, die an drei unterschiedlichen Zeitpunkten der EAE-Erkrankung im Vergleich zur gesunden Kontrolle gemessen wurde, konnte eine verminderte Expression von IL-2 an Tag 8 nach EAE-Induktion sowohl bei WT (schwarz) als auch bei MK2^{-/-} (grau) Mäusen gezeigt werden ($p < 0,001$) (Abb. 26A). Das mRNA-Niveau bei MK2^{-/-} Tieren stieg an Tag 16, der akuten Phase der EAE, im Vergleich zur Expression an Tag 8 wieder an ($p < 0,05$).

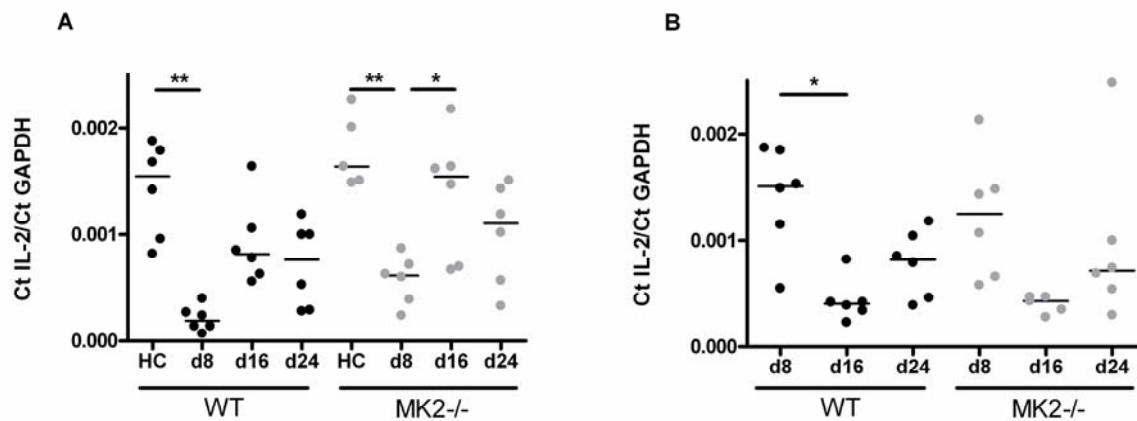


Abbildung 26: mRNA-Expression von IL-2 in Leukozyten aus der Milz und dem ZNS EAE-kranker MK2^{-/-} und WT Tiere

Die mRNA-Expression von IL-2 wurde in Leukozyten, die aus der Milz (A) bzw. dem ZNS (B) von WT und MK2^{-/-} Tieren in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung durch Real Time-PCR bestimmt. In Proben aus der Milz von WT Mäusen (schwarz) konnte eine erniedrigte Expression von IL-2 an Tag 8 nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ festgestellt werden, ebenso wie bei MK2^{-/-} Tieren (grau). Im Gegensatz zu WT wurde bei MK2^{-/-} Mäusen eine Erhöhung des IL-2-Levels an Tag 16 im Vergleich zu Tag 8 gefunden. In Leukozyten aus dem ZNS konnte bei WT (schwarz) eine Erniedrigung des mRNA-Niveaus von IL-2 an Tag 16 im Vergleich zu Tag 8 festgestellt werden, wohingegen bei MK2^{-/-} Tieren (grau) kein Unterschied der Expression gefunden wurde (jeder Punkt ein Tier; statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software: one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test).

Leukozyten, die aus dem ZNS kranker Tiere isoliert wurden zeigten nur bei WT Tieren eine Reduktion des mRNA-Levels an Tag 16 im Vergleich zu Tag 8 ($p < 0.05$) nach Immunisierung der Tiere (Abb. 26B).

Neben IL-2 wurde die mRNA-Expression von IL-6 gemessen. IL-6 spielt eine Schlüsselrolle bei der Übertragung von Mechanismen der angeborenen zur adaptiven Immunantwort und wirkt anti-apoptotisch auf Immunzellen während einer Entzündungsreaktion (Jones 2005).

In aus der Milz isolierten Leukozyten von WT (schwarz) und MK2^{-/-} Mäusen (grau) konnte eine Reduktion der mRNA-Expression von IL-6 an Tag 8 nach der Immunisierung im Vergleich zur gesunden Kontrolle sowohl in WT als auch in MK2^{-/-} Mäusen detektiert werden ($p < 0,05$) (Abb. 27A).

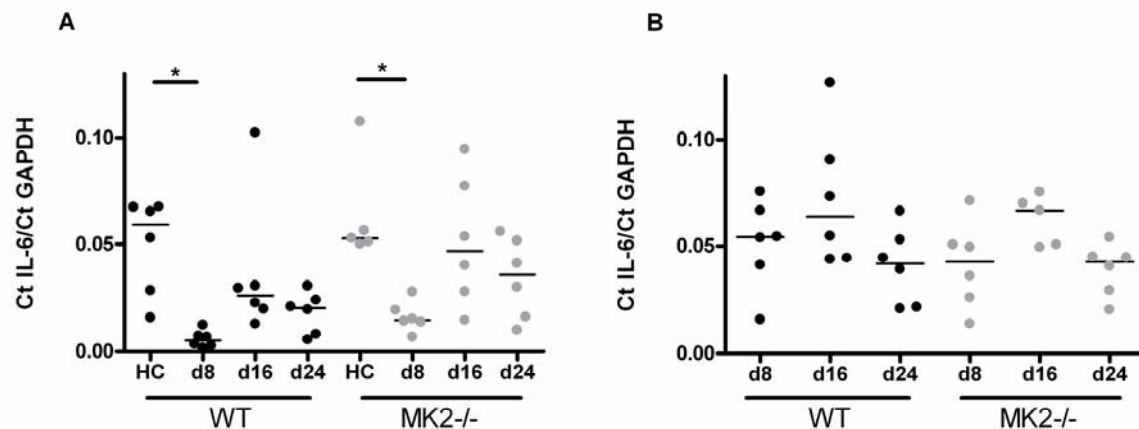


Abbildung 27: mRNA-Expression von IL-6 in Leukozyten aus der Milz und dem ZNS EAE-kranker MK2-/- und WT Tiere

Die mRNA-Expression von IL-6 wurde in Leukozyten, die aus der Milz (A) bzw. dem ZNS (B) von WT und MK2-/- Tieren in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung durch Real Time-PCR bestimmt. In Proben aus der Milz von WT Mäusen (schwarz) konnte eine erniedrigte Expression von IL-6 an Tag 8 nach Immunisierung festgestellt werden, ebenso wie bei MK2-/- Tieren (grau). In Leukozyten aus dem ZNS wurde keine Veränderung des mRNA-Niveaus von IL-6 gefunden (jeder Punkt ein Tier; statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software: one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test).

In Leukozyten, die aus dem ZNS kranker Tiere isoliert wurden, konnte keine Veränderung der IL-6-mRNA-Expression festgestellt werden (Abb. 27B).

Als weiterer essentieller Entzündungsmediator wurde die mRNA-Expression TNF α gemessen. Kotlyarov et al. konnten zeigen, dass die MK2-abhängige TNF α -Biosynthese post-transkriptionell reguliert wird, die mRNA Expression also unbeeinflusst bleibt (Kotlyarov, Neiningner et al. 1999). Hier wurde die mRNA-Expression, ebenfalls wie die von IL-2 und IL-6, in Leukozyten gemessen, die an unterschiedlichen Zeitpunkten aus der Milz und dem ZNS von EAE-kranken Tieren isoliert wurden.

Bei Leukozyten, die aus der Milz von WT Tieren (schwarz) stammten, konnte keine Veränderung des TNF α -mRNA-Levels festgestellt werden. In Leukozyten MK2-defizienter Mäuse (grau) hingegen stieg die mRNA-Expression an Tag 8 nach der Immunisierung im Vergleich zur gesunden Kontrolle an ($p < 0,05$). An Tag 16 und Tag 24 nach EAE-Induktion war die Expression auf den Ausgangswert gesunken ($p < 0,05$). Zwischen WT und MK2-/- konnte kein signifikanter Unterschied in der TNF α -mRNA-Expression gefunden werden (Abb. 28A).

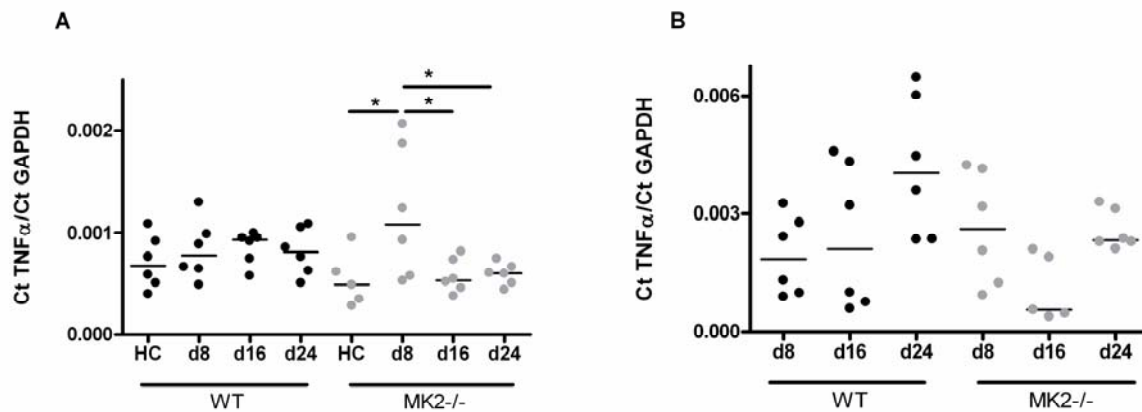


Abbildung 28: mRNA-Expression von TNF α in Leukozyten aus der Milz und dem ZNS EAE-kranker WT und MK2 $^{-/-}$ Tiere

Die mRNA-Expression von TNF α wurde in Leukozyten, die aus der Milz (A) bzw. dem ZNS (B) von WT und MK2 $^{-/-}$ Tieren in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung durch Real Time-PCR bestimmt. In Proben aus der Milz von WT Mäusen (schwarz) konnte keine veränderte Expression detektiert werden, im Gegensatz zu Proben aus MK2 $^{-/-}$ Tieren (grau), bei denen die Expression von TNF α an Tag 8 erhöht war. In Leukozyten aus dem ZNS wurde keine Veränderung des mRNA-Niveaus von TNF α gefunden (jeder Punkt ein Tier; statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software: one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test).

In der Expression der TNF α -mRNA von Leukozyten, die aus dem ZNS kranker Tiere isoliert wurde, konnte kein Unterschied gefunden werden (Abb. 28B).

3.1.10 PROTEINE DER TNFR1 SIGNALKASKADE

TNF α vermittelt innerhalb der Zelle ein breites Spektrum an Effekten. Über die Bindung von trimerisiertem TNF α an seinen Rezeptor TNF Rezeptor (TNFR) 1 werden Signale wie Apoptose, Nekrose oder auch Aktivierung, Differenzierung und Proliferation ausgelöst. Diese Effekte werden durch Komplexbildung des TNFR1 mit Adaptermolekülen bewirkt bzw. ein extrazelluläres antiapoptotisches Signal und ein intrazelluläres proapoptotisches Signal vermittelt (Schutze, Tchikov et al. 2008). Bei der Komplexbildung bzw. der intra- oder extrazellulären Signalübertragung des TNFR1 spielen RIP 1, cFLIP und Caspase 8 eine zentrale Rolle. Wie bereits erwähnt demonstrierten Kotlyarov und Mitarbeiter, dass die TNF α -Biosynthese post-transkriptionell durch MK2 reguliert wird, die mRNA Expression aber unbeeinflusst bleibt (Kotlyarov, Neininger et al. 1999). Untersuchungen zur TNF α -Konzentration ergaben, dass tendenziell weniger TNF α bei EAE-induzierten

MK2-defizienten Tieren nachgewiesen werden konnte. Nun sollte geklärt werden, ob durch die reduzierte TNF α -Konzentration die Adapter der TNFR1 Signalkaskade beeinflusst waren. Hierzu wurden Proteinlysate von Leukozyten aus der Milz von WT und MK2 $^{-/-}$ Mäusen in verschiedenen Krankheitsstadien elektrophoretisch aufgetrennt und Mitglieder des TNFR1 Signalwegs sichtbar gemacht und quantifiziert. Die Expression von RIP 1 war beim Vergleich von WT und MK2 $^{-/-}$ Proteinlysaten unbeeinflusst, wohingegen die Expression von cFLIP an Tag 24 nach Immunisierung einmal leicht (Abb. 29A; 10 %) und einmal stark (Abb. 29B; 300 %) verändert war. Die Expression von Caspase 8 schien bei beiden Genotypen unverändert zu sein und sich auch im Vergleich von WT Kontrolltieren und MK2-defizienten Mäusen nicht zu unterscheiden (*Daten nicht dargestellt*).

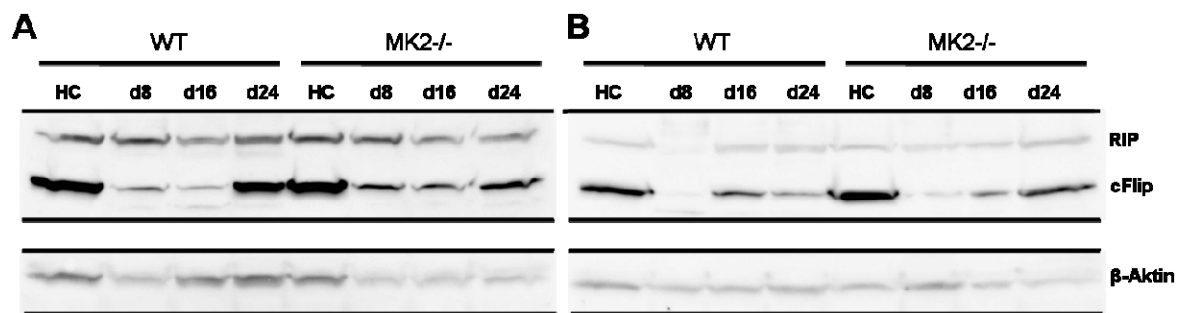


Abbildung 29: Expression für die Signaltransduktion des TNFR1 relevanter Proteine in MK2-defizienten Leukozyten und WT Kontrollen während der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE

Proteinlysate von Leukozyten, die aus der Milz von MK2 $^{-/-}$ und WT Mäusen isoliert wurden (A) Experiment 1: gepoolte Lysate von n = 3 pro Gruppe; B) Experiment 2: gepoolte Lysate von n = 3 pro Gruppe), wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mit anti-RIP, anti-cFLIP und anti- β -Aktin Antikörper immunogelblottet. Die Analyse der Bandenintensität ergab, dass die Expression von RIP 1 sowohl in unterschiedlichen Stadien der EAE, als auch zwischen den Genotypen unverändert war. cFLIP hingegen war bei MK2 $^{-/-}$ Tieren an Tag 24 nach der Immunisierung im Vergleich zu WT erhöht - A) rechte Bande; B) rechte Bande (Quantitative Auswertung: BioID Software; peqlab).

3.1.11 DIE mRNA-EXPRESSION VON ADAPTERN DER TNFR1 SIGNALKASKADE IST VERÄNDERT

Neben der Proteinexpression der Adaptermoleküle der TNFR1 Signalkaskade wurde auch deren mRNA-Expression in Leukozyten aus der Milz und in Leukozyten gemessen, die aus dem ZNS EAE-kranker WT (schwarz) und MK2^{-/-} (grau) Tiere isoliert wurden.

Bei MK2^{-/-} Tieren war eine Erhöhung der mRNA Expression des TNFR1 an Tag 8 nach der Immunisierung im Vergleich zur gesunden Kontrolle zu sehen ($p < 0,05$) (Abb. 30A), ebenso wie eine Erhöhung der RIP Kinase 1-mRNA an Tag 8 nach EAE-Induktion im Vergleich zur gesunden Kontrolle ($p < 0,01$), Tag 16 ($p < 0,01$) und Tag 24 ($p < 0,05$) nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ (Abb. 30B). Der Level der cFLIP-mRNA blieb bei allen Tieren unverändert (Abb. 30D). Der von Caspase 8 war bei MK2^{-/-} Tieren an Tag 16 im Vergleich zu Tag 8 nach Immunisierung vermindert ($p < 0,05$) (Abb. 30C). WT Tiere zeigten bei all diesen Parametern keine Veränderungen. Der Vergleich der mRNA-Expression von NFκB von WT und MK2^{-/-} Tieren zeigte einen signifikanten Unterschied an Tag 8 nach EAE-Induktion. Der NFκB-mRNA-Level in Zellen von MK2-defizienten Tieren war im Vergleich zu denen von WT erhöht ($p < 0,05$) (Abb. 30E).

Im Gegensatz zu aus der Milz isolierten Leukozyten stellt die Population derer, die aus dem ZNS isoliert wurden spezialisierte, auf Selbst-Antigen *geprimte* Effektorzellen dar. In diese spezialisierten Leukozyten konnten keine Veränderungen der mRNA-Expression des TNFR1, der RIP Kinase, von Caspase 8 oder cFLIP und NFκB gemessen werden (Abb. 31A-E).

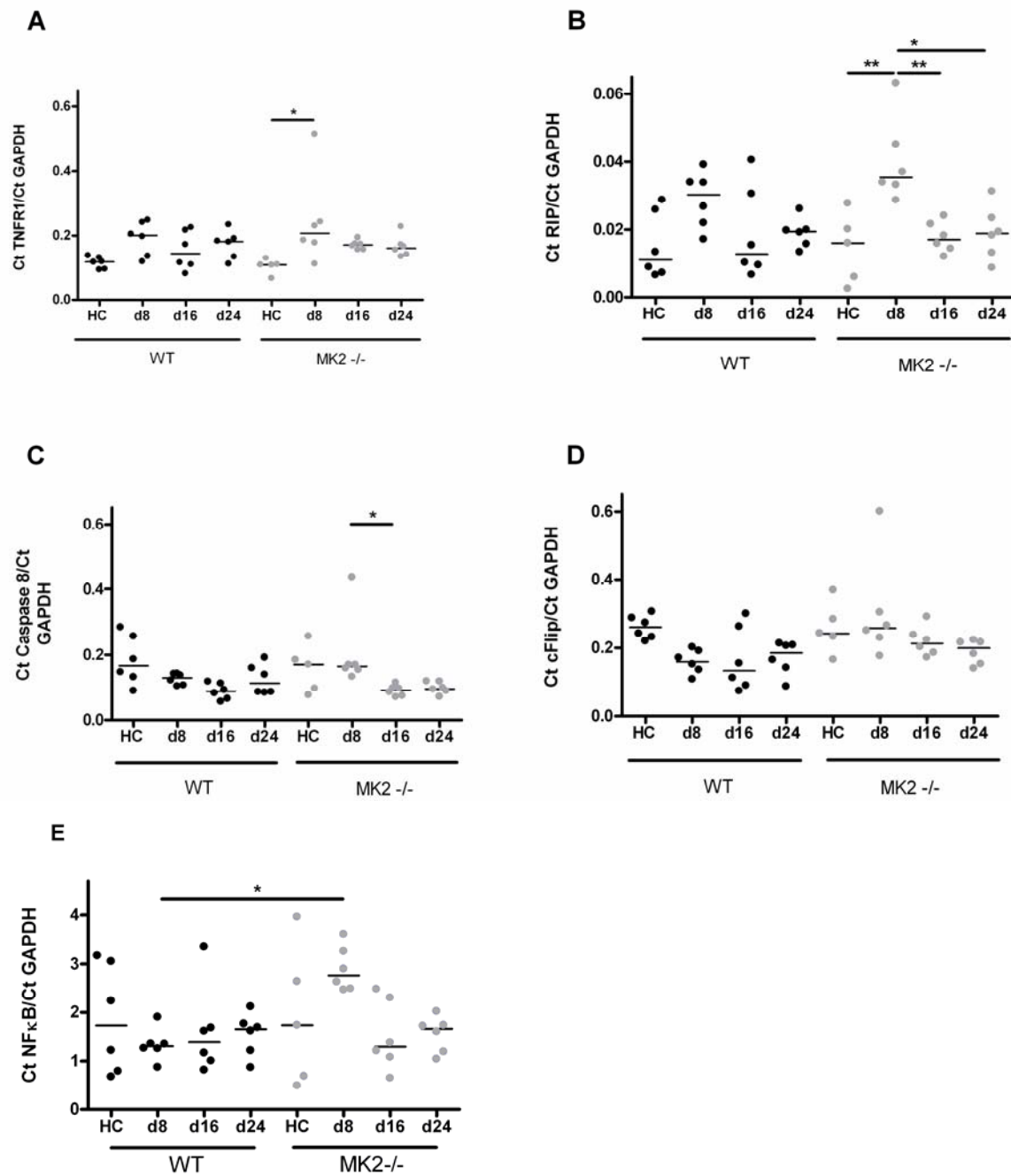


Abbildung 30: mRNA-Expression von Molekülen der TNFR1 Signalkaskade in Leukozyten aus der Milz von MK2-defizienten Tieren und WT Kontrollen im Verlauf der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE

Die mRNA-Expression von TNFR1 (A), RIP (B), Caspase 8 (C), cFLIP (D) und NFκB (E) wurde in Leukozyten, die aus der Milz von WT und MK2^{-/-} Tieren isoliert waren, in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung durch Real Time-PCR bestimmt. In WT-Proben (schwarz) konnte keine veränderte Expression der mRNA-Level detektiert werden, im Gegensatz zu Proben aus MK2^{-/-} Tieren (grau), bei denen die Expression von TNFR1 an Tag 8 im Vergleich zur gesunden Kontrolle erhöht war (A), ebenso wie die Expression von RIP (B). Die Expression von Caspase 8 nahm bei MK2^{-/-} Tieren an Tag 16 im Vergleich zu Tag 8 nach Immunisierung ab (C). Im Vergleich der NFκB-mRNA-Expression an Tag 8 von WT und MK2^{-/-} Mäusen wurde eine erhöhte Expression bei MK2^{-/-} Tieren gefunden (E); (jeder Punkt ein Tier; statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software: one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test).

