

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik

der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. Jens Volkmann

**EXPRESSION UND FUNKTION VON INTEGRIN α -4
IN HUMANEN ZEREBRALEN ENDOTHELZELLEN**

Analysen unter Zuhilfenahme des therapeutisch eingesetzten
Antikörpers Natalizumab

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Eva Nowak

aus Herzogenaurach

Würzburg, Oktober 2013

Referent: Prof. Dr. Guido Stoll

Koreferent: Prof. Dr. Jörg Wischhusen

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 05.06.2014

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Multiple Sklerose	1
1.1.1	Epidemiologie und Symptomatik	1
1.1.2	Pathogenese	2
1.2	Entzündungsprozesse allgemein sowie im zentralen Nervensystem	4
1.3	Entzündungsgeschehen bei Multipler Sklerose	9
1.4	Natalizumab und Integrin α -4	10
1.4.1	Herstellung und Zulassung von Natalizumab.....	11
1.4.2	Vermutete Wirkung von Natalizumab bei Multipler Sklerose unter Darstellung der möglichen Bindungspartner von Integrin α -4.....	13
1.5	Fragestellung	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Material	18
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	18
2.1.2	Chemikalien und Lösungen	19
2.1.3	Rekombinante Proteine	22
2.1.4	Reaktionslösungen und spezielle Reagenzien	22
2.1.5	Antikörper.....	23
2.1.6	Proteinmarker	27
2.1.7	Zellen	28
2.1.8	Protokolle	30
2.1.9	Standard-Zentrifugenprogramm für Zellkultur	35
2.1.10	Computerprogramme.....	35
2.2	Methoden	36
2.2.1	Zellkultur	36
2.2.2	Immunzytochemische Färbungen.....	37
2.2.3	Durchflusszytometrie.....	39
2.2.4	Untersuchungen zum Adhäsionsverhalten	40
2.2.5	Western Blot.....	43
3	Ergebnisse.....	48
3.1	Subzelluläres Verteilungsmuster von Integrin α -4 und β -1 in zerebralen Endothelzellen mittels immunzytochemischer Färbung.....	48

3.2	Untersuchungen am Durchflusszytometer hinsichtlich der basalen und stimulierten Expression der Integrine α -4 und β -1	55
3.3	Beobachtung der Adhäsion von Endothelzellen nach Zugabe von Natalizumab und Kontrollantikörpern	62
3.3.1	Adhäsionsverhalten bei Integrin α -4-Nachweis	67
3.3.2	Adhäsionsverhalten bei fehlendem Nachweis von Integrin α -4.....	74
3.4	Western-Blot-Analyse von Proteinen verschiedener Signalkaskaden nach Stimulation mit löslichem VCAM-1	76
4	Diskussion	80
4.1	Integrin α -4-Expression auf primären humanen zerebralen Endothelzellen ...	80
4.2	Blockade der Adhäsion primärer Endothelzellen an Fibronectin durch Natalizumab.....	83
4.3	Aktivierung der Proteinkinase p38 in Endothelzellen nach Stimulation mit löslichem VCAM-1	85
5	Zusammenfassung	87
6	Literaturverzeichnis.....	88
7	Abbildungsverzeichnis	97
8	Herstellerverzeichnis	98
9	Abkürzungen	101
10	Danksagung	105

1 Einleitung

In den letzten Jahren ergaben sich auf vielen Gebieten der Medizin neue, hochselektive Therapieansätze durch den Einsatz von Antikörpern. Zur Behandlung der Multiplen Sklerose (MS) wurde 2006 Natalizumab zugelassen, ein humanisierter, monoklonaler Antikörper gegen Integrin α -4. Neben einer direkten Blockade der Leukozytenextravasation durch Bindung an aktivierte Immunzellen übt dieser Antikörper wahrscheinlich eine Reihe weiterer, noch unzureichend charakterisierter Effekte aus. Zur Annäherung an die Frage nach der möglichen Wirkweise von Natalizumab sollen zunächst die der MS zugrunde liegenden Pathomechanismen zusammengefasst werden. Anschließend folgt eine nähere Betrachtung des Antikörpers und seiner Zielstruktur Integrin α -4. Die Tatsache, dass das Antigen auf unterschiedlichen Zellen vorkommt und dort wiederum mit mehreren Strukturen interagiert, macht deutlich, dass Natalizumab potentiell Einfluss auf zahlreiche Molekülinteraktionen nehmen kann.

