

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. J. Volkmann

**Modulation der Schrankenfunktion
primärer humaner zerebraler
Endothelzellen durch Fumarsäureester
unter inflammatorischen und nicht-
inflammatorischen Bedingungen**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Mathias Julius Nehen
aus Essen

Würzburg, August 2020



Referent:
Buttmann

Priv.-Doz. Dr. Mathias

Korreferent:

Univ.-Prof. Dr. rer. nat.
Jörg Wischhusen

Dekan:
Frosch

Prof. Dr. Matthias

Tag der mündlichen Prüfung: 15.06.2021

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Multiple Sklerose	1
1.1.1 Epidemiologie und Klinik	1
1.1.2 Ätiologie.....	5
1.1.3 Pathogenese	9
1.2 Blut-Hirn-Schranke	14
1.2.1 Aufbau und Funktion der Blut-Hirn-Schranke	14
1.2.1.1 Anatomie der Blut-Hirn-Schranke.....	15
1.2.1.2 Zell-Zell-Kontakte von Endothelzellen	18
1.2.1.3 Transportvorgänge an der Blut-Hirn-Schranke	23
1.2.2 Blut-Hirn-Schranke bei Inflammation des zentralen Nervensystems.....	26
1.2.3 Blut-Hirn-Schranke bei Multipler Sklerose	32
1.2.4 Wirkmechanismen von Immuntherapeutika an der Blut-Hirn-Schranke	37
1.2.5 Therapie mit Dimethylfumarat bei Multipler Sklerose	41
1.2.6 Mögliche Effekte von Dimethylfumarat an der Blut-Hirn-Schranke	42
1.2.7 Fragestellung.....	45
2. Material und Methoden	48

2.1	Material	48
2.1.1	Verbrauchsmaterialien	48
2.1.2	Geräte	50
2.1.3	Chemikalien und Lösungen	52
2.1.4	Zusammensetzung verwendeter Lösungen	53
2.1.5	Stimulantien	60
2.1.6	Antikörper	61
2.1.7	Zellen	63
2.2	Methoden	64
2.2.1	Zellkultur	64
2.2.2	Durchflusszytometrie	65
2.2.3	Westernblot	67
2.2.4	Adhäsionsassay	72
3.	Ergebnisse	74
3.1	Fumarsäureester reduzieren nicht die T-Zell Adhäsion an humanen zerebralen Endothelzellen	74
3.2	Fumarsäureester reduzieren weder die basale noch die inflammatorisch induzierte Expression von ICAM-1 auf humanen zerebralen Endothelzellen	83
3.3	Auswirkungen von Fumarsäureestern auf die NF κ B-Translokation in Endothelzellen	90
3.3.1	Kinetik der NF κ B/p65-Translokation bei inflammatorischer Stimulation	92

3.3.2 In DMSO gelöstes Dimethylfumarat hemmt die IL-1 β induzierte NF κ B/p65 Translokation in Nabelschnurvenenendothel.....	94
3.3.3 Fumarsäureester hemmen nicht die IL-1 β induzierte NF κ B/p65-Translokation in primären humanen zerebralen Endothelzellen.....	96
3.4 Auswirkungen der Fumarsäureester auf MAP-Kinasen in primären humanen zerebralen Endothelzellen.....	101
4. Diskussion	106
5. Zusammenfassung	116
6. Literaturverzeichnis	118
7. Abbildungsverzeichnis.....	150
8. Abkürzungsverzeichnis.....	152
Danksagung	156
Curriculum Vitae	158

1. Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

1.1.1 Epidemiologie und Klinik

Multiple Sklerose (MS) ist eine nicht heilbare, inflammatorische, demyelinisierende Krankheit des zentralen Nervensystems (ZNS) (Reich et al. 2018). Ihre Prävalenz weist starke geographische Unterschiede auf (World Health Organization 2013). In Deutschland sind circa 289 pro 100.000 Menschen betroffen (Petersen et al. 2014). Die Erstdiagnose wird durchschnittlich im Alter von 35 Jahren und damit 3,4 Jahre nach Krankheitsbeginn gestellt (Flachenecker et al. 2008). Bei Frauen bricht die Krankheit durchschnittlich einige Jahre früher aus (Ramagopalan und Sadovnick 2011).

Es wird zwischen verschiedenen Verlaufsformen unterschieden. Bei 85% der MS-Patienten beginnt die Krankheit mit einer Phase rezidivierender Schübe (*relapsing-remitting MS*; RRMS). Ein Schub ist

Einleitung

definiert als das Neuauftreten neurologischer Ausfälle oder die deutliche Verschlechterung bereits bestehender Symptome, die für mindestens 24 Stunden persistieren und nicht durch einen systemischen Infekt, eine erhöhte Körperkerntemperatur oder andere von der MS unabhängige Faktoren erklärbar sind. Zwischen zwei Schüben liegt definitionsgemäß ein Intervall von mindestens 30 Tagen. Die durch diese Schübe verursachten Beeinträchtigungen können komplett oder nur zu Teilen remittieren.

Die RRMS wird weltweit durchschnittlich mit 29 Jahren diagnostiziert und betrifft Frauen mindestens doppelt so häufig wie Männer (Palmer 2013). Mit Fortschreiten der Erkrankung kann die RRMS in eine chronisch-progrediente Verlaufsform übergehen (Goodin 2014).

Dieser Zeitpunkt wird unter anderem durch die Anzahl und den Schweregrad der Rezidive beeinflusst (Confavreux et al. 2000). Bei 15% der Patienten beginnt die Krankheit mit einer kontinuierlichen Zunahme der neurologischen

Einleitung

Symptome. Bei dieser selteneren Form spricht man von primär progredienter MS (PPMS). Sie wird im Durchschnitt mit 40 Jahren später diagnostiziert und betrifft im Gegensatz zur RRMS Frauen und Männer zu gleichen Teilen (Miller und Leary 2007).

Die Klinik ist vielfältig und unterscheidet sich individuell je nach Lokalisation der Entzündung. Zu Beginn besteht klassischerweise eine einseitige Neuritis nervi optici (Retrobulbärneuritis) mit Schleiersehen, Rotentsättigung und Bulbusbewegungsschmerz. Störungen der Okulomotorik werden in Form von Doppelbildern oder eines Nystagmus deutlich. Weitere häufige Primärsymptome sind lokalisierte Sensibilitätsstörungen (Thompson et al. 2018).

Mit Fortschreiten der Erkrankung können Dysfunktionen im Großhirn, Kleinhirn, Hirnstamm und Rückenmark auftreten (Compston und Coles 2008). Sie werden unter anderem durch Koordinationsstörungen apparent. Patienten klagen über Ungeschicklichkeit, Gang- und Standunsicherheit oder Schwäche der Extremitäten.

Einleitung

Gleichzeitiges Vorliegen von Nystagmus, Intentionstremor und skandierender Sprache wird als Charcot-Trias zusammengefasst und kann Folge zerebellärer Läsionen sein.

Die Folgen der Demyelinisierung werden auch durch das MS-typische Lhermitte-Zeichen, ein bei Flexion des Kopfes auftretendes schmerzhaftes und elektrisierendes Gefühl, das vom Nacken in die Extremitäten und den Rumpf austrahlt, deutlich. Ebenso typisch ist das Uhthoff-Phänomen, das die reversible Verschlechterung der Symptome bei ansteigender Körperkerntemperatur beschreibt (Compston und Coles 2008).

Unter den nicht traumatischen ZNS-Krankheiten führt die MS am häufigsten zu einer dauerhaften Behinderung (Ramagopalan und Sadovnick 2011). Die Quantifizierung des Grades der Behinderung erfolgt anhand der von John F. Kurtzke entwickelten *Expanded Disability Status Scale* (EDSS). Das Voranschreiten der Krankheit führt dazu, dass Erkrankte im Durchschnitt mit 52 Jahren Hilfsmittel

Einleitung

zum Gehen benötigen. Das entspricht auf der EDSS Stufe 6 von 10 (Leray et al. 2016). Die mittlere Lebenserwartung liegt unter Therapie bei 76 Jahren, was einer Verkürzung der durchschnittlichen Lebenszeit um 7 Jahre gleichkommt. Der häufigste Grund für das Versterben ist die MS selbst, allerdings sterben Erkrankte häufiger an Infektionskrankheiten, kardiovaskulären Ereignissen und Suizid (Marrie et al. 2015; Manouchehrinia et al. 2016)

1.1.2 Ätiologie

Der Ausbruch der Krankheit wird multifaktoriell beeinflusst. Dabei spielen Umwelteinflüsse eine wichtige Rolle. Die Prävalenz der MS steigt mit der Entfernung zum Äquator (Simpson et al. 2011). Mit größerem Abstand zum Äquator sinkt auch die Intensität der UVB-Strahlung im Sonnenlicht (Handel et al. 2010). Die Abnahme der UVB-Intensität steht wiederum im Zusammenhang mit geringeren Vitamin-D₃-Spiegeln im Blut (Ascherio und Munger 2010). Da Vitamin-D₃ immunmodulierende und antiinflammatorische Effekte besitzt (Smolders et al.

Einleitung

2011), liegt es nahe, dass eine verringerte Vitamin-D₃-Konzentration das Risiko einer MS-Erkrankung erhöht (Ascherio und Munger 2010; Mokry et al. 2015). In einer amerikanischen Studie konnte gezeigt werden, dass bei manifester MS erhöhte Vitamin-D-Level mit einer erniedrigten Aktivität der Krankheit einhergehen (Mowry et al. 2012).

Als weiterer Risikofaktor wurde Zigaretten-Rauchen identifiziert (Belbasis et al. 2015). Das Erkrankungsrisiko steht dabei in direktem Zusammenhang mit Rauchdauer und -intensität (Ascherio et al. 2012).

Ein infektiöser Risikofaktor ist die Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektion. MS-Erkrankte sind praktisch immer mit EBV infiziert (Levin et al. 2010). Umgekehrt ist das Risiko einer MS-Erkrankung bei EBV-negativen Personen extrem gering. Für diese Beobachtung existieren verschiedene Erklärungsansätze. Es ist möglich, dass während der Infektion durch eine Kreuzreaktion autoreaktive T- und B-Lymphozyten entstehen. Weiterhin denkbar ist, dass verschiedene EBV-vermittelte Mimikry-Prozesse die Apoptose

Einleitung

dieser autoreaktiven B-Zellen verhindern und damit zu einer uneingeschränkten Autoantikörper-Produktion führen (Ascherio et al. 2012; Thorley-Lawson 2001). In ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zellen erkennen die immortalisierten B-Zellen unablässig körpereigene Antigene und halten die darauf folgende Immunantwort aufrecht (Ascherio et al. 2012).

Wird die EBV-Infektion in Form einer infektiösen Mononukleose sichtbar, steigert dies das Risiko an MS zu erkranken um das Zwei- bis Dreifache (Thacker et al. 2006). Eine starke Immunaktivierung während der ersten EBV-Infektion könnte auch im Sinne einer Kreuzreaktion die Aktivierung von autoreaktiven und polyspezifischen T- und B-Zellen begünstigen. Diese Hypothese unterstützend besitzen MS-Patienten auch lange nach einer akuten EBV-Infektion eine vermehrte Anzahl an *Epstein-Barr nuclear antigen 1* (EBNA1)-spezifischen T-Zellen (Almohmeed et al. 2013). EBNA1 ist das EBV-Antigen, das bei Nicht-MS-Erkrankten meist durch CD4⁺-T-Zellen erkannt wird und zur spezifischen

Einleitung

Zellantwort führt (Münz et al. 2000). Bei MS-Patienten wird die Zellantwort der EBNA1-spezifischen T-Zellen aber auch durch Proteine der Myelinscheide ausgelöst (Lünemann et al. 2006; Lünemann et al. 2008).

Auf eine genetische Risikokomponente weist die familiäre Häufung der Krankheit hin. Mit engerem Verwandtschaftsgrad zu Patienten mit MS steigt das Lebensrisiko, ebenfalls an MS zu erkranken. In so einem Fall beträgt das Lebenszeitrisiko bei monozygoten Zwillingen 30%, bei heterozygoten Geschwistern liegt es nur noch bei 5% (Compston und Coles 2008). Entsprechend konnten über 200 Risikogene identifiziert werden. Am bedeutsamsten ist dabei die Variante HLA-DR15, Haplotyp DRB1*1501-DQB1*0602 (Reich et al. 2018).

Gestützt wird die These der autoimmunen Genese zum einen durch die Beobachtung, dass MS-Patienten ein erhöhtes Risiko besitzen an autoimmunvermittelten Schilddrüsenerkrankungen oder Psoriasis zu leiden (Ruth et al. 2015). Zum anderen wird sowohl bei Patienten mit Diabetes

Einleitung

mellitus Typ I als auch bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ein erhöhtes Auftreten von MS verzeichnet (Loftus 2005; Nielsen et al. 2006).

1.1.3 Pathogenese

Die zentralen Mechanismen der Pathogenese der MS sind ein Zusammenspiel aus Inflammation, De- und Remyelinisierung und Neurodegeneration im ZNS. Voraussetzung dafür ist die Migration von Entzündungszellen über die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS (Dendrou et al. 2015). Die dortige erneute Aktivierung von T-Zellen ruft einen Entzündungsprozess hervor, der im Untergang von Oligodendrozyten, Neuronen und konsekutiver Astroglieose mündet.

Histologisch zeigt sich dies entsprechend in bereits makroskopisch erkennbaren grau-braunen Plaques von derber Konsistenz in grauer und weißer Substanz. Diese führten zur Namensgebung der Multiplen Sklerose oder Encephalomyelitis disseminata (Lassmann 2013).

Einleitung

Auch während eines akuten Schubes zeigen sich charakteristische histopathologische Veränderungen. Der gesamte Entzündungsprozess geht mit einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und Zytokinen einher (Frischer et al. 2009). Außerdem werden verstärkt Proteinkomplexe der Klasse MHC-I auf Entzündungszellen, Gliazellen und Neuronen, sowie MHC-II auf Mikroglia und Makrophagen exprimiert. Beide Veränderungen der Expression initiieren zunächst eine T-Zell-vermittelte Inflammation und tragen im Verlauf zu ihrer Aufrechterhaltung bei (Lassmann 2013). Initial befinden sich in der Läsion perivaskulär zahlreiche T-Lymphozyten sowie einzelne B-Zellen und Plasmazellen. Am Rand der Entzündung sind vorwiegend Makrophagen präsent (Frohman et al. 2006; Stadelmann et al. 2011; Lassmann 2013).

Auch makroskopisch intakt scheinende Bereiche im Gehirn, sie werden *normal appearing white matter* (NAWM) und *normal appearing grey matter* (NAGM) genannt, können betroffen sein. Hier zeigen sich

Einleitung

neben diffusen Entzündungen, Mikroglia-Aktivierung und Narbengewebe auch ein diffuser axonaler Schaden sowie eine voranschreitende Volumenabnahme (Kutzelnigg und Lassmann 2014). Die MS führt im Verlauf zu Hirnatrophie, die durch Vergrößerung des inneren und äußeren Liquorraums deutlich wird. Neue Daten weisen auf einen oxidativ vermittelten Schaden an Mitochondrien hin, der durch aktivierte Makrophagen und Mikroglia verursacht wird. Dieser scheint zusätzlich in allen Stadien für Gewebsschädigungen verantwortlich zu sein (Lassmann 2013).

Mit der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) steht ein weit verbreitetes und anerkanntes Tiermodell der Multiplen Sklerose zur Verfügung, das verschiedene Aspekte der humanen Erkrankung abbilden kann. Durch eine Vakzinierung mit im ZNS exprimierten Myelin-Proteinen oder deren Peptidbestandteilen (aktive EAE), durch eine Übertragung autoreaktiver T-Lymphozyten (adoptive Transfer-EAE) oder in genetisch manipulierten Tieren (spontane EAE) wird

Einleitung

ein Autoimmunprozess ausgelöst, der mit pathologischen Grundlagen der MS Ähnlichkeiten aufweist. Es kommt wie bei der MS zur Entzündung und Demyelinisierung mit Neurodegeneration (Mix et al. 2010).

Eine vereinfachte Übersicht über das Zusammenspiel der verschiedenen pathophysiologischen Vorgänge gibt die Abbildung 1.

Einleitung

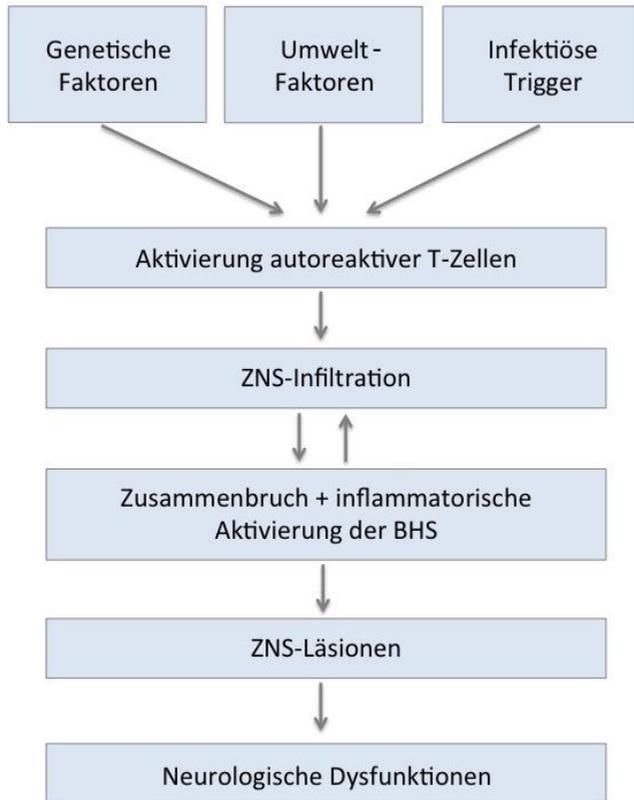


Abbildung 1: Übersicht des Zusammenspiels verschiedener pathophysiologischer Vorgänge, die an der Entstehung der MS beteiligt sind. ZNS, zentrales Nervensystem; BHS, Blut-Hirn-Schranke.

Nach: Kremetsov et al. 2013

1.2 Blut-Hirn-Schranke

1.2.1 Aufbau und Funktion der Blut-Hirn-Schranke

Die das ZNS versorgenden Blutgefäße besitzen bestimmte Eigenschaften, die unter dem Begriff Blut-Hirn-Schranke (BHS) zusammengefasst werden. Die BHS bildet eine physiologische Barriere zwischen dem intra- und extravasalen Raum. Über sie wird die Zusammensetzung des im ZNS vorherrschenden Milieus aufrecht erhalten und reguliert (Daneman und Prat 2015; Zlokovic 2008). Diese für die Funktion essentielle Regulation ist ein dynamischer Prozess und findet auf verschiedenen Ebenen statt.

Die Aufrechterhaltung bestimmter Elektrolytkonzentrationen im ZNS wird durch die Regulation des Austausches bestimmter Ionen erreicht. Durch die BHS wird das ZNS außerdem vor in der Blutbahn befindlichen neurotoxischen Substanzen geschützt. Dies können sowohl endogene Metabolite, wie z.B. der Neurotransmitter

Einleitung

Glutamat, als auch Xenobiotika sein (Abbott et al. 2010). Außerdem sichert sie neben der Zufuhr nicht lipophiler Nährstoffe auch den Abtransport von Stoffwechselprodukten (Abbott et al. 2010; Ballabh et al. 2004; Zlokovic 2008).

1.2.1.1 Anatomie der Blut-Hirn-Schranke

Am Aufbau der BHS sind Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten beteiligt, deren Zusammenwirken im Folgenden detaillierter beschrieben wird.

Das Lumen zerebraler Kapillaren wird, analog dem Aufbau anderer Gefäße, von **Endothelzellen** ausgekleidet. Diese unterscheiden sich in einigen Punkten von Endothelzellen sonstiger Gewebe: Die extrem dünnen Endothelzellen der BHS sind nicht fenestriert, sie sind über *tight junctions* verbunden und betreiben wenig Transzytose (Daneman und Prat 2015). Um den erhöhten Energiebedarf der verschiedenen aktiven Transportprozesse decken zu können, besitzen sie eine besonders hohe Anzahl von Mitochondrien (Zlokovic 2008). Außerdem exprimieren sie vergleichsweise wenige *leukocyte*

Einleitung

adhesion molecules (LAMs) auf der Oberfläche, was mitursächlich für die geringe Anzahl von Immunzellen im ZNS sein könnte (Daneman und Prat 2015).

Auf der abluminalen Seite der Kapillaren sitzen **Perizyten**. Sie sind in die vaskuläre Basalmembran eingegliedert und besitzen lange Fortsätze, die mehrere Endothelzellen umfassen können. Über diese Fortsätze sind sie an einzelnen Punkten fest mit den Endothelzellen verankert. Diese Verbindungen werden durch N-Cadherine gebildet und *peg and socket*-Verbindungen genannt. Andere Verbindungen zum Endothel werden durch *gap junctions* und *tight junctions* gebildet. Durch Veränderung von kontraktilen Proteinen kann über die Fortsätze der Durchmesser der Kapillaren und somit lokal die Flussgeschwindigkeit reguliert werden (Díaz-Flores et al. 2009).

Die an der BHS beteiligten Perizyten besitzen die Fähigkeit zur Phagozytose und Antigenpräsentation. Damit in Einklang ist der Nachweis verschiedener Makrophagen-Marker auf Perizyten. Da diese

Einleitung

Abwehrmechanismen Stoffe betreffen, die das Endothel bereits passiert haben, werden sie in der Literatur auch als „die letzte Abwehrfront“ betitelt (Rucker et al. 2000; Thomas 1999).

Die Kapillargefäße sind annähernd vollständig mit Fortsätzen von **Astrozyten** bedeckt. Astrozyten sind Gliazellen, die auch Neurone ummanteln. Sie können Signale weiterleiten, die den Blutfluss über glatte Muskelzellen an die neuronale Aktivität anpassen (Daneman und Prat 2015). Gleichzeitig sind sie in der Lage verschiedene Botenstoffe zu sezernieren, die innerhalb von Sekunden bis Minuten die Durchlässigkeit des Endothels verändern können (Abbott et al. 2006). Wie Transplantationsversuche zeigen, können sie Barrierecharakteristika zerebralen Endothels in Kapillaren, die sich außerhalb des ZNS befinden, induzieren (Daneman und Prat 2015).

Die Kapillaren der BHS sind von zwei Basalmembranen (BM), der inneren, auch vaskulären Basalmembran und der äußeren, auch parenchymalen BM, umgeben. Die vaskuläre BM

Einleitung

wird durch extrazelluläre Matrix, synthetisiert von Endothelzellen und Perizyten, gebildet. Die parenchymale BM wird durch Astrozyten synthetisiert. Beide enthalten Proteine, wie Typ IV Kollagen, Laminin, Nidogen, und Heparin-Sulfat-Proteoglykane. Sie stellen eine weitere Barriere für Moleküle und Zellen, die sich in der Blutbahn befinden, dar (Abbott und Friedman 2012; Daneman und Prat 2015).