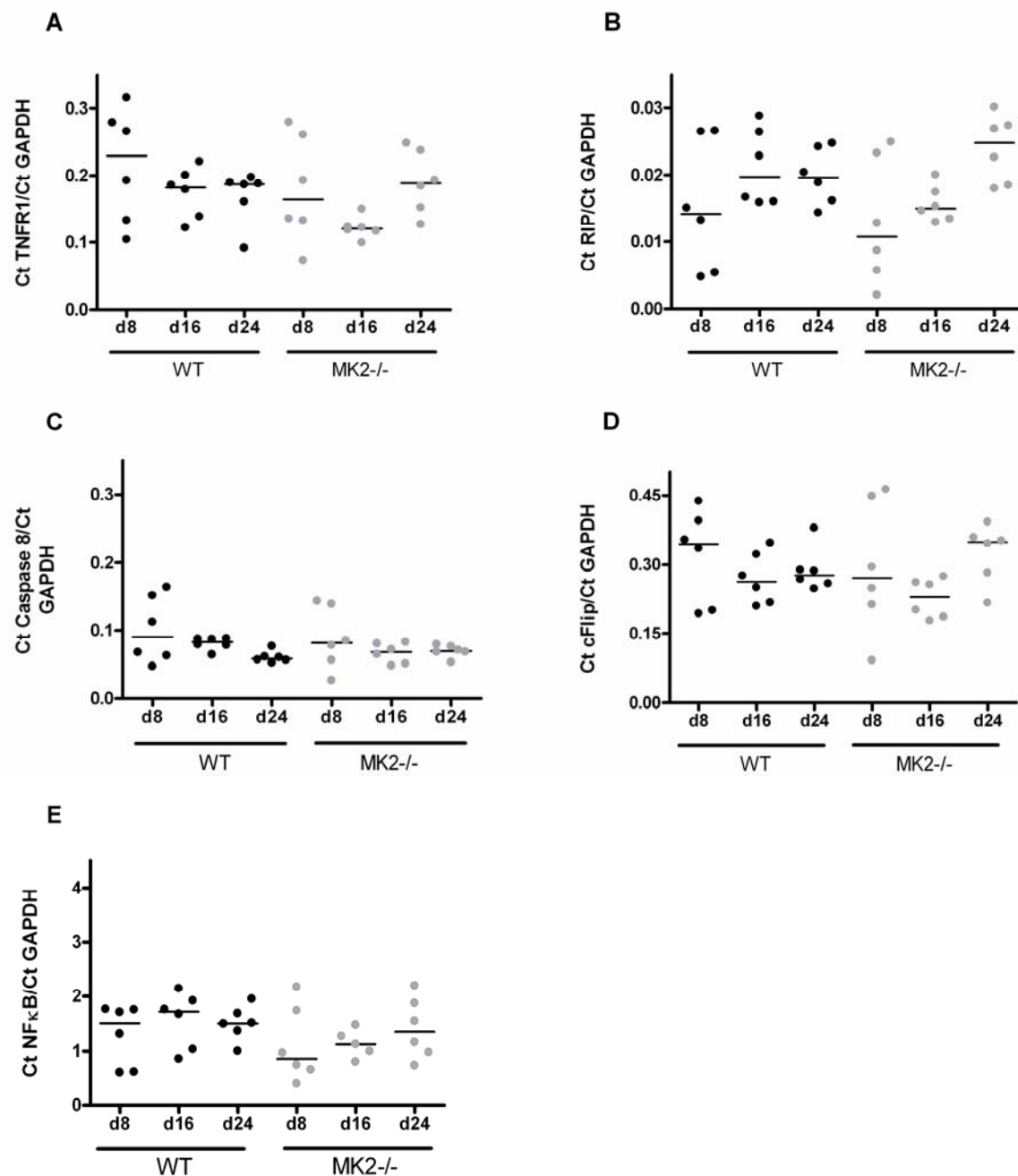


Abbildung 31: mRNA-Expression von Molekülen der TNFR1 Signalkaskade in Leukozyten aus dem ZNS von MK2-defizienten Tieren und WT Kontrollen im Verlauf der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE

Die mRNA-Expression von TNFR1 (A), RIP (B), Caspase 8 (C), cFLIP (D) und NFκB (E) wurde in Leukozyten, die aus dem ZNS von WT (schwarz) und MK2^{-/-} (grau) Tieren isoliert waren, in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung durch Real Time-PCR bestimmt. Es konnte keine Veränderung der Expression der mRNA-Level detektiert werden; (jeder Punkt ein Tier; statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software: one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test).

In Tabelle 5 sind die signifikanten Unterschiede innerhalb der Mausstämme bzw. Unterschiede zwischen WT und MK2-defizienten Mäusen zusammengefasst.

Tabelle 5: Zusammenfassung der mRNA-Expression unterschiedlicher Parameter der TNFR1-Signalkaskade in Leukozyten aus der Milz und dem ZNS im Verlauf der EAE

	Leukozyten aus der Milz			Leukozyten aus dem ZNS
TNFR1	<i>WT</i> *	<i>MK2-/-</i> **	<i>WT vs. MK2-/-</i> ***	-
	-	+	-	
RIP	<i>WT</i>	<i>MK2-/-</i>	<i>WT vs. MK2-/-</i>	-
	-	+	-	
Caspase 8	<i>WT</i>	<i>MK2-/-</i>	<i>WT vs. MK2-/-</i>	-
	-	+	-	
cFLIP	<i>WT</i>	<i>MK2-/-</i>	<i>WT vs. MK2-/-</i>	-
	-	-	-	
NFκB	<i>WT</i>	<i>MK2-/-</i>	<i>WT vs. MK2-/-</i>	-
	-	-	+	

*WT: Unterschiede während des EAE-Verlaufs bei WT Tieren

**MK2-/-: Unterschiede während des EAE-Verlaufs bei WT Tieren

***WT vs. MK2-/-: Unterschiede während des EAE-Verlaufs zwischen WT und MK2-/- Mäusen

(+ signifikanter Unterschied; - kein Unterschied)

3.1.12 LEUKOZYTEN VON MK2-/- TIEREN BINDEN SCHWACH AN ENDOTHELZELLEN

Sowohl das Adhäsionsmolekül ICAM-1 als auch VCAM-1 werden MK2-abhängig exprimiert. In einem Adhäsionsexperiment sollte geklärt werden, ob die Verminderte Expression dieser Adhäsionsmoleküle eine Veränderung im Adhäsionsverhalten von MK2-defizienten Zellen bewirkte. Hierzu wurde eine humane Endothelzelllinie (hCMEC/D3) mit murinen primär isolierten Leukozyten kokultiviert. Zuvor wurden die Zellen in Reinkultur stimuliert. Nach 30 min. Inkubation wurden die adhärenenten Leukozyten wieder ab gespült und durchflusszytometrisch quantifiziert.

Die Analyse ergab, dass zirka 2 % der unstimulierten adhärenenten Zellen CD3 positiv waren. Nach Stimulation dieser Zellen konnte kein Unterschied im Adhäsionsverhalten festgestellt werden. Bei Vorstimulation der humanen Leukozyten änderte sich die Adhäsion der Leukozyten ebenfalls nicht. Bei Stimulation von sowohl Endothelzellen als auch Leukozyten konnte eine gesteigerte Adhäsion von WT-CD3+ Zellen (schwarz) gezeigt werden, im Gegensatz zu Leukozyten aus MK2-/- Tieren (grau), deren Adhäsion unbeeinflusst blieb ($p < 0,01$) (Abb. 32A).

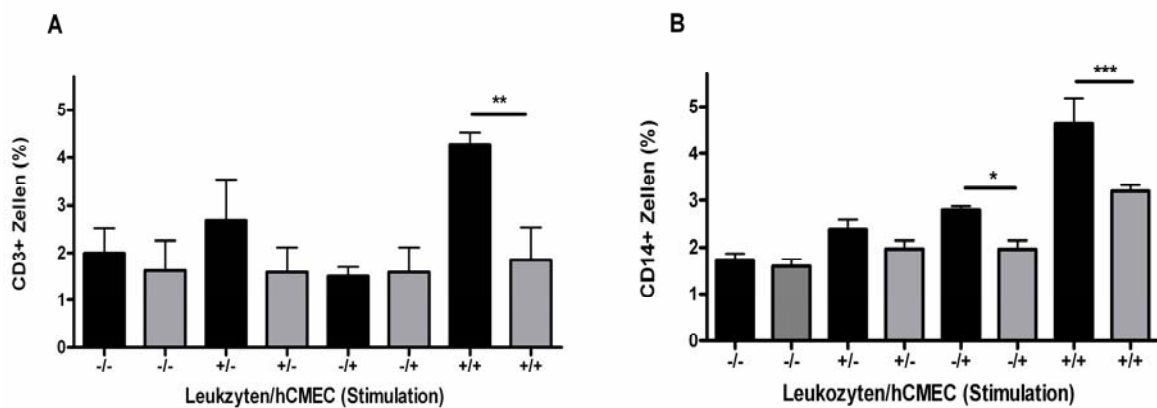


Abbildung 32: Adhäsionsverhalten von aktivierten murinen MK2-defizienten und WT Leukozyten an humanen Endothelzellen *in vitro*

Primär isolierte Leukozyten aus der Milz gesunder WT und MK2^{-/-} Mäuse wurden einzeln, *in vitro* stimuliert und auf unterschiedlich behandelte humane Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke gegeben. Nach 30 min. Inkubation wurden die adhärenen Zellen durchflusszytometrisch gemessen und quantifiziert. Aktivierte, MK2-defiziente CD3⁺ T-Zellen banden weniger an stimulierte hCMEC/D3 Zellen als Zellen aus WT (A). Ebenso konnte dies bei der Population CD14⁺ Monozyten beobachtet werden (B). MK2-defiziente CD14⁺ Zellen banden unstimuliert weniger an aktiviertes Endothel als WT.

Bei der Untersuchung der CD14⁺ Population (Abb. 32B) konnte Ähnliches beobachtet werden. Während sich die Adhäsion der Zellen aus WT (schwarz) deutlich nach Stimulation anstieg, war die Zahl adhärenen Zellen aus MK2^{-/-} Tieren im Vergleich deutlich geringer (unstimulierte Leukozyten/stimulierte Endothelzellen: $p < 0.05$; Stimulation beider Reinkulturen: $p < 0,001$). Dies zeigt, dass die Adhäsion von Leukozyten durch MK2 deutlich beeinflusst ist. MK2-defiziente Zellen werden im Vergleich zu WT Leukozyten an ruhenden oder aktivierten Endothelzellen weniger adhären.

3.1.13 mRNA-EXPRESSION VON ADHÄSIONSMOLEKÜLEN AUF LEUKOZYTEN

Adhäsionsmoleküle spielen eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion und Migration von Zellen. Die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 werden post-transkriptionell von MK2 reguliert. Um zu klären, ob Expressionsunterschiede auf mRNA-Ebene zwischen WT und MK2^{-/-} Mäusen bestehen, wurde die mRNA-Expression von ICAM-1, VCAM-1 und VLA-4 auf Leukozyten, die in unterschiedlichen Stadien der EAE-Erkrankung aus der Milz isoliert wurden, gemessen. Die Expression von VLA-4 mRNA war zu keinem Zeitpunkt und nicht im Vergleich WT zu MK2^{-/-} Tieren verändert (Abb. 33A).

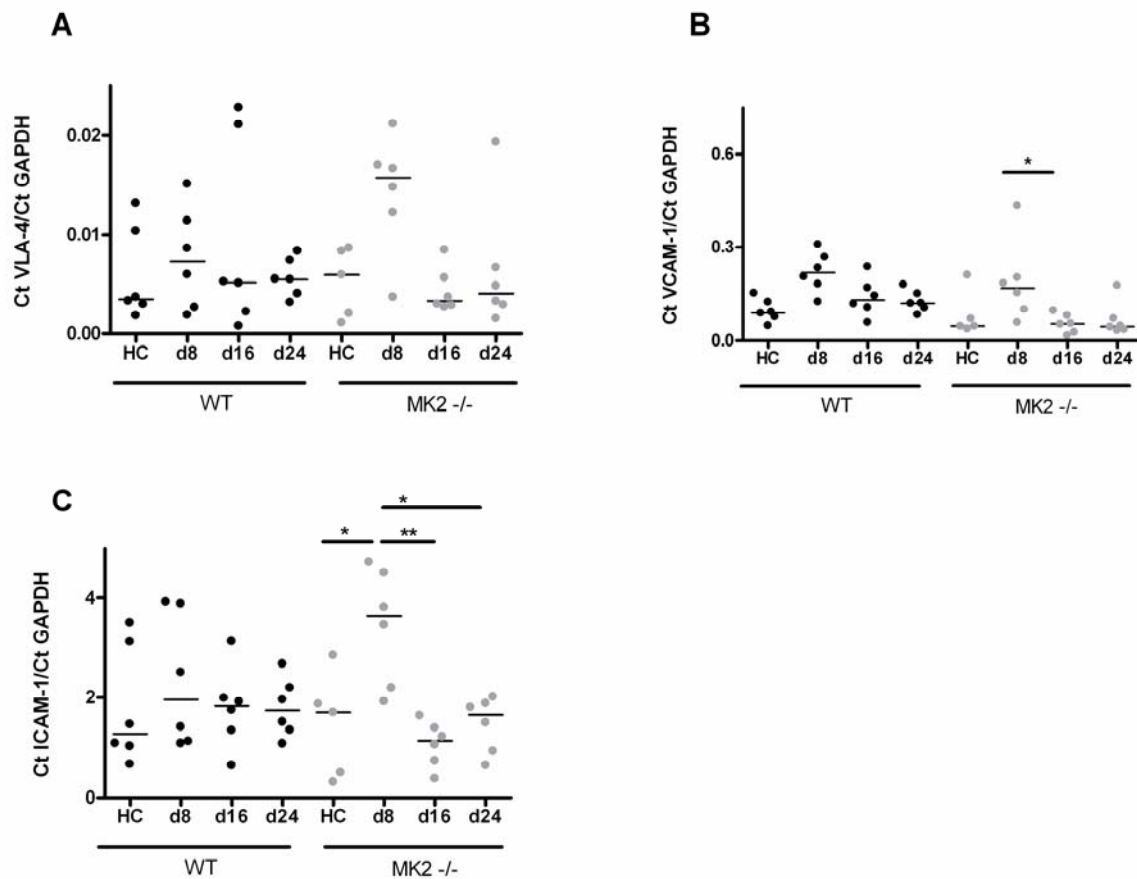


Abbildung 33: mRNA-Expression von Adhäsionsmolekülen in Leukozyten aus der Milz EAE-kranker WT Tiere und MK2^{-/-} Mäuse

Die mRNA-Expression von VLA-4 (A), VCAM-1 (B) und ICAM-1 (C) wurde in Leukozyten, die aus der Milz von WT (schwarz) und MK2^{-/-} (grau) Tieren isoliert wurden, in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung durch Real Time-PCR bestimmt. Es konnte eine Veränderung der mRNA-Level von VCAM-1 und ICAM-1 in MK2^{-/-} Mäusen detektiert werden. Während VCAM-1 an Tag 8 nach EAE-Induktion im Vergleich zur gesunden Kontrolle erniedrigt war (B), konnte eine erhöhte Expression von ICAM-1 an Tag 8 im Vergleich zur gesunden Kontrolle und Tag 16 und Tag 24 (C) festgestellt werden; (jeder Punkt ein Tier; statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software: one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test).

Die mRNA-Expression von VCAM-1 war bei MK2-defizienten Tieren an Tag 16 nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ im Vergleich zu Tag 8 vermindert ($p < 0,05$) (Abb. 33B). Die Expression von ICAM-1 war an Tag 8 nach der Immunisierung bei MK2^{-/-} Tieren im Vergleich zur gesunden Kontrolle erhöht ($p < 0,05$). An Tag 16 ($p < 0,01$) bzw. Tag 24 ($p < 0,05$) nach der Immunisierung war der mRNA-Level von ICAM-1 auf das Ausgangsniveau gesunken (Abb. 33C).

Neben der Messung der mRNA-Expression von Adhäsionsmolekülen in Zellen aus der Milz, wurden Leukozyten, die aus dem ZNS kranker Tiere isoliert wurden, gemessen.

Die Analyse ergab, dass die mRNA-Expression von VLA-4 in MK2-defizienten Mäusen an Tag 24 nach der Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ im Vergleich zu Tag 8 erhöht war ($p < 0,05$) (Abb. 34A). Bei der Expression der mRNA von VCAM-1 (Abb. 34B) und ICAM-1 (Abb. 34C) konnte kein Unterschied gemessen werden. Zwischen WT und MK2^{-/-} Tieren bestand weder bei der Expression der Adhäsionsmolekül-mRNA in der Milz, noch im ZNS ein Unterschied.

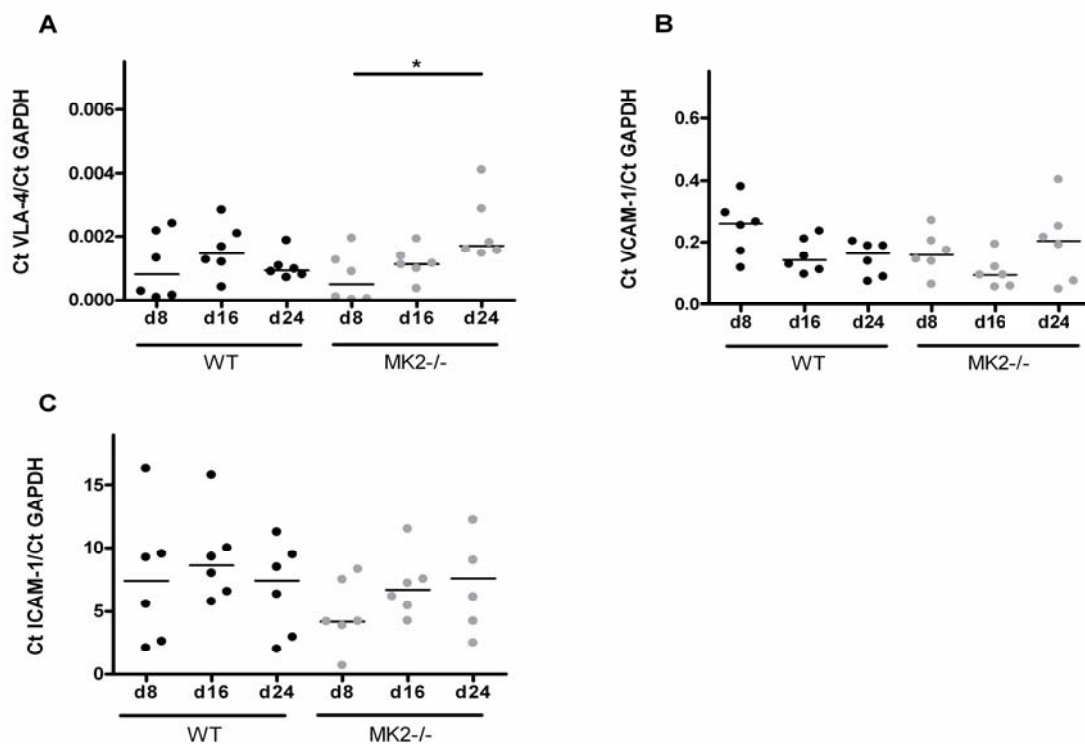


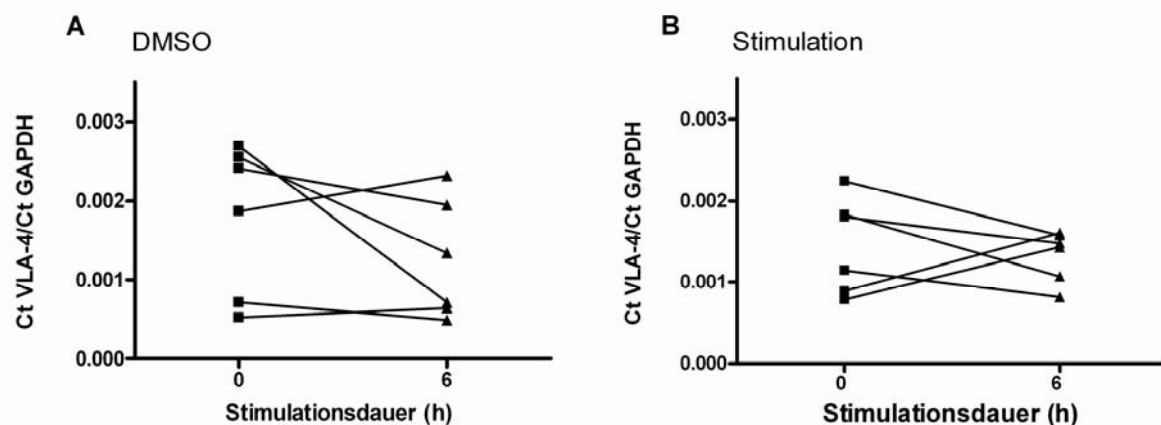
Abbildung 34: mRNA-Expression von Adhäsionsmolekülen in Leukozyten aus dem ZNS EAE-kranker MK2^{-/-} und WT Tiere

Die mRNA-Expression von VLA-4 (A), VCAM-1 (B) und ICAM-1 (C) wurde in Leukozyten, die aus dem ZNS von WT (schwarz) und MK2^{-/-} (grau) Tieren isoliert waren, in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung durch Real Time-PCR bestimmt. Es konnte eine Veränderung des mRNA-Level von VLA-4 in MK2^{-/-} Mäusen detektiert werden. Im Vergleich von Tag 8 zu Tag 24 nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ konnte eine Erhöhung der mRNA-Expression von VLA-4 festgestellt werden (A); (jeder Punkt ein Tier; statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software: one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test).