1.1 Multiple Sklerose

1.1.1 Epidemiologie und Symptomatik

Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), in deren Pathogenese eine Autoimmunreaktion gegen Proteine der zentralen Myelinscheiden wahrscheinlich eine entscheidende Bedeutung besitzt (Dutta, Trapp 2007). Weltweit sind derzeit etwa zwei Millionen Menschen erkrankt, wobei Frauen etwa doppelt so häufig betroffen sind wie Männer (Dutta, Trapp 2007). In Europa und Nordamerika ist die MS die wichtigste Ursache einer nicht traumatisch bedingten neurologischen Behinderung bei jungen Erwachsenen (Pittock, Lucchinetti 2007). Die genaue Ätiologie der Erkrankung konnte trotz intensiver Forschung bisher noch nicht vollständig geklärt werden. Neben einer genetischen Disposition wird auch die Beteiligung exogener Faktoren, wie z.B. bestimmte Virusinfektionen, als Ursache der Aktivierung autoreaktiver Immunzellen diskutiert (Markowitz 2007).

Von großer Bedeutung für eine wirksame Behandlung ist die Früherkennung einer MS-Erkrankung. Erstsymptome können beispielsweise in Form einer Optikusneuritis oder einer Myelitis transversa auftreten; dabei spricht man dann zunächst von einem „klinisch isolierten Syndrom“ (CIS: *clinically isolated syndrome*; Thrower 2007). Zur endgültigen Diagnose der MS sind insgesamt mehrere, zeitlich versetzt auftretende neurologische Symptome oder kernspintomographische Veränderungen im Sinne einer zeitli-

chen und räumlichen Dissemination Voraussetzung (Nielsen, Korteweg et al. 2007). Die Wahrscheinlichkeit, nach einem CIS an einer MS zu erkranken, hängt vom Vorliegen zusätzlicher Risikofaktoren wie radiologisch nachgewiesenen Läsionen im ZNS oder einem positiven Liquorbefund mit oligoklonalen Banden ab (Thrower 2007).

Weitere mögliche Frühmanifestationen der MS sind Doppelbilder oder auch das positive Nackenbeugezeichen (sog. Lhermitte-Zeichen): Hierbei treten bei Nackenbeugung Parästhesien an Rumpf und Extremitäten auf (Noseworthy et al. 2000). Zerebelläre Ausfälle, wie z.B. Ataxie, Koordinationsstörungen und Intentionstremor, sowie rasche Ermüdbarkeit (Fatigue) sind ebenfalls typische klinische Symptome (Compston, Coles 2002). Im weiteren Verlauf der Erkrankung treten oft Gangunsicherheit, spastische Paresen, gesteigerte Muskeleigenreflexe und Störungen der Sensibilität sowie der Blasenfunktion auf (Noseworthy et al. 2000; Crayton, Rossman 2006; Compston, Coles 2002).

Bezüglich des Erkrankungsverlaufs werden bei der MS verschiedene Formen unterschieden. Besonders häufig ist dabei die sog. schubförmig-remittierende MS (*relapsing-remitting* MS; RRMS), die durch Krankheitsschübe und anschließende Phasen der Besserung gekennzeichnet ist (Dutta, Trapp 2007; Noseworthy et al. 2000). Diese Form kann meist nach Jahren in eine sekundär progrediente MS (*secondary progressive* MS; SPMS) übergehen, in deren Verlauf bleibende neurologische Defizite auftreten (Dutta, Trapp 2007). Bei einigen Patienten (ca. 10 %) wird von Anfang an eine chronisch progrediente Verschlechterung beobachtet (*primary progressive* MS; PPMS; Dutta, Trapp 2007). Die Ausprägung der Behinderung im Alltag kann dabei individuell sehr unterschiedlich sein und hängt vor allem von der Regeneration nach einem Schub bzw. von der Progressionstendenz der Erkrankung ab (Compston, Coles 2002).

1.1.2 Pathogenese

Wichtigstes Korrelat zu den wechselnden neurologischen Ausfallerscheinungen ist das zeitlich gestaffelte Auftreten multipler entzündlicher Läsionen (Noseworthy et al. 2000) hauptsächlich in der weißen Substanz des ZNS (Lassmann et al. 2007). Prädilektionsstellen sind periventrikuläre Areale, Hirnstamm, Kleinhirn, Rückenmark sowie die Sehnerven (Pittock, Lucchinetti 2007; Noseworthy et al. 2000). Ein Nachweis aktiv entzündlicher Foci kann, mit allerdings relativ geringer Sensitivität, durch eine Gadolinium (Gd)-Anreicherung in der Magnetresonanztomographie (MRT) geführt werden (Compston, Coles 2002).