1.2.1.2 Zell-Zell-Kontakte von Endothelzellen

Benachbarte Endothelzellen sind apikal über Zonulae occludentes (*tight junctions (TJ)*) und basal über Zonulae adhaerentes (*adherens junctions (AJ)*) eng miteinander verbunden. *Tight junctions* bilden eine dichte Barriere für Ionen und Moleküle. Sie sind verantwortlich für die geringe parazelluläre Permeabilität und den hohen elektrischen Widerstand der Endothelzellen (Zlokovic 2008). Da sie auch die Bewegung von Struktur- und Transportproteinen innerhalb der Membran verhindern, entsteht eine polarisierte Zelle mit

Einleitung

luminalem und apikalem Membrankompartiment (Daneman und Prat 2015). *Tight junctions* bestehen aus einem Komplex verschiedener Transmembranproteine, insbesondere aus Claudin, Occludin und *junctional adhesion molecules* (JAMs) (Abbott et al. 2010).

Von Claudin sind über 25 verschiedene Isoformen bekannt. Sie durchspannen die Membran viermal und gehen sowohl homo- als auch heterophile Wechselwirkungen ein. Die verschiedenen Isoformen sind für die spezifischen parazellulären Barrieren in verschiedenen Organen bedeutsam. In *tight junctions* des zerebralen Endothels sind Claudin-3, -5, und -12 vorhanden. Die Expression von Claudin-1 ist umstritten (Daneman und Prat 2015; Zlokovic 2008). Besonders Claudin-5 kommt ein hoher Stellenwert zu, da es für die Dichtigkeit der BHS entscheidend ist (Haseloff et al. 2015).

Occludin konnte als erstes Protein der *tight junctions* identifiziert werden (Dörfel und Huber 2012). Inzwischen sind 7 Isoformen bekannt. Analog zu

Einleitung

Claudin besitzt auch Occludin 4 Transmembrandomänen. Die beiden extrazellulären Schleifen interagieren homophil miteinander (Haseloff et al. 2015; Zlokovic 2008). Da experimentell *tight junctions* auch ohne Occludin gebildet werden konnten, wird Occludin weniger eine strukturelle als eine regulatorische Funktion zugeschrieben (Saitou et al. 2000). Änderungen der Struktur und Funktion von *tight junctions* können beispielsweise zytokininduziert über den Phosphorylierungsstatus von Occludin beeinflusst werden. (Ni et al. 2017; Krug et al. 2014). Eine Möglichkeit die Anzahl der *tight junctions* zu verringern ist der enzymatische Abbau von Occludin durch Matrix-Metallo-Proteasen (MMP) (Zlokovic 2008).

JAMs werden der Immunglobulin-Superfamilie zugeordnet. Im Gegensatz zu Claudin und Occludin besitzen sie nur eine transmembranäre Domäne, bei der sich der N-Terminus im extrazellulären Raum befindet (Ballabh et al. 2004). JAM-Proteine lassen sich in verschiedene Unterformen unterteilen. Bei der

Einleitung

Bildung von *tight junctions* sind hauptsächlich Proteine der JAM-A-Familie beteiligt. Auch durch JAM-A kann die parazelluläre Permeabilität reguliert werden (Aurrand-Lions 2001). Über homophile Bindungen stehen JAMs in Verbindung mit Endothelzellen. Heterophile Bindungen dagegen erleichtern unter Inflammation die Adhäsion von Leukozyten. Dazu wandert JAM-A von den Zell-Zell-Kontakten zur apikalen Membran der Endothelzelle (Chavakis et al. 2003).

Die Transmembranproteine der *tight junctions* sind mit dem Zytoskelett der Endothelzellen über zytoplasmatische Adaptermoleküle verbunden. Dazu gehören unter anderem die Zonula occludens Proteine (ZO-1; ZO-2; ZO-3), Cingulin, 7H6, MAGIs und MPP (Daneman und Prat 2015; Ballabh et al. 2004). Über diese Verbindungen wird die funktionale Integrität der Zelle aufrechterhalten.

Die Zonula occludens Proteine werden der Gruppe der *membrane-associated guanylate kinase-like proteins* (MAGUKs) zugeordnet. Claudin, Occludin

Einleitung

und JAM-A binden jeweils an unterschiedlichen Bindungsdomänen der ZO-Proteine (Ballabh et al. 2004). Gleichzeitig interagieren die ZO-Proteine auch untereinander. ZO-1 kann jeweils mit ZO-2 und ZO-3 unabhängige Komplexe bilden (Wittchen et al. 1999). Werden die ZO-Proteine nicht exprimiert, resultiert daraus der komplette Verlust der *tight junctions* und damit der endothelialen Barrierefunktion (Umeda et al. 2006).

Adherens junctions werden von *vascular endothelial cadherin* (VE-Cadherin) und *platelet endothelial cell adhesion molecules 1* (PECAM-1) gebildet (Daneman und Prat 2015). Cadherine sind kalziumabhängige Glykoproteine. Durch homophile Verbindungen ihrer extrazellulären Teile verbinden sie die *adherens junctions* benachbarter Zellen. Der zytoplasmatische Teil bindet über β - oder γ -Catenin an α -Catenin, welches mit dem Aktinzytoskelett verbunden ist (Ballabh et al. 2004). PECAM-1, auch CD31 genannt, besteht aus sechs extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen. Über homophile Bindungen zwischen PECAM-1-Molekülen wird die

Einleitung

interzelluläre Stabilität gefördert. Es ist auch an der transzellulären Leukozytendiapedese und der Migration von Leukozyten über Zell-Zell-Verbindungen beteiligt. Bei der Diapedese von Monozyten wird über eine verstärkte Expression von PECAM-1 und eine verminderte Expression von VE-Cadherin im Endothel die Migration nachfolgender Monozyten erleichtert (Privratsky und Newman 2014). Außerdem fungiert PECAM-1 in einem Komplex mit VE-Cadherin als Mechanosensor und reagiert auf verminderten Blutfluss mit Initiierung inflammatorischer Kaskaden (Tzima et al. 2005).

1.2.1.3 Transportvorgänge an der Blut-Hirn-Schranke

An der intakten BHS finden verschiedene Transportvorgänge statt. Durch den oben beschriebenen molekularen Aufbau der BHS ist der parazelluläre Transport stark eingeschränkt. Die Transportvorgänge können in fünf Gruppen unterteilt werden:

Einleitung

1) freie Diffusion; 2) *solute carriers* (SLC-Transporter); 3) ABC-Transporter; 4) Transzytose-vermittelter Transport; 5) Migration von Immunzellen. Freie Diffusion kann sowohl trans-, als auch parazellular entlang eines Konzentrationsgradienten stattfinden (Egleton und Davis 2005). Je geringer die molare Masse und je lipophiler der Stoff, desto leichter kann er durch das Gewebe diffundieren (Abbott et al. 2010). Der Austausch der im Blut gelösten Gase wie Sauerstoff und Kohlendioxid findet durch Diffusion statt und ist abhängig vom bestehenden Blutfluss.

Auch der Transport mit Hilfe von SLC-Transportern folgt einem Konzentrationsgradienten und benötigt keine Energie. Durch SLC-Transporter wird die Versorgung des Gehirns mit polaren Nährstoffen wie Glukose und Aminosäuren gewährleistet, die nicht durch die Membran diffundieren können. Glukose kann über den Uniporter GLUT-1, aber auch im Symport über den *sodium-dependent glucose transporter-1* (SGLT-1) transportiert werden (Abbott et al. 2010).

Einleitung

Die Familie der ABC-Transporter besitzt eine ATP-bindende Kasette und transportiert Stoffe aktiv, auch gegen einen Konzentrationsgradienten, über die Zellmembran. Hauptvertreter in der BHS sind P-Glykoproteine (Pgp), *multidrug resistance-associated* Proteine (MRP) und *breast cancer resistance* Proteine (BRCA). Über ABC-Transporter können lipophile Stoffe aktiv aus dem ZNS heraustransportiert werden (Efflux). Dies erklärt die niedrige Konzentration stark lipophiler Stoffe, von denen man eine erhöhte Konzentration im ZNS erwarten würde (Abbott et al. 2010; Zlokovic 2008; Miller 2015).

Makromoleküle, wie Proteine und Peptide, passieren die BHS mit Hilfe von Transzytose. Dabei wird zwischen rezeptorvermittelter (RMT) und adsorptionsvermittelter Transzytose (AMT) unterschieden. Bei der RMT bewirkt die Bindung von Makromolekülen an spezifische Oberflächenrezeptoren eine Endozytose. Anschließend durchqueren Ligand und Rezeptor in einem Vesikel die Zelle. Bei der AMT entsteht die

Einleitung

initiale Bindung durch Wechselwirkungen von Kationen und negativ geladenen Glykoproteinen an der Zelloberfläche (Abbott et al. 2010; Zlokovic 2008; Winkler et al. 2011; Pardridge 2007). Stoffe, die die BHS per Transzytose überwinden, sind beispielsweise Leptin, Insulin und Transferrin (Duffy und Pardridge 1987; Pardridge 1987).

Immunzellen können trans- und parazellulär in das ZNS migrieren. Unter inflammatorischen Bedingungen nimmt die Kapazität zerebralen Endothels zur Migration von Leukozyten drastisch zu (Abbott et al. 2010).

1.2.2 Blut-Hirn-Schranke bei Inflammation des zentralen Nervensystems

Voraussetzung für inflammatorische Prozesse im ZNS ist die Migration von Immunzellen über die BHS. Dies kann über drei Wege geschehen. Der erste folgt der Bildung des Liquors. Im Blutstrom befindliche Leukozyten wandern durch das fenestrierte Endothel in das Interstitium des Plexus choroideus. Von dort gelangen sie über Epithelzellen in den Liquor. Als zweite Möglichkeit gelangen Leukozyten über

Einleitung

postkapilläre Venolen zum einen in den Subarachnoidalraum, zum anderen in einen perivaskulären Spaltraum, den Virchow-Robin-Raum, der ebenfalls mit Liquor gefüllt ist und in direkter Verbindung mit dem Subarachnoidalraum steht. Die letzte Möglichkeit ist der direkte Weg der Leukozyten aus der Blutbahn über die BHS in das Parenchym (Ransohoff et al. 2003). Dieser mehrstufige Prozess ist vereinfacht in Abbildung 2 dargestellt.

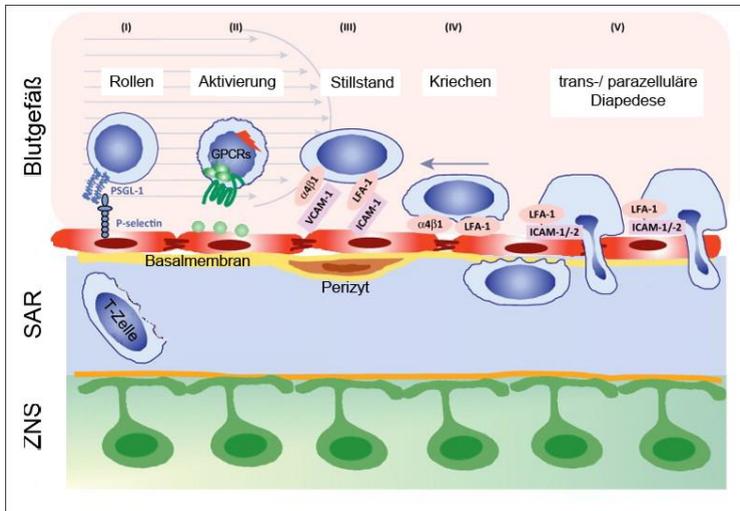


Abbildung 2: An der T-Zell Migration über die BHS beteiligte molekulare Mechanismen. Zeitliche Abfolge von links nach rechts: Die verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen auf den

Einleitung

Endothelzellen der Blutgefäße (rote Zellen) führt zum ersten vorübergehenden Kontakt zwischen Endothel und T-Zelle (blaue Zelle) und dem anschließenden **Rollen** über das Endothel. Es entsteht eine Verbindung zwischen P-Selektin im Endothel und dem P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) auf der T-Zelle. Chemokine (grüne Punkte) binden über sogenannte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) an die Leukozyten. Die aus dieser **Aktivierung** resultierende stärkere Bindung an die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, ICAM-2 und VCAM-1 ermöglicht den kompletten **Stillstand** der Leukozyten. VCAM-1 bildet eine Verbindung mit α 4-Integrinen. Anschließend **kriechen** die Immunzellen, reguliert durch die Interaktion zwischen *leukocyte function-associated antigen-1* (LFA-1) und die endothelialen Liganden ICAM-1 und -2, über das Endothel gegen den Blutstrom, bis sich eine **Diapedesemöglichkeit** in den Subarachnoidalraum (SAR) und folgend in das ZNS ergibt.

Nach: Engelhardt und Ransohoff 2012

Die Infiltration wird unter anderem durch die Flusssdynamik des Blutes und molekulare Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothel beeinflusst.

Der Kontakt von Leukozyten mit der Gefäßwand wird durch das Phänomen der Margination erleichtert. Es beschreibt den Umstand, dass die mit dem Blutstrom transportierten Leukozyten dazu tendieren in Nähe der Wand des Gefäßes zu schwimmen. Im Zentrum ist die Flussgeschwindigkeit am höchsten. Dort treiben überwiegend rote Blutkörperchen, die überdies die Leukozyten in die Peripherie drängen.

Einleitung

Dieses Phänomen kommt verstärkt in den kleinen postkapillären Venolen zum Tragen, in denen der Blutfluss ohnehin relativ langsam ist (Schmid-Schonbein et al. 1980; Engelhardt und Ransohoff 2012). Außerdem wird der Vorgang maßgeblich durch die Anwesenheit von Chemokinen beeinflusst. Als Chemokine werden bestimmte Zytokine bezeichnet, die die Fortbewegungsrichtung anderer Zellen (Chemotaxis) beeinflussen (Wu und Alvarez 2011).

Der erste vorübergehende Kontakt zwischen Leukozyt und Endothel wird mit Hilfe einer Bindung zwischen Adhäsionsproteinen der Selektin-Familie und dem dazugehörigen glykosylierten Liganden hergestellt. Es entsteht eine lockere Verbindung zwischen L-, E-, oder P-Selektin im Endothel und dem P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) auf dem Leukozyt. Eine weitere Verbindung bilden α 4-Integrine und das zur Superfamilie der Immunglobuline gehörige *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) auf der Endothelzelle (Engelhardt und Ransohoff 2012). Integrine befinden

Einleitung

sich auf der Lymphozytenoberfläche und bestehen jeweils aus einer α - und einer β -Untereinheit (Constantin 2008).

Mit nun reduzierter Geschwindigkeit rollt die Immunzelle entlang der Gefäßwand. Die auf der Endotheloberfläche präsentierten Chemokine binden über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) an die Leukozyten. Die daraus resultierende Signalkaskade erhöht die Affinität und Avidität der Integrine (Holman et al. 2011; Engelhardt und Ransohoff 2012). Erst diese Veränderungen und die daraus resultierende stärkere Bindung an die Interzellulären Adhäsions Moleküle-1 (ICAM-1) und ICAM-2 sowie VCAM-1 ermöglichen den kompletten Stillstand der Leukozyten. Gleichzeitig wird die Expression der Integrin-Liganden ICAM-1 und VCAM-1 am Endothel der BHS gesteigert. Anschließend kriechen die Immunzellen, meist gegen die Stromrichtung des Blutes, reguliert durch die Interaktion zwischen *leukocyte function-associated antigen-1* (LFA-1) und ICAM-1 und -2

Einleitung

über das Endothel, bis sich eine Diapedesemöglichkeit ergibt.

Die Migration kann über zwei verschiedene Wege erfolgen: trans- und parazellulär. Der transzelluläre Weg wird durch strukturelle Veränderungen des Endothels ermöglicht. Es bilden sich Andock-Strukturen, an denen die Immunzelle von endothelialen Ausläufern umschlossen wird (Carman 2009). Die parazelluläre Migration ist vorwiegend PECAM-1 und JAM-A vermittelt (Engelhardt und Ransohoff 2012).

1.2.3 Blut-Hirn-Schranke bei Multipler Sklerose

Die bei MS-Erkrankten vorliegende Inflammation im ZNS spiegelt sich in strukturellen und funktionellen Änderungen an der BHS wider. Eine inflammatorische Aktivierung der BHS resultiert in sich wechselseitig beeinflussenden Phänomenen:

1. Dem Herabsetzen der Barrierefunktion durch Modulation der Zell-Zell-Kontakte
2. Einer erhöhten Immunzellmigration durch Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen

An diesen Vorgängen sind Endothelzellen, Astrozyten und wahrscheinlich zusätzlich auch Perizyten beteiligt. Durch sie wird neben der Rekrutierung auch die Funktion und das Überleben der Leukozyten, die in das ZNS penetrieren, beeinflusst (Alvarez et al. 2011).

Die herabgesetzte Barrierefunktion geht mit einer Veränderung von TJ und AJ einher. Dies kann sowohl histologisch in autoptischen Gewebeproben in Form von perivaskulären Fibrinogen-

Einleitung

Extravasaten, als auch zu Lebzeiten kernspintomographisch durch vermehrte Anreicherung von gadoliniumhaltigem Kontrastmittel gesehen werden (Kirk et al. 2003; Alvarez et al. 2011; Lövblad et al. 2010). Passend dazu findet sich eine reduzierte Expression von Occludin und ZO-1. Da diese Veränderungen nicht nur in aktiven Plaques, sondern auch in der NAWM sichtbar sind, liegt es nahe, dass sie nicht nur Resultat der akuten Entzündung sind, sondern auch infolge pathologischer Prozesse entstehen, die bereits vor der Bildung von MS-Läsionen ablaufen (Alvarez et al. 2011).

Zu ähnlichen Erkenntnissen führten Untersuchungen im EAE-Modell mit Ratten, die bereits vor dem Zusammenbruch der BHS eine verstärkte Occludin-Dephosphorylierung nachwiesen (Morgan et al. 2007).

Die Veränderungen in inaktiven Plaques lassen entweder auf fehlerhafte Reparaturmechanismen oder auf weiterhin anhaltende pathologische

Einleitung

Prozesse schließen (McQuaid et al. 2002; Leech et al. 2007).

Die inflammatorische Aktivierung der BHS wird durch verschiedene Zytokine gesteuert. Generell lassen sich Zytokine in fünf verschiedene Gruppen einteilen: Tumornekrosefaktoren (TNF), Interferone (IFN), Chemokine, Interleukine (IL) und Kolonie-stimulierende Faktoren.

Einige dieser Mediatoren, wie CCL19 und CCL21, werden selbstständig vom aktivierten Endothel sezerniert (Holman et al. 2011).

Bei der MS werden verstärkt TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-17, IL-22 und CCL2 ausgeschüttet (Alvarez et al. 2011).

Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) ist vermehrt im Serum von MS-Patienten zu finden. Dabei korreliert die Menge mit der Krankheitsaktivität. Ebenso sind oft erhöhte Interferon- γ (IFN- γ)-Spiegel zu finden (Larochelle et al. 2011).

An der BHS bewirken TNF- α und IFN- γ eine Umverteilung der TJ- und AJ-Proteine. TNF- α -

Einleitung

vermittelt wird beispielsweise VE-Cadherin in den AJ herabreguliert. Gleichzeitig erleichtern beide Zytokine über eine vermehrte Expression von ICAM-1, VCAM-1, *activated leukocyte cell adhesion molecule* (ALCAM), E- und P-Selektin die Migration von Immunzellen in das ZNS und führen sowohl einzeln als auch synergistisch wiederum zu einer gesteigerten Expression bestimmter Chemokine (Larochelle et al. 2011; Cayrol et al. 2008). Viele dieser Effekte werden durch Aktivierung des inflammatorischen Transkriptionsfaktors *nuclear factor- κ B* (NF κ B) vermittelt.

IL-1 β verstärkt die Expression von MMP-9 und führt somit über den Abbau von ZO-1 und Claudin-5 zu einer Destabilisierung der BHS. IL-17 und -22 bewirken Ähnliches über das Herabregulieren von Occludin und ZO-1. CCL2 induziert den Abbau von TJ-Proteinen über Endozytose-vermittelte Vorgänge (Alvarez et al. 2011).

Des Weiteren können Zytokine den *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinase-Signalweg aktivieren. Durch verschiedene

Einleitung

Phosphorylierungsvorgänge wird letztendlich die MAP-Kinase phosphoryliert. Die daraus resultierende Aktivierung führt zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, die anschließend in den Kern verlagert werden. Die Auswirkungen der Transkriptionsfaktoren haben ein weites Spektrum. Folgen sind beispielsweise Apoptose, Zellproliferation und -differenzierung oder Entzündungsreaktionen.

Die MAP-Kinasen werden in drei Untergruppen eingeteilt:

- 1) *extracellular signal-regulated kinases* (ERK) mit den Isoformen ERK-1; ERK-2; und ERK-5
- 2) p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
- 3) c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK) (Kyriakis und Avruch 2012)

Die Migration der Leukozyten in das ZNS wird als frühes Phänomen bei MS gewertet, welches über weitere Vorgänge zu neuronalen Entzündungen und Plaquebildung führt. Außerdem zieht es eine erhöhte Permeabilität der BHS nach sich, die wiederum die Infiltration weiterer Leukozyten begünstigt

Einleitung

(Larochelle et al. 2011). Durch die gegenseitige Beeinflussung von erhöhter Permeabilität und verstärkter Ausschüttung von Adhäsionsmolekülen kommt es zu einem Circulus vitiosus, den es therapeutisch zu durchbrechen gilt.

1.2.4 Wirkmechanismen von Immuntherapeutika an der Blut-Hirn-Schranke

Die medikamentöse Therapie von Patienten mit MS unterscheidet sich je nach Verlaufsform. Weiterhin lässt sie sich in die Therapie des akuten Schubes und die immunmodulatorische Langzeittherapie einteilen.

Für die Therapie der RRMS stehen verschiedene Wirkstoffe zur Verfügung. Ziel der Behandlung sind die Reduktion der Schubrate und der Behinderungsprogression sowie eine Verminderung kernspintomographisch fassbarer Krankheitsaktivität. In der Endstrecke reduzieren alle Präparate direkt oder indirekt die Migration von Leukozyten in das ZNS. Häufig spielt beim

Einleitung

Wirkmechanismus die Interaktion der Leukozyten mit zerebralem Endothel eine Rolle, was die zentrale Bedeutung der BHS verdeutlicht.

Als Basistherapeutika sind seit Mitte der 90er Jahre verschiedene Formen von Interferon- β (IFN- β) zugelassen (Annibaldi et al. 2015). Besonders die Frühtherapie mit IFN- β -Präparaten ist effektiv (Deutsche Gesellschaft für Neurologie 2012). IFN- β -1b wirkt unter anderem über Beeinflussung von Adhäsionsmolekülen. Unter Therapie ist im Serum vermehrt gelöstes VCAM-1 nachweisbar, das an VLA-4 der Immunzellen bindet und so kompetitiv deren Bindung an zerebrale Endothelzellen hemmen kann. Als Korrelat finden sich dazu im MRT weniger Kontrastmittel aufnehmende Herde (Correale und Villa 2007). Ein weiterer Wirkmechanismus von IFN- β ist die verringerte IFN- γ -Produktion und die daraus resultierende verringerte Aktivierung von T-Lymphozyten (Cross und Naismith 2014). Bei manchen Patienten wird der Effekt der IFN- β -Therapie allerdings durch das Entstehen von

Einleitung

IFN- β -neutralisierenden Antikörpern limitiert (Wingerchuk und Carter 2014).