3.2 ERGEBNISSE TEIL 2: DIE ROLLE DER MK2 BEI DER REGULATION VON VLA-4

3.2.1 DIE VLA-4 mRNA-EXPRESSION IST IN ABHÄNGIGKEIT VON SB203580 REDUZIERT

Bei der Biosynthese von Protein nimmt MK2 durch post-transkriptionelle mRNA-Stabilisierung über Adenin-Uracil-reiche Elemente in der 3'-untranslatierten Region, Einfluss auf die entsprechende Proteinproduktion. Neben der Regulation von TNF α und anderen Zytokinen konnte eine regulatorische Funktion von MK2 auch für die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 gezeigt werden (Gorska, Liang et al. 2007; Su, Ao et al. 2008). Alle diese Proteine weisen Adenin-Uracil-reiche Regionen in ihrer 3'-untranslatierten Region auf. Bei der mRNA-Sequenzanalyse fiel auf, dass auch VLA-4 Adenin-Uracil-reiche Elemente besitzt. Um zu klären, ob MK2 eine regulatorische Funktion bei der Expression von VLA-4 hat, wurde zunächst die VLA-4 mRNA in Abhängigkeit von aktivierenden Stimuli, SB203580-Inhibitor und DMSO (Lösungsmittelkontrolle) in humanen monozytären Zellen (U937) gemessen. Die Analyse der Daten aus der Real Time-PCR ergaben, dass die mRNA Expression durch die Gabe von DMSO nach 6 h unbeeinflusst bleibt (Abb. 35A). Ebenso änderte die Stimulation von U937 Zellen deren VLA-4 mRNA Expression nicht (Abb. 35B). Administration des p38-Inhibitors SB203580 hingegen, führte zu einem reduzierten mRNA-Level in U937 nach 6 h ($p < 0,001$) (Abb. 35C). Des Weiteren ergab die Studie, dass Stimulation der Zellen diesen Effekt nicht veränderte. Stimulierte Zellen, die mit SB203580 vorbehandelt waren, wiesen ebenfalls eine reduzierte mRNA-Expression nach 6 h auf ($p < 0,01$) (Abb. 35D).



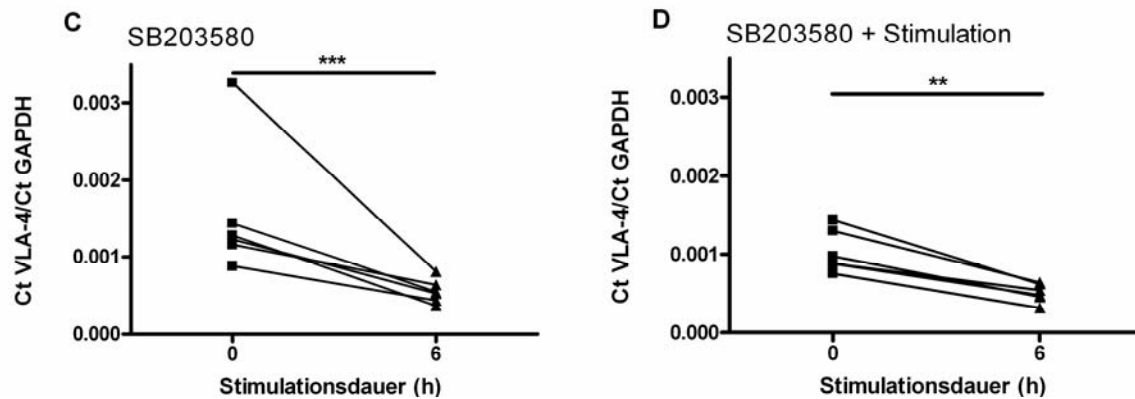


Abbildung 35: VLA-4-mRNA-Expression in U937 Zellen unter Einfluss von SB203580

Die mRNA-Expression von VLA-4 wurde in Abhängigkeit unterschiedlicher Behandlung von U937 Zellen gemessen. In Zellen, die 6 h mit DMSO inkubiert wurden, konnte keine Veränderung der mRNA-Expression von VLA-4 festgestellt werden (A), ebenso wie in Zellen, die mit proinflammatorischen Stimuli behandelt wurden (B). Zellen, die für 6 h mit dem p38-Inhibitor SB203580 (C) und Zellen, die mit SB203580 vorbehandelt und anschließend stimuliert wurden (D), wiesen eine Reduktion der VLA-4 mRNA auf (statistische Auswertung: GraphPad Prims4 Software, studentische t-Verteilung).

3.2.2 ACTINOMYCIN D BEEINFLUSST DIE VLA-4 MRNA NICHT

Um zu zeigen, dass die mRNA von VLA-4 tatsächlich durch den Inhibitor SB203580 beeinflusst wurde, wurde anschließend ein mRNA-Stabilitäts-Assay durchgeführt. Hierzu wurde der Transkriptionshemmer Actinomycin D auf die Zellen gegeben und bis zu 6 h inkubiert. Nach 1 h, 3 h und 6 h wurden die Zellen lysiert und die RNA isoliert. Die anschließende Messung der mRNA von VLA-4 zeigte keine Beeinflussung der VLA-4-mRNA-Expression durch Actinomycin D (Abb. 36). Das bedeutet, dass die Reduktion der mRNA-Expression in Abhängigkeit des Inhibitors SB203580, spezifisch durch diesen hervorgerufen wird.

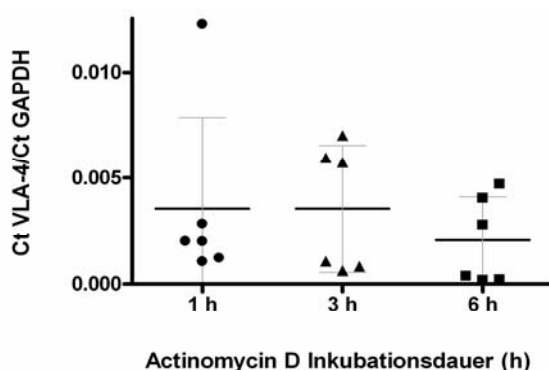


Abbildung 36: mRNA-Expression von VLA-4 in Abhängigkeit von Actinomycin D

Die Behandlung von U937 Zellen mit dem Transkriptionshemmer Actinomycin D für 1 h, 3 h und 6 h führte zu keiner Veränderung der VLA-4-mRNA-Expression. (Statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software: one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test).

3.2.3 DIE PROTEINEXPRESSION VON VLA-4 IST IN ABHÄNGIGKEIT DES p38-INHIBITORS SB203580 VERMINDERT

Die VLA-4-mRNA-Expression war in Anwesenheit des p38-Inhibitors SB203580 reduziert. Um zu klären, ob auch die Proteinexpression beeinflusst ist, wurden U937 Zellen 24 h mit SB203580 inkubiert bzw. mit SB203580 vorbehandelt und anschließend stimuliert. In Anwesenheit des Inhibitors SB203580 war die Proteinexpression von VLA-4 reduziert. Die Stimulation der Zellen führte zu keiner gesteigerten VLA-4-Expression (Abb. 37). Das Experiment wurde dreimal wiederholt. Abb. 37 zeigt einen repräsentativen Western Blot.

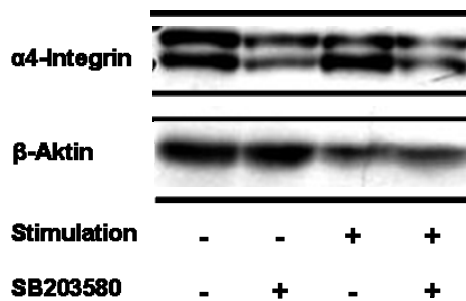


Abbildung 37: VLA-4-Expression in Abhängigkeit von SB203580

Proteinlysate von U937 Zellen, die unbehandelt (linke Bande), mit SB203580 behandelt (2. Bande von links), für 24 h stimuliert (3. Bande von links) oder mit SB203580 vorbehandelt und anschließend stimuliert (rechte Bande) wurden, wurden elektrophoretisch aufgetrennt und α4-Integrin und β-Aktin (Ladungskontrolle) entwickelt. In Anwesenheit des Inhibitors war die VLA-4-Expression reduziert.

3.2.4 DAS OBERFLÄCHENPROTEIN-VLA-4 BLEIBT VON SB203580 UNBEINFLUSST

Die Ergebnisse der Proteinexpression von VLA-4 zeigten, dass VLA-4 in Anwesenheit des p38-Inhibitors SB203580 reduziert war. Um zu klären, ob dieser Unterschied auf der Oberfläche lebender Zellen zu detektieren ist, wurden U937 durchflusszytometrisch untersucht. Hierzu wurden Zellen für 24 h mit SB203580 oder der Lösungsmittelkontrolle DMSO inkubiert und VLA-4 mit einem biotinyliertem anti-CD49d-Antikörper, der über Streptavidin-PerCP Cy 5.5 gekoppelt wurde gefärbt. Die durchflusszytometrische Untersuchung ergab, dass VLA-4 auf Zellen, die mit SB203580 behandelt wurden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle weniger VLA-4 exprimierten ($p < 0,05$). Allerdings war kein Unterschied zur Lösungsmittelkontrolle sichtbar (Abb. 38). In Zellen, die für 48 h mit SB203580 bzw. der Lösungsmittelkontrolle inkubiert wurden, konnte eine verringerte

VLA-4-Expression sowohl auf Zellen, die mit DMSO behandelt wurden ($p < 0,05$) und Zellen, die mit dem Inhibitor behandelt wurden ($p < 0,01$) nachgewiesen werden (*Daten nicht dargestellt*).

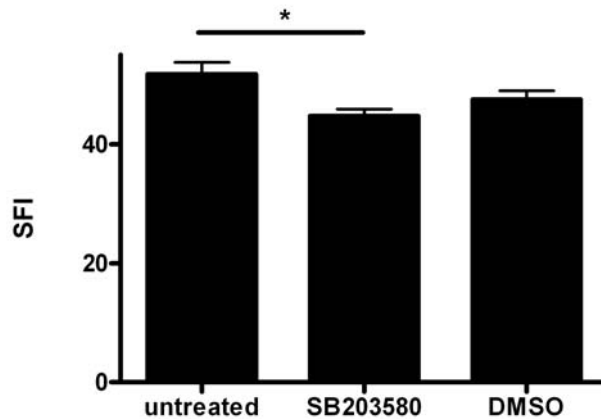


Abbildung 38: Oberflächenexpression von VLA-4 auf U937 Zellen in Abhängigkeit von SB203580

Humane monozytäre U937 Zellen wurden unbehandelt, mit SB203580 oder DMSO behandelt und durchflusszytometrisch auf die Oberflächenexpression von VLA-4 hin untersucht ($n = 15$; 3 Experimente $n = 5$). Das Adhäsionsmolekül VLA-4 auf der Oberfläche SB203580 behandelter Zellen war im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle reduziert, jedoch nicht im Vergleich zu mit Lösungsmittel behandelten Kontrolle (Statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software: one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test).

3.2.5 DIE ADHÄSION NATALIZUMAB BEHANDELTEN ZELLEN IST STARK REDUZIERT

Natalizumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der als Therapeutikum zur Behandlung von Patienten mit MS eingesetzt wird. Natalizumab bindet an VLA-4, so dass die Bindung des Adhäsionsmoleküls an seinen Wechselwirkungspartner unterbunden wird. Dadurch soll verhindert werden, dass Leukozyten ins ZNS der Patienten migrieren und dort ihre zerstörerische Wirkung entfalten. In der Tat konnte gezeigt werden, dass Patienten die mit Natalizumab behandelt werden, eine deutlich verminderte Schubrate aufweisen (Rudick and Panzara 2008). Um zu klären, ob der p38-Inhibitor SB203580 ebenfalls in der Lage ist, die Adhäsion von Leukozyten (hier U937 Zellen) an Zellen der Blut-Hirn-Schranke zu unterbinden, wurden ein Adhäsions-Assay mit unbehandelten, SB203580 oder Natalizumab behandelten Zellen durchgeführt. Nach 24 h Inkubation mit den jeweiligen Chemikalien wurden die U937 Zellen auf die Endothelzellen gegeben und nach 30 min. Inkubation die Zahl der adhären Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Quantifizierung ergab, dass U937 Zellen, die mit dem p38-Inhibitor behandelt waren,

keine verminderte Adhäsion an Endothelzellen zeigten. Natalizumab behandelte U937 Zellen hingegen waren nicht in der Lage, auf den Endothelzellen adhären zu werden ($p < 0,001$) (Abb. 39A). Abbildung 39B zeigt repräsentative *Dot-Blots* der durchflusszytometrischen Untersuchung.

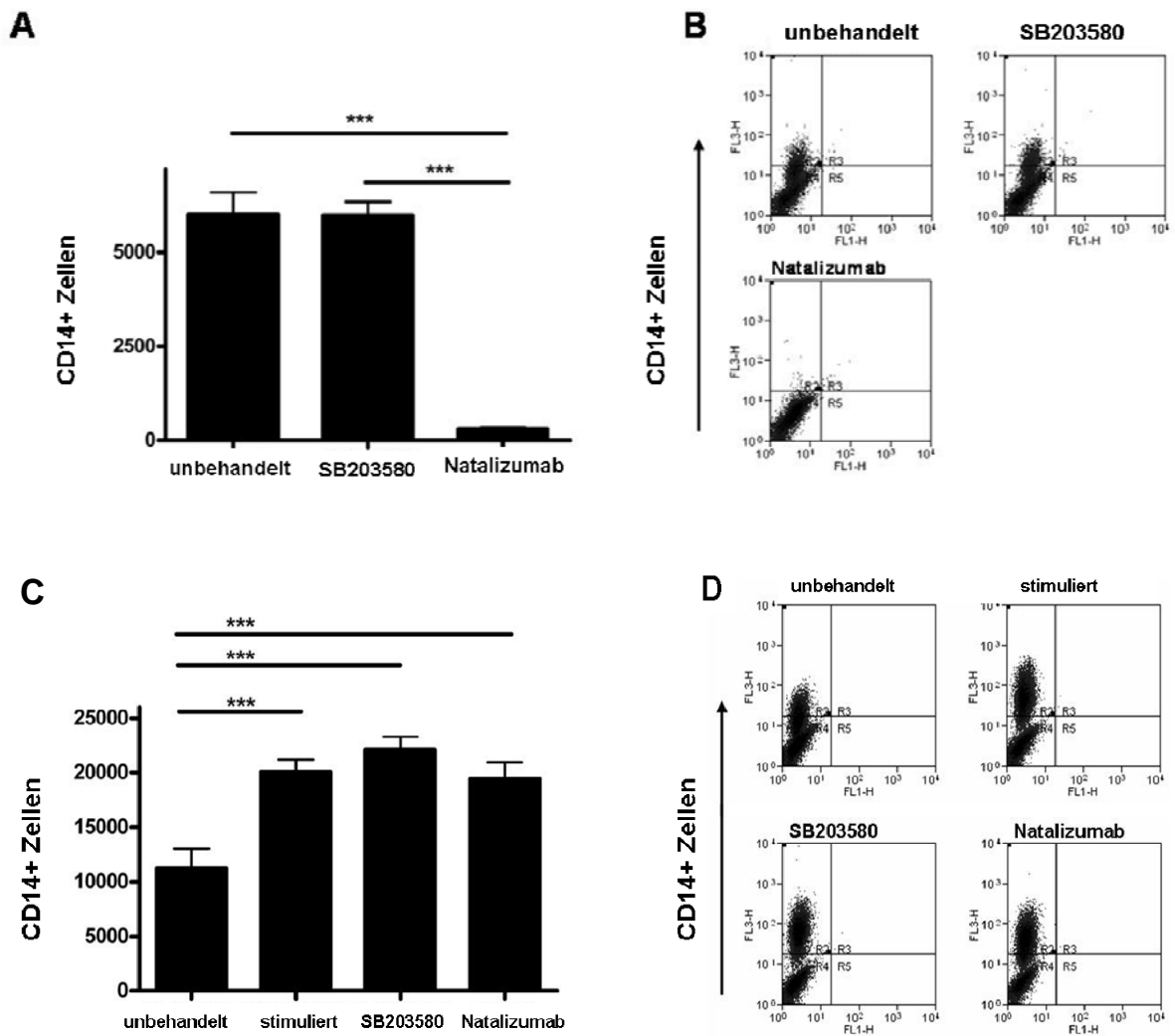


Abbildung 39: Adhäsion von U937 in Abhängigkeit von Natalizumab- und SB203580-Behandlung
 U937 Zellen wurden unterschiedlich behandelt: A) Natalizumab bzw. SB203580, B) Stimulation, Natalizumab bzw. SB203580 und die Adhäsion durchflusszytometrisch untersucht. Bei unstimulierten Zellen wurde die Adhäsion durch die Natalizumab-Behandlung unterbunden, wohingegen eine Stimulation dieser Zellen den Effekt umkehrte. C und D zeigen repräsentative *Dot Blots* der durchflusszytometrischen Untersuchung (n = 15; n = 5 in 3 Experimenten; statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software: one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test).

Um zu klären, ob eine Aktivierung der Zellen das Adhäsionsverhalten in Abhängigkeit der Behandlung beeinflussen kann, wurden die Zellen zunächst mit Natalizumab bzw. SB203580 vorbehandelt und anschließend mit proinflammatorischen Stimuli aktiviert. Die durchflusszytometrische Quantifizierung ergab, dass die Adhäsion bei allen Zellen in Abhängigkeit der Stimulanzen zunahm, und unbeeinflusst von der Behandlung an den Endothelzellen hafteten ($p < 0,001$) (Abb. 39C). Abbildung 39D zeigt repräsentative Dot Blots der durchflusszytometrischen Untersuchung.

3.2.6 siRNA-TRANSFEKTION - *KNOCKDOWN* VON MK2

Um die Rolle der MK2 bei der Expression von VLA-4 zu untersuchen, wurden humane U937 Zellen mit VLA-4 mRNA spezifischer siRNA transfiziert und so ein *knockdown* generiert. 48 h nach der Transfektion waren noch maximal 3 % MK2 in Proteinlysaten aus U937 Zellen nachweisbar (Abb. 40).

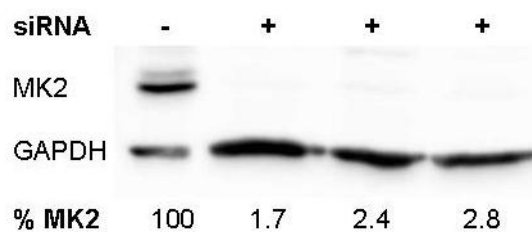


Abbildung 40: MK2 *knockdown* in U937 Zellen

Humane U937 Monozyten wurden mittels HVJ-Envelope Vektor System transfiziert, um MK2 aus den Zellen zu eliminieren. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion lysiert und die Proteinlysate elektrophoretisch aufgetrennt. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen (linke Bande) war der MK2-Level in transfizierten Zellen um über 90 % reduziert (3 unabhängige Experimente: 2., 3. und 4. Bande). Die Analyse der Lichtintensität wurde mittels der BioID Software von peqlab durchgeführt.

3.2.7 DIE OBERFLÄCHENEXPRESSION VON VLA-4 BLEIBT DURCH MK2-*KNOCKDOWN* UNBEEINFLUSST

Um zu klären, ob die Oberflächenexpression durch MK2 reguliert ist, wurden U937 mit siRNA transfiziert, um einen MK2-*knockdown* zu generieren. 48 h nach der Transfektion wurde die Oberflächenexpression von VLA-4 durchflusszytometrisch quantifiziert. Die Expression von VLA-4 wurde durch den Transfektionsvektor allein, sowie durch siRNA-Transfektion nicht beeinflusst (Abb. 41A). Des Weiteren wurden Proteinlysate transfizierter Zellen elektrophoretisch aufgetrennt und die Expression von VLA-4

gemessen. Die quantitative Analyse der Bandenintensität ergab, dass VLA-4 in Abhängigkeit vom *knockdown* um zirka 30 % reduziert war (Abb. 41B). Die Kombination von siRNA-Transfektion und dem Inhibitor SB203580 zur Behandlung von Zellen, um die VLA-4-Expression zu verringern, war geringfügig effizienter als der *knockdown* allein. Interessanterweise konnte in U937 Zellen, die sowohl transfiziert und mit dem Inhibitor behandelt waren mehr von der geschnittenen (*cleaved*) Form von VLA-4 nachgewiesen werden. Die Spaltung von des 150 kDa großen Proteins VLA-4 in ein 80 kDa und ein 70 kDa großes Fragment ist ein regulierter Prozess, der nach der Reifung der β_1 -assoziierten α_4 -Untereinheit auftritt, und in aktivierten T-Zellen verstärkt gefunden wurde. Dies könnte bedeuten, dass U937 Zellen durch die Anwesenheit des Inhibitors SB203580 bzw. des Lösungsmittels DMSO aktiviert wurden.

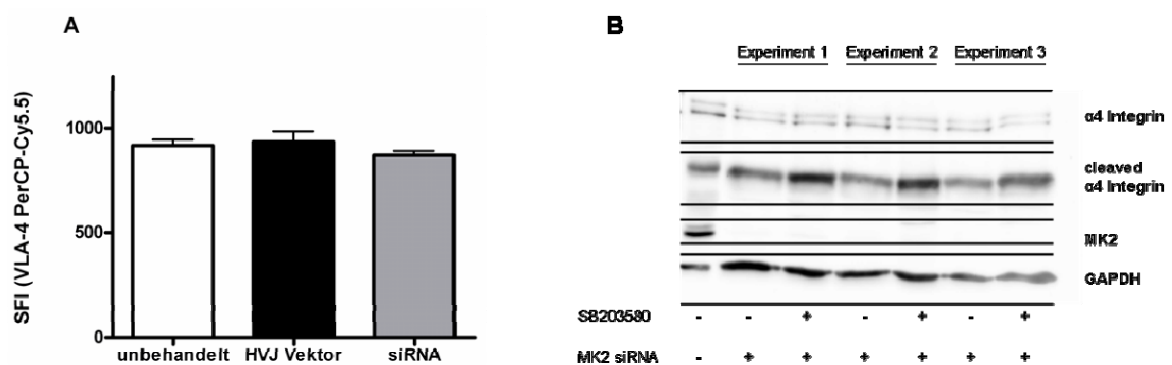


Abbildung 41: VLA-4-Expression in Abhängigkeit von SB203580 und MK2-knockdown in U937 Zellen
 Die Oberflächenexpression (A) von VLA-4 auf U937 Zellen, die unbehandelt oder MK2-siRNA transfiziert waren, wurde durchflusszytometrisch bestimmt. HVJ Vektor Kontrolle ohne siRNA. Die Analyse ergab keinen Unterschied in der Expression von VLA-4. Proteinlysate unbehandelter oder transfizierter U937 Zellen wurde elektrophoretisch aufgetrennt und VLA-4 entwickelt (B). Die Analyse und quantitative Auswertung des Blots ergab, dass in Abhängigkeit des MK2-knockdown die Expression von VLA-4 um zirka 30 % reduziert war (n = 3).