Die zum Teil in der Bildgebung sichtbaren Plaques entstehen im Rahmen einer erhöhten Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke (BHS) für Entzündungszellen, die zunächst v.a. zu einer akuten Schädigung der Myelinscheiden führen, aber auch bereits früh zu einem Axonverlust und im Verlauf zu einer Gliose (Compston, Coles 2002). Histologisch lassen sich inaktive hypozelluläre Läsionen von aktiven Arealen unterscheiden, die durch Myelinabbauprodukte in den zahlreichen Makrophagen charakterisiert sind (Pittock, Lucchinetti 2007; Noseworthy et al. 2000). Auch außerhalb der Plaques findet sich in histologischen Untersuchungen bei MS-Patienten eine diffuse Leukozyteninfiltration, die ebenfalls mit einem Axonverlust einhergehen kann (Lassmann et al. 2007).

Viele Erkenntnisse über die Pathogenese der MS wurden im Tiermodell, insbesondere der sog. Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), gewonnen (Ransohoff et al. 2003, Engelhardt 2008). Hierbei handelt es sich um eine durch autoreaktive T-Zellen ausgelöste Erkrankung, die der MS, je nach erkrankter Spezies und verwendetem EAE-Modell, in unterschiedlichen Aspekten ähnlich ist. Diese T-Zellen richten sich gegen körpereigene Myelinbestandteile und können entweder von kranken auf gesunde Tiere übertragen oder durch eine aktive Immunisierung im Tier selbst erzeugt werden (Ransohoff et al. 2003). Das Modell bietet gute Anhaltspunkte hinsichtlich der Pathogenese einer demyelinisierenden Autoimmunerkrankung; jedoch ist eine generelle Übertragung auf die humane MS-Erkrankung wie bei jedem Tiermodell nicht uneingeschränkt möglich.

Sowohl bei MS als auch bei EAE basieren die der Demyelinisierung zugrunde liegenden immunpathologischen Mechanismen unter anderem auf einer T-Zell-vermittelten Entzündungsreaktion, die durch verschiedene inflammatorische Zytokine aufrechterhalten wird (Pittock, Lucchinetti 2007). Besonders die CD4⁺-T-Helferzellen (Th: T-Helferzelle, CD: *cluster of differentiation*), die wiederum in verschiedene Klassen unterteilt werden können, spielen hierbei eine wichtige Rolle. Während Th₁-Zellen typischerweise die zelluläre Immunität vermitteln, wird über die Th₂-Antwort vor allem die humorale Abwehr initiiert (von Andrian, Mackay 2000). Die ursprüngliche Ansicht, dass die Autoimmunerkrankung MS wie die EAE hauptsächlich auf autoreaktiven Th₁-Zellen beruht, wird derzeit jedoch in Frage gestellt (Pittock, Lucchinetti 2007). Vielmehr gewinnt eine neue Klasse von T-Helferzellen an Bedeutung, die sogenannten Th₁₇-Zellen: Diese Zellen können Interleukin-17 (IL-17) produzieren (Tesmer et al. 2008) und sind im Tiermodell (EAE) zur Übertragung der Erkrankung fähig (Langrish et al. 2005). Die Differenzierung zu Th₁₇-Populationen wird durch die Zytokine IL-6

und TGF- β (*transforming growth factor- β*) gesteuert (Kikly et al. 2006). Darüber hinaus benötigen die Th₁₇-Zellen für ihr Überleben IL-23, das bei der EAE in erhöhter Konzentration zu finden ist (Zhang et al. 2003). Auch bei MS-Patienten findet man das von antigenpräsentierenden Zellen (APC: *antigen-presenting cells*) sezernierte IL-23 sowie das IL-17 der Th₁₇-Zellen in erhöhten Konzentrationen (Kikly et al. 2006; Tesmer et al. 2008). Daher geht man derzeit bezüglich der Pathogenese der MS von einem Zusammenhang zwischen IL-23 und Th₁₇-Zellen aus.

Die endgültige lokale Demyelinisierung im ZNS beruht schließlich auf dem Zusammenspiel weiterer Elemente des Immunsystems wie Makrophagen, zytotoxischer T-Zellen, autoreaktiver Antikörper und aktivierter Komplementfaktoren (Noseworthy et al. 2000; Pittock, Lucchinetti 2007). Darüber hinaus werden auch pathologische Vorgänge in Oligodendrozyten (Dutta, Trapp 2007) diskutiert, die zum Abbau des Myelins führen bzw. ihn beschleunigen. Mögliche Störungen sind eine erhöhte Apoptoserate im Zusammenhang mit einer Degeneration des myelinassoziierten Glycoproteins (MAG), ein pathologischer Zellmetabolismus durch genetische Defekte sowie eine verminderte Regenerationsfähigkeit (Pittock, Lucchinetti 2007). Besonders wichtig für eine mögliche Remission nach einem akuten Erkrankungsschub ist eine Reorganisation der Oligodendrozyten und teilweise auch eine Remyelinisierung in den betroffenen Arealen unter Stimulation mit Wachstumsfaktoren und Zytokinen (Compston, Coles 2002).