Natalizumab ist in Europa seit 2006 zur krankheitsmodifizierenden Monotherapie der hochaktiven RRMS bei Patienten zugelassen, die durch die Medikation eines Basistherapeutikums nicht genügend profitieren (Buttmann und Rieckmann 2008). Der humanisierte monoklonale Antikörper bindet selektiv an die α -4-Untereinheit des Zelladhäsionsmolekül VLA-4 auf Lympho- und Monozyten. So wird die Bindung zwischen VLA-4 und dem endothelialen Liganden VCAM-1 verhindert. Durch die fehlende Interaktion kommt es nicht zur Adhäsion und folglich auch nicht zur Migration der Leukozyten. Eine seltene schwere unerwünschte Nebenwirkung der Natalizumabtherapie ist die progressive multifokale Leukenzephalopathie (PML), die durch das John-Cunningham-Virus (JCV) verursacht wird (Wingerchuk und Carter 2014). Da keine effektive Behandlung der PML zur Verfügung steht, sollte individuell das Risiko des Patienten abhängig von

Einleitung

JCV-Serostatus, immunsuppressiver Vorbehandlung und Behandlungsdauer mit Natalizumab evaluiert werden (Bloomgren et al. 2012).

Mit Fingolimod steht ein orales Therapeutikum zur Verfügung, das in der EU für Patienten mit hochaktiver RRMS nach Behandlung mit IFN- β zugelassen ist. Es wirkt an verschiedenen Unterformen von Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren (S1PR), einer Klasse von GPCRs. Über eine funktionelle Antagonisierung des S1PR-1 wird die Wanderung der Lymphozyten aus peripheren lymphatischen Organen in das Blut und somit auch in das ZNS gehemmt. In EAE-Mausmodellen konnte mit Fingolimod eine mit *vascular endothelial growth factor* (VEGF) induzierte Störung der BHS abgeschwächt werden (Brinkmann et al. 2010; Wingerchuk und Carter 2014). Diese S1PR-1-vermittelte stabilisierende Wirkung von Fingolimod konnte inzwischen für zahlreiche weitere Endothelien gezeigt werden (Stone et al. 2015; Mousseau et al. 2012; Hasegawa et al. 2010).

1.2.5 Therapie mit Dimethylfumarat bei Multipler Sklerose

Seit Februar 2014 ist mit Dimethylfumarat (DMF) ein neues orales Basistherapeutikum für RRMS in Europa zugelassen. Es wird zweimal täglich eingenommen und nach Aufnahme zu Monomethylfumarat (MMF) hydrolisiert. Eliminiert wird es zum größten Teil respiratorisch. Die Behandlung mit Fumarsäureestern ist auf anderen Feldern erprobt. Sie werden seit Jahrzehnten erfolgreich in der Behandlung von Psoriasis mit dem Handelsnamen Fumaderm™, bestehend aus einer Mischung verschiedener Fumarsäureester mit Zink-, Calcium- und Magnesiumsalz eingesetzt (Wingerchuk und Carter 2014). Die Weichen für die Zulassung bei RRMS wurden durch Ergebnisse von zwei Phase-3-Studien gestellt. Die DEFINE- und CONFIRM-Studie testeten randomisiert, doppelblind und multizentrisch die orale DMF-Gabe gegen die Gabe eines Placebos bzw. gegen Glatirameracetat-Therapie. Unter DMF-Therapie reduzierte sich sowohl die Schubrate als auch die Progression der

Einleitung

Behinderung. Zudem wurden weniger Läsionen im MRT beschrieben (Gold et al. 2012; Fox et al. 2012). Diese Beobachtungen waren auch in verschiedenen Patienten-Subgruppen einheitlich (Gold et al. 2015). Günstig ist, dass für Fumaderm™ gute Daten zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen bei Psoriasis vorliegen (Deutsche Gesellschaft für Neurologie 2012). Diese therapeutische Sicherheit gilt es allerdings etwas zu relativieren, da sich das Patientengut von MS-Erkrankten und Psoriasis-Patienten unterscheidet.

1.2.6 Mögliche Effekte von Dimethylfumarat an der Blut-Hirn-Schranke

Die exakten Wirkmechanismen von DMF als MS-Therapeutikum sind nicht komplett verstanden. Bekannt ist, dass Fumarsäureester verschiedene anti-inflammatorische und anti-oxidative Effekte besitzen (Rubant et al. 2008).

Auch im Tiermodell für intrazerebrale Blutungen konnten anti-oxidative Effekte unter DMF-Therapie beobachtet werden. Durch DMF-Gabe wird der zytoprotektive Transkriptionsfaktor *nuclear factor-*

Einleitung

erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) aktiviert. Nrf2- und *antioxidant responsive element* (ARE)-vermittelt wird die Genexpression von Enzymen verstärkt, die den Zellen ermöglichen, sich vor oxidativem Stress zu schützen (Zhao et al. 2015a; Zhao et al. 2015b).

Die Einflüsse von DMF auf Immunzellen sind vielfältig. In aktivierten T-Lymphozyten kann DMF Apoptose induzieren, aus der eine Lymphopenie resultiert (Treumer et al. 2003). Nach Stimulation mit DMF ist die Bindung von Leukozyten an die Adhäsionsmoleküle E-Selektin, P-Selektin, und VCAM-1 abgeschwächt. Vor allem das P-Selektin-vermittelte Rollen der DMF-behandelten T-Zellen wird *in vivo* reduziert (Rubant et al. 2008). Ähnliche Ergebnisse im Sinne einer reduzierten Migrationsfähigkeit finden sich bei Inkubation von T-Zellen mit MMF. Allerdings wurde hier die Migration nur *in vitro* untersucht (Dehmel et al. 2014).

Direkte Einflüsse von DMF auf Endothelzellen konnten *in vitro* an *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) beobachtet werden. Dort hemmt DMF ebenso die Adhäsion von Leukozyten über eine

Einleitung

Herunterregulation der endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin. Ein möglicher Wirkmechanismus von DMF ist die Inhibition der nukleären Translokation des inflammatorischen Transkriptionsfaktors NF κ B und die daraus resultierende reduzierte Expression von Adhäsionsmolekülen, Matrix-Metallo-Proteasen und inflammatorischen Chemokinen. Allerdings wurde dieser Effekt nicht bei der Inkubation der Endothelzellen mit MMF erreicht (Wallbrecht et al. 2011a; Loewe et al. 2002). Der inflammatorische Transkriptionsfaktor spielt im humanen zerebralen Endothel neben seinem Einfluss auf die Expression von Adhäsionsmolekülen, Matrix-Metallo-Proteasen und inflammatorischen Chemokinen eine wichtige Rolle in der Regulation der Schrankenfunktion. Im EAE-Modell der Maus konnte unter Therapie mit DMF und dessen primärem Metaboliten MMF eine verringerte Infiltration von T-Lymphozyten und mononukleären Immunzellen in das Rückenmark gezeigt werden (Schilling et al. 2006).

1.2.7 Fragestellung

Obwohl Dimethylfumarat (BG-12, Tecfidera™) als orales Basistherapeutikum erfolgreich in der Therapie der schubförmigen Multiplen Sklerose eingesetzt wird, sind die pleiotropen Wirkmechanismen des Präparates unzureichend geklärt. Trotz der in den Phase-3-Studien gezeigten anti-inflammatorischen Effekte ist die Wirkung von Fumarsäureestern auf humane zerebrale Endothelzellen nur partiell und methodisch insuffizient untersucht. Die Mechanismen, die zu einer reduzierten Immunzellinfiltration in das ZNS im Tiermodell und wahrscheinlich auch bei MS-Patienten führen, sind nicht klar. Die oben beschriebenen Einflüsse auf Adhäsionsmoleküle wurden an HUVEC beobachtet. Da HUVEC sich auf molekularer und funktionaler Ebene von mikrovaskulären Endothelzellen der BHS unterscheiden (Kallmann 2002), wurden die folgenden Untersuchungen unter anderem an humanen zerebralen Endothelzellen (HCEC)

Einleitung

durchgeführt, um Effekte an einem Modell zu beurteilen, welches der BHS näherkommt.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den Wirkmechanismus von DMF an der BHS genauer zu verstehen. Dabei stellen sich folgende Fragen:

1. Welche Auswirkungen haben Fumarsäureester auf die Adhäsion von T-Zellen an humanen zerebralen Endothelzellen?
2. Beeinflussen Fumarsäureester die Expression von Adhäsionsmolekülen auf humanen zerebralen Endothelzellen unter inflammatorischen Bedingungen?

Einleitung

3. Modulieren Fumarsäureester die Aktivierung der proinflammatorischen Signalwege NF κ B und MAPK p38?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Accutase	PAA, Pasching, Österreich
Amphotericin B	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma- Aldrich, München, Deutschland
Durchflusszyto- metrieröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Material und Methoden

Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS)	Sigma- Aldrich
FCS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Fischgelatine	Sigma- Aldrich
Gentamicin	Gibco
Heparin	Sigma- Aldrich
Nährmedium M199	Lonza
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom
Penicillin	Gibco
Trypsin/EDTA	Sigma- Aldrich

Material und Methoden

Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Zellschaber	SDL Lifescience, München, Deutschland

2.1.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Bio-Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Brutschrank HeraCell	Heraeus GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Elektrophorese- Netzteil	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Feinwaage PB303	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Fuji Super RX Filme	FUJIFLM, Düsseldorf, Deutschland

Material und Methoden

Heizblock	Biosan, Riga, Lettland
Küvetten	Sarstedt
Mikroskop Wilovert S	Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland
Nitrozellulose Membran	Whatman, GE Healthcare, Buckinghamshire, England
pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
Rüttelplatte Vibrax VXR	IKA, Staufen, Deutschland
Schwenker Unimax 1010	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland
Sterilbank	Nuaire, Plymouth, USA
Vortexer L46	Gesellschaft für Laborbedarf, Würzburg, Deutschland
Westernblot- Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH
Zentrifuge BioFuge 15R	Heraeus

Zentrifuge MC6400	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge Multifuge 3SR+	Heraeus
Schwenker Unimax 1010	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland

2.1.3 Chemikalien und Lösungen

Name	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Aceton	J.T. Baker (Avantor Inc.), Venter Valley, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bicinchoninic acid (BCA)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH
Enhanced Chemiluminescence Substrate (ECL)	Perkin Elmer, Rodgau, Deutschland

Material und Methoden

H ₂ O ₂ 30%	Merck
HEPES	Sigma-Aldrich
Methanol	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Merck
NP-40	Calbiochem (Merck), Darmstadt, Deutschland
Ponceau-Konzentrat®	Sigma-Aldrich
Roti®-Block	Carl Roth GmbH
Rotiphorese Acrylamid Mix 30%	Carl Roth GmbH
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich

2.1.4 Zusammensetzung verwendeter Lösungen

Hepes-Puffer	
BSA	0.1%
Glucose	4,5%
HEPES	10 mM
In PBS ansetzen und pH auf 7,2 einstellen.	

Material und Methoden

Waschpuffer	
Tween 20	500 µL
In 1 l TBS lösen, vor Verwendung gut schütteln.	

Stripping-Puffer (50mL)	
Aqua dest.	25 mL
H ₂ O ₂ 30%	25 mL

Durchflusszytometrie Puffer	
BSA	0.1%
Natriumacid (NaN ₃)	0,1%
In PBS ansetzen.	

Material und Methoden

Einfriermedium	
DMSO	10%
FCS	90%

HCEC-Nährmedium	
Amphotericin B	1250 µg
ECGS	10 mg
FCS (inaktiviert)	50 mL
Gentamicin	250 mg
Heparin	500 mg
M199 Medium	500 mL
Penicillin	25000 U
Streptomycin	25000 µg

Material und Methoden

HCEC-Nährmedium	
Amphotericin B	1250 µg
ECGS	10 mg
FCS (inaktiviert)	50 mL
Gentamicin	250 mg
Heparin	500 mg
M199 Medium	500 mL
Penicillin	25000 U
Streptomycin	25000 µg

Westernblot-Trenngel 12% (40 mL)	
Aqua dest.	13,2 mL
Acrylamid Mix 30%	16 mL
1,5 M Tris (pH 8,8)	10 mL
10% APS	0,4 mL
10% SDS	0,4 mL
TEMED	16 µL

Material und Methoden

Westernblot-Sammelgel 5% (8mL)	
Aqua dest.	5,5 mL
Acrylamid mix 30%	1,3 mL
1 M Tris (pH 6,8)	1 mL
10% APS	80 μ L
10% SDS	80 μ L
TEMED	8 μ L

Ponceau-Lösung	
Ponceau-Konzentrat®	20 mL
Aqua dest.	180mL

6x Ladepuffer = „Laemmli Puffer“	
4x Tris HCL (pH 6,8)	1 mL
Bromphenolblau	1,2 mg
Glycerin	3 mL
SDS	1 g

Material und Methoden

Kurz vor der Anwendung 5% β -Mercaptoethanol dazugeben.

Lysepuffer (20mL)	
50 mM Tris-HCl (pH 7,4)	4 mL
150 mM NaCl	2 mL
1% NP-40	200 μ L
0,25% Desoxycholsäure	2 mL
Phosphatase Inhibitor	Calbiochem
Boehringer Complete Protease Inhibitor mix	2 Tabletten
Aqua dest.	8,2 mL
Kurz vor der Anwendung 5% β -Mercaptoethanol dazugeben.	

Trennpuffer	
SDS	1 g
Tris	45 g
In 500 mL Aqua dest. lösen und pH auf 8,8 einstellen.	

Material und Methoden

Sammelpuffer	
SDS	1 g
Tris	15 g
In 500 mL Aqua dest. lösen und pH auf 6,8 einstellen.	

Hypotonischer Puffer (20mL)	
10 mM HEPES (pH 7,9)	5 mL
10 mM KCl	200 μ L
1 mM MgCl ₂	20 μ L
0,1 mM EDTA	2 mL
0,1 mM EGTA	2 mL
0,05% NP-40	10 μ L
Boehringer Complete Protease Inhibitor mix	2 Tabletten
Aqua dest.	10,77 mL
Kurz vor der Anwendung 5% β -Mercaptoethanol dazugeben.	

Material und Methoden

Hypertonischer Puffer (20mL)	
20 mM HEPES (pH 7,9)	10 mL
25% Glycerol	5 mL
0,42 M NaCl	4,2 mL
1mM MgCl	20 μ L
0,2 mM EDTA	400 μ L
0,2 mM EGTA	400 μ L
Boehringer Complete Protease Inhibitor mix	2 Tabletten
Kurz vor der Anwendung 5% β -Mercaptoethanol dazugeben.	

2.1.5 Stimulantien

Name	Hersteller
IL- β	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
IFN- γ	Richter-Helm Biologics, Hamburg, Deutschland
TNF- α	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland

2.1.6 Antikörper

Name	Hersteller
NF κ B/p65 (A) Rabbit poly-clonal	Santa Cruz Biotechnology Katalognummer: sc-372
NF κ B/p65 (A) Goat poly-clonal	Santa Cruz Biotechnology Katalognummer: sc-372(G)
p38 α/β mouse mono-clonal IgG	Santa Cruz Biotechnology Katalognummer: sc-7972
ERK-1 Rabbit poly-clonal IgG	Santa Cruz Biotechnology Katalognummer: sc-94
p-ERK mouse mono-clonal IgG 2a	Santa Cruz Biotechnology Katalognummer: sc-7383

Material und Methoden

JNK-1 Rabbit poly-clonal IgG	Santa Cruz Biotechnology Katalognummer: sc-474
p-JNK mouse mono-clonal IgG 1	Santa Cruz Biotechnology Katalognummer: sc-6254
Peroxidase-conjugated Rabbit Anti-Goat IgG	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, England Katalognummer: 305-035-003
Peroxidase-conjugated Goat Anti-Mouse IgG	Jackson ImmunoResearch Katalognummer: 115-035-003
Peroxidase-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch Katalognummer: 111-035-144

2.1.7 Zellen

Name	Hersteller
HCEC 404	Cell Systems, Kirkland, USA
Jurkat	ATCC, Manassas, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Um Endothelzellen auszusäen, wurden die in flüssigem Stickstoff gelagerten Kryoröhrchen kurz im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Anschließend wurde die flüssige Suspension aus Zellen und Einfriermedium in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 mL Nährmedium pipettiert. Dieses wurde dann bei 4°C und 150 G für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet mit neuem Nährmedium versehen und mit 5 mL pro Fläschchen ausgesät. Zuvor wurden in jedem Fläschchen 2 mL Fischgelatine gleichmäßig auf dem Boden verteilt und nach einer Stunde Lagerung im Brutschrank abgesaugt. Die bleibende Beschichtung erleichtert im Folgenden die Adhäsion und ermöglicht ein gleichmäßiges Wachstum. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂, zudem wurde das Medium alle 48 Stunden gewechselt. Zum Teilen wurden die konfluenten Zellen, nach Absaugen des Mediums, mit PBS gewaschen, um sicherzustellen,

Material und Methoden

dass alle Serumreste entfernt wurden. Danach wurde pro Flasche 2 mL Trypsin/EDTA dazugegeben und diese anschließend für 10 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle der Lösung der Zellen wurde die Suspension in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und, um die Enzymaktivität zu stoppen, mit FCS-haltigem Medium verdünnt. Im Anschluss wurden die Zellen wie oben beschrieben zentrifugiert und im Verhältnis 1:4 ausgesät.

2.2.2. Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen anhand ihrer Größe, Granularität und bestimmter Antigene charakterisiert werden. Dazu passieren sie einzeln in einem Flüssigkeitsstrom einen fokussierten Laser. Die Zellen streuen das auftreffende Licht, das von Detektoren zum einen in der Längsachse, und zum anderen im 90° Winkel zum einfallenden Licht erfasst wird. Das Streulicht in Längsachse (FSC) erlaubt eine Aussage über die Größe der Zelle, das im 90° Winkel zum einfallenden

Material und Methoden

Licht (SSC) erfasste Streulicht gibt Informationen über die Granularität der Zelle. Zur Messung der Expression von Molekülen auf der Zelloberfläche können diese mit fluorochromkonjugierten Antikörpern markiert werden. Das Fluorochrom-Molekül absorbiert kurzfristig die Energie des Laserstrahls und wird hierdurch angeregt. Es gibt diese Energie sofort wieder ab, zunächst in Form von Wärme und anschließend in Form von Licht einer höheren Wellenlänge. Dieses Licht wird auch im 90° Winkel zum einfallenden Licht detektiert, wobei die gemessene Intensität mit der Menge des Antigens auf der Zelle korreliert. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der Software CellQuest, die auch eine grafische Darstellung erlaubt.

Für die Versuche wurden die Zellen in Flaschen gezüchtet. Nach entsprechender Stimulation und Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und, um die Zellen vom Boden zu lösen, pro Flasche 500 µL Accutase hinzugegeben. Anschließend wurden die Flaschen für 10 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Danach wurde die entstandene

Material und Methoden

Zellsuspension einer Flasche in ein FACS-Röhrchen umgefüllt und nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 150 G und 4°C der Überstand vorsichtig dekantiert. Für den folgenden Waschvorgang wurden pro Röhrchen 200 µL FACS-Puffer hinzugefügt. Nach kurzem Mischen mit Hilfe des Vortex-Schüttlers wurden die Röhrchen wie oben zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Folgend wurden die Zellen mit den entsprechenden Antikörpern (in der Verdünnung 1:50 in FACS-Puffer) für 30 Minuten inkubiert, erneut zweimal gewaschen und anschließend in 100 µL FACS-Puffer resuspendiert. Am Durchflusszytometer wurden pro Kondition 10.000 Zellen gemessen.

2.2.3. Westernblot

Beim Westernblot werden Proteine mit Hilfe einer immunochemischen Methode detektiert. Dazu wurden die in einer Zellkulturflasche konfluent gewachsenen Zellen nach entsprechender Stimulation zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde die Zellkulturflasche auf Eis

Material und Methoden

gestellt, um eine Hydrolyse der phosphorylierten Proteine möglichst zu vermeiden.

Um Ganz-Zell-Lysate zu gewinnen, wurde für 2 Minuten 180 μ L kalter Lysepuffer pro Flasche dazugegeben. Nachdem die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden gelöst wurden, wurde die Suspension in vorgekühlte Eppendorfgefäße gegeben. Diese wurden dann zunächst bei 4°C für 30 Minuten bei 2000 rpm stark gerüttelt und dann bei gleicher Temperatur für 20 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und die entstandenen Überstände in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Gewinnung der nukleären und zytosolischen Proteinextrakte wurden die Zellen nach dem Waschen für 2 Minuten mit 500 μ L hypoosmotischem Puffer pro Flasche inkubiert. Anschließend wurde, wie oben beschrieben, die Suspension in Eppendorfgefäße gegeben und bei 4°C für 10 Sekunden mit 8.000 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand mit zytosolischen Proteinen wurde abgenommen und bei -80°C gefroren.

Material und Methoden

Der zentrifugierte Niederschlag wurde zunächst mit hypotonischem Puffer gewaschen und im Anschluss in jeweils 50 μL hypertonischem Puffer resuspendiert und bei 4°C für 20 Minuten auf die Wackelplatte gestellt. Nach anschließender 20-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 14.000 rpm wurden die Überstände, die nun die nukleären Extrakte beinhalteten, abgenommen und bei -80°C gefroren. Alle Schritte erfolgten mit gekühlten Reagenzien.

Die quantitative Bestimmung der Proteine erfolgte photometrisch im BCA-Test. Dazu wurden die Proben mit sechsfachem Laemmli-Puffer und 5% β -Mercaptoethanol zunächst für 30 Minuten im Heizblock bei 100°C erhitzt und dann auf Eis gelagert. Die Proteine bilden in alkalischer Lösung Komplexe, die photometrisch gemessen werden können. Als Referenzwert diente die Messung einer definierten Konzentration aus Rinderserumalbumin (BSA). Anhand der gemessenen Proteinkonzentration kann der Proteingehalt der einzelnen Proben in der Elektrophorese vereinheitlicht werden.

Material und Methoden

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) trennt in einem elektrischen Feld Proteine der Größe nach auf. Es wurden 12% und 10% Acrylamidgele verwendet, bestehend aus Sammelgel und Trenngel. Nachdem die Proben mit dem Ladepuffer gemischt wurden, wurden 20 µg bis 50 µg Gesamtprotein jeder Probe aufgetragen. Das SDS (Natriumdodecylsulfat) in den Acrylamidgelen wird von den Proteinen gebunden, diese werden negativ geladen und im angelegten elektrischen Feld nach ihrer Molmasse aufgetrennt. Der Transfer auf die Nitrozellulosemembran erfolgte bei 4°C über Nacht bei 65 mA. Im Anschluss wurde die Membran 4 Stunden mit Roti®-Block gewaschen, um unspezifische Wechselwirkungen zu unterdrücken. Mit der reversiblen Ponceau S Färbung lässt sich überprüfen, ob Auftrennung und Transfer der Proteine erfolgreich waren. Gleichzeitig kann die Ladungsmenge in jedem Slot kontrolliert werden. Die Membran wurde 5 Minuten auf dem Schüttler gefärbt und anschließend mit Aqua dest. gewaschen, bis klare Bandenmuster erkennbar waren. So wurde die

Material und Methoden

Membran zur Dokumentation in Klarsichtfolie eingescannt. Danach wurde sie mit Aqua dest. gewaschen und entfärbt.