3.2.8 MK2-KNOCKDOWN UNTERBINDET DIE ADHÄSION AN ENDOTHELZELLEN NICHT

Die Adhäsion von U937 an immortalisierte Endothelzellen aus der Blut-Hirn-Schranke wurde durch Bindung des monoklonalen Antikörpers Natalizumab unterbunden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass MK2 potentiell die Expression von VLA-4 beeinflusst. Außerdem reguliert MK2 die Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 (Gorska, Liang et al. 2007; Su, Ao et al. 2008). Um zu klären, ob ein MK2-knockdown einen ähnlichen Effekt wie der monoklonale Antikörper Natalizumab hervorrufen kann,

wurde ein Adhäsions-Assay mit Natalizumab behandelten Zellen und transfizierten Zellen im Vergleich durchgeführt.

Die Adhäsion stimulierter U937 Zellen war im Gegensatz zu unbehandelten Zellen deutlich gesteigert. Bei Behandlung der U937 Zellen mit Natalizumab konnten annähernd keine adhärenen U937 Zellen nachgewiesen werden ($p < 0,001$). U937, die mit Natalizumab vorbehandelt und anschließend stimuliert wurden, zeigten dasselbe Adhäsionsverhalten wie Zellen, die keine Natalizumab Vorbehandlung erhalten hatten. Ebenso konnte ein *knockdown* von MK2 und eine Kombination des SB203580 Inhibitors und der siRNA-Behandlung die Adhäsion von U937 an Endothelzellen nicht unterbinden. In allen Proben konnten gleich viele adhärenente U937 Zellen detektiert werden (Abb. 42).

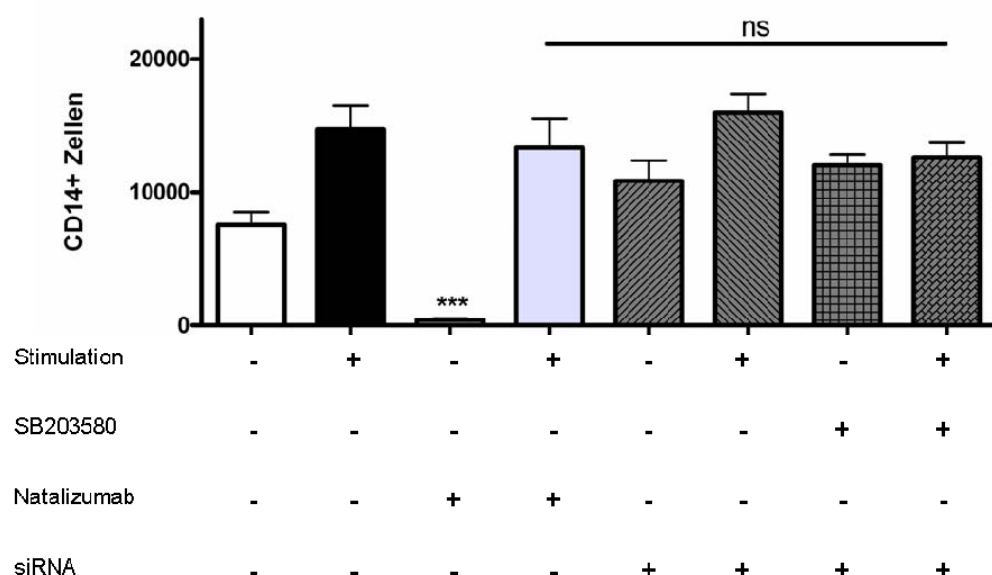


Abbildung 42: Adhäsions-Assay von Natalizumab behandelten Zellen im Vergleich zu „MK2-defizienten“ U937 Zellen

Das Adhäsionsverhalten von Zellen, die stimuliert, mit Natalizumab behandelt, stimuliert und mit Natalizumab behandelt, siRNA-transfiziert, siRNA-transfiziert und stimuliert, SB203580 und siRNA-transfiziert und Zellen, die stimuliert, SB203580 und siRNA-transfiziert wurden, wurde in einem vergleichenden Adhäsions-Assay untersucht. Die Analyse ergab, dass die Adhäsion von Zellen, die mit Natalizumab behandelt waren, verhindert war. Bei allen anderen Behandlungen konnte keine Veränderung in der Adhäsionscharakteristik im Vergleich zur Positivkontrolle (stimulierte Zellen) nachgewiesen werden. (n = 9; n = 3 in 3 Experimenten; statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software: one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test).

3.2.9 NATALIZUMAB WIRD VON DER OBERFLÄCHE AKTIVIERTER U937 ZELLEN NICHT ENTFERNT

Die vorausgegangenen Experimente zur Adhäsion von U937 Zellen konnten zeigen, dass eine Behandlung mit Natalizumab die Adhäsion an Endothelzellen verhinderte. Dieser Effekt wurde durch nachfolgende Stimulation mit proinflammatorischen Stimuli aufgehoben. Um zu klären, ob der monoklonale Antikörper durch Zugabe der Stimuli von der Oberfläche der Zellen eliminiert wird, wurden Zellen mit biotinyliertem Natalizumab inkubiert und der Antikörper durch Streptavidin-PerCP Cy 5.5 Anlagerung durchflusszytometrisch nachgewiesen.

Die Analyse zeigte, dass zirka 40 % der Zellen für Natalizumab positiv waren und die Zahl der positiven Events in Abhängigkeit einer Zellaktivierung durch proinflammatorische Stimuli unbeeinflusst blieb (Abb. 43).

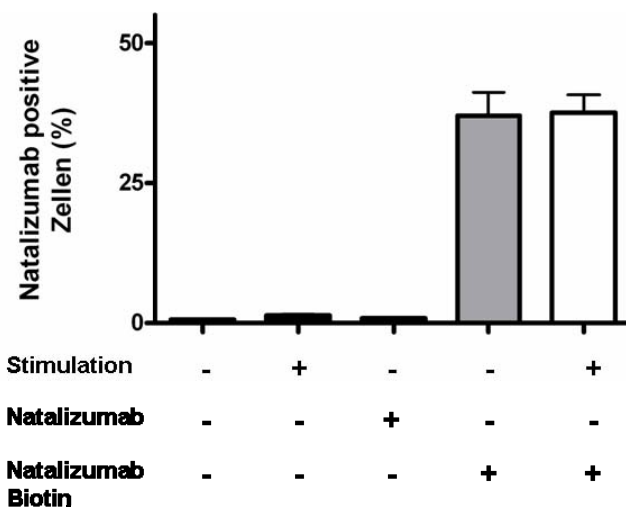


Abbildung 43: Oberflächengebundenes Natalizumab

Zellen wurden mit biotinyliertem Natalizumab und nichtbiotinyliertem Natalizumab als Kontrolle behandelt. Nach 24 h Stimulation wurde das oberflächengebundene Natalizumab durchflusszytometrisch durch Streptavidin-PerCP Cy 5.5-Substitution untersucht. Die Analyse ergab keine Veränderung des gebundenen Natalizumab in Abhängigkeit der Zellaktivierung (n = 9; n = 3 in drei Experimenten).

4. DISKUSSION

Durch proinflammatorische Stimuli werden innerhalb einer Zelle vier Hauptsignalwege aktiviert: der NF κ B-Signalweg und die drei MAP-Kinase-Signalwege (Lee, Laydon et al. 1994; Clark, Dean et al. 2003). Frühere Studien belegen, dass einer der drei MAP-Kinase-Signalwege, der p38-Signalweg bzw. die *downstream* von p38 gelegene Sernin/Threonin-Kinase MK2 eine entscheidende Rolle bei Entzündungsreaktionen spielt. Ihre Funktion bei neurologischen Erkrankungen konnte in verschiedenen Tiermodellen zu Alzheimer, Parkinson, Ischämie und Epilepsie demonstriert werden (Barone, Irving et al. 2001; Sun, Liu et al. 2003; Thomas, Hitti et al. 2008; Thomas, Timmer et al. 2008). Inwieweit MK2 eine Rolle bei der EAE spielt ist jedoch nicht bekannt und sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

4.1 DIE ROLLE VON MK2 BEI IMMUNREAKTIONEN

Seit einiger Zeit wird der p38-Signalweg als potentiell therapeutisches Ziel bei Entzündungserkrankungen angesehen, belegt durch zahlreiche Studien in tierexperimentellen entzündlichen Erkrankungen.

MK2 spielt bei vielen zellulären Prozessen wie der Regulation des Zell-Zyklus, der Migration, Proliferation und Apoptose, der Expression proinflammatorischer Zytokine, Adhäsionsmolekülen und neurotoxischer Substanzen wie NO eine wichtige Rolle (Crawley, Rawlinson et al. 1997; Winzen, Kracht et al. 1999; Kayyali, Pennella et al. 2002; Thomas, Timmer et al. 2008). Frühere Studien in experimentellen neurodegenerativen Erkrankungen konnten zeigen, dass eine Inhibition der p38-Isoformen durch den p38-Inhibitor SB203580 zu verminderter Neurodegeneration im Modell für Schlaganfall führt (Kim, Yu et al. 2004). Die Inhibition von p38 wirkt außerdem neuroprotektiv bei zerebraler fokaler Ischämie (Barone, Irving et al. 2001). Des Weiteren konnten Ghasemlou und Mitarbeiter 2010 demonstrieren, dass MK2 eine entscheidende Rolle bei Rückenmarksverletzungen spielt. Sie konnten zeigen, dass in WT Tieren die Expression und Phosphorylierung von MK2 in Rückenmarksverletzungen erhöht war. Im Vergleich von WT Kontrollen mit MK2-defizienten Mäusen, konnte bei MK2^{-/-} eine verbesserte Lokomotion als bei WT festgestellt werden. MK2^{-/-} Tiere wiesen außerdem weniger proinflammatorische Zytokine und nitrosylierte Proteine im verletzten Rückenmark auf, sowie eine geringere Verminderung von Neuronen und Myelin. Außerdem schienen MK2-

defiziente Makrophagen im verletzten Gewebe einen anti-inflammatorischen Phänotyp zu haben (Ghasemlou, Lopez-Vales et al.).

In dieser Arbeit wurde hingegen deutlich, dass MK2-defiziente Mäuse einen schwereren Verlauf der entzündlichen ZNS-Erkrankung EAE im Vergleich zu WT Kontrolltieren aufwiesen. WT Tiere zeigten wie MK2^{-/-} Mäuse zwischen Tag 9 und Tag 12 nach der Immunisierung erste Krankheitssymptome. Beide Genotypen entwickelten im Verlauf der MOG-induzierten EAE Paresen in der akuten Phase (Tag 16 nach der Immunisierung). Im weiteren Krankheitsverlauf der EAE begannen die WT Kontrollen zu remittieren, wohingegen MK2^{-/-} eine verlängerte akute Phase aufwiesen, die mit stärkeren Bewegungseinschränkungen einherging (Abb. 16). In histologischen Schnitten konnten außerdem mehr CD4 und CD8 positive Zellen an Tag 16 nach der EAE-Induktion detektiert werden. Dieses Ergebnis ließ sich durch die Isolation von Leukozyten aus dem ZNS über ein Percoll-Kissen allerdings nicht bestätigen. Hier konnte nur an Tag 24 nach der Immunisierung ein Unterschied detektiert werden. Ein Unterschied der Leukozytenzahl an Tag 16 betreffend (Immunhistochemie und Zellisolation), könnte durch aufwendige Isolationsverfahren und damit einem Verlust an Zellen verursacht sein. Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass unspezifische Anfärbungen oder die Anfärbung von Mikrogliazellen in den histologischen Schnitten zu finden sind. Die Begutachtung der Schnitte zeigte außerdem, dass die Läsionslast ebenso wie der Grad der Demyelinisierung bei MK2^{-/-} und WT Mäusen nicht unterschiedlich war. Interessant ist, dass bereits beschrieben wurde, dass die Aktivierung von p38 selektiv Apoptose in CD8 zytotoxischen T-Zellen auslösen kann, CD4⁺ Zellen jedoch unbeeinflusst bleiben. Die Reduktion der CD8⁺ Zellen scheint dabei mit einer verminderten Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 einher zu gehen (Merritt, Enslin et al. 2000). Vor diesem Hintergrund lässt sich die Vermutung aufstellen, dass aufgrund von mehr Effektorzellen (CD8 zytotoxische Zellen) im ZNS von MK2^{-/-} Mäusen auch mehr Neurodegeneration bzw. mehr Demyelinisierung stattfindet, was zu einer schwereren Krankheitsgenese führt, dieser Effekt histologisch an Tag 16 allerdings nicht zu detektieren ist, sondern möglicherweise erst an einem späteren Zeitpunkt der Erkrankung. Dafür würd auch die erhöhte Zahl an Leukozyten sprechen, die an Tag 24 aus dem ZNS von MK2-defizienten Tieren isoliert werden konnte.

Unabhängig davon konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass MK2^{-/-} Tiere in der Milz per se eine erhöhte Zahl an Leukozyten aufweisen (Abb. 18). Im Vergleich zu WT Tieren, waren in MK2^{-/-} Mäusen prozentual mehr CD4⁺, CD8⁺ und CD14⁺ Zellen in der Milz zu finden. Dies könnte möglicherweise auf einen kompensatorischen Mechanismus zurückzuführen sein - dies aufgrund der mangelnden Fähigkeit eine effiziente Immunantwort zu gewährleisten - konventionelle Tierhaltung und dadurch mögliche Infektionskrankheiten. An Tag 8, Tag 16 und Tag 24 nach der Immunisierung wiesen MK2^{-/-} Tiere ebenfalls mehr Leukozyten in der Milz auf (Abb. 21, Abb. 22, Abb. 23).

Um die Frage zu beantworten warum MK2-defiziente Tiere einen schwereren Verlauf der EAE aufweisen, wurde versucht Rückschlüsse auf die Aktivität von Leukozyten, die aus der Milz und dem ZNS EAE-kranker Tiere in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung isoliert wurden zu ziehen. Hierzu wurde die mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine analysiert. Das komplizierte Zusammenspiel von Zytokinen, Sauerstoffradikalen, NO und Proteasen, die die Integrität der Blut-Hirn-Schranke und die Neuronenfunktion beeinflussen, wurde vielfach untersucht. Auf der einen Seite konnte in früheren Experimenten gezeigt werden, dass IL-6 die Neurodegeneration fördert, ebenso wie IL-1. Auf der anderen Seite wurde demonstriert, dass TNF α , IL-6 und IL-1 das Überleben von Neuronen fördern können (Rothwell and Strijbos 1995; Carlson, Wieggl et al. 1999).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression der Zytokine TNF α , IL-2 und IL-6 in Leukozyten bei MK2^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT unverändert war (Abb. 26, Abb. 27, Abb. 28). Es ist allerdings bekannt, dass MK2 bei der Regulation der Proteinproduktion durch post-transkriptionelle mRNA-Stabilisierung über Adenin-Uracil-reiche Elemente in der 3'-untranslatierten Region Einfluss auf die entsprechende Proteinsynthese nimmt. Dies geschieht auf indirektem Wege durch Phosphorylierung von Substraten, die eine RNA-bindende Domäne besitzen, wie z.B. Tristetraprolin (TTP) (Hitti, Iakovleva et al. 2006). Dass MK2-defiziente Tiere im Vergleich zu WT keine gesteigerte mRNA-Expression ausweisen, legt den Schluss nahe, dass kein Unterschied in der Aktivität der Leukozyten als Antwort des Immunsystems auf die EAE besteht. Allerdings könnte die Proteinkonzentration aufgrund post-transkriptioneller Regulation durchaus verändert sein. Dies konnte in dieser Arbeit für die Expression des Entzündungsmediators TNF α gezeigt werden (Diskussion 4.4 und 4.5).

4.2 IMMUNISIERUNG - DIE ROLLE VON PERTUSSIS TOXIN

Frühere Studien mit MK2-defizienten Tieren belegen, dass das Fehlen von MK2 sich günstig, das heißt mildernd auf den Verlauf unterschiedlicher Erkrankungen auswirkt. So sind MK2-defiziente Tiere gegenüber LPS-induziertem endotoxischem Schock, aufgrund einer verringerten Produktion an proinflammatorischen Mediatoren wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, IL-1 und IL-6 resistenter als WT-Artgenossen (Kotlyarov, Neininger et al. 1999). Auch die Produktion des Neurotoxins NO wird durch MK2 beeinflusst. Mittelhirn-Kokulturen MK2-defizienter Tiere wiesen nach LPS-Behandlung eine geringere Produktion an NO auf, was sich neuroprotektiv auf dopaminerge Neurone auswirkte (Thomas, Timmer et al. 2008). Im tierexperimentellen Modell für Asthma konnte gezeigt werden, dass MK2-defiziente Tiere weniger Entzündungsreaktionen aufwiesen, nicht zuletzt aufgrund einer reduzierten Permeabilität der Blut-Lungen-Schranke (Gorska, Liang et al. 2007).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MK2-defiziente Tiere, die mit EAE induziert wurden, einen schwereren Krankheitsverlauf aufwiesen als WT Mäuse. Die genaue Ursache konnte jedoch nicht eindeutig geklärt werden. Als möglicher Grund wurde eine Veränderung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke in Betracht gezogen. Die Expression des Blut-Hirn-Schranke-Proteins β -Catenin war bei einem MK2^{-/-} Tier im ZNS in Vergleich zu WT tendenziell erhöht (Abb. 19). Eine erhöhte Expression von β -Catenin konnten auch Gorska und Mitarbeitern im tierexperimentellen Modell für Atemwegesentzündung in der Blut-Lungen-Schranke zeigen (Gorska, Liang et al. 2007). Aufgrund des fehlexprimierten β -Catenins in der Blut-Lungen-Schranke postulierten Gorska und Mitarbeiter, dass diese Schranke weniger permeabel war, es deshalb zur verminderten Infiltration von Leukozyten in die Lunge kam, und MK2-defiziente Tiere deshalb weniger stark von der Erkrankung betroffen waren.

In dieser Arbeit wiesen MK2-defiziente Tiere, bei denen eine EAE durch MOG₃₅₋₅₅ ausgelöst wurde, an Tag 24 nach EAE-Induktion in der chronischen Phase der Erkrankung eine erhöhte Zahl an Leukozyten im ZNS auf. Vor der Ausprägung klinischer Symptome bzw. in der akuten Phase der Erkrankung war ein Unterschied die Zahl der infiltrierten Leukozyten betreffend, im ZNS zwischen WT und MK2^{-/-} Tieren zu detektieren - nur in histologischen Schnitten war ein Unterschied an Tag 16 zu erahnen (Abb. 17). Obwohl β -Catenin verstärkt im ZNS von MK2^{-/-} Tieren exprimiert war, schien dies keinen Einfluss auf die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke bzw. die Infiltration von Leukozyten zu

haben. Diese Ergebnisse implizieren, dass β -Catenin keinen Einfluss auf die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke hat, oder aber eine andere Ursache die Permeabilität stärker beeinflusst. Um EAE auszulösen wurde den Tieren Pertussis Toxin injiziert, welches die autoimmune Reaktion fördert. Derzeit geht man davon aus, dass Pertussis Toxin die Integrität der Blut-Hirn-Schranke beeinflusst - sie gezielt für Leukozyten durchgängig macht. Bei der Pathogenese neurologischer Erkrankungen ist die Integrität, bzw. die veränderte Integrität zerebraler kapillarer Verbindungen von Bedeutung. Die Integrität der Blut-Hirn-Schranke wird maßgeblich von der Präsenz der *tight junctions* bestimmt, die es selbst kleinsten Molekülen schwer macht über die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS zu gelangen (Franke, Galla et al. 1999). Untersuchungen zur Integrität der Blut-Hirn-Schranke in Mäusen konnten bereits zeigen, dass die Permeabilität 24 h nach einer Pertussis Toxin-Injektion erhöht war (Amiel 1976). Pertussis Toxin wird häufig benutzt, um die Immunantwort bei der Untersuchung experimenteller autoimmuner Erkrankungen zu erhöhen (Munoz and Mackay 1984). Der Mechanismus, wie Pertussis Toxin diese Erhöhung der Immunantwort induziert, ist weitgehend unbekannt, ist aber wie bereits erwähnt ein Mechanismus, der vermutlich ein Durchlässigwerden der Blut-Hirn-Schranke bewirkt (Linthicum and Frelinger 1982; Ben-Nun, Mendel et al. 1997). Das Durchlässigwerden der Blut-Hirn-Schranke scheint dabei ein Phosphokinase C vermittelter Mechanismus zu sein (Bruckener, el Baya et al. 2003). Diese Tatsache legt den Schluss nahe, dass Pertussis Toxin in dieser Arbeit mögliche positive Effekte aufgrund des MK2-*knockouts*, nämlich die erhöhte β -Cateninexpression, aufhebt.

4.3 MK2 IST WICHTIG FÜR DIE MIGRATION VON LEUKOZYTEN

Die Tatsache, dass Pertussis Toxin die Blut-Hirn-Schranke permeabler macht und somit möglicherweise positive Aspekte, bedingt durch eine erhöhte β -Catenin-Expression aufheben könnte, erklärt jedoch nicht die erhöhte Leukozytenzahl, die in dieser Arbeit an Tag 24 bzw. an Tag 16 nach der EAE-Induktion im ZNS von MK2^{-/-} Mäusen gefunden wurde. Ursächlich könnte hierfür ein gestörtes Migrationsverhalten der MK2-defizienten Leukozyten sein. Frühere Studien demonstrierten, dass die Phosphorylierung von p38 α bzw. - β als Antwort auf externe Stimuli zur Phosphorylierung von MK2 und MK3 führt. Substrat dieser Kinasen ist das Hitze-Schock-Protein 27 (Hsp27) (Rouse, Cohen et al. 1994; McLaughlin, Kumar et al. 1996). Die Phosphorylierung des Substrats Hsp27 durch

MK2 bewirkt eine erhöhte F-Aktin-Polymerisation und stabilisiert das F-Aktin-Netzwerk innerhalb einer Zelle in Abhängigkeit von Stressstimuli (Lavoie, Hickey et al. 1993; Huot, Houle et al. 1996; Huot, Houle et al. 1997). Außerdem konnten Wang und Mitarbeiter zeigen, dass die Aktinorganisation maßgeblich durch die Aktivität von p38 beeinflusst ist. Die Migration von Neutrophilen über endotheliale Barrieren war durch die Gabe des SB203580-Inhibitors vermindert (Wang and Doerschuk 2001). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch eine Behandlung von Neutrophilen mit dem p38-Inhibitor die Chemotaxis, NO-Produktion, IL-8-Expression und die TNF α -induzierte Adhäsion inhibiert war (Krump, Sanghera et al. 1997; Nick, Avdi et al. 1997; Detmers, Zhou et al. 1998; Underwood, Osborn et al. 2000). Abgesehen davon konnten Studien mit MK2-defizienten Neutrophilen zeigen, dass die Migration dieser Zellen entlang eines fMLP-Gradienten ungerichtet und schneller war als die von normalen Neutrophilen (Hannigan, Zhan et al. 2001).

Diese Arbeit konnte demonstrieren, dass MK2-defiziente T-Zellen und Monozyten, die aus der Milz von MK2 $^{-/-}$ Mäusen isoliert wurden, kein gesteigertes Adhäsionsverhalten an Endothelzellen als Reaktion auf TNF α , LPS und IFN γ Stimulation zeigten. Dies lässt die wichtige Rolle von MK2 bei der Adhäsion und möglicherweise auch der Migration von Leukozyten erkennen. Demnach sollten MK2-defiziente Leukozyten möglicherweise weniger ins ZNS infiltrieren. Außerdem sollte eine erhöhte Zellzahl im ZNS EAE-kranker Tiere, wie sie hier gefunden wurde bereits an Tag 8 nach der Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ sichtbar sein. Im Gegensatz zu den hier gefundenen Ergebnissen, konnten Thuraisingam und Mitarbeiter im experimentellen Tiermodell für Wundheilung zeigen, dass die Zahl infiltrierender Makrophagen und Monozyten durch einen MK2-*knockout* unbeeinflusst blieb (Thuraisingam, Xu et al.). Dies legt den Schluss nahe, dass die Erhöhte Zahl an Leukozyten im ZNS EAE-kranker MK2 $^{-/-}$ Tiere nicht durch ein gestörtes Adhäsions- bzw. Migrationsverhalten bedingt ist, sondern eine andere Ursache wie ein gestörtes Apoptoseverhalten z.B. aufgrund einer veränderten TNFR-Signaltransduktionskaskade und damit inhibierten Apoptose in Effektorzellen des Immunsystems im ZNS zugrunde liegt.

4.4 DIE ROLLE DES TNFR-SIGNALWEGS

Analysen zur Zahl der Leukozyten im ZNS EAE-kranker WT und MK2 $^{-/-}$ Mäusen konnten in dieser Arbeit zeigen, dass MK2 $^{-/-}$ Tiere an Tag 24 nach der Immunisierung

mehr Zellen im ZNS aufwiesen als WT Kontrollen, ebenso wie in histologischen Schnitten, die an Tag 16 nach der Immunisierung angefertigt wurden. In WT Tieren war die Leukozytenzahl im ZNS an Tag 24 auf einen Wert (1 Million Zellen), unter dem von Tag 8 (1,5 Millionen Zellen) nach Immunisierung gesunken und korrelierte mit schwächeren klinischen Symptomen - der Remission der Erkrankung. Im Gegensatz dazu remittierten MK2^{-/-} Tiere, bei denen die Zahl der Leukozyten (1,5 Millionen) im Vergleich zu WT erhöht war weniger (Abb. 16 und Abb. 18). Dieser Tatsache schien unabhängig von einem gestörten Migrationsverhalten, könnte aber durch eine fehlgesteuerte Apoptoseregulation während überschießender Immunantworten zurückzuführen sein.

Um zu verhindern, dass der eigene Organismus aufgrund einer Immunantwort geschädigt wird, werden Zellen durch programmierten Zelltod eliminiert. Dieser Mechanismus könnte unter anderem durch proinflammatorische Zytokine, wie TNF α ausgelöst werden. Bei der EAE verursachen autoreaktive T-Zellen die Erkrankung. Der TNFR1 Signalweg scheint maßgeblich daran beteiligt zu sein, diese Zellen zu eliminieren und die Remission der Erkrankung zu bewirken (Bachmann, Eugster et al. 1999; Eugster, Frei et al. 1999). Der Entzündungsmediator TNF α ist Ligand für den TNFR1. Die Biosynthese dieses Entzündungsmediators wird durch MK2 reguliert (Kotlyarov, Neininger et al. 1999). Neben einer reduzierten Konzentration an TNF α konnte auch eine reduzierte Konzentration anderer proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-8 in Studien zur Rolle von MK2 bei Entzündungsreaktionen belegt werden. Z.B. waren diese Zytokine bei der experimentellen Oxazolol-induzierten allergischen Dermatitis vermindert, was eine Entzündungsreaktion bei MK2^{-/-} Mäusen inhibierte. Im Modell kollagen-induzierter Arthritis konnte ebenfalls demonstriert werden, dass aufgrund einer verminderten TNF α -Produktion, MK2^{-/-} Mäuse verminderte Krankheitssymptome zeigten. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MK2^{-/-} Mäuse weniger TNF α im Verlauf der EAE produzieren, allerdings wiesen sie schwerere Krankheitssymptome auf als WT (Tabelle 3 und 4).

Es ist bekannt, dass TNF α zellmembranständig als Homotrimer exprimiert und durch Verdau über die Metalloprotease *TNF alpha converting enzyme* (TACE) als 51 kDa großes Trimer abgespalten wird (Tang, Hung et al. 1996; Black, Rauch et al. 1997). TNF α kann je nach physiologischen Bedingungen unterschiedliche, zum Teil gegensätzliche Funktionen haben. Bei Entzündungsreaktionen fördert es nicht nur die Zelldifferenzierung und

Proliferation, sondern kann auch Apoptose vermitteln (Hehlhans and Pfeffer 2005). Das trimerisierte TNF α kann sowohl an den TNFR1 binden, der ubiquitär von fast allen Zellen exprimiert wird, als auch an den TNFR2, der hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems zu finden ist (Aggarwal 2003). Durch die Bindung von TNF α an den TNFR1 kommt es zur Konformationsänderung seines intrazellulären Teils, wodurch Adapterproteine des Signalwegs rekrutiert werden und an die Todesdomäne des Rezeptors binden (Chen, Cao et al. 2002; Chen and Goeddel 2002). Je nach Adapterrekrutierung wird Apoptose oder *Survival* in der Zelle vermittelt. Über die Todesdomäne des transmembranen TNFR1 kann das Adaptermolekül *TNF-receptor associated death domain protein* (TRADD) binden (Hsu, Xiong et al. 1995). Durch die Bindung von *TNF-receptor associated factor* (TRAF) 2 und die Serin/Threonin-Kinase *receptor interacting protein* (RIP) 1 wird der Proteinkinase-Komplex IKK rekrutiert und aktiviert, wodurch NF κ B aktiv wird und die Produktion des Apoptoseinhibitors *cellular caspase-8 (FLICE)-like inhibitory protein* (cFLIP) bewirkt. Der membranständige Komplex aus TRADD, RIP1 und TRAF2 wird auch als Komplex I (Abb. 44) bezeichnet (Devin, Cook et al. 2000; Micheau and Tschopp 2003; Kimberley, Lobito et al. 2007). Durch die Ausbildung eines zyttoplasmatischen Komplexes (Komplex II) wird in der Zelle Apoptose vermittelt. Das *Fas-associated protein with death domain* (FADD) und Caspase 8 werden bei der Ausbildung des Komplexes nach Dissoziation von TRADD und TRAF2 rekrutiert, wodurch Caspase 8 aktiviert wird (Micheau and Tschopp 2003; Kimberley, Lobito et al. 2007). Die Aktivierung von Caspase 8 führt weiter zur Aktivierung von Caspase 3, was letztlich Apoptose in der Zelle auslöst (Hsu, Shu et al. 1996).

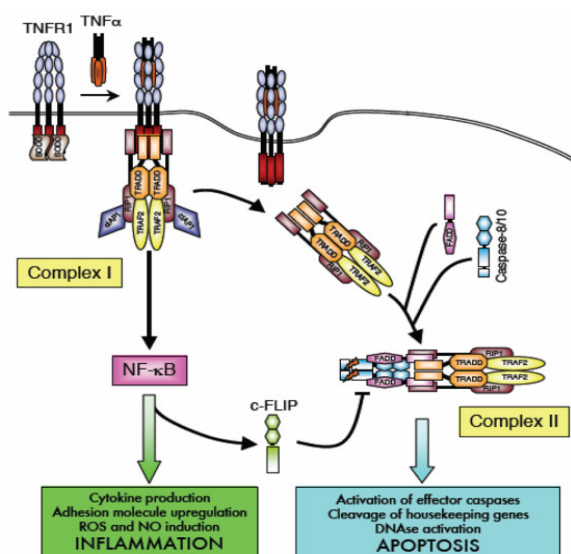


Abbildung 44: Die TNFR1 Signalkaskade

Die TNFR1 Signalkaskade kann zwei Signale innerhalb der Zelle auslösen. Durch die Rekrutierung der Adapter TRADD, TRAF2 und RIP1 an den zellmembrangebunden Rezeptor (Komplex I) kommt es zur Aktivierung von NF κ B und somit zur Produktion des Apoptoseinhibitors cFLIP. Der Rezeptor wird anschließend in einem zeit-abhängigen Mechanismus internalisiert wobei TRADD, TRAF2 und RIP1 dissoziieren. Zu diesem Komplex werden FADD und Caspase 8 rekrutiert (Komplex II). Wenn die Konzentration von cFLIP gering genug ist, um anti-apoptotisch zu wirken, wird durch den Komplex II die „Maschinerie“ des programmierten Zelltods eingeleitet. (aus Kimberley et al. *ArthritisResearch & Therapy*, 2007 (Kimberley, Lobito et al. 2007))

In Immunzellen auf denen sowohl der TNFR1 als auch der TNFR2 durch TNF α stimuliert werden, kommt es verstärkt zu Apoptose der Zellen (Chan and Lenardo 2000; Wajant, Pfizenmaier et al. 2003). Zugrundeliegender Mechanismus scheint die Fähigkeit des TNFR2 zu sein, große Mengen an TRAF2 zu rekrutieren, was in einem relativen TRAF2-Mangel am TNFR1 führt. Aufgrund des Mangels kann die Aktivierung des NF κ B-Signalwegs nicht aufrechterhalten werden, was die Aktivierung von Caspasen und somit den programmierten Zelltod auslöst (Fotin-Mleczek, Henkler et al. 2002).

In dieser Arbeit wurde die mRNA-Expression von NF κ B sowie die Proteinexpression unterschiedlicher Adapterproteine der TNFR1 Signaltransduktionskaskade gemessen. In MK2 $^{-/-}$ Mäuse war an Tag 8 nach der Immunisierung in Leukozyten, die aus der Milz isoliert wurden, die NF κ B-mRNA-Konzentration im Vergleich zu WT Tiere erhöht. (Abb. 28E). Des Weiteren war die Proteinkonzentration von cFLIP in Leukozyten aus der Milz an Tag 24 nach der Immunisierung im Vergleich zu WT gesteigert (Abb. 29). Beide Marker, NF κ B und cFLIP, sprechen für eine Aktivierung der MK2-defizienten Zellen – *Survival*-Signal innerhalb der Zellen. Ursächlich könnte es in Leukozyten von MK2 $^{-/-}$ Mäusen, aufgrund des Mangels an TNF α zu einem verstärkten antiapoptischen Signal, bzw. einem verminderten apoptotischen Signal in den Zelle kommen. Bindet nur wenig oder kein TNF α an die TNF-Rezeptoren 1 und 2 in MK2-defizienten Tieren, könnte es möglicherweise zu keinem relativen TRAF2-Mangel am TNFR1 kommen, wodurch die Aktivierung des NF κ B-Signalwegs aufrechterhalten werden kann. Dadurch ist die Aktivierung von Caspasen unterbunden und somit auch der programmierten Zelltod. Hierfür spricht vor allem die gesteigerte Expression des Apoptoseinhibitors cFLIP in MK2 $^{-/-}$ Mäusen (Abb. 29) bzw. keine Veränderung in der Expression von Caspase 8 (*Daten nicht dargestellt*).

Außerdem wäre denkbar, dass die Formation des Komplex' II bei MK2 $^{-/-}$ Tieren gestört ist. Bisher ließ sich dieser Komplex durch Immunopräzipitation scheinbar noch nicht nachweisen, was darauf schließen lässt, dass die Rekrutierung der Adapter möglicherweise nicht bekannte Bedingungen benötigt (Micheau and Tschopp 2003; Wajant, Pfizenmaier et al. 2003). Neuere Arbeiten zur TNFR-Signalkaskade weisen allerdings darauf hin, dass die Signalkaskade zwar über einen membranständigen Komplex und einen zytosolischen Komplex gesteuert wird, der zytosolische jedoch nicht aus dissoziiertem TRADD, TRAF2 und FADD besteht. Mit neuen experimentellen Verfahren konnten Schütze und Mitarbeiter

zeigen, dass die Rekrutierung von RIP1 und TRAF2 zum membranständigen TNFR1 die NF κ B-Aktivierung bewirkt (Komplex I), TRADD, FADD und Caspase 8 jedoch im Komplex mit dem TNFR1 in endosomalen Kompartimenten im Zytosol zu finden ist (*TNFR1 receptosomes*) (Schneider-Brachert, Tchikov et al. 2004). Die Rezeptorinternalisierung verläuft dabei über einen Clathrin-abhängigen Endozytoseprozess. Clathrin interagiert mit mehreren Adapterproteinen, die Clathrin mit dem zu endozytierenden Protein verbinden (Kirchhausen 1999). Wichtigster Adapter für die Internalisierung membranständiger Proteine ist das *adaptor protein* (AP) 2, das eine spezifische Sequenz zellmembrangebundener Proteine erkennt (Owen 2004). Durch Phosphorylierung von AP2 durch die *adaptor-associated kinase* (AAK) 1 wird die Internalisierung der Protein reguliert (Olusanya, Andrews et al. 2001).

Möglicherweise könnte die Internalisierung des Rezeptors bei MK2-defizienten Mäusen aufgrund geringer Mengen TNF α , oder aber der Involvierung von MK2 bei der Proteinregulation eines dafür essentiellen Proteins, gestört sein. Diese Ansätze könnten in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Weitere Studien zur Rolle des TNFR1 Signalwegs, insbesondere der Rolle des TNFR1 bei ZNS-Erkrankungen offerierten, dass dieser die Demyelinisierung aber auch die T-Zellantwort während immunvermittelten ZNS-Erkrankungen limitiert (Probert, Eugster et al. 2000). Die Demyelinisierung ist eines der Markenzeichen der EAE und korreliert bei der MOG-induzierten EAE in C57Bl/6 Mäusen mit der Zahl eingewanderter Lymphozyten und Makrophagen. Studien zur Rolle des TNFR1 bei EAE konnten belegen, dass ein TNFR1-*knockout* bei Mäusen den Beginn der EAE verzögert, und den Verlauf der Erkrankung abmildert. Im Gegensatz dazu zeigten TNF α -defiziente Mäuse keinen verzögerten Beginn der MOG-induzierten EAE, dafür einen verlängerten Verlauf und eine erhöhte Zahl mononukleärer Zellen im ZNS sowie verstärkte Demyelinisierung (Liu, Marino et al. 1998; Probert, Eugster et al. 2000). Dies zeigt, dass TNF α neben seiner Funktion als inflammatorischer Mediator durchaus anti-inflammatorische Wirkung haben kann, und legt den Schluss nahe, dass MK2-/- Mäuse aufgrund eines TNF α -Mangels verstärkte/verlängerte klinische Symptome aufweisen, bedingt durch eine veränderte TNFR1 Signaltransduktion und somit erhöhte Zahl an Leukozyten im ZNS.

4.5 TNF α UND IGF-1 BEI NEURODEGENERATION

Neben der Rolle des TNFR1 bzw. der Interaktion mit seinem Liganden TNF α kommen auch andere Interaktionen, die bei Neurodegeneration eine wichtige Rolle spielen in Betracht eine Immunantwort zu modulieren. Die Rolle von Zytokinen und Wachstumsfaktoren in vielen neurologischen Erkrankungen ist hinreichend bekannt, allerdings sind die Interaktionen dieser Moleküle weitgehend unverstanden. Dennoch werden sie bei vielen neurobiologischen Fragen und der der Suche nach neuen Therapien bei neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert. Eine wichtige Interaktion zweier Moleküle bei der Neurodegeneration, scheint die von TNF α und IGF-1 zu sein. IGF-1 bzw. der IGF-1-Rezeptor scheint eine entscheidende Rolle bei der Oligodendrozytenentwicklung und der Myelinbildung sowie bei der Remyelinisierung zu spielen (Komoly, Hudson et al. 1992; Shinar and McMorris 1995) und wird seit einiger Zeit als mögliches neues Therapeutikum bei MS diskutiert. Die Tatsache, dass TNF α einen entscheidenden Beitrag bei der Neurodegeneration leistet ist ebenso deutlich wie kontrovers. Die immunoreaktive Rolle von TNF α wurde bereits für Neurone, Astrozyten, Mikroglia und Endothelzellen beschrieben (Botchkina, Meistrell et al. 1997). Studien im Tiermodell für Ischämie konnten zeigen, dass die Injektion von exogenem TNF α , die Ischämie deutlich verstärkten, jedoch Tiere, die keinen TNFR besitzen deutlich größere Verwundungen zeigten als WT (Barone, Arvin et al. 1997; Gary, Bruce-Keller et al. 1998). IGF-1 hingegen wirkt meist protektiv und entgegengesetzt von TNF α . In Experimenten mit primären Körnerzellen konnte gezeigt werden, dass Zelltod, der durch Serumentzug herbeigeführt wurde, durch die Zugabe von IGF-1 dosisabhängig vermindert werden konnte (Venters, Tang et al. 1999). Allerdings war dieser protektive Effekt bei Zugabe kleinster Menge TNF α aufgehoben. Neuere Studien konnten zeigen, dass diese inhibitorische Wirkung durch eine Reduktion der IGF-1-Synthese bedingt ist (Frost, Nystrom et al. 2003). Mäuse, die mit LPS behandelt wurden, wiesen einen erhöhten TNF α -Spiegel im Blut, sowie eine erhöhte TNF α -mRNA-Expression in Skelettmuskel auf. Im Gegensatz dazu war die IGF-1-Konzentration im Blut der Tiere vermindert, sowie die mRNA-Expression von IGF-1 im Muskel. Studien zur Rolle des IGF-1 bei EAE konnten zeigen, dass eine Therapie mit IGF-1/*IGF-binding protein* (IGFBP) 3 den Beginn der Erkrankung dosisabhängig verzögerte, sowie dass weniger inflammatorische Zellen im ZNS zu finden waren. Die Behandlung mit IGF-1/IGFBP3 nach dem Beginn der Erkrankung führte jedoch zu einer Verschlechterung,

bedingt durch eine gesteigerte Expandierung autoreaktiver T-Zellen (Lovett-Racke, Bittner et al. 1998). Des Weiteren konnten Dávila und Mitarbeiter zeigen, dass neuronaler Tod bedingt durch oxidativen Stress die Aktivierung von FOXO3 benötigt. Die Aktivität von FOXO3 wird dabei über zwei Wege innerhalb der Zelle reguliert. Zum einen kommt es über einen schnellen ersten Weg durch die Inhibition von Akt und zum anderen durch die Aktivierung von JNK2 zu Aktivierung von FOXO3 (Davila and Torres-Aleman 2008). Diese beiden Mechanismen scheinen aufgrund der Interaktion von ROS mit Mediatoren der IGF-1-Signalkaskade den neuroprotektiven Effekt von IGF-1 aufzuheben.

In dieser Arbeit konnte beim Vergleich der Serumkonzentration von TNF α und IGF-1 von EAE-kranken WT und MK2 $^{-/-}$ Mäusen zwar ein geringer Unterschied in der TNF α -Konzentration, aber nicht in der IGF-1-Konzentration gezeigt werden (Tabelle 3 und 4; Abb. 25). Dass keine Veränderung der Serumkonzentration von IGF-1 gefunden wurde könnte dadurch bedingt sein, dass im ZNS lokal kleine Unterschiede auftreten, die peripher im Serum nicht messbar sind. Allerdings konnte auch in ZNS-Homogenaten kein Unterschied in der IGF-1-Konzentration gefunden werden (*Daten nicht gezeigt*), was nicht zuletzt dadurch bedingt sein könnte, dass in den Blutkapillaren des ZNS viel des Wachstumsfaktors vorhanden war und ein kleiner Unterschied im ZNS unsichtbar wurde.

Dennoch konnte diese Arbeit demonstrieren, dass die TNF α -Konzentration im Serum vermindert war. Durch die verminderte TNF α -Konzentration war das relative Verhältnis von IGF-1 zu TNF α in MK2 $^{-/-}$ Tieren verändert. MK2 $^{-/-}$ Tiere wiesen verhältnismäßig mehr IGF-1 auf. Möglicherweise könnte es bei MK2-defizienten Tieren somit zu einer verstärkten Interaktion von IRS-1 und p38, aufgrund des fehlenden Konkurrenz molekuls MK2 kommen. Dies könnte eine verstärkte Inhibition von Akt, stärkere Aktivierung von FOXO3 und somit vermehrtem neuronalen Zelltod bewirken. Allerdings scheint dies in an betracht der histologischen Schnitte, bei denen keine verstärkte Demyelinisierung gezeigt werden konnte unwahrscheinlich, ebenso wie ein durch NO induzierter Effekt.