Um das zu untersuchende Protein zu markieren, wurde die Membran über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler mit dem Primärantikörper in entsprechender Verdünnung in 10% Roti®-Block-Aqua-dest.-Lösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert, der an das Fc-Fragment des Primärantikörpers bindet. Die Peroxidase des Sekundärantikörpers katalysiert die Oxidation von Luminol und ermöglicht die anschließende Detektion der Lumineszenz. Um die Lumineszenz der Peroxidase zu verbessern, fand die Entwicklung nach einminütiger Inkubation der Membran mit ECL statt.

2.2.4. Adhäsionsassay

Im Adhäsionsassay wird die Adhäsion von Lymphozyten an Endothelzellen quantifiziert. Dazu wurden in einer mit Fischgelatine beschichteten 96er Wellplatte 5×10^4 Endothelzellen pro Napf ausgesät und für 48 Stunden kultiviert. Anschließend (48 Stunden vor der Messung) wurden sie mit den entsprechenden Zusätzen versehen. Tags darauf (24 Stunden vor der Messung) wurden 5×10^5 Lymphozyten pro Well in einer kleinen Flasche ausgesät und mit Phorbol-12-myristate-13-acetat (PMA) aktiviert. Am Tag der Messung wurden die Zellen mit serumfreiem RPMI-Medium gewaschen und für 30 Minuten mit $50 \mu\text{g}$ Calcein inkubiert, das in $10 \mu\text{g}$ DMSO gelöst wurde.

Dieser nicht-fluoreszierende Farbstoff wird nach Penetration der Zellmembran durch unspezifische Esterasen gespalten. Dabei entsteht das fluorogene, nicht-permeable Calcein. Das Gemisch wurde dann für 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen, wie oben beschrieben, mit 1% FCS in RPMI-Medium

Material und Methoden

gewaschen, um sie danach in RPMI-Medium ohne FCS zu suspendieren. Danach wurde das Medium der Endothelzellen abgesaugt, pro Napf 100 μ L der Lymphozytensuspension gegeben und die Platte erneut für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Darauf folgend wurde viermal im Fluorocan die Intensität der Abstrahlung erfasst, die direkt proportional zur Anzahl der zuvor gefärbten Lymphozyten ist. Zwischen den Messungen wurde die Wellplatte vorsichtig ausgeklopft und pro Napf 100 μ L RPMI-Medium gegeben, um die nicht adhärenen Zellen zu lösen.

3. Ergebnisse

3.1 Fumarsäureester reduzieren nicht die T-Zell Adhäsion an humanen zerebralen Endothelzellen

Voraussetzung für die Migration aktivierter Entzündungszellen über die BHS ist die Adhäsion an das zerebrale Endothel. Diese wurde mit Adhäsionsassays unter inflammatorischen und nicht inflammatorischen Bedingungen untersucht.

Dazu wurden konfluent gewachsene HCEC für 24 Stunden mit DMF, MMF oder DMSO behandelt. DMF und MMF wurden jeweils mit einer Konzentration von 10 μM oder 50 μM in DMSO gelöst. Um zu evaluieren, inwieweit die gezeigten Effekte Auswirkungen der DMF-Behandlung sind oder durch das Lösungsmittel verursacht werden, wurden die Kontrollen mit einer korrespondierenden DMSO-Konzentration behandelt. Anschließend wurden die HCEC für weitere 24 Stunden mit 10 ng/mL TNF- α und 100 IU/mL IFN- γ stimuliert oder blieben unbehandelt. Danach wurde die Adhäsion

Ergebnisse

der Calcein-markierten Jurkat T-Zellen, die zuvor mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) aktiviert wurden, an den HCEC quantifiziert. Phorbol-ester führen über Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren zu vermehrter Adhäsion von T-Zellen (Shimizu Y et al. 1990). Die Intensität der Abstrahlung des aus Calcein entstandenen Farbstoffes wurde in vier Durchgängen, zunächst ohne Intervention und folgend jeweils nach vorsichtigem Ausklopfen der Platte gemessen. Sie korrelierte proportional mit der Menge anhaftender T-Zellen. Aus den acht erhaltenen Werten pro Stimulationsreihe wurden die Extremwerte eliminiert und anschließend der Durchschnittswert ermittelt. Dieser Durchschnittswert wurde jeweils ins Verhältnis zum Durchschnittswert der Kontrolle gesetzt und in der Einheit der relativen Fluoreszenzstärke angegeben.

Ergebnisse

In Abbildung 3 wird die vermehrte Adhäsion aktivierter T-Zellen im Sinne einer Steigerung der relativen Fluoreszenzstärke unter inflammatorischen Bedingungen deutlich. Weder die Präinkubation mit DMSO noch mit FSE bewirkten eine Änderung der Menge an adhärenierten T-Zellen. Durch Präinkubation mit FSE konnte keine Reduktion der Adhäsion beobachtet werden.

Ergebnisse

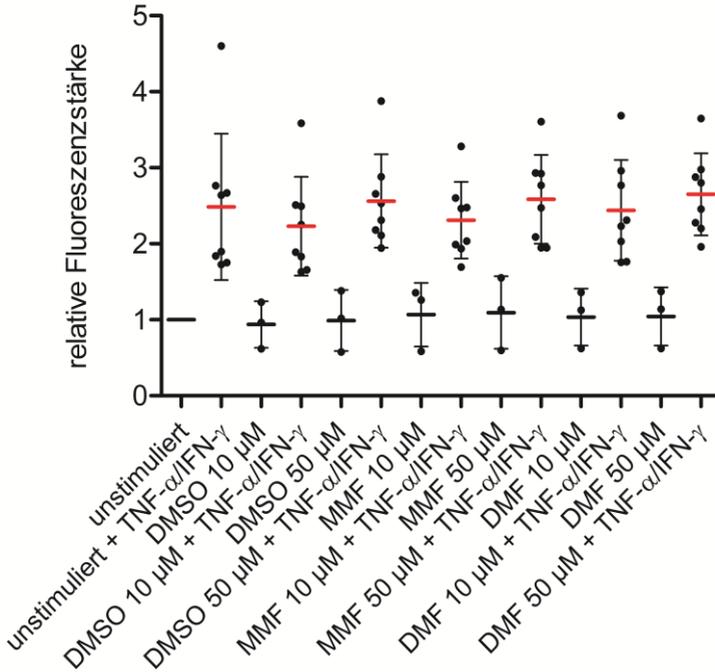


Abbildung 3: FSE reduzierten nicht die quantitative Adhäsion von T-Zellen an HCEC unter inflammatorischer Stimulation mit TNF- α und IFN- γ . 8 inflammatorisch stimulierte und 3 Adhäsionsassays ohne inflammatorische Stimulation mit HCEC nach angegebenen Konditionen in unabhängigen Experimenten. Dabei erfolgte die Inkubation mit FSE oder DMSO für insgesamt 48 Stunden und mit den in der Abbildung angegebenen Konzentrationen. Die inflammatorische Stimulation wurde mit 10 ng/mL TNF- α und 100 IU/mL IFN- γ für 24 Stunden vorgenommen. Ein Punkt entspricht dem Verhältnis des Durchschnittswerts der gemessenen Fluoreszenz in der jeweiligen Stimulation zum Durchschnittswert der Fluoreszenz der gänzlich unstimulierten Zellen. Die Fluoreszenz wurde nach dreimaligem

Ergebnisse

Ausklopfen der Wellplatten erhoben. Balken repräsentieren die Mittelwerte und sind zusammen mit der Standardabweichung angegeben. Die Mittelwerte sind jeweils rot bei inflammatorischer Stimulation.

Gleichzeitig wurden Versuche zu dem oben beschriebenen Aufbau, statt der inflammatorischen Stimulation mit TNF- α und IFN- γ , mit 10 ng/mL IL-1 β durchgeführt. Die übrigen Stimulationen blieben analog. Ein Punkt in Abbildung 4 entspricht dem Verhältnis des Durchschnittswerts der gemessenen Fluoreszenz in der jeweiligen Stimulation zum Durchschnittswert der Fluoreszenz der gänzlich unstimulierten Zellen. Er wird erneut in der Einheit der relativen Fluoreszenzstärke angegeben. Die Fluoreszenz wurde nach dreimaligem Ausklopfen der Platten erhoben.

Ergebnisse

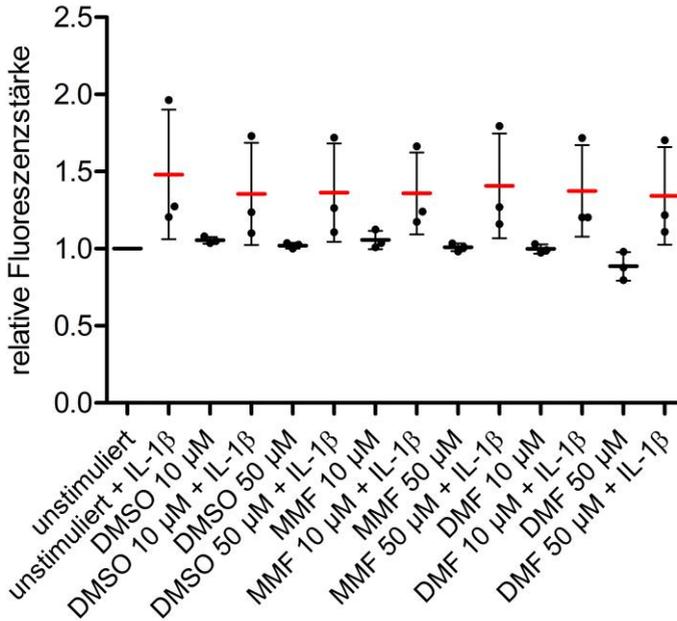


Abbildung 4: FSE reduzierten nicht die quantitative Adhäsion von T-Zellen an HCEC unter inflammatorischer Stimulation mit IL-1 β . 3 Adhäsionsassays mit HCEC nach angegebenen Stimulationen in unabhängigen Experimenten. Dabei erfolgte die Inkubation mit FSE oder DMSO für insgesamt 48 Stunden und mit den in der Abbildung angegebenen Konzentrationen. Die inflammatorische Stimulation wurde mit 10 ng/mL IL-1 β für 24 Stunden vorgenommen. Ein Punkt entspricht dem Verhältnis des Durchschnittswerts der gemessenen Fluoreszenz in der jeweiligen Stimulation zum Durchschnittswert der Fluoreszenz der gänzlich unstimulierten Zellen. Die Fluoreszenz wurde nach dreimaligem Ausklopfen der Wellplatten erhoben. Balken repräsentieren die Mittelwerte und sind zusammen mit der Standardabweichung angegeben. Die Mittelwerte sind jeweils rot bei inflammatorischer Stimulation.

Ergebnisse

Die Anzahl der adhärenierten T-Zellen war in den IL-1 β -stimulierten Proben erhöht. Die alleinige Behandlung mit FSE oder mit DMSO veränderte die Adhäsion der T-Zellen nicht. Auch die unter inflammatorischen Bedingungen gesteigerte Adhäsion wurde nicht durch FSE oder DMSO moduliert.

Neben der absoluten Anzahl an adhärenierten T-Zellen kann auch die Stärke der Bindung beurteilt werden. Der Graph in Abbildung 5 stellt die prozentuale Zelladhäsion nach dreimaligem Ausklopfen im Verhältnis zur basalen Zelladhäsion dar. Ein Punkt im Graph entspricht dem Mittelwert der Fluoreszenzen nach dreimaligem Ausklopfen im Verhältnis zum Mittelwert der detektierten Fluoreszenzen in der ersten Messung. Dabei wird deutlich, dass die inflammatorisch stimulierten Zellen eine festere Bindung eingingen, charakterisiert durch eine höhere Zelladhäsion in Prozent, als die Zellen, die unter nicht-inflammatorischen Verhältnissen adhärenierten. Eine Hemmung dieser Steigerung durch

Ergebnisse

FSE war nicht erkennbar. Zwar unterschied sich die basale Zelladhäsion zwischen den verschiedenen Experimenten, blieb aber innerhalb eines jeden konstant.

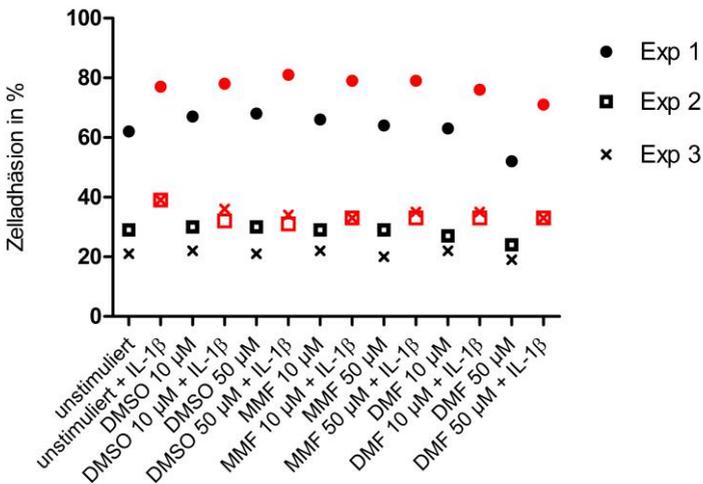


Abbildung 5: FSE nahmen keinen Einfluss auf die Stärke der Adhäsion von T-Zellen an HCEC unter inflammatorischer Stimulation mit IL-1β. 3 Adhäsionsassays mit HCEC nach angegebenen Stimulationen in unabhängigen Experimenten. Die Inkubation mit FSE oder DMSO erfolgte für insgesamt 48 Stunden und mit den in der Abbildung angegebenen Konzentrationen. Die inflammatorische Stimulation wurde mit 10 ng/mL IL-1β für 24 Stunden vorgenommen. Ein Punkt entspricht der Zelladhäsion der T-Zellen in %. Diese ergibt sich aus den Mittelwerten der detektierten Fluoreszenz der Calcein-markierten T-Zellen nach dreimaligem Ausklopfen im Verhältnis zu den Mittelwerten der Fluoreszenzen in der ersten Messung. Die roten Punkte sind jeweils die Werte der IL-1β-

Ergebnisse

stimulierten Zellen. Für die Darstellung der verschiedenen Experimentreihen wurden jeweils unterschiedliche Symbole verwendet.

Zusammenfassend wurde durch FSE unabhängig von den verwendeten inflammatorischen Stimuli weder eine quantitative Hemmung der Adhäsion beobachtet noch die Stärke der Bindung beeinflusst.

3.2 Fumarsäureester reduzieren weder die basale noch die inflammatorisch induzierte Expression von ICAM-1 auf humanen zerebralen Endothelzellen

In einem weiteren Schritt wurde die Wirkung von FSE auf die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle unter basalen und inflammatorischen Bedingungen mittels Durchflusszytometrie untersucht.

ICAM-1 wird verstärkt unter Inflammation exprimiert (Voraberger et al. 1991) und nimmt eine besondere Stellung in der Migration von Immunzellen über die BHS ein, da es als Rezeptor für LFA-1 auf aktivierten Leukozyten dient (Carman 2009). Konfluente HCEC wurden mit 10 und 50 μM MMF, DMF (jeweils gelöst in DMSO) und DMSO für 24 Stunden behandelt. Anschließend wurden die Zellen entweder für weitere 24 Stunden mit 10 ng/mL IL-1 β stimuliert oder blieben ohne Stimulation. Auf den verwendeten HCEC wurde ICAM-1 basal exprimiert. Die Stimulation mit IL-1 β bewirkte eine deutliche Steigerung der ICAM-1 Expression um

Ergebnisse

durchschnittlich 285% (SD \pm 55%, n=6). Abbildung 6 zeigt ein repräsentatives Experiment. Die Hochregulation von ICAM-1 wird durch die Verschiebung des Histogramms nach rechts auf der x-Achse deutlich, auf der die Intensität der Fluoreszenz logarithmisch aufgetragen ist.

Ergebnisse

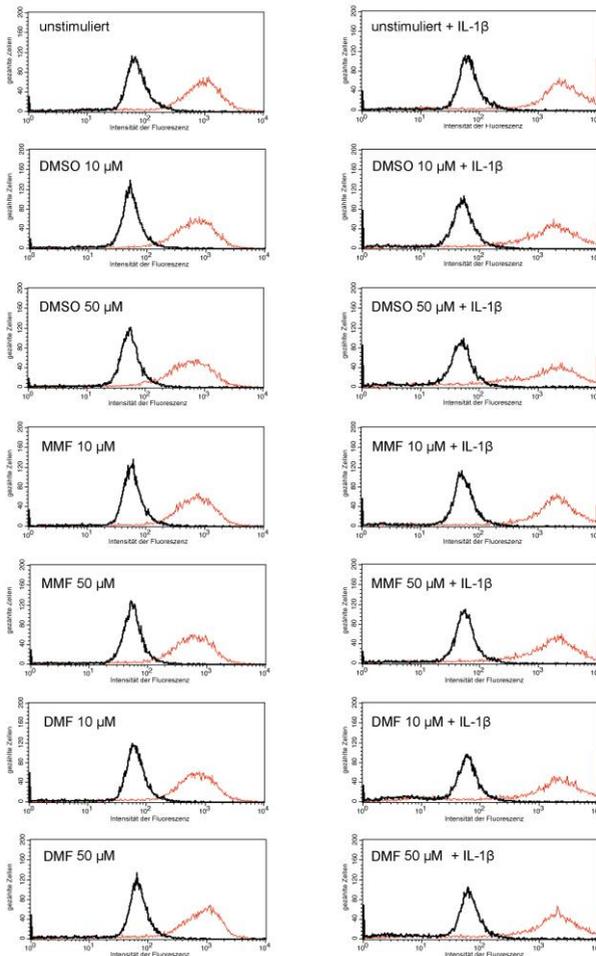


Abbildung 6: ICAM-1 Expression wurde durch inflammatorische Stimulation gesteigert. Durchflusszytometrie von HCEC mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen ICAM-1 (rote Kurve). Die Inkubation erfolgte mit den angegebenen Konzentrationen für 24 Stunden. Anschließend wurde ein Teil der Zellen mit 10 ng/mL IL-1 β für weitere 24 Stunden stimuliert. Die Detektion des Isotypen-Antikörpers ist durch die schwarze Kurve dargestellt. Repräsentativ für 6 jeweils unabhängige Experimente.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der verschiedenen Experimente sind im Diagramm in Abbildung 7 zusammengefasst. Dazu wurden die geometrischen Mittelwerte (geom. MW) der Fluoreszenzstärke der einzelnen Proben ins Verhältnis zum geometrischen Mittelwert der Fluoreszenzstärke des jeweils verwendeten Iso-Antikörpers gesetzt. Dieses Verhältnis wurde wiederum mit dem der unstimulierten Zellen zum Iso-Antikörper in Beziehung gesetzt und auf der y-Achse als relative Fluoreszenzstärke aufgetragen. Eine Präinkubation mit FSE oder DMSO nahm keinen Einfluss auf die gesteigerte ICAM-1 Expression. Auch ohne inflammatorische Stimulation übten die FSE keinen Einfluss auf die basale Expression von ICAM-1 aus. Aus Übersichtsgründen ist die relative Fluoreszenzstärke beispielhaft in der folgenden Formel dargestellt:

$$\text{rel. Fluoreszenzstärke} = \frac{\text{geom. MW (Bsp. Probe)} / \text{geom. MW d. Iso-AK (Bsp.)}}{\text{geom. MW (unstimulierte Probe)} / \text{geom. MW d. Iso-AK (unstim.)}}$$

Ergebnisse

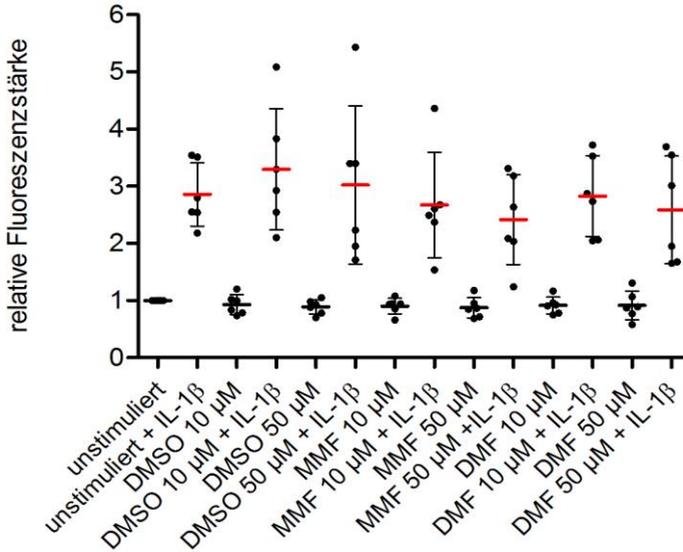


Abbildung 7: Inflammatorische Stimulation verstärkte die ICAM-1 Expression. Durch FSE wurde sie weder basal noch unter Inflammation reduziert. 6 durchflusszytometrische Untersuchungen der ICAM-1 Expression auf HCEC in unabhängigen Experimenten. Dabei erfolgte die Inkubation mit FSE oder DMSO für 24 Stunden und mit den in der Abbildung angegebenen Konzentrationen. Die inflammatorische Stimulation wurde mit 10 ng/mL IL-1 β für eine Stunde vorgenommen. Die geometrischen Mittelwerte der Fluoreszenzstärke der einzelnen Proben wurden ins Verhältnis zur Fluoreszenzstärke des jeweils verwendeten Iso-Antikörpers gesetzt. Dieses Verhältnis wiederum wurde mit dem der unstimulierten Zellen zum Iso-Antikörper in Beziehung gesetzt und auf der y-Achse als relative Fluoreszenzstärke aufgetragen. Die Balken stehen für die ermittelten Mittelwerte (jeweils rot bei inflammatorischer Stimulation) und werden zusammen mit der Standardabweichung angegeben.

Ergebnisse

Auf den verwendeten HCEC ließ sich auch ALCAM nachweisen. Allerdings nahmen weder die inflammatorische Stimulation noch die Inkubation mit FSE Einfluss auf die Expression (siehe Abbildung 8).

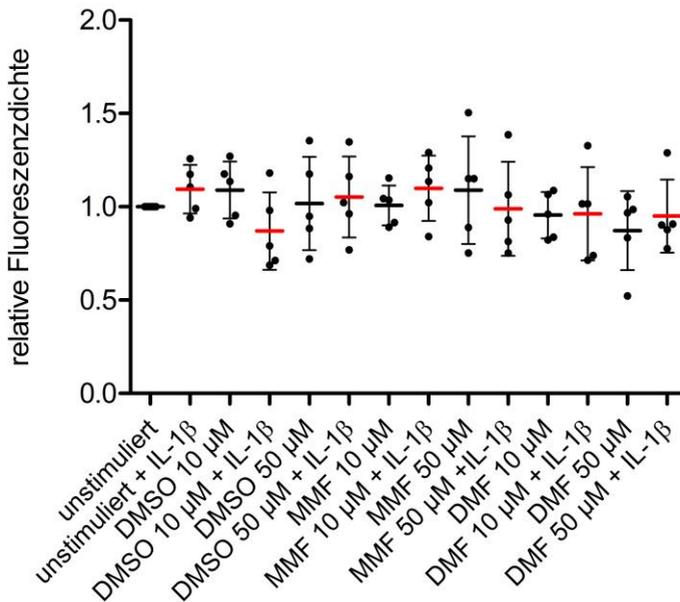


Abbildung 8: Die ALCAM Expression änderte sich bei inflammatorischer Stimulation oder FSE-Behandlung nicht. 5 durchflusszytometrische Untersuchungen der ALCAM Expression in unabhängigen Experimenten. Dabei erfolgte die Inkubation mit FSE oder DMSO für 24 Stunden und mit den in der Abbildung angegebenen Konzentrationen. Die inflammatorische Stimulation wurde mit 10 ng/mL IL-1β für eine Stunde vorgenommen. Die geometrischen Mittelwerte der

Ergebnisse

Fluoreszenzstärke der einzelnen Proben wurden ins Verhältnis zum geometrischen Mittelwert der Fluoreszenzstärke des jeweils verwendeten Iso-Antikörpers gesetzt. Dieses Verhältnis wiederum wurde mit dem der unstimulierten Zellen zum Iso-Antikörper in Beziehung gesetzt und auf der y-Achse als relative Fluoreszenzstärke aufgetragen. Die Balken stehen für die ermittelten Mittelwerte (jeweils rot bei inflammatorischer Stimulation) und werden zusammen mit der Standardabweichung angegeben.