4.6 NO UND NEURODEGENERATION

NO gilt als neurotoxisches Substanz, die Neurone direkt schädigen kann. *In vitro* Experimente mit MK2-defizienten Mittelhirn-Kokulturen konnten zeigen, dass nach LPS-Behandlung mehr dopaminerge Neurone in MK2 $^{-/-}$ Kulturen als in WT Kulturen zu finden waren. Diese erhöhte Anzahl dopaminerger Neurone war auf eine reduzierte Produktion

proinflammatorischer Zytokine und neurotoxischer Faktoren wie TNF α , IL-6 und NO zurückzuführen und nicht auf ein verändertes Verhalten bei der Neurodegeneration, bedingt durch den *knockout* (Thomas, Timmer et al. 2008). Jedoch sind *in vitro* Experimente von der Gesamtphysiologie bzw. Pathologie einer Erkrankung im Organismus abgekoppelt.

In dieser Arbeit konnte NO weder im Überstand von ZNS-Homogenaten von WT Tieren noch von MK2^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden. Diese Tatsache macht es schwer die Rolle von NO bei EAE zu diskutieren. Es konnte weder eine Aussage über die Produktion von NO bei EAE getroffen werden, noch konnten dadurch Rückschlüsse auf die Neurodegeneration gezogen werden. Möglicherweise konnte NO aufgrund der Tatsache, dass es als flüchtiges Radikal sehr schnell Proteine nitrolysieren kann nicht nachgewiesen werden.

4.7 DIE ROLLE DER ADHÄSIONSMOLEKÜLE ICAM-1, VCAM-1 UND VLA-4

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Rolle von Adhäsionsmolekülen. Im experimentellen Tiermodell für Asthma konnten Gorska und Mitarbeiter zeigen, dass ein MK2-*knockout* in einer reduzierten Permeabilität der Blut-Lungen-Schranke resultiert, was zu einer verminderten Entzündungsreaktion in der Lunge führte (Gorska, Liang et al. 2007). Des Weiteren war das Adhäsionsmolekül VCAM-1 auf Endothelzellen der Lunge vermindert. Dass Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1 post-transkriptionell über MK2 reguliert werden, konnte bereits demonstriert werden (Pietersma, Tilly et al. 1997; Su, Ao et al. 2008). Für die Adhäsion bzw. die Migration und somit für die Infiltration von Leukozyten ins Gewebe sind Adhäsionsmoleküle von enormer Bedeutung. VCAM-1 ist neben Fibronectin der Interaktionspartner von VLA-4 und wird nur von aktiviertem Endothel exprimiert (Elices, Osborn et al. 1990; Springer 1994; Brosnan, Cannella et al. 1995). Es konnte gezeigt werden, dass VCAM-1 z.B. in chronisch-aktiven MS-Läsionen exprimiert wird (Brosnan, Cannella et al. 1995). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ICAM-1 nur von wenigen Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke exprimiert wird, die Zahl der positiven Zellen in MS-Läsionen erhöht war, und dass diese Erhöhung zeitlich und topographisch mit der Infiltration von Leukozyten ins Gewebe korrelierte (Sobel, Mitchell et al. 1990).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion von primär isolierten Leukozyten aus WT und MK2-defizienten Tieren nach unterschiedlicher Stimulation verschieden war. Während sich die Zahl adhärenter WT-Zellen durch Aktivierung der Zellen vermehrte, blieben MK2-defiziente Zellen beinahe unbeeinflusst (Abb. 32). Dies könnte auf die verminderte Expression von ICAM-1 und VCAM-1 zurückzuführen sein. Dennoch konnten im ZNS EAE-kranker Tiere keine Unterschiede bei der Zahl infiltrierter bzw. isolierter Zellen nach Beginn der Erkrankung sowie in der akuten Phase festgestellt werden (Abb. 18). Dies könnte auf Veränderungen der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zurückzuführen sein (Diskussion 4.2) eher aber auf ein verändertes Apoptoseverhalten autoreaktiver Zellen bedingt durch entweder eine veränderte TNFR1 Signaltransduktionskaskade oder eine inhibierte p38-vermittelte Apoptose in CD8+ Zellen. Ob VLA-4 ebenfalls MK2-abhängig exprimiert wird, ist bisher unbekannt. Auch die Studien in dieser Arbeit konnten darüber keine endgültige Aussage treffen. VLA-4 wird von fast allen Leukozyten exprimiert und ist maßgeblich an deren Adhäsion und Migration beteiligt (Puig-Kroger, Sanz-Rodriguez et al. 2000). VLA-4 ist ein Heterodimer und besteht aus einer α 4- und einer β 1-Kette (Hemler, Elices et al. 1990). Die Bindung von VLA-4 an seine Bindungspartner ist durch die flexible Grundstruktur des Moleküls gegeben. Nach Aktivierung der Zelle kommt es zur Konformationsänderung des Rezeptors, die es der Zelle erlaubt, entweder zu rollen oder sich anzuheften (Alon, Kassner et al. 1995; Shimaoka, Takagi et al. 2002).

Der p38-Signalweg stabilisiert relevante Proteine von Entzündungsreaktionen auf mRNA-Ebene in einem phosphorylierungsabhängigen Mechanismus und fördert deren Translation über Adenin-Uracil-reiche Regionen in der 3'-untranslatierten Region. Die 3'-untranslatierte Region p38- bzw. MK2-abhängiger Proteine beinhaltet Wiederholungen des AUUUA-Motivs (Winzen, Kracht et al. 1999; Bollig, Winzen et al. 2003; Clark, Dean et al. 2003). Ebenso wie ICAM-1 und VCAM-1 beinhaltet auch die mRNA von VLA-4 dieses Motiv. Die Untersuchung der mRNA-Expression sowie der Proteinexpression ergaben, dass diese in Anwesenheit des p38-Inhibitors SB203580 reduziert waren (Abb. 35; Abb. 37). Ebenso war die Oberflächenexpression von VLA-4 auf U937 Zellen reduziert, allerdings zeigte diese Untersuchung auch, dass dies möglicherweise auf einen Effekt durch das Lösungsmittel DMSO zurückzuführen war (Abb. 38). Nach Transfektion der Zellen mit MK2-siRNA konnte eine 30 % reduzierte VLA-4-Proteinexpression

demonstriert werden (Abb. 41B), allerdings war dieser Effekt durchflusszytometrisch nicht nachweisbar (Abb. 41A). Interessanterweise fand sich in transfizierten Zellen, die zusätzlich mit dem SB203580 p38-Inhibitor behandelt wurden verstärkt *cleaved* VLA-4 (Abb. 41B). Die *cleaved* Form konnte erhöht bereits in aktivierten T-Zellen nachgewiesen werden, was dafür sprechen würde, dass die U937 durch die Gabe des p38-Inhibitors bzw. des Lösungsmittels DMSO aktiviert wurden. Allerdings scheint die Adhäsionsfunktion von VLA-4 durch *cleaved* VLA-4 unbeeinflusst (Teixido, Parker et al. 1992). Dies schien auch in dieser Arbeit der Fall gewesen zu sein.

Die Adhäsionsstudien der vorliegenden Arbeit, die im Zusammenhang mit der Natalizumab- bzw. SB203580-Behandlung durchgeführt wurden, zeigten, dass in Anwesenheit des monoklonalen Antikörpers die Bindung von U937 Zellen an humane mikrovaskuläre Zellen nahezu vollständig inhibiert wurde, wohingegen die SB203580-Behandlung keine Reduktion der adhärennten Zellen bewirkte. Vorexperimente zum Adhäsionsverhalten zeigten, dass die Adhäsion der U937 Zellen durch deren Aktivitätszustand bedingt und unabhängig von der Stimulation der Endothelzellen ist. Dies gibt Hinweis darauf, dass die Bindung an den Rezeptor durch VLA-4 und dessen Konformationsänderung am Rezeptor bedingt ist. Da humane Endothelzellen in nichtaktiviertem Zustand kein VCAM-1 exprimieren, muss die Adhäsion der Monozyten durch Fibronektin bewirkt werden. In Anwesenheit von Natalizumab und anschließender Stimulation der Zellen war die Adhäsionsinhibition aufgehoben (Abb. 39). Untersuchungen zur Bindung des Antikörpers auf U937 konnten zeigen, dass zirka 50 % der Zellen positiv waren, und dass dies auch nach Stimulation der Fall war (Abb. 43). Diese Tatsache spricht dafür, dass im nicht aktivierten Zustand die 50 %ige Bindung des Natalizumab ausreicht, um eine Adhäsion der Zellen zu verhindern. Im aktivierten Zustand hingegen scheint die Konformationsänderung von VLA-4 und die damit verbundene Affinitätssteigerung zum Liganden diesen Effekt auszuheben.

4.8 DIE PROBLEMATIK DES ZELLKULTURMODELLS U937

Zur Untersuchung der Expression von VLA-4 in Abhängigkeit von MK2 wurde in dieser Arbeit die myelomonozytische Zelllinie U937 benutzt. VLA-4 wird hauptsächlich von Monozyten, Eosinophilen und Leukozyten exprimiert. Generell nutzen T-Zellen und Monozyten die VLA-4-Interaktion mit VCAM-1, um fest an Endothel zu binden

(Siegelman, Stanescu et al. 2000). Prinzipiell eignen sich daher beide Zelltypen zur Analyse des Adhäsionsmoleküls. U937 Zellen sind humane histiozytische Lymphomzellen, die dem promonozytischen Stadium entsprechen (Sundstrom and Nilsson 1976). In Vorexperimenten zur Adhäsion von Leukozyten wurden neben der Zelllinie U937 auch die Zelllinien Jurkat (T-Zellen) und Raji (B-Zellen) sowie primär isolierte Leukozyten getestet. Experimente mit primär isolierten Leukozyten bargen einige Probleme wie z.B. aufwendige Isolationsverfahren und limitierte Zellzahl. Des Weiteren zeigten primär isolierte Leukozyten im Vergleich zur Zellkultur unterschiedliche Charakteristika bei der Adhäsion an Endothelzellen aus der Blut-Hirn-Schranke. Während primär isolierte T-Zellen durch proinflammatorische Stimuli verstärkt an die Endothelzellen banden, war die Adhäsion der Jurkat Zellen durch diese Stimuli unbeeinflusst. Darüber hinaus zeigten weder primär isolierte B-Zellen noch die Zelllinie Raji ein verändertes Adhäsionsverhalten als Antwort auf die Zellstimulation. Einzig die Ergebnisse der Adhäsionsstudie von primär isolierten Monozyten und der Zelllinie U937 waren gleich (*Daten nicht gezeigt*). Angesichts dieser Ergebnisse wurde U937 Zellen für die Analyse der Abhängigkeit von VLA-4 von MK2 gewählt. Dennoch stellt sich die Frage, ob die Zelllinie U937 ein geeignetes Zellkulturmodell darstellt.

Grundsätzlich ist bekannt, dass sich Zellen während der Kultivierung verändern bzw. mutieren können, was einen Einfluss auf die Untersuchungen haben könnte. Des Weiteren stellt sich die Frage inwieweit eine Modulation durch äußere Einflüsse in den Krebszellen möglich ist.

5. SCHLUSSFOLGERUNG

Die Schwere der EAE scheint maßgeblich von der TNFR Signaltransduktionskaskade beeinflusst, wobei dem TNFR1 die entscheidende Rolle zuzuschreiben ist. Frühere Studien mit TNFR1^{-/-} bzw. TNFR1/TNFR2^{-/-} Mäusen konnten zeigen, dass die Schwere der EAE durch den *knockout* vermindert war. Der Beginn der Erkrankung war verzögert und die klinischen Symptome abgemildert. Ein TNFR2 *knockout* hingegen konnte zu keiner Verbesserung der Erkrankung führen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die defizient für den Liganden TNF α sind keinen akuten Verlauf der EAE Erkrankung entwickeln, aber eine langsame progressive Form aufweisen (Eugster, Frei et al. 1999). Diese Erkenntnisse zeigen, dass die akute Phase der EAE maßgeblich durch, entweder die Abwesenheit der Liganden oder die Abwesenheit des TNFR1 kontrolliert ist. Darüber hinaus konnten Studien mit MOG-induzierten C57Bl/6 TNF α ^{-/-} Mäusen zeigen, dass die Abwesenheit des Entzündungsmediators entgegengesetzt der Erwartung zu einer Verlängerung der Erkrankung führte und mit mehr infiltrierten Zellen im ZNS sowie extensiver Demyelinisierung korrelierte (Liu, Marino et al. 1998).

Der akute Verlauf der EAE in MOG-induzierten MK2^{-/-} Mäusen war in dieser Arbeit ebenfalls verlängert und durch mehr mononukleäre Zellen im ZNS gekennzeichnet. Außerdem war der Entzündungsmediator TNF α reduziert, dessen Biosynthese durch MK2 reguliert ist (Kotlyarov, Neininger et al. 1999). Diese Tatsachen lassen vermuten, dass eine Defizienz in MK2 zu einer Verminderung des TNF α -Levels in MK2^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT führt, was letztlich in einer Veränderung des TNFR1 Signalwegs und somit auch einem veränderten Apoptoseverhalten in infiltrierten autoreaktiven Zellen im ZNS führt. Eine Apoptoseinhibition, ausgelöst durch eine unvollständige Aktivierung des p38-Signalwegs speziell in CD8⁺ Zellen ist ebenso denkbar.

Des Weiteren spielen Adhäsionsmoleküle eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion und Migration und somit auch bei der Infiltration ins ZNS. Adhäsionsstudien mit MK2-defizienten U937 Zellen zeigten allerdings keine Veränderung im Adhäsionsverhalten, welches wesentlich durch VLA-4 bedingt ist. *In vitro* Studien zur Rolle der MK2 bei der Expression von VLA-4 mit der Zelllinie U937, legten den Schluss nahe, dass VLA-4 nicht durch MK2 reguliert ist bzw. die Expression des Moleküls durch MK2 allenfalls leicht beeinflusst, der Hauptregulationsmechanismus aber ein anderer ist. Allerdings wäre denkbar, dass die Krebszelllinie U937 kein geeignetes Untersuchungsmodell darstellte.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Abramsky, O., D. Teitelbaum, et al. (1977). "Effect of a synthetic polypeptide (COP 1) on patients with multiple sclerosis and with acute disseminated encephalomyelitis. Preliminary report." J Neurol Sci **31**(3): 433-8.

Aderem, A. and D. M. Underhill (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." Annu Rev Immunol **17**: 593-623.

Aggarwal, B. B. (2003). "Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword." Nat Rev Immunol **3**(9): 745-56.

al-Ali, S. Y. and S. M. al-Hussain (1996). "An ultrastructural study of the phagocytic activity of astrocytes in adult rat brain." J Anat **188 (Pt 2)**: 257-62.

Alon, R., P. D. Kassner, et al. (1995). "The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1." J Cell Biol **128**(6): 1243-53.

Amiel, S. A. (1976). "The effects of Bordetella pertussis vaccine on cerebral vascular permeability." Br J Exp Pathol **57**(6): 653-62.

Andersson, J., A. Coutinho, et al. (1977). "Clonal growth and maturation to immunoglobulin secretion in vitro of every growth-inducible B lymphocyte." Cell **10**(1): 27-34.

Antony, V. B., S. W. Godbey, et al. (1993). "Recruitment of inflammatory cells to the pleural space. Chemotactic cytokines, IL-8, and monocyte chemoattractant peptide-1 in human pleural fluids." J Immunol **151**(12): 7216-23.

Bachmann, R., H. P. Eugster, et al. (1999). "Impairment of TNF-receptor-1 signaling but not fas signaling diminishes T-cell apoptosis in myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide-induced chronic demyelinating autoimmune encephalomyelitis in mice." Am J Pathol **154**(5): 1417-22.

Bagasra, O., F. H. Michaels, et al. (1995). "Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(26): 12041-5.

Baron, J. L., J. A. Madri, et al. (1993). "Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma." J Exp Med **177**(1): 57-68.

Barone, F. C., B. Arvin, et al. (1997). "Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury." Stroke **28**(6): 1233-44.

Barone, F. C., E. A. Irving, et al. (2001). "Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase provides neuroprotection in cerebral focal ischemia." Med Res Rev **21**(2): 129-45.

- Bassing, C. H., R. E. Tillman, et al. (2003). "T cell receptor (TCR) alpha/delta locus enhancer identity and position are critical for the assembly of TCR delta and alpha variable region genes." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2598-603.
- Baxter, A. G. (2007). "The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis." Nat Rev Immunol **7**(11): 904-12.
- Beilharz, E. J., V. C. Russo, et al. (1998). "Co-ordinated and cellular specific induction of the components of the IGF/IGFBP axis in the rat brain following hypoxic-ischemic injury." Brain Res Mol Brain Res **59**(2): 119-34.
- Ben-Levy, R., S. Hooper, et al. (1998). "Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2." Curr Biol **8**(19): 1049-57.
- Ben-Levy, R., I. A. Leighton, et al. (1995). "Identification of novel phosphorylation sites required for activation of MAPKAP kinase-2." Embo J **14**(23): 5920-30.
- Ben-Nun, A., I. Mendel, et al. (1996). "The autoimmune reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in multiple sclerosis is potentially pathogenic: effect of copolymer 1 on MOG-induced disease." J Neurol **243**(4 Suppl 1): S14-22.
- Ben-Nun, A., I. Mendel, et al. (1997). "Immunomodulation of murine experimental autoimmune encephalomyelitis by pertussis toxin: the protective activity, but not the disease-enhancing activity, can be attributed to the nontoxic B-oligomer." Proc Assoc Am Physicians **109**(2): 120-5.
- Benoist, C. and D. Mathis (2001). "Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry?" Nat Immunol **2**(9): 797-801.
- Berger, T., P. Rubner, et al. (2003). "Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event." N Engl J Med **349**(2): 139-45.
- Bertrams, H. J. and E. K. Kuwert (1976). "Association of histocompatibility haplotype HLA-A3-B7 with multiple sclerosis." J Immunol **117**(5 Pt.2): 1906-12.
- Betelli, E., Y. Carrier, et al. (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." Nature **441**(7090): 235-8.
- Bitsch, A., J. Schuchardt, et al. (2000). "Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation." Brain **123** (Pt 6): 1174-83.
- Black, R. A., C. T. Rauch, et al. (1997). "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells." Nature **385**(6618): 729-33.
- Bolig, F., R. Winzen, et al. (2003). "Affinity purification of ARE-binding proteins identifies polyA-binding protein 1 as a potential substrate in MK2-induced mRNA stabilization." Biochem Biophys Res Commun **301**(3): 665-70.
- Botchkina, G. I., M. E. Meistrell, 3rd, et al. (1997). "Expression of TNF and TNF receptors (p55 and p75) in the rat brain after focal cerebral ischemia." Mol Med **3**(11): 765-81.

- Bradbury, M. W. (1985). "The blood-brain barrier. Transport across the cerebral endothelium." Circ Res **57**(2): 213-22.
- Brancho, D., N. Tanaka, et al. (2003). "Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo." Genes Dev **17**(16): 1969-78.
- Bray, P. F., L. C. Bloomer, et al. (1983). "Epstein-Barr virus infection and antibody synthesis in patients with multiple sclerosis." Arch Neurol **40**(7): 406-8.
- Brightman, M. W. and T. S. Reese (1969). "Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain." J Cell Biol **40**(3): 648-77.
- Brinkmann, V., M. D. Davis, et al. (2002). "The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors." J Biol Chem **277**(24): 21453-7.
- Bronstein, D. M., I. Perez-Otano, et al. (1995). "Glia-dependent neurotoxicity and neuroprotection in mesencephalic cultures." Brain Res **704**(1): 112-6.
- Brosnan, C. F., B. Cannella, et al. (1995). "Cytokine localization in multiple sclerosis lesions: correlation with adhesion molecule expression and reactive nitrogen species." Neurology **45**(6 Suppl 6): S16-21.
- Bruckener, K. E., A. el Baya, et al. (2003). "Permeabilization in a cerebral endothelial barrier model by pertussis toxin involves the PKC effector pathway and is abolished by elevated levels of cAMP." J Cell Sci **116**(Pt 9): 1837-46.
- Burgoon, M. P., G. P. Owens, et al. (1999). "Cloning the antibody response in humans with inflammatory central nervous system disease: analysis of the expressed IgG repertoire in subacute sclerosing panencephalitis brain reveals disease-relevant antibodies that recognize specific measles virus antigens." J Immunol **163**(6): 3496-502.
- Cannella, B. and C. S. Raine (1995). "The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions." Ann Neurol **37**(4): 424-35.
- Carlson, N. G., W. A. Wieggl, et al. (1999). "Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways." J Immunol **163**(7): 3963-8.
- Casetta, I. and E. Granieri (2000). "Clinical infections and multiple sclerosis: contribution from analytical epidemiology." J Neurovirol **6 Suppl 2**: S147-51.
- Chan, F. K. and M. J. Lenardo (2000). "A crucial role for p80 TNF-R2 in amplifying p60 TNF-R1 apoptosis signals in T lymphocytes." Eur J Immunol **30**(2): 652-60.
- Chen, G., P. Cao, et al. (2002). "TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90." Mol Cell **9**(2): 401-10.
- Chen, G. and D. V. Goeddel (2002). "TNF-R1 signaling: a beautiful pathway." Science **296**(5573): 1634-5.

- Chevalier, D. and B. G. Allen (2000). "Two distinct forms of MAPKAP kinase-2 in adult cardiac ventricular myocytes." Biochemistry **39**(20): 6145-56.
- Clark, A. R., J. L. Dean, et al. (2003). "Post-transcriptional regulation of gene expression by mitogen-activated protein kinase p38." FEBS Lett **546**(1): 37-44.
- Coico, R. F., B. S. Bhogal, et al. (1983). "Relationship of germinal centers in lymphoid tissue to immunologic memory. VI. Transfer of B cell memory with lymph node cells fractionated according to their receptors for peanut agglutinin." J Immunol **131**(5): 2254-7.
- Crawley, J. B., L. Rawlinson, et al. (1997). "T cell proliferation in response to interleukins 2 and 7 requires p38MAP kinase activation." J Biol Chem **272**(23): 15023-7.
- Culbert, A. A., S. D. Skaper, et al. (2006). "MAPK-activated protein kinase 2 deficiency in microglia inhibits pro-inflammatory mediator release and resultant neurotoxicity. Relevance to neuroinflammation in a transgenic mouse model of Alzheimer disease." J Biol Chem **281**(33): 23658-67.
- Dan, I., N. M. Watanabe, et al. (2001). "The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades." Trends Cell Biol **11**(5): 220-30.
- Davila, D. and I. Torres-Aleman (2008). "Neuronal death by oxidative stress involves activation of FOXO3 through a two-arm pathway that activates stress kinases and attenuates insulin-like growth factor I signaling." Mol Biol Cell **19**(5): 2014-25.
- Detmers, P. A., D. Zhou, et al. (1998). "Role of stress-activated mitogen-activated protein kinase (p38) in beta 2-integrin-dependent neutrophil adhesion and the adhesion-dependent oxidative burst." J Immunol **161**(4): 1921-9.
- Devin, A., A. Cook, et al. (2000). "The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation." Immunity **12**(4): 419-29.
- Dissing-Olesen, L., R. Ladeby, et al. (2007). "Axonal lesion-induced microglial proliferation and microglial cluster formation in the mouse." Neuroscience **149**(1): 112-22.
- Dohrmann, G. J. (1970). "The choroid plexus: a historical review." Brain Res **18**(2): 197-218.
- Dopp, J. M., S. M. Breneman, et al. (1994). "Expression of ICAM-1, VCAM-1, L-selectin, and leukosialin in the mouse central nervous system during the induction and remission stages of experimental allergic encephalomyelitis." J Neuroimmunol **54**(1-2): 129-44.
- Ebers, G. C., D. E. Bulman, et al. (1986). "A population-based study of multiple sclerosis in twins." N Engl J Med **315**(26): 1638-42.
- Ebers, G. C. and A. D. Sadovnick (1993). "The geographic distribution of multiple sclerosis: a review." Neuroepidemiology **12**(1): 1-5.

- Ehltling, C., W. S. Lai, et al. (2007). "Regulation of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA stability by TNF-alpha involves activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 cascade." J Immunol **178**(5): 2813-26.
- Ehrlich, P. (1885). "Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus : eine farbenanalytische Studie." Berlin: Hirschwald.
- Elices, M. J., L. Osborn, et al. (1990). "VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site." Cell **60**(4): 577-84.
- Elson, L. H., T. B. Nutman, et al. (1995). "Flow cytometric analysis for cytokine production identifies T helper 1, T helper 2, and T helper 0 cells within the human CD4+CD27- lymphocyte subpopulation." J Immunol **154**(9): 4294-301.
- Engel, K., A. Kotlyarov, et al. (1998). "Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation." Embo J **17**(12): 3363-71.
- Engel, K., H. Schultz, et al. (1995). "Constitutive activation of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 by mutation of phosphorylation sites and an A-helix motif." J Biol Chem **270**(45): 27213-21.
- Ermann, J. and C. G. Fathman (2001). "Autoimmune diseases: genes, bugs and failed regulation." Nat Immunol **2**(9): 759-61.
- Eugster, H. P., K. Frei, et al. (1999). "Severity of symptoms and demyelination in MOG-induced EAE depends on TNFR1." Eur J Immunol **29**(2): 626-32.
- Fagerholm, U. (2007). "The highly permeable blood-brain barrier: an evaluation of current opinions about brain uptake capacity." Drug Discov Today **12**(23-24): 1076-82.
- Farooq, A. and M. M. Zhou (2004). "Structure and regulation of MAPK phosphatases." Cell Signal **16**(7): 769-79.
- Farrell, C. R., P. A. Stewart, et al. (1987). "Pericytes in human cerebral microvasculature." Anat Rec **218**(4): 466-9.
- Ferrari, C., A. Penna, et al. (1986). "Selective sensitization of peripheral blood T lymphocytes to hepatitis B core antigen in patients with chronic active hepatitis type B." Clin Exp Immunol **66**(3): 497-506.
- Foster, C. A. (1996). "VCAM-1/alpha 4-integrin adhesion pathway: therapeutic target for allergic inflammatory disorders." J Allergy Clin Immunol **98**(6 Pt 2): S270-7.
- Fotin-Mleczek, M., F. Henkler, et al. (2002). "Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8." J Cell Sci **115**(Pt 13): 2757-70.

- Franke, H., H. J. Galla, et al. (1999). "An improved low-permeability in vitro-model of the blood-brain barrier: transport studies on retinoids, sucrose, haloperidol, caffeine and mannitol." Brain Res **818**(1): 65-71.
- Frei, K., C. Siepl, et al. (1987). "Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma-treated microglial cells." Eur J Immunol **17**(9): 1271-8.
- Frost, R. A., G. J. Nystrom, et al. (2003). "Tumor necrosis factor-alpha decreases insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid expression in C2C12 myoblasts via a Jun N-terminal kinase pathway." Endocrinology **144**(5): 1770-9.
- Fukui, Y., T. Ishimoto, et al. (1997). "Positive and negative CD4+ thymocyte selection by a single MHC class II/peptide ligand affected by its expression level in the thymus." Immunity **6**(4): 401-10.
- Gaestel, M. (2006). "MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(2): 120-30.
- Gaestel, M. (2008). "Specificity of signaling from MAPKs to MAPKAPKs: kinases' tango nuevo." Front Biosci **13**: 6050-9.
- Gary, D. S., A. J. Bruce-Keller, et al. (1998). "Ischemic and excitotoxic brain injury is enhanced in mice lacking the p55 tumor necrosis factor receptor." J Cereb Blood Flow Metab **18**(12): 1283-7.
- Gehrmann, J., Y. Matsumoto, et al. (1995). "Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain." Brain Res Brain Res Rev **20**(3): 269-87.
- Ghasemlou, N., R. Lopez-Vales, et al. "Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 (MK2) contributes to secondary damage after spinal cord injury." J Neurosci **30**(41): 13750-9.
- Gold, R., C. Linington, et al. (2006). "Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research." Brain **129**(Pt 8): 1953-71.
- Gonsette, R. E. (1996). "Mitoxantrone immunotherapy in multiple sclerosis." Mult Scler **1**(6): 329-32.
- Goodnow, C. C. (1997). "Balancing immunity, autoimmunity, and self-tolerance." Ann N Y Acad Sci **815**: 55-66.
- Gorska, M. M., Q. Liang, et al. (2007). "MK2 controls the level of negative feedback in the NF-kappaB pathway and is essential for vascular permeability and airway inflammation." J Exp Med **204**(7): 1637-52.
- Han, Q., J. Leng, et al. (2002). "Rac1-MKK3-p38-MAPKAPK2 pathway promotes urokinase plasminogen activator mRNA stability in invasive breast cancer cells." J Biol Chem **277**(50): 48379-85.

- Hannigan, M. O., L. Zhan, et al. (2001). "Abnormal migration phenotype of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2^{-/-} neutrophils in Zigmund chambers containing formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine gradients." J Immunol **167**(7): 3953-61.
- Harrington, L. E., R. D. Hatton, et al. (2005). "Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." Nat Immunol **6**(11): 1123-32.
- Harry, G. J., C. Lefebvre d'Hellencourt, et al. (2008). "Tumor necrosis factor p55 and p75 receptors are involved in chemical-induced apoptosis of dentate granule neurons." J Neurochem **106**(1): 281-98.
- Hassfeld, W., G. Steiner, et al. (1993). "Autoantibody to the nuclear antigen RA33: a marker for early rheumatoid arthritis." Br J Rheumatol **32**(3): 199-203.
- Hegen, M., M. Gaestel, et al. (2006). "MAPKAP kinase 2-deficient mice are resistant to collagen-induced arthritis." J Immunol **177**(3): 1913-7.
- Hehlgans, T. and K. Pfeffer (2005). "The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games." Immunology **115**(1): 1-20.
- Hemler, M. E., M. J. Elices, et al. (1990). "Structure of the integrin VLA-4 and its cell-cell and cell-matrix adhesion functions." Immunol Rev **114**: 45-65.
- Hillert, J., T. Kall, et al. (1994). "The HLA-Dw2 haplotype segregates closely with multiple sclerosis in multiplex families." J Neuroimmunol **50**(1): 95-100.
- Hitti, E., T. Iakovleva, et al. (2006). "Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element." Mol Cell Biol **26**(6): 2399-407.
- Holz, A., B. Bielekova, et al. (2000). "Myelin-associated oligodendrocytic basic protein: identification of an encephalitogenic epitope and association with multiple sclerosis." J Immunol **164**(2): 1103-9.
- Hsu, H., H. B. Shu, et al. (1996). "TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways." Cell **84**(2): 299-308.
- Hsu, H., J. Xiong, et al. (1995). "The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation." Cell **81**(4): 495-504.
- Huang, B., A. Yachou, et al. (1997). "Analysis of the contact sites on the CD4 molecule with class II MHC molecule: co-ligand versus co-receptor function." J Immunol **158**(1): 216-25.
- Huot, J., F. Houle, et al. (1997). "Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells." Circ Res **80**(3): 383-92.

- Huot, J., F. Houle, et al. (1996). "HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress." Cancer Res **56**(2): 273-9.
- Huseby, E. S., D. Liggitt, et al. (2001). "A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis." J Exp Med **194**(5): 669-76.
- Jackman, N., A. Ishii, et al. (2009). "Oligodendrocyte development and myelin biogenesis: parsing out the roles of glycosphingolipids." Physiology (Bethesda) **24**: 290-7.
- Jacobsen, M., S. Cepok, et al. (2002). "Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients." Brain **125**(Pt 3): 538-50.
- Janeway, C. A., Jr. (2002). Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag; Auflage: 5. Auflage.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.
- Jiang, Y., H. Gram, et al. (1997). "Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta." J Biol Chem **272**(48): 30122-8.
- Jones, S. A. (2005). "Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6." J Immunol **175**(6): 3463-8.
- Jurewicz, A., W. E. Biddison, et al. (1998). "MHC class I-restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide-specific CD8 T lymphocytes." J Immunol **160**(6): 3056-9.
- Kaiser, M., G. R. Wiggin, et al. (2007). "MSK regulate TCR-induced CREB phosphorylation but not immediate early gene transcription." Eur J Immunol **37**(9): 2583-95.
- Kandel, E. S., J.; Jessell, T. (1995). Neurowissenschaften, Spektrum Akademischer Verlag.
- Kaye, J. F., N. Kerlero de Rosbo, et al. (2000). "The central nervous system-specific myelin oligodendrocytic basic protein (MOBP) is encephalitogenic and a potential target antigen in multiple sclerosis (MS)." J Neuroimmunol **102**(2): 189-98.
- Kayyali, U. S., C. M. Pennella, et al. (2002). "Cytoskeletal changes in hypoxic pulmonary endothelial cells are dependent on MAPK-activated protein kinase MK2." J Biol Chem **277**(45): 42596-602.
- Kervinen, J., H. Ma, et al. (2006). "Effect of construct design on MAPKAP kinase-2 activity, thermodynamic stability and ligand-binding affinity." Arch Biochem Biophys **449**(1-2): 47-56.
- Kim, S. W., Y. M. Yu, et al. (2004). "Inhibition of delayed induction of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates kainic acid-induced neuronal loss in the hippocampus." Brain Res **1007**(1-2): 188-91.

- Kimberley, F. C., A. A. Lobito, et al. (2007). "Falling into TRAPS--receptor misfolding in the TNF receptor 1-associated periodic fever syndrome." Arthritis Res Ther **9**(4): 217.
- Kirchhausen, T. (1999). "Adaptors for clathrin-mediated traffic." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 705-32.
- Kisielow, P., H. S. Teh, et al. (1988). "Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules." Nature **335**(6192): 730-3.
- Kolch, W. (2000). "Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions." Biochem J **351 Pt 2**: 289-305.
- Komoly, S., L. D. Hudson, et al. (1992). "Insulin-like growth factor I gene expression is induced in astrocytes during experimental demyelination." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(5): 1894-8.
- Kotlyarov, A., A. Neininger, et al. (1999). "MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis." Nat Cell Biol **1**(2): 94-7.
- Kotlyarov, A., Y. Yannoni, et al. (2002). "Distinct cellular functions of MK2." Mol Cell Biol **22**(13): 4827-35.
- Kruetzmann, S., M. M. Rosado, et al. (2003). "Human immunoglobulin M memory B cells controlling Streptococcus pneumoniae infections are generated in the spleen." J Exp Med **197**(7): 939-45.
- Krump, E., J. S. Sanghera, et al. (1997). "Chemotactic peptide N-formyl-met-leu-phe activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and MAPK-activated protein kinase-2 in human neutrophils." J Biol Chem **272**(2): 937-44.
- Kuchroo, V. K., C. A. Martin, et al. (1993). "Cytokines and adhesion molecules contribute to the ability of myelin proteolipid protein-specific T cell clones to mediate experimental allergic encephalomyelitis." J Immunol **151**(8): 4371-82.
- Kyriakis, J. M. and J. Avruch (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." Physiol Rev **81**(2): 807-69.
- Lambert, H., S. J. Charette, et al. (1999). "HSP27 multimerization mediated by phosphorylation-sensitive intermolecular interactions at the amino terminus." J Biol Chem **274**(14): 9378-85.
- Laschinger, M. and B. Engelhardt (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**(1): 32-43.
- Lassmann, H., W. Bruck, et al. (2001). "Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy." Trends Mol Med **7**(3): 115-21.

- Lassmann, H., C. S. Raine, et al. (1998). "Immunopathology of multiple sclerosis: report on an international meeting held at the Institute of Neurology of the University of Vienna." J Neuroimmunol **86**(2): 213-7.
- Lassmann, H., F. Zimprich, et al. (1991). "Microglial cells are a component of the perivascular glia limitans." J Neurosci Res **28**(2): 236-43.
- Lavoie, J. N., E. Hickey, et al. (1993). "Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27." J Biol Chem **268**(32): 24210-4.
- Ledeboer, A., J. J. Breve, et al. (2000). "Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor-beta differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells." Glia **30**(2): 134-42.
- Lederberg, J. (1959). "Genes and antibodies." Science **129**(3364): 1649-53.
- Lee, J. C., J. T. Laydon, et al. (1994). "A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis." Nature **372**(6508): 739-46.
- Lee, S. H., J. H. Bahn, et al. "Activating transcription factor 2 (ATF2) controls tolfenamic acid-induced ATF3 expression via MAP kinase pathways." Oncogene **29**(37): 5182-92.
- Li, K., S. H. Sacks, et al. (2008). "The classical complement pathway plays a critical role in the opsonisation of uropathogenic Escherichia coli." Mol Immunol **45**(4): 954-62.
- Linthicum, D. S. and J. A. Frelinger (1982). "Acute autoimmune encephalomyelitis in mice. II. Susceptibility is controlled by the combination of H-2 and histamine sensitization genes." J Exp Med **156**(1): 31-40.
- Liu, B. and J. S. Hong (2003). "Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention." J Pharmacol Exp Ther **304**(1): 1-7.
- Liu, J., M. W. Marino, et al. (1998). "TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination." Nat Med **4**(1): 78-83.
- Liu, Y., K. Z. Guyton, et al. (1996). "Differential activation of ERK, JNK/SAPK and P38/CSBP/RK map kinase family members during the cellular response to arsenite." Free Radic Biol Med **21**(6): 771-81.
- Liu, Y. J., J. Zhang, et al. (1991). "Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens." Eur J Immunol **21**(12): 2951-62.
- Loddick, S. A. and N. J. Rothwell (1999). "Mechanisms of tumor necrosis factor alpha action on neurodegeneration: interaction with insulin-like growth factor-1." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(17): 9449-51.

- Lovett-Racke, A. E., P. Bittner, et al. (1998). "Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis with insulin-like growth factor (IGF-1) and IGF-1/IGF-binding protein-3 complex (IGF-1/IGFBP3)." J Clin Invest **101**(8): 1797-804.
- Lublin, F. D. and S. C. Reingold (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**(4): 907-11.
- Lucchinetti, C. F., W. Bruck, et al. (1996). "Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis." Brain Pathol **6**(3): 259-74.
- Mamputu, J. C. and G. Renier (1999). "Differentiation of human monocytes to monocyte-derived macrophages is associated with increased lipoprotein lipase-induced tumor necrosis factor-alpha expression and production: a process involving cell surface proteoglycans and protein kinase C." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(6): 1405-11.
- Manke, I. A., A. Nguyen, et al. (2005). "MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation." Mol Cell **17**(1): 37-48.
- Martino, G. and H. P. Hartung (1999). "Immunopathogenesis of multiple sclerosis: the role of T cells." Curr Opin Neurol **12**(3): 309-21.
- McFarlin, D. E. and P. J. Lachmann (1989). "Multiple sclerosis. Hopeful genes and immunology." Nature **341**(6244): 693-4.
- McGeer, P. L. and E. G. McGeer (1998). "Glial cell reactions in neurodegenerative diseases: pathophysiology and therapeutic interventions." Alzheimer Dis Assoc Disord **12 Suppl 2**: S1-6.
- McLaughlin, M. M., S. Kumar, et al. (1996). "Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase." J Biol Chem **271**(14): 8488-92.
- Meinl, E. (1999). "Concepts of viral pathogenesis of multiple sclerosis." Curr Opin Neurol **12**(3): 303-7.
- Mendel, I., N. Kerlero de Rosbo, et al. (1995). "A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells." Eur J Immunol **25**(7): 1951-9.
- Mendes, A. and M. J. Sa "Classical immunomodulatory therapy in multiple sclerosis: how it acts, how it works." Arq Neuropsiquiatr **69**(3): 536-43.
- Merritt, C., H. Enslin, et al. (2000). "Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in vivo selectively induces apoptosis of CD8(+) but not CD4(+) T cells." Mol Cell Biol **20**(3): 936-46.

- Micheau, O. and J. Tschopp (2003). "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes." Cell **114**(2): 181-90.
- Miller, D. H., O. A. Khan, et al. (2003). "A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis." N Engl J Med **348**(1): 15-23.
- Miller, L. S., E. M. Pietras, et al. (2007). "Inflammasome-mediated production of IL-1beta is required for neutrophil recruitment against Staphylococcus aureus in vivo." J Immunol **179**(10): 6933-42.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, et al. (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." J Immunol **136**(7): 2348-57.
- Mostoslavsky, R., F. W. Alt, et al. (2004). "The lingering enigma of the allelic exclusion mechanism." Cell **118**(5): 539-44.
- Muir, A. R. and A. Peters (1962). "Quintuple-layered membrane junctions at terminal bars between endothelial cells." J Cell Biol **12**: 443-8.
- Mukhopadhyay, S., A. Pluddemann, et al. (2009). "Macrophage pattern recognition receptors in immunity, homeostasis and self tolerance." Adv Exp Med Biol **653**: 1-14.
- Munoz, J. J. and I. R. Mackay (1984). "Production of experimental allergic encephalomyelitis with the aid of pertussigen in mouse strains considered genetically resistant." J Neuroimmunol **7**(2-3): 91-6.
- Nathan, C. F. (1987). "Secretory products of macrophages." J Clin Invest **79**(2): 319-26.
- Neininger, A., D. Kontoyiannis, et al. (2002). "MK2 targets AU-rich elements and regulates biosynthesis of tumor necrosis factor and interleukin-6 independently at different post-transcriptional levels." J Biol Chem **277**(5): 3065-8.
- Newton, H. B. (2006). "Advances in strategies to improve drug delivery to brain tumors." Expert Rev Neurother **6**(10): 1495-509.
- Nick, J. A., N. J. Avdi, et al. (1997). "Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and FMLP." J Clin Invest **99**(5): 975-86.
- Nicola, N. A. and L. Peterson (1986). "Identification of distinct receptors for two hemopoietic growth factors (granulocyte colony-stimulating factor and multipotential colony-stimulating factor) by chemical cross-linking." J Biol Chem **261**(26): 12384-9.
- Oldstone, M. B. (1998). "Molecular mimicry and immune-mediated diseases." Faseb J **12**(13): 1255-65.
- Olusanya, O., P. D. Andrews, et al. (2001). "Phosphorylation of threonine 156 of the mu2 subunit of the AP2 complex is essential for endocytosis in vitro and in vivo." Curr Biol **11**(11): 896-900.

- Owen, D. J. (2004). "Linking endocytic cargo to clathrin: structural and functional insights into coated vesicle formation." Biochem Soc Trans **32**(Pt 1): 1-14.
- Ozinsky, A., D. M. Underhill, et al. (2000). "The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13766-71.
- Panitch, H. and C. Ciccone (1981). "Induction of recurrent experimental allergic encephalomyelitis with myelin basic protein." Ann Neurol **9**(5): 433-8.
- Pardridge, W. M. (2003). "Molecular biology of the blood-brain barrier." Methods Mol Med **89**: 385-99.
- Parker, D. C. (1993). "T cell-dependent B cell activation." Annu Rev Immunol **11**: 331-60.
- Pearson, G., F. Robinson, et al. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." Endocr Rev **22**(2): 153-83.
- Pettinelli, C. B. and D. E. McFarlin (1981). "Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes." J Immunol **127**(4): 1420-3.
- Pietersma, A., B. C. Tilly, et al. (1997). "p38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level." Biochem Biophys Res Commun **230**(1): 44-8.
- Plath, K., K. Engel, et al. (1994). "Characterization of the proline-rich region of mouse MAPKAP kinase 2: influence on catalytic properties and binding to the c-abl SH3 domain in vitro." Biochem Biophys Res Commun **203**(2): 1188-94.
- Poduslo, J. F. (1978). "The molecular architecture of myelin: identification of the external surface membrane components." Adv Exp Med Biol **100**: 189-205.
- Poser, S. (1980). Multiple Sklerose in Forschung, Klinik und Praxis. Stuttgart-New York, Schattauer.
- Probert, L., H. P. Eugster, et al. (2000). "TNFR1 signalling is critical for the development of demyelination and the limitation of T-cell responses during immune-mediated CNS disease." Brain **123** (Pt 10): 2005-19.
- Puig-Kroger, A., F. Sanz-Rodriguez, et al. (2000). "Maturation-dependent expression and function of the CD49d integrin on monocyte-derived human dendritic cells." J Immunol **165**(8): 4338-45.
- Rabinovitch, M. (1995). "Professional and non-professional phagocytes: an introduction." Trends Cell Biol **5**(3): 85-7.
- Raingeaud, J., S. Gupta, et al. (1995). "Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine." J Biol Chem **270**(13): 7420-6.