Weitere an der Migration von Immunzellen beteiligte Adhäsionsmoleküle wie ICAM-2, VCAM-1, JAM-A und PECAM-1 waren auf den verwendeten HCEC durchflusszytometrisch weniger robust nachweisbar und wurden daher für die Experimente mit FSE nicht näher untersucht.

Als Fazit lässt sich festhalten, dass FSE keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Adhäsionsmoleküle auf den verwendeten HCEC hatten, was die fehlende Modulierbarkeit der Adhäsion von aktivierten T-Zellen an zerebrales Endothel durch FSE *in vitro* erklären könnte.

3.3 Auswirkungen von Fumarsäureestern auf die NF κ B-Translokation in Endothelzellen

NF κ B nimmt eine Schlüsselstellung für schnelle Reaktionen der Zelle auf inflammatorische Stimuli ein. Der Transkriptionsfaktor ruht inaktiv im Zytoplasma und transloziert bei Aktivierung, z.B. durch Zytokine wie TNF- α und IL1 β , in den Zellkern, wodurch die Transkription bestimmter Zielgene gesteigert werden kann. Hierzu zählen in Endothelzellen u.a. die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin, die anschließend die Migration von Immunzellen in entzündetes Gewebe erleichtern (Voraberger et al. 1991; Siebenlist et al. 1994).

Die Translokation von NF κ B ist in HUVEC durch FSE modulierbar (Loewe et al. 2002). Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit zeigten jedoch, dass die ICAM-1 Expression nicht durch FSE moduliert wird. Im nächsten Schritt wurden daher die Effekte der FSE auf die Kerntranslokation von NF κ B in humanen zerebralen Endothelzellen bei Inflammation

Ergebnisse

untersucht. Dazu wurde zunächst die Kinetik der Kerntranslokation von NF κ B in Westernblots analysiert.

3.3.1 Kinetik der NF κ B/p65-Translokation bei inflammatorischer Stimulation

Konfluent gewachsene HCEC wurden jeweils eine Stunde, 12 Stunden oder 24 Stunden vor Lyse mit 10 ng/mL IL-1 β oder für 24 Stunden mit 10 ng/mL TNF- α stimuliert. Zur Quantifizierung der NF κ B-Translokation wurde ein Antikörper gegen RelA (p65), ein Protein, welches an der Bildung der Heterodimeren von NF κ B beteiligt ist, benutzt. Um sicherzustellen, dass die Proteinmengen in den Proben gleichmäßig verteilt sind, wurde bei sämtlichen Westernblots eine Ponceau-S-Färbung als Ladekontrolle durchgeführt. Wie in Abbildung 9 ersichtlich, fand sich bei den verwendeten HCEC das stärkste Signal für NF κ B/p65 in den nukleären Lysaten (nuk.) bei Behandlung der Endothelzellen mit IL-1 β für eine Stunde. Diese Beobachtung spricht für eine rasche Wirkung von IL-1 β auf die Kerntranslokation von NF κ B in den verwendeten HCEC und ist kongruent mit Ergebnissen anderer Forschungsgruppen (Karin und Ben-Neriah 2000). Im Folgenden wurde deswegen diese Konstellation

Ergebnisse

für die Simulation inflammatorischer Verhältnisse der Endothelzellen gewählt. Außerdem ist dem Versuch zu entnehmen, dass die stärkste Aktivierung von NF κ B im Zytosol (zyt.) im Sinne einer Expressionssteigerung bei 12-stündiger IL-1 β - und 24-stündiger TNF- α -Behandlung vorliegt.

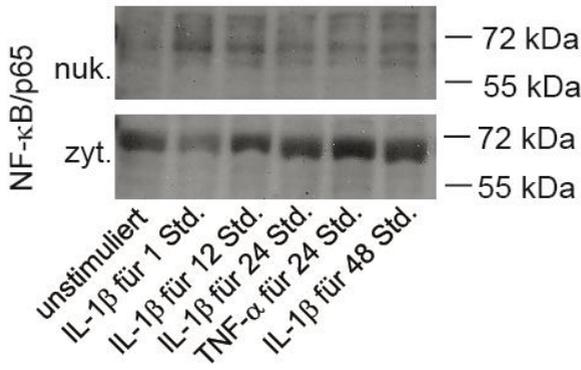


Abbildung 9: Frühe Kerntranslokation von NF κ B/p65 unter inflammatorischer Stimulation mit IL-1 β . Westernblot-Analyse von nukleären (nuk.) und zytosolischen (zyt.) Lysaten HCEC zur Aktivierungskinetik von NF κ B/p65 mit angegebenen Stimulationen. IL-1 β wurde in einer Konzentration von 10 ng/mL verwendet, ebenso wie TNF- α .

3.3.2 In DMSO gelöstes Dimethylfumarat hemmt die IL-1 β induzierte NF κ B/p65-Translokation in Nabelschnurvenenendothel

Durch andere Forschungsgruppen sind hemmende Wirkungen von DMF auf die NF κ B/p65-Translokation in HUVEC beschrieben worden (Loewe et al. 2002). Um die Wirksamkeit des verwendeten DMFs zu prüfen, wurden HUVEC mit 10 oder 50 μ M DMF und die Kontrollen mit korrespondierenden DMSO-Konzentrationen für 24 Stunden präinkubiert. Jeweils die Hälfte der Zellen wurde zusätzlich für eine Stunde mit 10 ng/mL IL-1 β behandelt, die andere Hälfte blieb ohne inflammatorische Stimulation. Wie zuvor an HCEC gesehen, fand unter inflammatorischer Stimulation eine Translokation von NF κ B/p65 in den Kern statt (siehe Abbildung 10). Durch Behandlung der Zellen mit DMF in einer Konzentration von 50 μ M konnte diese Translokation eindeutig gehemmt werden. Die Hemmung war wesentlich ausgeprägter als die leichte, durch DMSO verursachte Reduktion der Kerntranslokation von NF κ B/p65. Die Behandlung

Ergebnisse

der Zellen mit 10 μM DMF zeigte keinen eindeutigen Effekt.

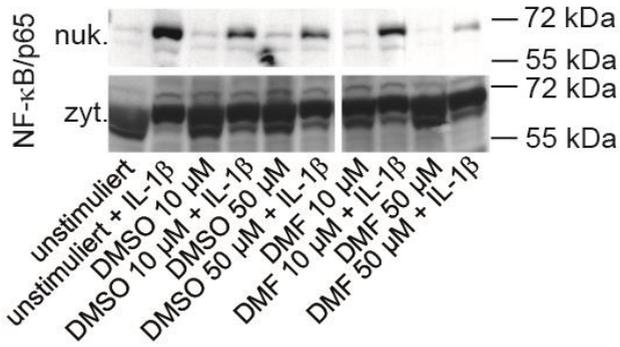


Abbildung 10: DMF inhibierte bei einer Konzentration von 50 μM die nukleäre Translokation von NF κ B/p65 in HUVEC. Westernblotanalyse von nukleären (nuk.) und zytosolischen (zyt.) Lysaten nach Präinkubation mit DMF oder DMSO für 24 Stunden und anschließender inflammatorischer Stimulation mit 10 ng/mL IL-1 β für eine Stunde.

In der Zusammenschau hemmt DMF in einer Konzentration von 50 μM die inflammatorisch vermittelte Kerntranslokation von NF κ B/p65 in HUVEC.

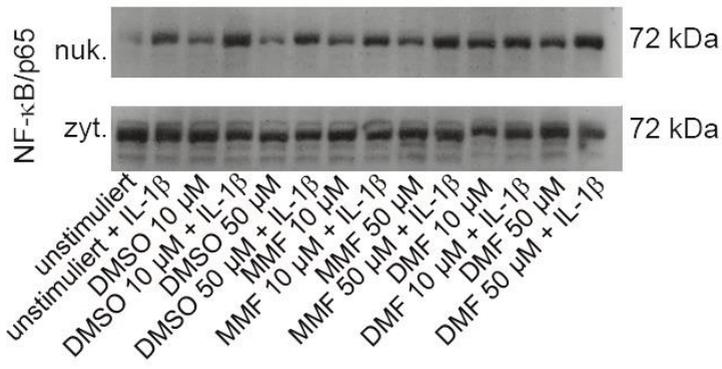
3.3.3 Fumarsäureester hemmen nicht die IL-1 β induzierte NF κ B/p65-Translokation in primären humanen zerebralen Endothelzellen

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich die NF κ B/p65-Translokations-Hemmung in HUVEC in primären humanen zerebralen Endothelzellen reproduzieren lässt. Zusätzlich zu den in 3.3.2 beschriebenen Konditionen wurde die NF κ B-Translokation bei MMF-Inkubation mit 10 μ M und 50 μ M untersucht.

Wie aus Abbildung 11 ersichtlich, fand sich bei den Zellen ohne FSE-Behandlung nach IL-1 β -Gabe eine robuste Aktivierung von NF κ B mit Translokation von NF κ B/p65 in den Zellkern. Entsprechend findet sich eine stärkere Bande in den nukleären Lysaten mit korrespondierender Abnahme von NF κ B/p65 in zytosolischen Lysaten. Auch die Behandlung mit DMSO ohne FSE führte zu einer leichten Aktivierung von NF κ B. Interessanterweise war dies bei der höheren Konzentration mit 50 μ M DMSO weniger stark ausgeprägt als bei 10 μ M. Die Stimulation mit

Ergebnisse

den FSE hatte in unterschiedlichen Versuchsreihen eine unterschiedlich starke Aktivierung von NF κ B zur Folge. War diese nur leicht, konnte sie durch IL-1 β noch gesteigert werden. Bei starker NF κ B-Aktivierung durch die FSE führten zusätzliche inflammatorische Bedingungen nicht zu einer Verstärkung.



Ergebnisse

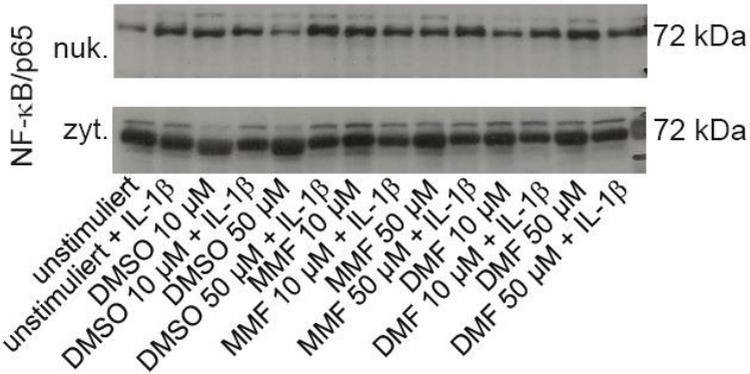
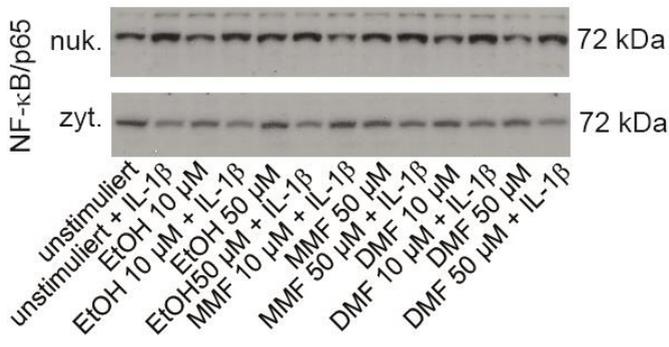


Abbildung 11: In DMSO gelöste FSE hemmen unter inflammatorischer Stimulation die NF κ B/p65-Translokation in HCEC nicht. Zwei Westernblot-Analysen unabhängiger Experimente von nukleären (nuk.) und zytosolischen (zyt.) Lysaten HCEC zur Quantifizierung des durch FSE ausgelösten Effekts an NF κ B/p65. Die Versuchsreihen erfolgten mit den jeweils angegebenen Stimulationen. Dabei erfolgte die Inkubation mit FSE oder DMSO für 24 Stunden und mit den in der Abbildung angegebenen Konzentrationen. Die inflammatorische Stimulation wurde mit 10 ng/mL IL-1 β für eine Stunde vorgenommen.

Um mögliche durch DMSO verursachte Verfälschungen der Ergebnisse sichtbar zu machen, wurde die Versuchsreihe zu oben beschriebenen Konstellationen mit Ethanol als Lösungsmittel durchgeführt. Wie aus Abbildung 12 deutlich wird, zeigte sich bei den Zellen ohne FSE- oder Ethanol-

Ergebnisse

Behandlung weiterhin eine konstante und deutliche Verlagerung von NF κ B/p65 in den Zellkern unter inflammatorischen Verhältnissen. Basal führte auch Ethanol dosisabhängig zu einer NF κ B Aktivierung. Sowohl die Behandlung mit MMF als auch mit DMF in den unterschiedlichen Konzentration konnte die NF κ B/p65-Translokation unter Inflammation nicht hemmen.



Ergebnisse

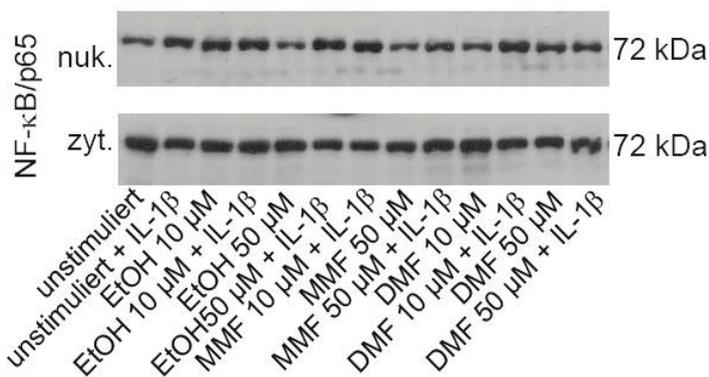


Abbildung 12: In Ethanol gelöste FSE hemmten unter inflammatorischer Stimulation die NFκB/p65-Translokation in HCEC nicht. Zwei Westernblot-Analysen unabhängiger Experimente von nukleären (nuk.) und zytosolischen (zyt.) Lysaten HCEC zur Quantifizierung des durch FSE ausgelösten Effekts an NFκB/p65. Die Versuchsreihen erfolgten mit den jeweils angegebenen Stimulationen. Dabei erfolgte die Inkubation mit FSE oder Ethanol für 24 Stunden und mit den in der Abbildung angegebenen Konzentrationen. Die inflammatorische Stimulation wurde mit 10 ng/mL IL-1β für eine Stunde vorgenommen.

So wiesen die nukleären Banden unter IL-1β-Stimulation stets eine höhere Dichte auf. Allein bei der Behandlung mit 50 μM MMF war die Aktivierung basal bereits ohne IL-1β so stark, dass sie sich nicht weiter steigern ließ.

Ergebnisse

Es konnte durchgehend beobachtet werden, dass in HCEC die IL-1 β -vermittelte NF κ B-Aktivierung nicht durch FSE-Behandlung gehemmt werden konnte.

3.4 Auswirkungen der Fumarsäureester auf MAP-Kinasen in primären humanen zerebralen Endothelzellen

Um den Effekt der FSE unter Stimulation mit IL-1 β auf weitere intrazelluläre Signalwege zu untersuchen, wurde die Aktivierung von MAP-Kinasen in Zell-Lysaten von HCEC der in 3.3.2 und 3.3.3 beschriebenen Versuchsreihe evaluiert. Der p38-Signalweg ist bei Patienten mit RRMS verändert. In T-Lymphozyten MS-Erkrankter ist die Phosphorylierung von p38 (p-p38) unter proinflammatorischer Stimulation mit PMA und Inomycin gesteigert. Vermittelt durch p-p38 wird die Produktion von IL-1 β , -6, -12 und -23 verstärkt und Entzündungsprozesse aufrechterhalten (Di Mitri et al. 2015).

In den HCEC fand sich für p38 durchgängig eine Aktivierung durch IL-1 β , entsprechend einem

Ergebnisse

verstärkten Signal für p-p38. Diese Aktivierung von p38 durch Interleukine und andere proinflammatorische Stimuli ist bereits bekannt (Kyriakis und Avruch 2012). Sowohl in DMSO als auch in Ethanol gelöst führte die Inkubation mit FSE nicht zu einer Hemmung der inflammatorisch vermittelten Phosphorylierung. Eine basale p38-Aktivierung, gleich der IL-1 β -induzierten Phosphorylierung, konnte bei alleiniger Inkubation

Ergebnisse

mit FSE nicht beobachtet werden (siehe Abbildung 13).

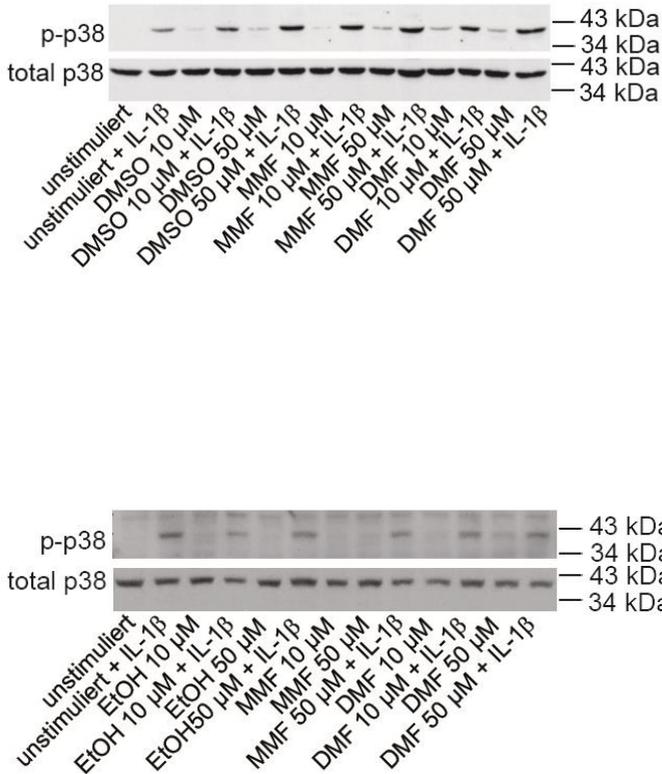


Abbildung 13: FSE inhibierten unabhängig vom Lösungsmittel nicht die IL-1 β -vermittelte p38 Aktivierung in HCEC. Westernblot-Analyse des Aktivierungszustandes von p38 in Zell-Lysaten von HCEC. Dabei erfolgte die Inkubation mit FSE oder DMSO bzw. Ethanol

Ergebnisse

für 24 Stunden und mit den in der Abbildung angegebenen Konzentrationen. Die inflammatorische Stimulation wurde mit 10 ng/mL IL-1 β für eine Stunde vorgenommen. Die abgebildeten Westernblots sind repräsentativ für jeweils zwei unabhängige Experimente.

Kürzlich wurde die Hemmung der Phosphorylierung von ERK-1 und -2 in dendritischen Zellen durch DMF beschrieben. Diese Inhibition reduzierte die inflammatorische Antwort der dendritischen Zellen (Peng et al. 2012). Um einen möglichen Effekt der DMF-Inkubation bei HCEC darzustellen, wurde in den Zell-Lysaten die Phosphorylierung von ERK-1 untersucht. Die aktivierte und phosphorylierte Form von ERK (p-ERK) war bei IL-1 β -Stimulation tendenziell nicht so stark vorhanden wie in den Proben ohne Stimulation. Sowohl Lösungskontrolle als auch FSE in verschiedenen Konzentrationen führten tendenziell dosisabhängig zu einer Aktivierung von ERK, die durch IL-1 β -Stimulation wieder verringert wurde (siehe Abbildung 14).

Ergebnisse

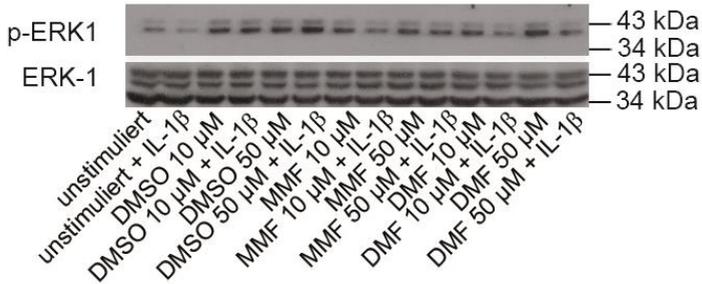


Abbildung 14: Unter IL-1 β -Stimulation lag in HCEC weniger phosphorylierte ERK im Zytoplasma vor. Tendenziell aktivierten FSE dosisabhängig diese Phosphorylierung. Western blot-Analyse des Aktivierungszustandes von ERK-1 in Zell-Lysaten HCEC zu angegebenen Stimulationen. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Davon wurde bei zwei Versuchsreihen DMSO und bei einer Ethanol als Lösungsmittel verwendet. Die Inkubation mit FSE oder DMSO, bzw. Ethanol erfolgte für 24 Stunden mit den in der Abbildung angegebenen Konzentrationen. Die inflammatorische Stimulation wurde mit 10 ng/mL IL-1 β für eine Stunde vorgenommen.

Die Expression von JNK blieb durch die inflammatorische Stimulation unbeeinflusst. Zusammenfassend wird auch der MAP-Kinaseweg in HCEC nicht durch FSE beeinflusst.

4. Diskussion

Die Multiple Sklerose ist eine vorwiegend T-Zell vermittelte inflammatorische Erkrankung des zentralen Nervensystems. Es findet sich eine erhöhte Expression der proinflammatorischen Zytokine $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$ und $IL-1\beta$, die durch Herabsetzen der Barrierefunktion und Heraufregulation von Zelladhäsionsmolekülen die Kapazität zerebralen Endothels zur Migration von Entzündungszellen in das Hirnparenchym erhöhen (Alvarez et al. 2011). Das Ziel dieser Arbeit war es, mögliche direkte antiinflammatorische Effekte des für die orale Therapie der schubförmigen Multiplen Sklerose zugelassenen Wirkstoffes Dimethylfumarat auf humanes zerebrales Endothel zu untersuchen.

Ein essentieller Schritt der pathophysiologisch bedeutsamen Leukozytenmigration in das ZNS ist die Adhäsion des Leukozyten auf aktiviertem Endothel. Dies wurde in Adhäsionsassays untersucht, die eine Aussage über die Adhäsion

Diskussion

ermöglichen, ohne dabei den Fokus auf einzelne Adhäsionsmoleküle zu legen. Erwartungsgemäß konnte an humanen zerebralen Endothelzellen von Einzelspendern in niedrigen Zellpassagen eine adäquate Steigerung der Leukozytenadhäsion unter inflammatorischer Stimulation sowohl mit IL-1 β als auch mit TNF- α und IFN- γ gesehen werden. Entgegen der beschriebenen anti-inflammatorischen Wirkung von DMF in HUVEC, ließ sich allerdings trotz analoger Stimulationsbedingungen weder die Stärke der Adhäsion noch die Anzahl adhärerter T-Zellen an den HCEC durch die Behandlung mit Fumarsäureestern beeinflussen (Vandermeeren et al. 1997; Wallbrecht et al. 2011a). Wir entschieden uns daher für eine genauere vergleichende Untersuchung der FSE-Effekte auf molekularer Ebene in HUVEC und HCEC.

Die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen wird maßgeblich von NF κ B reguliert (Wallbrecht et al. 2011a). NF κ B ist kein einzelnes Protein, sondern ein Dimer aus Proteinen, denen die sogenannte Rel-Domäne gemeinsam ist.

Diskussion

Unter ruhenden Bedingungen befindet sich NF κ B überwiegend gebunden an Inhibitionsproteine (I κ Bs), die den Eintritt in den Zellkern verhindern, im Zytoplasma. Die Aktivierung der Zelle durch inflammatorische Stimuli führt zur Dissoziation von den Inhibitionsproteinen und ermöglicht die Translokation von NF κ B in den Zellkern. Nach Bindung an einen spezifischen DNA-Abschnitt wirkt NF κ B anschließend als proinflammatorischer Transkriptionsfaktor (Karin und Ben-Neriah 2000). Dies umfasst neben der Induktion von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 beispielsweise auch die gesteigerte Expression von Myosin-Leicht-Ketten-Kinasen (MLCK), die über Aktivierung des Aktin-Zytoskeletts zur Internalisierung von TJ führen und damit direkt auf die endotheliale Permeabilität Einfluss nehmen können (Alvarez et al. 2011). Dabei nutzen einige der inflammatorischen Botenstoffe, die zur Kerntranslokation von NF κ B führen, wie TNF- α , TNF- β und IL-1, die NF κ B-vermittelten Signalkaskaden als positiven Rückkopplung, um ihre eigene Expression zu steigern (Siebenlist et al.

Diskussion

1994). Eine Hemmung der NF κ B-Translokation, die also auf verschiedenen Ebenen antiinflammatorisch wirksam wäre, ist durch DMF für verschiedene Zelltypen, wie z.B. die humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 (Kastrati et al. 2015), Fibroblasten (Vandermeeren et al. 2001), T-Zellen (Gerdes et al. 2007) und auch HUVEC beschrieben (Loewe et al. 2002). Entsprechend wäre eine Modulation NK κ B-vermittelter Signale durch FSE in HCEC denkbar gewesen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass trotz eines vergleichbaren Versuchsaufbaus und unabhängig vom Lösungsmittel weder MMF noch DMF in HCEC die inflammatorisch vermittelte Kerntranslokation von NF κ B/p65 hemmen. Da sich gleichzeitig jedoch in vergleichenden Experimenten mit HUVEC die Inhibition mittels DMF nachweisen ließ, werten wir das Ausbleiben dieses Effekts als spezifische Eigenschaft der hochspezialisierten zerebralen Endothelzellen.

In HUVEC wurde eine Reduktion der Zytokin-induzierten ICAM Expression durch DMF-Inkubation

Diskussion

beschrieben (Wallbrecht et al. 2011b; Vandermeeren et al. 1997) und tatsächlich wirken verschiedene bei MS eingesetzte Immuntherapeutika zu mindestens teilweise über eine Beeinflussung endothelialer Adhäsionsmoleküle (Buttmann und Rieckmann 2008; Correale und Villa 2007). Vor dem Hintergrund der fehlenden Inhibition der $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Translokation durch die FSE in HCEC ist es allerdings plausibel, dass in unseren durchflusszytometrischen Untersuchungen mit HCEC keine Änderung der Zytokin-vermittelten ICAM-1 Expression durch FSE festgestellt werden konnte.

Als weitere intrazelluläre Signalwege wurden die MAP-Kinasen ERK, JNK und p38 untersucht. Dabei kann MAPK p38 als $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -unabhängiger Signalweg für proinflammatorische Zytokine ($\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$) dienen und in Endothelzellen ebenfalls über Modulation der MLCK und über Herabregulation von Occludin direkt auf die vaskuläre Permeabilität Einfluss nehmen (Adam et al. 2016; Borbiev et al. 2004; Tai et al. 2010). Eine Modulation der Aktivierung von p38 durch FSE zeigte sich in

Diskussion

unseren primären Endothelzellen analog zu den Ergebnissen mit NF κ B aber nicht.

Die Literatur ist hinsichtlich der Wirkung von MMF und DMF auf zerebrales Endothel widersprüchlich: Bérnardais und Kollegen zeigten, dass in der immortalisierten humanen zerebralen Endothelzelllinie hCMEC/D3 die TNF α -induzierte Reduktion von Occludin, Claudin-5 und ZO-1 partiell durch MMF (aber nicht durch DMF) antagonisiert wird. Diese Beobachtung ließ sich jedoch nicht durch *in vivo* Experimente mit C57BL/6 Mäusen und Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) 35-55 induzierter EAE bestätigen (Bérnardais et al. 2013). Zu bedenken ist der mit 72 Tagen nach MOG35-55-Injektion späte Zeitpunkt der Claudin-5-Analyse. In Versuchen der gleichen Arbeitsgruppe konnte 27 Tage nach MOG35-55-Injektion eine reduzierte Immunzell-Migration in das Rückenmark von FSE-behandelten Mäusen verzeichnet werden (Schilling et al. 2006). In der späteren chronischen Phase, 41 oder 74 Tage nach MOG35-55-Injektion, ließ sich in anderen Experimenten der gleichen Arbeitsgruppe

Diskussion

dieses Phänomen nicht beobachten (Linker et al. 2011). Deswegen liegt mit 72 Tagen der gewählte Zeitpunkt der Claudin-5-Quantifizierung zur Analyse des Schutzes der BHS durch FSE bei diesem Versuchsansatz vermutlich zu spät. Eine andere Forschungsgruppe konnte bei der Untersuchung des Pathomechanismus des Hirnödems im Mausmodell durch vorherige Behandlung mit DMF eine verminderte Herabregulation von Occludin und Claudin-5 an zerebralem Endothel im Zentrum eines experimentell gesetzten ischämischen Infarktes nachweisen (Kunze et al. 2015). Darauf aufbauende *in vitro* Experimente der gleichen Forschungsgruppe wurden mit bEnd.3, einer murinen Hirnendothelzelllinie, durchgeführt. Sauerstoff- und Glukosemangel, entsprechend einer ischämischen Situation im Gehirn, verursachten eine Verlagerung von ZO-1 und eine Reduktion der VE-Cadherin-Produktion, die unter DMF-Inkubation verhindert werden konnten. In dynamischen Migrationsversuchen über einen Einzelzellrasen aus bEnd.3 führte die DMF-Inkubation zu einer

Diskussion

Reduktion der wandernden Monozyten aus der humanen Zelllinie THP-1. Bei dieser Untersuchung wurden allerdings weder ischämische noch inflammatorische Bedingungen geschaffen, was eine Verallgemeinerung des DMF Effektes gerade in Bezug auf eine Wirkung bei MS einschränkt. Gleiches gilt für die durch dieselbe Arbeitsgruppe beschriebene DMF-vermittelte Reduktion der ICAM-1-, VCAM-1- und E-Selektin-mRNA-Expression. Ergebnisse von *in vitro* Versuchen mit MMF wurden von den Kollegen nicht veröffentlicht, obwohl ohnehin fraglich ist, inwieweit DMF die BHS in signifikanten Konzentrationen erreicht, da es nach oraler Aufnahme schnell zum aktiven Metaboliten MMF hydrolysiert wird und selber nicht im Patienten-Serum nachweisbar ist (Venci und Gandhi 2013). Hinzu kommt, dass sich die Barriereigenschaften von bEnd.3 deutlich von humanen zerebralen Endothelzellen unterscheiden (Gumbleton und Audus 2001; Omidi et al. 2003).

Insgesamt unterstreichen die Ergebnisse der Arbeit also die starke Heterogenität von Endothelien und

Diskussion

zeigen die häufig fehlende Übertragbarkeit von Beobachtungen an Endothelzellen unterschiedlicher Gefäßbetten und Spezies auf (Aird 2012; Kallmann 2002). Insofern halten wir die Daten aus unserem humanen *in vitro* Modell für besonders relevant. Die hier verwendeten Zellen zeigten adäquates Verhalten auf inflammatorische Stimuli im Sinne einer Kerntranslokation von NF κ B, einer Aktivierung der p38 MAP-Kinase, einer vermehrten Expression von ICAM-1 und einer verstärkten T-Zellbindung. Zudem wurden die Zellen hinsichtlich eines hohen transendothelialen Widerstandes und robuster ZO-1, Occludin und JAM-A Expression als *in vitro* Modell der BHS zur Untersuchung anderer pharmakologischer Wirkstoffen gut charakterisiert (Haarmann et al. 2015; Buttmann et al. 2007).

Nach unserer Einschätzung kommt im ZNS wahrscheinlich anderen Wirkmechanismen von DMF mehr Bedeutung zu, als der direkten Wirkung auf zerebrales Endothel: So beschreiben Kunze und Kollegen bei Mäusen unter DMF-Behandlung eine Reduktion der apoptotischen Neurone im Gebiet des

Diskussion

experimentellen Schlaganfalls im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine solche neuroprotektive Wirkung könnte unter anderem über den Nrf-2-Signalweg, der Gewebe gegen oxidativen Stress schützt, vermittelt werden (Scannevin et al. 2012; Linker et al. 2011). Kürzlich veröffentlichte Studien postulieren einen positiven Effekt von DMF auf den *hydroxycarboxylic acid receptor 2* (HCAR2)-vermittelten Signalweg an Mikroglia, der ebenso neuroprotektiv wirkt (Parodi et al. 2015).

Zusammenfassend konnte im Gegensatz zu HUVEC in HCEC durch FSE keine Reduktion der NF κ B-Kerntranslokation, der ICAM-1 Expression und der T-Zelladhäsion unter inflammatorischen Bedingungen festgestellt werden. Eine direkte anti-inflammatorische Wirkung von FSE auf humanes zerebrales Endothel trägt auf Basis dieser *in vitro* Daten entsprechend wahrscheinlich nicht zum Wirkmechanismus von DMF in Patienten mit MS bei.

5. Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose ist eine bisher nicht heilbare, chronisch-inflammatorische demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems. Trotz intensiver Forschungsbemühungen ist der exakte Pathomechanismus nicht vollkommen verstanden. Klar ist jedoch, dass der Blut-Hirn-Schranke eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese zukommt. Seit Februar 2014 ist mit Dimethylfumarat ein neues orales Medikament für die schubförmige Multiple Sklerose zugelassen. Die Wirkungen von Fumarsäureestern auf humane zerebrale Endothelzellen als Grundsteine der Blut-Hirn-Schranke sind allerdings nur unzureichend untersucht.

Mehrere Forschungsgruppen demonstrierten an humanem Nabelschnurvenenendothel einen hemmenden Effekt von Fumarsäureestern auf die Adhäsion von Leukozyten und beschrieben eine Inhibition der Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF κ B in den Endothelzellen.

Zusammenfassung

Aufgrund der charakteristischen Eigenschaften zerebralen Endothels ist eine Übertragung dieser Beobachtungen auf die Blut-Hirn-Schranke allerdings nicht ohne weiteres möglich. Daher galt es potentielle Effekte von Fumarsäureestern auf primäre humane zerebrale Endothelzellen als *in vitro* Modell der Blut-Hirn-Schranke zu überprüfen. Dabei wurden die Zellen nicht nur unter ruhenden Bedingungen, sondern auch unter inflammatorischer Stimulation mit TNF- α , IL-1 β und IFN γ untersucht, einem Milieu, wie es in inflammatorischen MS Läsionen zu finden ist. In Leukozyten-Adhäsionsassays konnte durch Inkubation mit Monomethylfumarat und Dimethylfumarat keine funktionale Beeinflussung der Adhäsion von T-Lymphozyten an den verwendeten zerebralen Endothelzellen verzeichnet werden. Kongruent dazu fand sich in durchflusszytometrischen Analysen keine Hemmung der inflammatorisch vermittelten Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1, welches eine tragende Rolle bei der Leukozytenmigration spielt. Inflammatorische

intrazelluläre Signalwege, wie die NF κ B-Kerntranslokation oder die Phosphorylierung von p38 wurden in HECE im Gegensatz zu HUVEC durch Fumarsäureester ebenso wenig beeinflusst.

Diese in sich konsistenten Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass im Gegensatz zu anderen Gefäßbetten weder Dimethylfumarat noch Monomethylfumarat direkt am zerebralen Endothel anti-inflammatorisch wirken.

6.Literaturverzeichnis

Abbott, N. Joan (2005): Dynamics of CNS Barriers. Evolution, Differentiation, and Modulation. In: *Cell Mol Neurobiol* 25 (1), S. 5–23. DOI: 10.1007/s10571-004-1374-y.

Abbott, N. Joan; Friedman, Alon (2012): Overview and introduction: the blood-brain barrier in health and disease. In: *Epilepsia* 53 Suppl 6, S. 1–6. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2012.03696.x.

Abbott, N. Joan; Patabendige, Adjanie A. K.; Dolman, Diana E. M.; Yusof, Siti R.; Begley, David J. (2010): Structure and function of the blood-brain

barrier. In: *Neurobiology of disease* 37 (1), S. 13–25. DOI: 10.1016/j.nbd.2009.07.030.

Abbott, N. Joan; Rönnbäck, Lars; Hansson, Elisabeth (2006): Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. In: *Nature reviews. Neuroscience* 7 (1), S. 41–53. DOI: 10.1038/nrn1824.

Adam, Alejandro P.; Lowery, Anthony M.; Martino, Nina; Alsaffar, Hiba; Vincent, Peter A. (2016): Src Family Kinases Modulate the Loss of Endothelial Barrier Function in Response to TNF- α : Crosstalk with p38 Signaling. In: *PloS one* 11 (9), S. e0161975. DOI: 10.1371/journal.pone.0161975.

Aird, William C. (2012): Endothelial cell heterogeneity. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2 (1). DOI: 10.1101/cshperspect.a006429.

Akkad, Denis A.; Olischewsky, Alexandra; Reiner, Franziska; Hellwig, Kerstin; Esser, Sarika; Epplen, Jörg T. et al. (2015): Combinations of susceptibility genes are associated with higher risk for multiple sclerosis and imply disease course specificity. In: *PLoS ONE* 10 (5), S. e0127632. DOI: 10.1371/journal.pone.0127632.

Albert, Monika; Antel, Jack; Brück, Wolfgang; Stadelmann, Christine (2007): Extensive cortical remyelination in patients with chronic multiple sclerosis. In: *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 17 (2), S. 129–138. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2006.00043.x.

Almohmeed, Yahya H.; Avenell, Alison; Aucott, Lorna; Vickers, Mark A. (2013): Systematic review and meta-analysis of the sero-epidemiological association between Epstein Barr virus and multiple sclerosis. In: *PLoS ONE* 8 (4), S. e61110. DOI: 10.1371/journal.pone.0061110.

Alvarez, Jorge Ivan; Cayrol, Romain; Prat, Alexandre (2011): Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. In: *Biochimica et biophysica acta* 1812 (2), S. 252–264. DOI: 10.1016/j.bbadis.2010.06.017.

Annibaldi, V.; Mechelli, R.; Romano, S.; Buscarinu, M. C.; Fornasiero, A.; Umeton, R. et al. (2015): IFN- β and multiple sclerosis: from etiology to therapy and back. In: *Cytokine & growth factor reviews* 26 (2), S. 221–228. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2014.10.010.

Ascherio, Alberto; Munger, Cassandra L. (2010): Vitamin D and Multiple Sclerosis. In: Michael F. Holick (Hg.): *Vitamin D*. Totowa, NJ: Humana Press, S. 881–893.

Ascherio, Alberto; Munger, Cassandra L.; Lünemann, Jan D. (2012): The initiation and prevention of multiple sclerosis. In: *Nat Rev Neurol* 8 (11), S. 602–612. DOI: 10.1038/nrneurol.2012.198.

Aurrand-Lions, Johnson-Leger (2001): Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members. In:

Blood, S. 3699–3707. DOI:
10.1182/blood.V98.13.3699.

Ballabh, Praveen; Braun, Alex; Nedergaard, Maiken (2004): The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. In: *Neurobiology of disease* 16 (1), S. 1–13. DOI: 10.1016/j.nbd.2003.12.016.

Bar-Or, Amit (2008): The Immunology of Multiple Sclerosis. In: *Semin Neurol* 28 (01), S. 29–45. DOI: 10.1055/s-2007-1019124.

Becker-Barroso, Elena (2009): Thanks to all our peer reviewers in 2008. In: *The Lancet Neurology* 8 (8), S. 699. DOI: 10.1016/S1474-4422(09)70187-5.

Belbasis, Lazaros; Bellou, Vanesa; Evangelou, Evangelos; Ioannidis, John P. A.; Tzoulaki, Ioanna (2015): Environmental risk factors and multiple sclerosis. An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. In: *The Lancet Neurology* 14 (3), S. 263–273. DOI: 10.1016/S1474-4422(14)70267-4.

Bénardais, Karelle; Pul, Refik; Singh, Vikramjeet; Skripuletz, Thomas; Lee, De-Hyung; Linker, Ralf A. et al. (2013): Effects of fumaric acid esters on blood-brain barrier tight junction proteins. In: *Neuroscience letters* 555, S. 165–170. DOI: 10.1016/j.neulet.2013.09.038.

Bloomgren, Gary; Richman, S.; Hotermans, Christophe (2012): Natalizumab-Associated Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. In: *N*

Engl J Med 367 (9), S. 871–872. DOI:
10.1056/NEJMc1207116.

Borbiev, Talaibek; Birukova, Anna; Liu, Feng;
Nurmukhambetova, Saule; Gerthoffer, William T.;
Garcia, Joe G. N.; Verin, Alexander D. (2004): p38
MAP kinase-dependent regulation of endothelial cell
permeability. In: *American journal of physiology.
Lung cellular and molecular physiology* 287 (5), S.
8. DOI: 10.1152/ajplung.00372.2003.

Bozic, C.; Subramanyam, M.; Richman, S.; Plavina,
T.; Zhang, A.; Ticho, B. (2014): Anti-JC virus (JCV)
antibody prevalence in the JCV Epidemiology in MS
(JEMS) trial. In: *European journal of neurology* 21
(2), S. 299–304. DOI: 10.1111/ene.12304.

Brinkmann, Volker; Billich, Andreas; Baumruker,
Thomas; Heining, Peter; Schmouder, Robert;
Francis, Gordon et al. (2010): Fingolimod (FTY720):
discovery and development of an oral drug to treat
multiple sclerosis. In: *Nature reviews. Drug
discovery* 9 (11), S. 883–897. DOI:
10.1038/nrd3248.

Buttmann, Mathias; Lorenz, Alexander; Weishaupt,
Andreas; Rieckmann, Peter (2007): Atorvastatin
partially prevents an inflammatory barrier
breakdown of cultured human brain endothelial cells
at a pharmacologically relevant concentration. In:
Journal of neurochemistry 102 (4), S. 1001–1008.
DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.04563.x.

Buttmann, Mathias; Rieckmann, Peter (2008):
Treating multiple sclerosis with monoclonal

antibodies. In: *Expert review of neurotherapeutics* 8 (3), S. 433–455. DOI: 10.1586/14737175.8.3.433.

Carman, Christopher V. (2009): Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by 'invadosome-like protrusions'. In: *Journal of cell science* 122 (Pt 17), S. 3025–3035. DOI: 10.1242/jcs.047522.

Cayrol, Romain; Wosik, Karolina; Berard, Jennifer L.; Dodelet-Devillers, Aurore; Ifergan, Igal; Kebir, Hania et al. (2008): Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. In: *Nature immunology* 9 (2), S. 137–145. DOI: 10.1038/ni1551.

Chavakis et al. (2003): Leukocyte trans-endothelial migration: JAMs add new pieces to the puzzle. In: *Thrombosis and haemostasis*.

Cohen, Philip (2009): Targeting protein kinases for the development of anti-inflammatory drugs. In: *Current opinion in cell biology* 21 (2), S. 317–324. DOI: 10.1016/j.ceb.2009.01.015.

Compston; Coles (2008): Multiple sclerosis. In: *The Lancet*, S. 1502–1517. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)61620-7.

Confavreux, Christian; Vukusic, Sandra (2006): Age at disability milestones in multiple sclerosis. In: *Brain* 129 (Pt 3), S. 595–605. DOI: 10.1093/brain/awh714.

Confavreux, Christian; Vukusic Sandra; Moreau Thibault; Adeleine Patrice (2000): Relapses and

Progression of Disability in Multiple Sclerosis. In: *The New England journal of medicine* 2000, S. 1430–1438. DOI: 10.1056/NEJM200011163432001.

Constantin, Gabriela (2008): Chemokine signaling and integrin activation in lymphocyte migration into the inflamed brain. In: *Journal of neuroimmunology* 198 (1-2), S. 20–26. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2008.04.023.

Correale, Jorge; Villa, Andrés (2007): The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting. In: *Autoimmunity* 40 (2), S. 148–160. DOI: 10.1080/08916930601183522.

Correale, Jorge; Villa, Andrés (2007): The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting. In: *Autoimmunity* 40 (2), S. 148–160. DOI: 10.1080/08916930601183522.

Cross, A. H.; Naismith, R. T. (2014): Established and novel disease-modifying treatments in multiple sclerosis. In: *Journal of internal medicine* 275 (4), S. 350–363. DOI: 10.1111/joim.12203.

Daneman, Richard; Prat, Alexandre (2015): The blood-brain barrier. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7 (1), S. a020412. DOI: 10.1101/cshperspect.a020412.

Dehmel, T.; Döbert, M.; Pankratz, S.; V. I. Leussink (2014): Monomethylfumarate reduces in vitro migration of mononuclear cells. In: *Neurological Sciences* (Volume 35, Issue 7 ,), S. 1121.

Dendrou, Calliope A.; Fugger, Lars; Friese, Manuel A. (2015): Immunopathology of multiple sclerosis.

In: *Nature reviews. Immunology* 15 (9), S. 545–558.
DOI: 10.1038/nri3871.

Deutsche Gesellschaft für Neurologie: Leitlinie der
Deutsche Gesellschaft für Neurologie: Diagnose
und Therapie der Multiplen Sklerose 2012. Online
verfügbar unter
http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-050I_S2e_Multiple_Sklerose_Diagnostik_Therapie_2014-08_verlaengert.pdf, zuletzt geprüft am
21.08.2015.

Deutsche Gesellschaft für Neurologie (2014):
Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose
2014.

Di Mitri, Diletta; Sambucci, Manolo; Loiarro, Maria;
Bardi, Marco de; Volpe, Elisabetta; Cencioni, Maria
Teresa et al. (2015): The p38 mitogen-activated
protein kinase cascade modulates T helper type 17
differentiation and functionality in multiple sclerosis.
In: *Immunology* 146 (2), S. 251–263. DOI:
10.1111/imm.12497.