- Rajewsky, K. (1996). "Clonal selection and learning in the antibody system." Nature **381**(6585): 751-8.
- Ridet, J. L., S. K. Malhotra, et al. (1997). "Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function." Trends Neurosci **20**(12): 570-7.
- Rieckmann, P., M. Albrecht, et al. (1995). "Tumor necrosis factor-alpha messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity." Ann Neurol **37**(1): 82-8.
- Rolink, A. G., F. Melchers, et al. (1999). "The transition from immature to mature B cells." Curr Top Microbiol Immunol **246**: 39-43; discussion 44.
- Romagnani, S. (1995). "Biology of human TH1 and TH2 cells." J Clin Immunol **15**(3): 121-9.
- Rothwell, N. J. and P. J. Strijbos (1995). "Cytokines in neurodegeneration and repair." Int J Dev Neurosci **13**(3-4): 179-85.
- Rouse, J., P. Cohen, et al. (1994). "A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins." Cell **78**(6): 1027-37.
- Roux, P. P. and J. Blenis (2004). "ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions." Microbiol Mol Biol Rev **68**(2): 320-44.
- Rudick, R. A. and M. A. Panzara (2008). "Natalizumab for the treatment of relapsing multiple sclerosis." Biologics **2**(2): 189-99.
- Sad, S. and T. R. Mosmann (1994). "Single IL-2-secreting precursor CD4 T cell can develop into either Th1 or Th2 cytokine secretion phenotype." J Immunol **153**(8): 3514-22.
- Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, et al. (2008). "Regulatory T cells and immune tolerance." Cell **133**(5): 775-87.
- Sakuma, H., K. Kohyama, et al. (2004). "Clinicopathological study of a myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced demyelinating disease in LEW.1AV1 rats." Brain **127**(Pt 10): 2201-13.
- Sanders, P. and J. De Keyser (2007). "Janus faces of microglia in multiple sclerosis." Brain Res Rev **54**(2): 274-85.
- Schneider-Brachert, W., V. Tchikov, et al. (2004). "Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles." Immunity **21**(3): 415-28.
- Schutze, S., V. Tchikov, et al. (2008). "Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(8): 655-62.

Schwartz, R. H. (1996). "Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism?" J Exp Med **184**(1): 1-8.

Seternes, O. M., B. Johansen, et al. (2002). "Both binding and activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) play essential roles in regulation of the nucleocytoplasmic distribution of MAPK-activated protein kinase 5 by cellular stress." Mol Cell Biol **22**(20): 6931-45.

Shiku, H., P. Kisielow, et al. (1975). "Expression of T-cell differentiation antigens on effector cells in cell-mediated cytotoxicity in vitro. Evidence for functional heterogeneity related to the surface phenotype of T cells." J Exp Med **141**(1): 227-41.

Shimaoka, M., J. Takagi, et al. (2002). "Conformational regulation of integrin structure and function." Annu Rev Biophys Biomol Struct **31**: 485-516.

Shinar, Y. and F. A. McMorris (1995). "Developing oligodendroglia express mRNA for insulin-like growth factor-I, a regulator of oligodendrocyte development." J Neurosci Res **42**(4): 516-27.

Shirai, Y. (1921). "On the transplantation of the rat sarcoma in adult heterogenous animals." Jap. Med. World **1**: 14-15.

Siegelman, M. H., D. Stanescu, et al. (2000). "The CD44-initiated pathway of T-cell extravasation uses VLA-4 but not LFA-1 for firm adhesion." J Clin Invest **105**(5): 683-91.

Silber, E. and M. K. Sharief (1999). "Axonal degeneration in the pathogenesis of multiple sclerosis." J Neurol Sci **170**(1): 11-8.

Sligh, J. E., Jr., C. M. Ballantyne, et al. (1993). "Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(18): 8529-33.

Smith, J. A., C. E. Poteet-Smith, et al. (2000). "Creation of a stress-activated p90 ribosomal S6 kinase. The carboxyl-terminal tail of the MAPK-activated protein kinases dictates the signal transduction pathway in which they function." J Biol Chem **275**(41): 31588-93.

Smith, K. A. (1988). "Interleukin-2: inception, impact, and implications." Science **240**(4856): 1169-76.

Sobel, R. A., M. E. Mitchell, et al. (1990). "Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cellular immune reactions in the human central nervous system." Am J Pathol **136**(6): 1309-16.

Sospedra, M. and R. Martin (2005). "Immunology of multiple sclerosis." Annu Rev Immunol **23**: 683-747.

Springer, T. A. (1994). "Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm." Cell **76**(2): 301-14.

- Stavnezer, J. (1996). "Immunoglobulin class switching." Curr Opin Immunol **8**(2): 199-205.
- Steinman, L. (1996). "Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system." Cell **85**(3): 299-302.
- Stohl, W. and N. K. Gonatas (1978). "Chronic permeability of the central nervous system to mononuclear cells in experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat." J Immunol **121**(3): 844-50.
- Stokoe, D., D. G. Campbell, et al. (1992). "MAPKAP kinase-2; a novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase." Embo J **11**(11): 3985-94.
- Stokoe, D., K. Engel, et al. (1992). "Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins." FEBS Lett **313**(3): 307-13.
- Storch, M. K., S. Piddlesden, et al. (1998). "Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination." Ann Neurol **43**(4): 465-71.
- Storch, M. K., A. Stefferl, et al. (1998). "Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology." Brain Pathol **8**(4): 681-94.
- Streit, W. J. (2006). "Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date?" Trends Neurosci **29**(9): 506-10.
- Stromnes, I. M. and J. M. Goverman (2006). "Active induction of experimental allergic encephalomyelitis." Nat Protoc **1**(4): 1810-9.
- Stromnes, I. M. and J. M. Goverman (2006). "Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis." Nat Protoc **1**(4): 1952-60.
- Su, X., L. Ao, et al. (2008). "Post-transcriptional regulation of TNF-induced expression of ICAM-1 and IL-8 in human lung microvascular endothelial cells: an obligatory role for the p38 MAPK-MK2 pathway dissociated with HSP27." Biochim Biophys Acta **1783**(9): 1623-31.
- Subbaramaiah, K., T. P. Marmo, et al. (2003). "Regulation of cyclooxygenase-2 mRNA stability by taxanes: evidence for involvement of p38, MAPKAPK-2, and HuR." J Biol Chem **278**(39): 37637-47.
- Sun, A., M. Liu, et al. (2003). "P38 MAP kinase is activated at early stages in Alzheimer's disease brain." Exp Neurol **183**(2): 394-405.
- Sundstrom, C. and K. Nilsson (1976). "Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)." Int J Cancer **17**(5): 565-77.

- Takahashi, Y., P. R. Dutta, et al. (1998). "In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. V. Affinity maturation develops in two stages of clonal selection." J Exp Med **187**(6): 885-95.
- Tang, P., M. C. Hung, et al. (1996). "Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer." Biochemistry **35**(25): 8216-25.
- Taub, R. N., W. Rosett, et al. (1972). "Distribution of labeled lymph node cells in mice during the lymphocytosis induced by Bordetella pertussis." J Exp Med **136**(6): 1581-93.
- Teixido, J., C. M. Parker, et al. (1992). "Functional and structural analysis of VLA-4 integrin alpha 4 subunit cleavage." J Biol Chem **267**(3): 1786-91.
- Thomas, T., E. Hitti, et al. (2008). "MAP-kinase-activated protein kinase 2 expression and activity is induced after neuronal depolarization." Eur J Neurosci **28**(4): 642-54.
- Thomas, T., M. Timmer, et al. (2008). "MAPKAP kinase 2-deficiency prevents neurons from cell death by reducing neuroinflammation--relevance in a mouse model of Parkinson's disease." J Neurochem **105**(5): 2039-52.
- Thuraisingam, T., Y. Z. Xu, et al. "MAPKAPK-2 signaling is critical for cutaneous wound healing." J Invest Dermatol **130**(1): 278-86.
- Underhill, D. M., A. Ozinsky, et al. (1999). "Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(25): 14459-63.
- Underwood, D. C., R. R. Osborn, et al. (2000). "SB 239063, a potent p38 MAP kinase inhibitor, reduces inflammatory cytokine production, airways eosinophil infiltration, and persistence." J Pharmacol Exp Ther **293**(1): 281-8.
- Vadeboncoeur, N., M. Segura, et al. (2003). "Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by Streptococcus suis serotype 2." FEMS Immunol Med Microbiol **35**(1): 49-58.
- van Furth, R. and Z. A. Cohn (1968). "The origin and kinetics of mononuclear phagocytes." J Exp Med **128**(3): 415-35.
- van Horssen, J., G. Schreibelt, et al. (2008). "Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression." Free Radic Biol Med **45**(12): 1729-37.
- Venters, H. D., Q. Tang, et al. (1999). "A new mechanism of neurodegeneration: a proinflammatory cytokine inhibits receptor signaling by a survival peptide." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(17): 9879-84.
- Wajant, H., K. Pfizenmaier, et al. (2003). "Tumor necrosis factor signaling." Cell Death Differ **10**(1): 45-65.

- Wang, Q. and C. M. Doerschuk (2001). "The p38 mitogen-activated protein kinase mediates cytoskeletal remodeling in pulmonary microvascular endothelial cells upon intracellular adhesion molecule-1 ligation." J Immunol **166**(11): 6877-84.
- Wang, X., L. Xu, et al. (2002). "Mitogen-activated protein kinase-activated protein (MAPKAP) kinase 2 deficiency protects brain from ischemic injury in mice." J Biol Chem **277**(46): 43968-72.
- Wang, X. S., K. Diener, et al. (1997). "Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase." J Biol Chem **272**(38): 23668-74.
- Wang, X. Z. and D. Ron (1996). "Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase." Science **272**(5266): 1347-9.
- Ward, P. A. (1997). "Recruitment of inflammatory cells into lung: roles of cytokines, adhesion molecules, and complement." J Lab Clin Med **129**(4): 400-4.
- Washington, R., J. Burton, et al. (1994). "Expression of immunologically relevant endothelial cell activation antigens on isolated central nervous system microvessels from patients with multiple sclerosis." Ann Neurol **35**(1): 89-97.
- Weaver, C. T., L. E. Harrington, et al. (2006). "Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties." Immunity **24**(6): 677-88.
- Weigle, W. O. (1966). "Persistence of immunological memory to soluble protein antigens." Immunology **10**(4): 377-82.
- Wekerle, H. (1998). "Immune pathogenesis of multiple sclerosis. Brain autoimmune reactivity and its control by neuronal function." Mult Scler **4**(3): 136-7.
- Wekerle, H., M. Bradl, et al. (1996). "The shaping of the brain-specific T lymphocyte repertoire in the thymus." Immunol Rev **149**: 231-43.
- Widmann, C., S. Gibson, et al. (1999). "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human." Physiol Rev **79**(1): 143-80.
- Wilkinson, M. G. and J. B. Millar (2000). "Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways." Faseb J **14**(14): 2147-57.
- Willer, C. J., D. A. Dyment, et al. (2003). "Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(22): 12877-82.
- Winzen, R., M. Kracht, et al. (1999). "The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism." Embo J **18**(18): 4969-80.
- Wong, D., R. Prameya, et al. (1999). "In vitro adhesion and migration of T lymphocytes across monolayers of human brain microvessel endothelial cells: regulation by ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and PECAM-1." J Neuropathol Exp Neurol **58**(2): 138-52.

- Wong, P. and E. G. Pamer (2003). "CD8 T cell responses to infectious pathogens." Annu Rev Immunol **21**: 29-70.
- Wood, C. D., T. M. Thornton, et al. (2009). "Nuclear localization of p38 MAPK in response to DNA damage." Int J Biol Sci **5**(5): 428-37.
- Woodroofe, M. N., G. S. Sarna, et al. (1991). "Detection of interleukin-1 and interleukin-6 in adult rat brain, following mechanical injury, by in vivo microdialysis: evidence of a role for microglia in cytokine production." J Neuroimmunol **33**(3): 227-36.
- Wucherpfennig, K. W. and J. L. Strominger (1995). "Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein." Cell **80**(5): 695-705.
- Yamaguchi, K., K. Shirakabe, et al. (1995). "Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction." Science **270**(5244): 2008-11.
- Yang, C. W., B. S. Strong, et al. "Neutrophils influence the level of antigen presentation during the immune response to protein antigens in adjuvants." J Immunol **185**(5): 2927-34.
- Yoshimura, T., T. Kunishita, et al. (1985). "Chronic experimental allergic encephalomyelitis in guinea pigs induced by proteolipid protein." J Neurol Sci **69**(1-2): 47-58.
- Zuniga-Pflucker, J. C., L. A. Jones, et al. (1989). "Both TCR/MHC and accessory molecule/MHC interactions are required for positive and negative selection of mature T cells in the thymus." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **54 Pt 1**: 153-8.

ANHANG
ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung der T-Zell-Differenzierung.....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus der Blut-Hirn-Schranke	8
Abbildung 3: Übersicht indirekter, direkter und gemischter Neurotoxine	9
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Immunreaktion bei Multipler Sklerose	12
Abbildung 5: bildlicher Vergleich zweier Mäuse (EAE/gesund).....	14
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Signalkaskade der MAP Kinasen.....	16
Abbildung 7: Schematische Darstellung der alternativen Splicingvarianten von MK2	18
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Immunisierung von Mäusen.....	37
Abbildung 9: Schematische Darstellung der RNA-Isolation (nach QIAGEN)	38
Abbildung 10: Beispiel einer Standardkurve.....	42
Abbildung 11: Beispiel einer Standardgeraden	43
Abbildung 12: Neubauer Zählkammer	53
Abbildung 13: Zentrifugation über ein Percoll-Kissen (schematische Darstellung)	56
Abbildung 14: Schematische Darstellung einer durchflusszytometrischen Messung	57
Abbildung 15: Adhärente Leukozyten auf Endothelzellen.....	59
Abbildung 16: Verlauf der EAE in MK2 ^{-/-} und WT Mäusen, die mit MOG ₃₅₋₅₅ immunisiert wurden.....	61
Abbildung 17: Mikroskopische Darstellung zellulärer Infiltrate und der Demyelinisierung bei MOG- induzierten MK2 ^{-/-} und WT Mäusen an Tag 16 der EAE	63
Abbildung 18: Zellzahl isolierter Leukozyten aus dem ZNS von MOG-immunisierten WT und MK2 ^{-/-} Mäusen in unterschiedlichen Phasen der Erkrankung.....	64
Abbildung 19: Expression von β -Catenin im Gehirn von MOG ₃₅₋₅₅ immunisierten WT und MK2 ^{-/-} Mäusen	65
Abbildung 20: Vergleich der Leukozytensubpopulationen in der Milz von gesunden WT und MK2 ^{-/-} Mäusen	67
Abbildung 21: Vergleich der Leukozytensubpopulationen in der Milz von EAE-induzierten Tieren an Tag 8 nach der Immunisierung mit MOG ₃₅₋₅₅	68
Abbildung 22: Vergleich der Leukozytensubpopulationen in der Milz von EAE-induzierten Tieren an Tag 16 nach Immunisierung mit MOG ₃₅₋₅₅	69
Abbildung 23: Vergleich der Leukozytensubpopulationen in der Milz von EAE-induzierter Tiere an Tag 24 nach Immunisierung mit MOG ₃₅₋₅₅	70
Abbildung 24: T-Zell-Verteilung in der Milz bei WT und MK2 ^{-/-} Mäusen im Verlauf der MOG-induzierten EAE.....	71
Abbildung 25: IGF-1-Konzentration im Serum von MK2 ^{-/-} und WT Mäusen in unterschiedlichen Stadien der MOG ₃₅₋₅₅ -induzierten EAE	73

Abbildung 26: mRNA-Expression von IL-2 in Leukozyten aus der Milz und dem ZNS EAE-kranker MK2 ^{-/-} und WT Tiere	74
Abbildung 27: mRNA-Expression von IL-6 in Leukozyten aus der Milz und dem ZNS EAE-kranker MK2 ^{-/-} und WT Tiere	75
Abbildung 28: mRNA-Expression von TNF α in Leukozyten aus der Milz und dem ZNS EAE-kranker WT und MK2 ^{-/-} Tiere	76
Abbildung 29: Expression für die Signaltransduktion des TNFR1 relevanter Proteine in MK2-defizienten Leukozyten und WT Kontrollen während der MOG ₃₅₋₅₅ -induzierten EAE.....	77
Abbildung 30: mRNA-Expression von Molekülen der TNFR1 Signalkaskade in Leukozyten aus der Milz von MK2-defizienten Tieren und WT Kontrollen im Verlauf der MOG ₃₅₋₅₅ -induzierten EAE	79
Abbildung 31: mRNA-Expression von Molekülen der TNFR1 Signalkaskade in Leukozyten aus dem ZNS von MK2-defizienten Tieren und WT Kontrollen im Verlauf der MOG ₃₅₋₅₅ -induzierten EAE	80
Abbildung 32: Adhäsionsverhalten von aktivierten murinen MK2-defizienten und WT Leukozyten an humanen Endothelzellen <i>in vitro</i>	82
Abbildung 33: mRNA-Expression von Adhäsionsmolekülen in Leukozyten aus der Milz EAE-kranker WT Tiere und MK2 ^{-/-} Mäuse.....	83
Abbildung 34: mRNA-Expression von Adhäsionsmolekülen in Leukozyten aus dem ZNS EAE-kranker MK2 ^{-/-} und WT Tiere	84
Abbildung 35: VLA-4-mRNA-Expression in U937 Zellen unter Einfluss von SB203580.....	86
Abbildung 36: mRNA-Expression von VLA-4 in Abhängigkeit von Actinomycin D.....	86
Abbildung 37: VLA-4-Expression in Abhängigkeit von SB203580	87
Abbildung 38: Oberflächenexpression von VLA-4 auf U937 Zellen in Abhängigkeit von SB203580	88
Abbildung 39: Adhäsion von U937 in Abhängigkeit von Natalizumab- und SB203580-Behandlung	89
Abbildung 40: MK2 <i>knockdown</i> in U937 Zellen	90
Abbildung 41: VLA-4-Expression in Abhängigkeit von SB203580 und MK2- <i>knockdown</i> in U937 Zellen ..	91
Abbildung 42: Adhäsions-Assay von Natalizumab behandelten Zellen im Vergleich zu „MK2-defizienten“ U937 Zellen.....	92
Abbildung 43: Oberflächengebundenes Natalizumab	93
Abbildung 44: Die TNFR1 Signalkaskade	101

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: klinischer Score zur Quantifizierung der EAE-Symptome.....	36
Tabelle 2: Zusammenfassung neu standardisierter Primerpaare für die Real Time-PCR.....	41
Tabelle 3: Übersicht der Resultate aus der TNF α -Messung im Serum EAE-kranker WT und MK2 $^{-/-}$ Mäuse	71
Tabelle 4: Übersicht über die TNF α -Konzentrationen (pg/ml) im Serum von EAE-kranken WT und MK2 $^{-/-}$ Mäusen	72
Tabelle 5: Zusammenfassung der mRNA-Expression unterschiedlicher Parameter der TNFR1-Signalkaskade in Leukozyten aus der Milz und dem ZNS im Verlauf der EAE	81

DANKSAGUNGEN

Herrn PD Dr. Martin Berghoff danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit in seinem Labor anfertigen zu dürfen. Außerdem möchte ich für die Unterstützung beim Verfassen von Veröffentlichungen danken.

Herrn Prof. Dr. Michael Martin möchte ich für die Betreuung meiner Arbeit, seiner steten Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei experimentellen Problemen danken.

Allen Mitarbeitern des neurochemisches Labors und insbesondere Frau Dr. Marlene Tschernatsch, Frau PhD Pratibha Sing und Frau Dr. Sandra Bick-Ackerschott danke ich für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen, Hilfestellung bei Problemen des Laboralltags und nette Gespräche.

Herrn Prof. Dr. Matthias Gästel danke ich für die Bereitstellung der MK2-/- Tiere, ohne die die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Des Weiteren danke ich ihm für seine Hilfestellung bei Problemen bezüglich der Tiere.

Herrn Dr. Tobias Thomas danke ich für die Auswahl des spannenden Themas, sowie für die Einarbeitung in dasselbe.

Herrn Dr. Daniel Zahner und seinen Mitarbeitern möchte ich für die Betreuung meiner Tiere im Zentralen Tierlabor danken.

Besonderer Dank für wissenschaftliche Diskussionen und emotionale Unterstützung gilt auch Frau Regina Hofmann - danke für die gute Freundschaft.

Herrn Maxime Viard sowie den Mitarbeitern der Neurophatologie Giessen unter der Leitung von Frau Dr. Anne Schänzer danke ich für seine Unterstützung beim Herstellen von Gewebeschnitten und histologischen Färbungen.

Herrn Prof. Dr. Michael Kaps danke ich für seine freundliche Unterstützung.

Meiner Familie und Freunden und besonders meinem Mann Frank Tietz möchte ich für die emotionale Stütze während dieser Zeit danken.

PUBLIKATIONSLISTE

Eingereichte wissenschaftliche Arbeiten:

“Gene silencing of the MK2 in hard-to-transfect human U937 cells”

S. Tietz and M. Berghoff

Posterpräsentationen:

“MK2 as possible target to alter cell adhesion”

S. Tietz, M. Kolbe, R. Budde, M. Berghoff; ECTRIMS, 19.-22. Oktober 2011, Amsterdam, Niederlande (*accepted*)

“mRNA expression of death receptors TNFR1 and FAS in relapsing-remitting multiple sclerosis”

R. Budde, **S. Tietz**, T. Thomas, R. Reuß, P. Oschmann, M. Berghoff; ECTRIMS, 13.-16. Oktober 2010, Göteborg, Schweden

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**