Díaz-Flores et al. (2009): Pericytes.
Morphofunction, interactions and pathology in a
quiescent and activated mesenchymal cell niche. In:
Histology and Histopathology 2009.

Dörfel, Max Johannes; Huber, Otmar (2012):
Modulation of tight junction structure and function by
kinases and phosphatases targeting occludin. In:
Journal of biomedicine & biotechnology 2012, S.
807356. DOI: 10.1155/2012/807356.

Duffy, Kent R.; Pardridge, William M. (1987): Blood-brain barrier transcytosis of insulin in developing rabbits. In: *Brain Research* 420 (1), S. 32–38. DOI: 10.1016/0006-8993(87)90236-8.

Duvernoy, Henri M.; Risold, Pierre-Yves (2007): The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. In: *Brain research reviews* 56 (1), S. 119–147. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2007.06.002.

Egleton, Richard D.; Davis, Thomas P. (2005): Development of neuropeptide drugs that cross the blood-brain barrier. In: *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2 (1), S. 44–53. DOI: 10.1602/neurorx.2.1.44.

Engelhardt, Britta; Ransohoff, Richard M. (2012): Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. In: *Trends in immunology* 33 (12), S. 579–589. DOI: 10.1016/j.it.2012.07.004.

Flachenecker, Peter; Stuke, Kristin; Elias, Wolfgang; Freidel, Matthias; Haas, Judith; Pitschnau-Michel, Dorothea et al. (2008): Multiple sclerosis registry in Germany: results of the extension phase 2005/2006. In: *Dtsch Arztebl Int* 105 (7), S. 113–119. DOI: 10.3238/arztebl.2008.0113.

Fox, Robert J.; Miller, David H.; Phillips, J. Theodore; Hutchinson, Michael; Havrdova, Eva; Kita, Mariko et al. (2012): Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. In: *The New England journal of medicine*

367 (12), S. 1087–1097. DOI:
10.1056/NEJMoa1206328.

Frischer, Josa M.; Bramow, Stephan; Dal-Bianco, Assunta; Lucchinetti, Claudia F.; Rauschka, Helmut; Schmidbauer, Manfred et al. (2009): The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. In: *Brain : a journal of neurology* 132 (Pt 5), S. 1175–1189. DOI:
10.1093/brain/awp070.

Frohman, Elliot.; Racke Michael K.; Raine Cedric S. (2006): Multiple Sclerosis — The Plaque and Its Pathogenesis. In: *The New England journal of medicine*, S. 942–955. DOI:
10.1056/NEJMra052130.

Gerdes, S.; Shakery, K.; Mrowietz, U. (2007): Dimethylfumarate inhibits nuclear binding of nuclear factor kappaB but not of nuclear factor of activated T cells and CCAAT/enhancer binding protein beta in activated human T cells. In: *The British journal of dermatology* 156 (5), S. 838–842. DOI:
10.1111/j.1365-2133.2007.07779.x.

Gesser, Borbala; Johansen, Claus; Rasmussen, Mads K.; Funding, Anne T.; Otkjaer, Kristian; Kjellerup, Rasmus B. et al. (2007): Dimethylfumarate specifically inhibits the mitogen and stress-activated kinases 1 and 2 (MSK1/2): possible role for its anti-psoriatic effect. In: *The Journal of investigative dermatology* 127 (9), S. 2129–2137. DOI: 10.1038/sj.jid.5700859.

Gold, Ralf; Giovannoni, Gavin; Philips J Theodore; Zhang Annie (2015): Efficacy and safety of delayed-

release dimethyl fumarate in patients newly diagnosed with relapsing–remitting multiple sclerosis (RRMS). In: *MULTIPLE SCLEROSIS JOURNAL* 2015 (21), S. 57–66.

Gold, Ralf; Kappos, Ludwig; Arnold, Douglas L.; Bar-Or, Amit; Giovannoni, Gavin; Selmaj, Krzysztof et al. (2012): Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. In: *The New England journal of medicine* 367 (12), S. 1098–1107. DOI: 10.1056/NEJMoa1114287.

Goldsmith, H. L.; Spain, S. (1984): Margination of leukocytes in blood flow through small tubes. In: *Microvascular research* 27 (2), S. 204–222.

Goodin, Douglas S. (Hg.) (2014): Handbook of Clinical Neurology : Multiple Sclerosis and Related Disorders: Elsevier.

Gumbleton, Mark; Audus, Kenneth L. (2001): Progress and limitations in the use of in vitro cell cultures to serve as a permeability screen for the blood-brain barrier. In: *Journal of pharmaceutical sciences* 2001, S. 1681–1698.

Haarmann, Axel; Nowak, Eva; Deiß, Annika; van der Pol, Susanne; Monoranu, Camelia-Maria; Kooij, Gijs et al. (2015): Soluble VCAM-1 impairs human brain endothelial barrier integrity via integrin α -4-transduced outside-in signalling. In: *Acta neuropathologica* 129 (5), S. 639–652. DOI: 10.1007/s00401-015-1417-0.

Hamilton, S. E., et al.: Differential Localization of G-proteins, G α o and G α i-1, -2, and -3, in Polarized Epithelial MDCK Cells.

Handel, A. E.; Handunnetthi, L.; Giovannoni, G.; Ebers, G. C.; Ramagopalan, S. V. (2010): Genetic and environmental factors and the distribution of multiple sclerosis in Europe. In: *Eur. J. Neurol.* 17 (9), S. 1210–1214. DOI: 10.1111/j.1468-1331.2010.03003.x.

Hasegawa, Yu; Suzuki, Hidenori; Sozen, Takumi; Rolland, William; Zhang, John H. (2010): Activation of sphingosine 1-phosphate receptor-1 by FTY720 is neuroprotective after ischemic stroke in rats. In: *Stroke; a journal of cerebral circulation* 41 (2), S. 368–374. DOI: 10.1161/STROKEAHA.109.568899.

Haseloff, Reiner F.; Dithmer, Sophie; Winkler, Lars; Wolburg, Hartwig; Blasig, Ingolf E. (2015): Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: structural and functional aspects. In: *Seminars in cell & developmental biology* 38, S. 16–25. DOI: 10.1016/j.semcd.2014.11.004.

Heinzlef, O.; Alamowitch, S.; Sazdovitch, V.; Chillet, P.; Joutel, A.; Tournier-Lasserre, E.; Rouillet, E. (2000): Autoimmune diseases in families of French patients with multiple sclerosis. In: *Acta Neurologica Scandinavica* 101 (1), S. 36–40. DOI: 10.1034/j.1600-0404.2000.101001036.x.

Höer, Ariane; Schiffhorst, Guido; Zimmermann, Anne; Fischaleck, Johann; Gehrman, Luise; Ahrens, Henrik et al. (2014): Multiple sclerosis in

Germany: data analysis of administrative prevalence and healthcare delivery in the statutory health system. In: *BMC Health Serv Res* 14, S. 381. DOI: 10.1186/1472-6963-14-381.

Holick, Michael F. (Hg.) (2010): Vitamin D. Totowa, NJ: Humana Press.

Holman, David W.; Klein, Robyn S.; Ransohoff, Richard M. (2011): The blood-brain barrier, chemokines and multiple sclerosis. In: *Biochimica et biophysica acta* 1812 (2), S. 220–230. DOI: 10.1016/j.bbadis.2010.07.019.

Holman, David W.; Klein, Robyn S.; Ransohoff, Richard M. (2011): The blood-brain barrier, chemokines and multiple sclerosis. In: *Biochimica et biophysica acta* 1812 (2), S. 220–230. DOI: 10.1016/j.bbadis.2010.07.019.

Huang, Gonghua; Wang, Yanyan; Vogel, Peter; Chi, Hongbo (2015): Control of IL-17 receptor signaling and tissue inflammation by the p38 α –MKP-1 signaling axis in a mouse model of multiple sclerosis. In: *Sci. Signal.* (366).

Jilek, Samantha; Schlupe, Myriam; Meylan, Pascal; Vingerhoets, François; Guignard, Laurence; Monney, Anita et al. (2008): Strong EBV-specific CD8+ T-cell response in patients with early multiple sclerosis. In: *Brain* 131 (Pt 7), S. 1712–1721. DOI: 10.1093/brain/awn108.

Kallmann, B.-A. (2002): Characteristic gene expression profile of primary human cerebral

endothelial cells. In: *The FASEB Journal*. DOI: 10.1096/fj.01-0594fje.

Karin, Michael; Ben-Neriah, Yinon (2000): Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF- κ B Activity. In: *Annual Review of Immunology*.

Karni, A.; Abramsky, O. (1999): Association of MS with thyroid disorders. In: *Neurology* 53 (4), S. 883–885.

Kastrati, Irida; Marton, A. Silkos; Calderon-Gierszal, Esther L. (2015): Dimethyl Fumarate Inhibits the Nuclear Factor κ B Pathway in Breast Cancer Cells by Covalent Modification of p65. In: *The Journal of Biological Chemistry*. Online verfügbar unter doi: 10.1074/jbc.M115.679704.

Kirk, John; Plumb, Jonnie; Mirakhur, Meenakshi; McQuaid, Stephen (2003): Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood–brain barrier leakage and active demyelination. In: *J. Pathol.* 201 (2), S. 319–327. DOI: 10.1002/path.1434.

Krankheitsbezogenes Kompetenznetz Multiple Sklerose (2014): KKNMS: Engmaschige Blutbildkontrollen unter Dimethylfumarat unverzichtbar.

Krementsov, Dimitry N.; Thornton, Tina M.; Teuscher, Cory; Rincon, Mercedes (2013): The emerging role of p38 mitogen-activated protein kinase in multiple sclerosis and its models. In:

Molecular and cellular biology 33 (19), S. 3728–3734. DOI: 10.1128/MCB.00688-13.

Krug, Susanne M.; Schulzke, Jörg D.; Fromm, Michael (2014): Tight junction, selective permeability, and related diseases. In: *Seminars in cell & developmental biology* 36, S. 166–176. DOI: 10.1016/j.semcdb.2014.09.002.

Kunze, Reiner; Urrutia, Andrés; Hoffmann, Angelika; Liu, Hui; Helluy, Xavier; Pham, Mirko et al. (2015): Dimethyl fumarate attenuates cerebral edema formation by protecting the blood-brain barrier integrity. In: *Experimental neurology* 266, S. 99–111. DOI: 10.1016/j.expneurol.2015.02.022.

Kurtzke, J. F. (2000): Epidemiology of multiple sclerosis. Does this really point toward an etiology? Lectio Doctoralis. In: *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 21 (6), S. 383–403.

Kutzelnigg, Alexandra; Lassmann, Hans (2014): Pathology of multiple sclerosis and related inflammatory demyelinating diseases. In: *Handbook of clinical neurology* 122, S. 15–58. DOI: 10.1016/B978-0-444-52001-2.00002-9.

Kyriakis, John M.; Avruch, Joseph (2012): Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. In: *Physiological reviews* 92 (2), S. 689–737. DOI: 10.1152/physrev.00028.2011.

Larochelle, Catherine; Alvarez, Jorge Ivan; Prat, Alexandre (2011): How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? In: *FEBS letters* 585 (23), S. 3770–3780. DOI: 10.1016/j.febslet.2011.04.066.

Lassmann, Hans (2013): Pathology and disease mechanisms in different stages of multiple sclerosis. In: *Journal of the neurological sciences* 333 (1-2), S. 1–4. DOI: 10.1016/j.jns.2013.05.010.

Lassmann, Hans; Brück, Wolfgang; Lucchinetti, Claudia F. (2007): The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. In: *Brain Pathol.* 17 (2), S. 210–218. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2007.00064.x.

Lassmann, Brück, Claudia Lucchinetti (2001): Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. In: *TRENDS in Molecular Medicine* 2001 (7), S. 115–121.

Leech, S.; Kirk, J.; Plumb, J.; McQuaid, S. (2007): Persistent endothelial abnormalities and blood-brain barrier leak in primary and secondary progressive multiple sclerosis. In: *Neuropathology and applied neurobiology* 33 (1), S. 86–98. DOI: 10.1111/j.1365-2990.2006.00781.x.

Leray, E.; Moreau, T.; Fromont, A.; Edan, G. (2016): Epidemiology of multiple sclerosis. In: *Revue neurologique* 172 (1), S. 3–13. DOI: 10.1016/j.neurol.2015.10.006.

Levin, Lynn I.; Munger, Kassandra L.; O'Reilly, Eilis J.; Falk, Kerstin I.; Ascherio, Alberto (2010): Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of

multiple sclerosis. In: *Annals of neurology* 67 (6), S. 824–830. DOI: 10.1002/ana.21978.

Linker, Ralf A.; Lee, De-Hyung; Ryan, Sarah; van Dam, Anne M.; Conrad, Rebecca; Bista, Pradeep et al. (2011): Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. In: *Brain : a journal of neurology* 134 (Pt 3), S. 678–692. DOI: 10.1093/brain/awq386.

Lock, C.; Hermans, G.; Pedotti, R.; Brendolan, A.; Schadt, E. H. Garren, A. Langer-Gould, S. Strober, B. Cannella, J. Allard, P. Klonowski, A. Austin, N. Lad, N. Kaminski, S. J. Galli, J. R. Oksenberg, C. S. Raine, R. Heller, L. Steinman (2002): Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. In: *Nature Medicine*. Online verfügbar unter doi:10.1038/nm0502-500.

Loewe, R.; Holnthoner, W.; Groger, M.; Pillinger, M.; Gruber, F.; Mechtcheriakova, D. et al. (2002): Dimethylfumarate Inhibits TNF-Induced Nuclear Entry of NF- B/p65 in Human Endothelial Cells. In: *The Journal of Immunology* 168 (9), S. 4781–4787. DOI: 10.4049/jimmunol.168.9.4781.

Loewe, R.; Pillinger, M.; Martin, R. de; Mrowietz, U.; Groger, M.; Holnthoner, W. et al. (2001): Dimethylfumarate inhibits tumor-necrosis-factor-induced CD62E expression in an NF-kappa B-dependent manner. In: *The Journal of investigative dermatology* 117 (6), S. 1363–1368. DOI: 10.1046/j.0022-202x.2001.01576.x.

- Loftus, Edward V. (2005): Inflammatory bowel disease extending its reach. In: *Gastroenterology* 129 (3), S. 1117–1120. DOI: 10.1053/j.gastro.2005.07.042.
- Lövblad, K-O; Anzalone, N.; Dörfler, A.; Essig, M.; Hurwitz, B.; Kappos, L. et al. (2010): MR imaging in multiple sclerosis: review and recommendations for current practice. In: *AJNR. American journal of neuroradiology* 31 (6), S. 983–989. DOI: 10.3174/ajnr.A1906.
- Lünemann, Jan D.; Edwards, Nancy; Muraro, Paolo A.; Hayashi, Shuhei; Cohen, Jeffrey I.; Münz, Christian; Martin, Roland (2006): Increased frequency and broadened specificity of latent EBV nuclear antigen-1-specific T cells in multiple sclerosis. In: *Brain* 129 (Pt 6), S. 1493–1506. DOI: 10.1093/brain/awl067.
- Lünemann, Jan D.; Jelčić, Ilijas; Roberts, Susanne; Lutterotti, Andreas; Tackenberg, Björn; Martin, Roland; Münz, Christian (2008): EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2. In: *J. Exp. Med.* 205 (8), S. 1763–1773. DOI: 10.1084/jem.20072397.
- Manouchehrinia, Ali; Tanasescu, Radu; Tench, Christopher R.; Constantinescu, Cris S. (2016): Mortality in multiple sclerosis: meta-analysis of standardised mortality ratios. In: *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 87 (3), S. 324–331. DOI: 10.1136/jnnp-2015-310361.

Literaturverzeichnis

Marrie, Ruth Ann; Elliott, Lawrence; Marriott, James; Cossoy, Michael; Blanchard, James; Leung, Stella; Yu, Nancy (2015): Effect of comorbidity on mortality in multiple sclerosis. In: *Neurology*. DOI: 10.1212/WNL.0000000000001718.

Matter, Karl; Balda, Maria S. (2003): Signalling to and from tight junctions. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 4 (3), S. 225–236. DOI: 10.1038/nrm1055.

McQuaid, S.; Plumb, J.; Mirakhur, M.; Kirk, J. (2002): Abnormal endothelial tight junctions in active lesions and normal-appearing white matter in multiple sclerosis. In: *Neuropathol Appl Neurobiol* 28 (2), S. 153. DOI: 10.1046/j.1365-2990.2002.39286_15.x.

Miller, D. S. (2015): Regulation of ABC transporters at the blood-brain barrier. In: *Clinical pharmacology and therapeutics* 97 (4), S. 395–403. DOI: 10.1002/cpt.64.

Miller, David H.; Leary, Siobhan M. (2007): Primary-progressive multiple sclerosis. In: *The Lancet Neurology* 6 (10), S. 903–912. DOI: 10.1016/S1474-4422(07)70243-0.

Mix, Eilhard; Meyer-Rienecker, Hans; Hartung, Hans-Peter (2010): Animal models of multiple sclerosis—Potentials and limitations. In: *Progress in Neurobiology* 2010 (Volume 92, Issue 3,).

Mokry, Lauren E.; Ross, Stephanie; Ahmad, Omar S.; Forgetta, Vincenzo; Smith, George Davey; Goltzman, David et al. (2015): Vitamin D and Risk

of Multiple Sclerosis: A Mendelian Randomization Study. In: *PLoS medicine* 12 (8), e1001866. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001866.

Morgan, L.; Shah, B.; Rivers, L. E.; Barden, L.; Groom, A. J.; Chung, R. et al. (2007): Inflammation and dephosphorylation of the tight junction protein occludin in an experimental model of multiple sclerosis. In: *Neuroscience* 147 (3), S. 664–673. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2007.04.051.

Morgan, L.; Shah, B.; Rivers, L. E.; Barden, L.; Groom, A. J.; Chung, R. et al. (2007): Inflammation and dephosphorylation of the tight junction protein occludin in an experimental model of multiple sclerosis. In: *Neuroscience* 147 (3), S. 664–673. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2007.04.051.

Mousseau, Yoanne; Mollard, Séverine; Richard, Laurence; Nizou, Angélique; Faucher-Durand, Karine; Cook-Moreau, Jeanne et al. (2012): Fingolimod inhibits PDGF-B-induced migration of vascular smooth muscle cell by down-regulating the S1PR1/S1PR3 pathway. In: *Biochimie* 94 (12), S. 2523–2531. DOI: 10.1016/j.biochi.2012.07.002.

Mowry, Ellen M.; Waubant, Emmanuelle; McCulloch, Charles E.; Okuda, Darin T.; Evangelista, Alan A.; Lincoln, Robin R. et al. (2012): Vitamin D status predicts new brain magnetic resonance imaging activity in multiple sclerosis. In: *Annals of neurology* 72 (2), S. 234–240. DOI: 10.1002/ana.23591.

Münz, Christian; Bickham KL, Subklewe M, Tsang ML, Chahroudi A, Kurilla MG, Zhang D, O'Donnell

M, Steinman RM. (2000): Human Cd4+ T Lymphocytes Consistently Respond to the Latent Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen Ebna1. In: *Journal of Experimental Medicine*, S. 1649–1660.

Murata, Masaki; Kojima, Takashi; Yamamoto, Toshinobu; Go, Mitsuru; Takano, Ken-Ichi; Osanai, Makoto et al. (2005): Down-regulation of survival signaling through MAPK and Akt in occludin-deficient mouse hepatocytes in vitro. In: *Experimental cell research* 310 (1), S. 140–151. DOI: 10.1016/j.yexcr.2005.07.017.

Nete M. Nielsen; MSc, MD, PhD; Tine Westergaard, MD, PhD; Morten Frisch, MD, PhD, DMSc; et al (2006): Type 1 Diabetes and Multiple Sclerosis A Danish Population-Based Cohort Study. In: *Arch Neurol* 2006.

Ni, Yawen; Teng, Tao; Li, Runting; Simonyi, Agnes; Sun, Grace Y.; Lee, James C. (2017): TNF α alters occludin and cerebral endothelial permeability: Role of p38MAPK. In: *PloS one* 12 (2), e0170346. DOI: 10.1371/journal.pone.0170346.

Nielsen, Nete M.; Westergaard, Tine; Frisch, Morten; Rostgaard, Klaus; Wohlfahrt, Jan; Koch-Henriksen, Nils et al. (2006): Type 1 diabetes and multiple sclerosis: A Danish population-based cohort study. In: *Archives of neurology* 63 (7), S. 1001–1004. DOI: 10.1001/archneur.63.7.1001.

Noseworthy, John H.; Lucchinetti Claudia; Rodriguez Moses; Weinshenker Brian G. (2000): Multiple Sclerosis. In: *The New England journal of*

medicine 2000, S. 938–952. DOI:
10.1056/NEJM200009283431307.

O'Connor, Kevin C.; McLaughlin, Katherine A.; Jager, Philip L. de; Chitnis, Tanuja; Bettelli, Estelle; Xu, Chenqi et al. (2007): Self-antigen tetramers discriminate between myelin autoantibodies to native or denatured protein. In: *Nature Medicine* 13 (2), S. 211–217. DOI: 10.1038/nm1488.

Omidi, Yadollah; Campbell, Lee; Barar, Jaleh; Connell, David; Akhtar, Saeed; Gumbleton, Mark (2003): Evaluation of the immortalised mouse brain capillary endothelial cell line, b.End3, as an in vitro blood–brain barrier model for drug uptake and transport studies. In: *Brain Research* 990 (1-2), S. 95–112. DOI: 10.1016/S0006-8993(03)03443-7.

Palmer, Alan M. (2013): Multiple sclerosis and the blood-central nervous system barrier. In: *Cardiovasc Psychiatry Neurol* 2013, S. 530356. DOI: 10.1155/2013/530356.

Pardridge, William M. (1987): Human blood-brain barrier transferrin receptor. In: *Metabolism*, S. 892–895. Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0026049587900990>.

Pardridge, William M. (2007): Blood-brain barrier delivery. In: *Drug discovery today* 12 (1-2), S. 54–61. DOI: 10.1016/j.drudis.2006.10.013.

Parodi, Benedetta; Rossi, Silvia; Morando, Sara; Cordano, Christian; Bragoni, Alberto; Motta, Caterina et al. (2015): Fumarates modulate

microglia activation through a novel HCAR2 signaling pathway and rescue synaptic dysregulation in inflamed CNS. In: *Acta neuropathologica* 130 (2), S. 279–295. DOI: 10.1007/s00401-015-1422-3.

Peng, Haiyan; Guerau-de-Arellano, Mireia; Mehta, Veela B.; Yang, Yuhong; Huss, David J.; Papenfuss, Tracey L. et al. (2012): Dimethyl Fumarate Inhibits Dendritic Cell Maturation via Nuclear Factor κ B (NF- κ B) and Extracellular Signal-regulated Kinase 1 and 2 (ERK1/2) and Mitogen Stress-activated Kinase 1 (MSK1) Signaling. In: *The Journal of Biological Chemistry* 287 (33), S. 28017–28026. DOI: 10.1074/jbc.M112.383380.

Petersen, G.; Wittmann, R.; Arndt, V.; Göppfarth, D. (2014): Epidemiologie der Multiplen Sklerose in Deutschland : Regionale Unterschiede und Versorgungsstruktur in Abrechnungsdaten der gesetzlichen Krankenversicherung. In: *Der Nervenarzt* 85 (8), S. 990–998. DOI: 10.1007/s00115-014-4097-4.

Podbielska, Maria; Banik, Naren L.; Kurowska, Ewa; Hogan, Edward L. (2013): Myelin recovery in multiple sclerosis: the challenge of remyelination. In: *Brain sciences* 3 (3), S. 1282–1324. DOI: 10.3390/brainsci3031282.

Privratsky, Jamie R.; Newman, Peter J. (2014): PECAM-1: regulator of endothelial junctional integrity. In: *Cell and tissue research* 355 (3), S. 607–619. DOI: 10.1007/s00441-013-1779-3.

Literaturverzeichnis

- Ramagopalan, Sreeram V.; Sadovnick, A. D. (2011): Epidemiology of Multiple Sclerosis. In: *Neurologic clinics* 29 (2), S. 207–217. DOI: 10.1016/j.ncl.2010.12.010.
- Ransohoff, Richard M.; Kivisäkk, Pia; Kidd, Grahame (2003): Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. In: *Nature reviews. Immunology* 3 (7), S. 569–581. DOI: 10.1038/nri1130.
- Reich, Daniel S.; Lucchinetti, Claudia F.; Calabresi, Peter A. (2018): Multiple Sclerosis. In: *The New England journal of medicine* 378 (2), S. 169–180. DOI: 10.1056/NEJMra1401483.
- Reinhardt, K.; Weiss, S.; Rosenbauer, J.; Gartner, J.; Kries, R. von (2014): Multiple sclerosis in children and adolescents: incidence and clinical picture - new insights from the nationwide German surveillance (2009-2011). In: *European journal of neurology* 21 (4), S. 654–659. DOI: 10.1111/ene.12371.
- Renoux, Christel; Vukusic, Sandra; Mikaeloff, Yann; Edan, Gilles; Clanet, Michel; Dubois, Bénédicte et al. (2007): Natural history of multiple sclerosis with childhood onset. In: *N. Engl. J. Med.* 356 (25), S. 2603–2613. DOI: 10.1056/NEJMoa067597.
- Rubant, Simone A.; Ludwig, Ralf J.; Diehl, Sandra; Hardt, Katja; Kaufmann, Roland; Pfeilschifter, Josef M.; Boehncke, Wolf-Henning (2008): Dimethylfumarate reduces leukocyte rolling in vivo through modulation of adhesion molecule expression. In: *The Journal of investigative*

dermatology 128 (2), S. 326–331. DOI:
10.1038/sj.jid.5700996.

Rucker, Hubert K.; Wynder, Howard J.; Thomas, W.Eric (2000): Cellular mechanisms of CNS pericytes. In: *Brain Research Bulletin* 51 (5), S. 363–369. DOI: 10.1016/S0361-9230(99)00260-9.

Ruth, Ann Marrie; Reider, Nadia; Cohen, Jeffrey; Gary Cutter (2015): A systematic review of the incidence and prevalence of autoimmune disease in multiple sclerosis. In: *MULTIPLE SCLEROSIS JOURNAL* 2015 (21), S. 282–293. DOI:
10.1177/1352458514564490.

Saitou, M.; Furuse, M.; Sasaki, H.; Schulzke, J. D.; Fromm, M.; Takano, H. et al. (2000): Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. In: *Molecular biology of the cell* 11 (12), S. 4131–4142. DOI:
10.1091/mbc.11.12.4131.

Sawcer, Stephen; Ban, Maria; Maranian, Mel; Yeo, Tai Wai; Compston, Alastair; Kirby, Andrew et al. (2005): A high-density screen for linkage in multiple sclerosis. In: *Am. J. Hum. Genet.* 77 (3), S. 454–467. DOI: 10.1086/444547.

Scannevin, Robert H.; Chollate, Sowmya; Jung, Miyoung; Shackett, Melanie; Patel, Hiral; Bista, Pradeep et al. (2012): Fumarates promote cytoprotection of central nervous system cells against oxidative stress via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 341 (1), S. 274–284. DOI: 10.1124/jpet.111.190132.

Schilling, S.; Goelz, S.; Linker, R.; Luehder, F.; Gold, R. (2006): Fumaric acid esters are effective in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis and suppress macrophage infiltration. In: *Clinical and experimental immunology* 145 (1), S. 101–107. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2006.03094.x.

Schmid-Schonbein, G. W.; Usami, S.; Skalak, R.; Chien, S. (1980): The interaction of leukocytes and erythrocytes in capillary and postcapillary vessels. In: *Microvascular research* 19 (1), S. 45–70.

Shimizu Y; van Seventer GA; Horgan KJ, Shaw S. (1990): Roles of Adhesion Molecules in T-Cell Recognition: Fundamental Similarities between Four Integrins on Resting Human T Cells (LFA-1, VLA-4, VLA-5, VLA-6) in Expression, Binding, and Costimulation. In: *Immunol Review*, S. 109–143. Online verfügbar unter <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-065X.1990.tb00563.x/epdf>.

Shin, Taekyun; Ahn, Meejung; Jung, Kyungsook; Heo, Seungdam; Kim, Dohyun; Jee, Youngheun et al. (2003): Activation of mitogen-activated protein kinases in experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *Journal of neuroimmunology* 140 (1-2), S. 118–125. DOI: 10.1016/S0165-5728(03)00174-7.

Siebenlist, Ulrich; Franzoso, Guido; and Keith Brown (1994): Structure, Regulation and Function of NF-kappaB. In: *Annu. Rev. Cell Biol.* 1994 (10), S. 405–455.

Simpson, Steve; Blizzard, Leigh; Otahal, Petr; van der Mei, Ingrid; Taylor, Bruce (2011): Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. In: *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 82 (10), S. 1132–1141. DOI: 10.1136/jnnp.2011.240432.

Smolders, Joost; Moen, Stine Marit; Damoiseaux, Jan; Huitinga, Inge; Holmøy, Trygve (2011): Vitamin D in the healthy and inflamed central nervous system: access and function. In: *J. Neurol. Sci.* 311 (1-2), S. 37–43. DOI: 10.1016/j.jns.2011.07.033.

Stadelmann, Christine; Wegner, Christiane; Brück, Wolfgang (2011): Inflammation, demyelination, and degeneration - recent insights from MS pathology. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1812 (2), S. 275–282. DOI: 10.1016/j.bbadis.2010.07.007.

Stadelmann, Christine; Wegner, Christiane; Brück, Wolfgang (2011): Inflammation, demyelination, and degeneration - recent insights from MS pathology. In: *Biochimica et biophysica acta* 1812 (2), S. 275–282. DOI: 10.1016/j.bbadis.2010.07.007.

Stone, Matthew L.; Sharma, Ashish K.; Zhao, Yunge; Charles, Eric J.; Huerter, Mary E.; Johnston, William F. et al. (2015): Sphingosine-1-phosphate receptor 1 agonism attenuates lung ischemia-reperfusion injury. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 308 (12), S. 52. DOI: 10.1152/ajplung.00302.2014.

Tai, L. M.; Holloway, K. A.; Male, D. K.; Loughlin, A. J.; Romero, I. A. (2010): Amyloid-beta-induced occludin down-regulation and increased

permeability in human brain endothelial cells is mediated by MAPK activation. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 14 (5), S. 1101–1112. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00717.x.

Thacker, Evan L.; Mirzaei, Fariba; Ascherio, Alberto (2006): Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. In: *Ann. Neurol.* 59 (3), S. 499–503. DOI: 10.1002/ana.20820.

Thomas, Eric W. (1999): Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. In: *Brain research reviews*, S. 42–57.

Thompson, Alan J.; Banwell, Brenda L.; Barkhof, Frederik; Carroll, William M.; Coetzee, Timothy; Comi, Giancarlo et al. (2018): Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. In: *The Lancet Neurology* 17 (2), S. 162–173. DOI: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2.

Thorley-Lawson, D. A. (2001): Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. In: *Nat. Rev. Immunol.* 1 (1), S. 75–82. DOI: 10.1038/35095584.

Treumer, Felix; Zhu, Kejian; Gläser, Regine; Mrowietz, Ulrich (2003): Dimethylfumarate is a potent inducer of apoptosis in human T cells. In: *The Journal of investigative dermatology* 121 (6), S. 1383–1388. DOI: 10.1111/j.1523-1747.2003.12605.x.

Tzima, Eleni; Irani-Tehrani, Mohamed; Kiosses, William B.; Dejana, Elizabetta; Schultz, David A.; Engelhardt, Britta et al. (2005): A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response

to fluid shear stress. In: *Nature* 437 (7057), S. 426–431. DOI: 10.1038/nature03952.

Umeda, Kazuaki; Ikenouchi, Junichi; Katahira-Tayama, Sayaka; Furuse, Kyoko; Sasaki, Hiroyuki; Nakayama, Mayumi et al. (2006): ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. In: *Cell* 126 (4), S. 741–754. DOI: 10.1016/j.cell.2006.06.043.

van Doorn, Ruben; Lopes Pinheiro, Melissa A.; Kooij, Gijs; Lakeman, Kim; van het Hof, Bert; van der Pol, Susanne M A et al. (2012): Sphingosine 1-phosphate receptor 5 mediates the immune quiescence of the human brain endothelial barrier. In: *Journal of neuroinflammation* 9, S. 133. DOI: 10.1186/1742-2094-9-133.

Vandenbroucke, Emily; Mehta, Dolly; Minshall, Richard; Malik, Asrar B. (2008): Regulation of endothelial junctional permeability. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1123, S. 134–145. DOI: 10.1196/annals.1420.016.

Vandermeeren, M.; Janssens, S.; Wouters, H.; Borghmans, I.; Borgers, M.; Beyaert, R.; Geysen, J. (2001): Dimethylfumarate is an inhibitor of cytokine-induced nuclear translocation of NF-kappa B1, but not RelA in normal human dermal fibroblast cells. In: *The Journal of investigative dermatology* 116 (1), S. 124–130. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2001.00211.x.

Vandermeeren, Marc; Janssens, Sophie; Borgers, Marcel; Geysen, Johan (1997): Dimethylfumarate Is

an Inhibitor of Cytokine-Induced E-Selectin, VCAM-1, and ICAM-1 Expression in Human Endothelial Cells. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 234 (1), S. 19–23. DOI: 10.1006/bbrc.1997.6570.

Venci, Jineane V.; Gandhi, Mona A. (2013): Dimethyl fumarate (Tecfidera): a new oral agent for multiple sclerosis. In: *The Annals of pharmacotherapy* 47 (12), S. 1697–1702. DOI: 10.1177/1060028013509232.

Voraberger, G.; Schäfer, R.; Stratowa, C. (1991): Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5'-regulatory region. Induction by cytokines and phorbol ester. In: *J. Immunol* (147), S. 2777–2786.

Wallbrecht, Katrin; Drick, Nora; Hund, Anna-Carina; Schön, Michael P. (2011): Downregulation of endothelial adhesion molecules by dimethylfumarate, but not monomethylfumarate, and impairment of dynamic lymphocyte-endothelial cell interactions. In: *Experimental dermatology* 20 (12), S. 980–985. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2011.01376.x.

Wallbrecht, Katrin; Drick, Nora; Hund, Anna-Carina; Schön, Michael P. (2011): Downregulation of endothelial adhesion molecules by dimethylfumarate, but not monomethylfumarate, and impairment of dynamic lymphocyte-endothelial cell interactions. In: *Experimental dermatology* 20 (12), S. 980–985. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2011.01376.x.

Wingerchuk, Dean M.; Carter, Jonathan L. (2014): Multiple sclerosis: current and emerging disease-modifying therapies and treatment strategies. In: *Mayo Clinic proceedings* 89 (2), S. 225–240. DOI: 10.1016/j.mayocp.2013.11.002.

Winkler, Ethan A.; Bell, Robert D.; Zlokovic, Berislav V. (2011): Central nervous system pericytes in health and disease. In: *Nature neuroscience* 14 (11), S. 1398–1405. DOI: 10.1038/nn.2946.

Wittchen, E. S.; Haskins, J.; Stevenson, B. R. (1999): Protein Interactions at the Tight Junction. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (49), S. 35179–35185. DOI: 10.1074/jbc.274.49.35179.

Wittchen, E. S.; Haskins, J.; Stevenson, B. R. (1999): Protein Interactions at the Tight Junction. ACTIN HAS MULTIPLE BINDING PARTNERS, AND ZO-1 FORMS INDEPENDENT COMPLEXES WITH ZO-2 AND ZO-3. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (49), S. 35179–35185. DOI: 10.1074/jbc.274.49.35179.

World Health Organization (2008): Atlas multiple sclerosis resources in the world 2008. Online verfügbar unter http://www.who.int/mental_health/neurology/atlas_multiple_sclerosis_resources_2008/en/.

World Health Organization (2013): Atlas-of-MS.

Wu, Gregory F.; Alvarez, Enrique (2011): The immunopathophysiology of multiple sclerosis. In: *Neurologic clinics* 29 (2), S. 257–278. DOI: 10.1016/j.ncl.2010.12.009.

Literaturverzeichnis

Xing, Xiaojing; Yang, Ji; Yang, Xiaoqin; Wei, Yi; Zhu, Lubing; Di Gao; Li, Ming (2013): IL-17A induces endothelial inflammation in systemic sclerosis via the ERK signaling pathway. In: *PloS one* 8 (12), S. e85032. DOI: 10.1371/journal.pone.0085032.

Zhao, Xiurong; Sun, Guanghua; Ting, Shun-Ming; Song, Shen; Zhang, Jie; Edwards, Nancy J.; Aronowski, Jaroslaw (2015): Cleaning up after ICH: the role of Nrf2 in modulating microglia function and hematoma clearance. In: *Journal of neurochemistry* 133 (1), S. 144–152. DOI: 10.1111/jnc.12974.

Zhao, Xiurong; Sun, Guanghua; Zhang, Jie; Ting, Shun-Ming; Gonzales, Nicole; Aronowski, Jaroslaw (2015): Dimethylfumarate protects brain from damage produced by intracerebral hemorrhage by mechanism involving Nrf2. In: *Stroke; a journal of cerebral circulation* 46 (7), S. 1923–1928. DOI: 10.1161/STROKEAHA.115.009398.

Zlokovic, Berislav V. (2008): The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. In: *Neuron* 57 (2), S. 178–201. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.01.003.

7. **Abbildungsverzeichnis**

- Abbildung 1: Übersicht des Zusammenspiels
verschiedener pathophysiologischer
Vorgänge, die an der Entstehung der MS
beteiligt sind..... 13
- Abbildung 2: An der T-Zell Migration über die BHS
beteiligte molekulare Mechanismen. ... 27
- Abbildung 3: FSE reduzierten nicht die quantitative
Adhäsion von T-Zellen an HCEC unter
inflammatorischer Stimulation mit TNF- α
und IFN- γ 77
- Abbildung 4: FSE reduzierten nicht die quantitative
Adhäsion von T-Zellen an HCEC unter
inflammatorischer Stimulation mit IL-
1 β 79
- Abbildung 5: FSE nahmen keinen Einfluss auf die Stärke
der Adhäsion von T-Zellen an HCEC unter
inflammatorischer Stimulation mit IL-
1 β 81

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 6: ICAM-1 Expression wurde durch inflammatorische Stimulation gesteigert..... 85
- Abbildung 7: Inflammatorische Stimulation verstärkte die ICAM-1 Expression. Durch FSE wurde sie weder basal noch unter Inflammation reduziert. 87
- Abbildung 8: Die ALCAM Expression änderte sich bei inflammatorischer Stimulation oder FSE-Behandlung nicht. 88
- Abbildung 9: Frühe Kerntranslokation von NFκB/p65 unter inflammatorischer Stimulation mit IL-1β 93
- Abbildung 10: DMF inhibierte bei einer Konzentration von 50 μM die nukleäre Translokation von NFκB/p65 in HUVEC. 95
- Abbildung 11: In DMSO gelöste FSE hemmten unter inflammatorischer Stimulation die NFκB/p65-Translokation in HCEC nicht..... 98
- Abbildung 12: In Ethanol gelöste FSE hemmten unter inflammatorischer Stimulation die NFκB/p65-Translokation in HCEC nicht. 100

Abkürzungsverzeichnis

- Abbildung 13: FSE inhibierten unabhängig vom Lösungsmittel nicht die IL-1 β -vermittelte p38 Aktivierung in HCEC. 103
- Abbildung 14: Unter IL-1 β -Stimulation lag in HCEC weniger phosphorylierte ERK im Zytoplasma vor. Tendenziell aktivierten FSE dosisabhängig diese Phosphorylierung..... 105

8. Abkürzungsverzeichnis

A

AJ *adherens Junction*
ALCAM *activated leukocyte cell adhesion molecule*
AMT
adsorptionsvermittelte Transzytose
Aqua dest *Aqua destillata*
ARE *antioxidant responsive element*

B

BCA *bicinchoninic acid*
BHS *Blut-Hirn-Schranke*
BM *Basalmembran*
BMDCs *bone marrow-derived dendritic cells*
BRCA *breast cancer resistance proteine*

Abkürzungsverzeichnis

BSA *Bovines Serum
Albumin*

D

DMF *Dimethylfumarat*

E

EAE *experimentelle
autoimmune*

Enzephalomyelitis

EBNA1 *Epstein-Barr
nuclear antigen 1*

EBV *Epstein-Barr-
Virus*

ECL *enhanced
luminol-based
substrate*

EDSS
*expanded disability
status scale*

ERK *extracellular
signal-regulated
kinases*

F

FSE *Fumarsäureester*

FSC *forward scatter*

G

GPCRs *G-Protein-
gekoppelte
Rezeptoren*

H

HCAR2
*hydroxycarboxylic
acid receptor 2*

HCEC *human cerebral
endothelial cells*

HUVEC *human
umbilical vein
endothelial cells*

I

ICAM *interzelluläres
Adhäsions Molekül*

IF *Interferon*

IL *Interleukin*

J

JAM *junctional
adhesion molecule*

JCV *John-
Cunningham-Virus*

JNK *c-Jun-N-
terminale Kinase*

Abkürzungsverzeichnis

K

KKNMS

*Krankheitsbezogene
Kompetenznetz
Multiple Sklerose*

L

LAM

*leukocyte adhesion
molecule*

LFA-1 *leukocyte*

*function-associated
antigen-1*

M

MAGUKs *membran-
associated*

*guanylate kinase-
like proteins*

MAP *mitogen-*

activated protein

MBP *myelin basic
protein*

MHC *major*

*histocompatibility
complex*

MMF

Monomethylfumarat

MMP *Matrix*

Metalloprotease

MOG *Myelin-*

*Oligodendrozyten-
Glykoprotein*

MRT

*Magnetresonanztom
ographie*

MS *Multiple Sklerose*

N

NAWM *normal*

*appearing white
matter*

NF κ B *Nekrosefaktor-
 κ B*

Nrf2 *nuclear factor-
erythroid 2-related
factor 2*

P

PBS *phosphat
buffered saline*

PECAM-1 *platelet
endothelial cell
adhesion molecule
1*

Pgp *P-Glykoproteine*

PLP *proteolipid
protein*

PMA *Phorbol-12-
myristat-13-acetat*

PML *progressive
multifokale
Leukenzephalopathi
e*

PPMS
*primär progrediente
Multiple Sklerose*

PSGL-1 *P-Selektin-
Glykoprotein-
Ligand-1*

R

RMT
*rezeptorvermittelter
Transzytose*

RRMS
*relapsing/remitting
Multiple Sklerose*

S

S1PR *Sphingosin-1-
Phosphat-Rezeptor*

SDS-Page *sodium
dodecyl sulfate
polyacrylamide gel
electrophoresis*

SGLT-1 *sodium-
dependent glucose
transporter-1*

SLC-Transporter
*solute carrier-
Transporter*

SSC *side scatter*

T

TJ *Tight Junction*

TNF
Tumornekrosefaktor

V

VCAM *vascular cell
adhesion molecule*

VE-Cadherin *vascular
endothelial cadherin*

VEGF *vascular
endothelial growth
factor*

Z

z.B. *zum Beispiel*

ZO *Zonula occludens*

Danksagung

Mein großer Dank gilt zunächst Herrn PD Dr. Mathias Buttman für die Vergabe des Promotionsthemas und seiner hilfreichen, freundlichen und konstruktiven Unterstützung während der gesamten Zeit.

Außerdem gilt ganz besonderer Dank Herrn Dr. Axel Haarmann für die konstante engagierte Betreuung bei der Durchführung des praktischen und theoretischen Teils dieser Arbeit. Bei Problemen jeder Art stand er mir immer unterstützend zur Seite und konnte mich mit wertvollen Ratschlägen immer wieder neu motivieren und begeistern.

Ich möchte auch der gesamten Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft danken.

Mein innigster Dank gilt jedoch meinen Eltern und meinem Bruder, ohne deren Fürsorge und Geduld diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zuletzt danke ich auch Markus Knauer und Aenne
Stöckmann für die ständige Hilfestellung.

Curriculum Vitae

Mathias Julius Nehen

Persönliche Daten

Geburtsdatum:

02/01/1990 (Essen)

Geburtsort:

Essen

Familienstand:

ledig

Nationalität:

Deutsch

Kontakt

Anschrift:

Mathias Julius Nehen
Felicitas-Kukuck-Straße 9c
22765 Hamburg

E-mail:

mathias-nehén@hotmail.com

Ausbildung

2016 (November) Staatsexamen	Drittes Julius- Maximilians-Universität Würzburg
2015 (Oktober) Staatsexamen	Zweites Julius- Maximilians-Universität Würzburg
2012 (März) Staatsexamen	Erstes Julius- Maximilians-Universität Würzburg
2010 (April) - 2016 (November) Humanmedizin	Studium der Julius- Maximilians- Universität Würzburg
2009 (Juni)	Abitur Burggymnasium Essen

Publikation

Fumaric Acid Esters Do Not Reduce Inflammatory NF- κ B/p65 Nuclear Translocation, ICAM-1 Expression and T-Cell Adhesiveness of Human Brain Microvascular Endothelial Cells. Haarmann A., Nehen M., Buttman M.
in: Int J Mol Sci. 2015 Aug 13;16(8):19086-95

Praktische Erfahrungen

Ab 2019 Februar Klinik	Assistenzarzt – Medizinische Krankenhaus Buchholz, Buchholz in der Nordheide
2017 (September) Gastroenterologie – 2018 (Dezember) Schweinfurt	Assistenzarzt - Leopoldina Krankenhaus,
2016 (Juni - Oktober)	PJ-Tertial - Anästhesie Krankenhaus Reinbek St. Adolf-Stift, Hamburg
2016 (März - Juni)	PJ-Tertial - Chirurgie University Hospital of the West Indies, Kingston, Jamaika
2015 (November) - 2016 (März)	PJ-Tertial - Innere Medizin Leopoldina Krankenhaus, Schweinfurt
2015 (März)	Famulatur - Allgemeinmedizin Ubombo Sugar Hospital, Big Bend, Swaziland
2014 (April - September)	Labortätigkeit im Rahmen der Dissertation Universitätsklinikum Würzburg Neurologische Klinik
2013 (September)	Famulatur - Orthopädie Orthopädische Praxis Dr. John, Essen
2013 (März)	Famulatur - Kardiologie Asklepios Klinik St. Georg, Hamburg
2012 (September)	Famulatur - Geriatrie Elisabeth-Krankenhaus, Essen
2009 (Juli) - 2010 (März)	Zivildienst Elisabeth-Krankenhaus, Essen