Ein zentrales Element der Pathogenese der entzündlichen ZNS-Läsionen ist der Übertritt peripher aktivierter Leukozyten über die BHS. Im Folgenden werden daher zunächst die Leukozytenextravasation allgemein und die Bedeutung der BHS in diesem Zusammenhang dargestellt, bevor nochmals auf spezielle Situation bei der MS eingegangen wird.

1.2 Entzündungsprozesse allgemein sowie im zentralen Nervensystem

Entzündungsreaktionen im menschlichen Organismus entstehen normalerweise zur Abwehr körperfremder Strukturen, wie z.B. verschiedener Krankheitserreger. Im Rahmen einer pathologischen Autoimmunreaktion können sich Entzündungsherde aber auch ohne exogene Trigger bilden und sich dann gegen körpereigene Strukturen richten.

In beiden Fällen gelangen spezialisierte Zellen des Immunsystems über den Blutstrom zum Entzündungsherd und werden dort aktiviert. Wichtige Abwehrzellen sind bei-

spielsweise Granulozyten sowie B- und T-Lymphozyten. Für deren Koordination sind außerdem Entzündungsmediatoren unerlässlich. Hierzu zählen verschiedene Zytokine, wie z.B. die Chemokine, die sowohl von Endothelzellen als auch von lokalen Immunzellen ausgeschüttet werden und die Leukozytenaktion koordinieren.

Für die lokale Entzündungsreaktion im Gewebe spielt die Extravasation der Leukozyten in der Nähe des Inflammationsareals eine zentrale Rolle. Außerhalb von lymphatischen Strukturen geschieht dies in erster Linie an den postkapillären Venulen (Ransohoff et al. 2003). Dieser Vorgang des Übertritts von Zellen aus dem Blut in das angrenzende Gewebe lässt sich in verschiedene Phasen einteilen, an denen jeweils spezielle Oberflächenstrukturen beteiligt sind (s. Abbildung 1). Zunächst müssen die Leukozyten, die im Blutstrom Geschwindigkeiten von 1-5 mm/s (Norman, Hickey 2005) erreichen, abgebremst werden. Dieser Vorgang, das sog. *tethering*, wird durch kurzfristige, relativ instabile Interaktionen zwischen Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten und Endothelzellen vermittelt (von Andrian, Mackay 2000). Bei den beteiligten molekularen Strukturen handelt es sich hauptsächlich um Glycopeptide, Selectine und Selectinliganden (Norman, Hickey 2005). Diese befinden sich zum Großteil an Mikrovillistrukturen der Leukozyten (Luster et al. 2005).

Durch das kurze Anhaften am Endothel verringert sich die Geschwindigkeit der Leukozyten und ihre Bewegung geht in ein Rollen über. Hierbei spielen ebenfalls Selectine aber auch auf Leukozytenoberflächen exprimierte Integrin-Heterodimere wie das Integrin α -4/ β -1 (auch VLA-4 für *very late antigen-4* bzw. CD49d-CD29 genannt) und das Integrin α -4/ β -7 sowie deren endotheliale Interaktionspartner VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) und MAdCAM (*mucosa addressin cell adhesion molecule*) eine Rolle (Norman, Hickey 2005). Die Stärke der Bindungen an das Endothel wird über inflammatorische Stimuli, insbesondere über lokal wirkende Chemokine, gesteuert. So ermöglichen beispielsweise die Integrine LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1* oder Integrin α -L/ β -2) und Integrin α -4/ β -1 in ihrem aktivierten Zustand eine wesentlich stabilere Anheftung an endotheliale ICAM- (*intercellular adhesion molecule*) bzw. VCAM-Moleküle (Molteni et al. 2006). Schließlich kommt es über diese Zell-Zellinteraktionen zum vollständigen Arrest der Leukozyten im Inflammationsareal. Daraufhin kann die eigentliche Extravasation der Entzündungszellen aus den Blutgefäßen erfolgen (Norman, Hickey 2005). Dieser Vorgang wird ebenfalls über Chemokine mit Hilfe eines Gradienten gesteuert (von Andrian, Mackay 2000) und kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen: Am häufigsten wird die parazelluläre

Migration der Leukozyten (Engelhardt, Wolburg 2004; Molteni et al. 2006) beschrieben, die auf der kurzfristigen Auflösung der Interzellularkontakte des Endothels beruht. Über Signalkaskaden kommt es zu Veränderungen im Zytoskelett und damit zu einer „Kontraktion“ der Endothelzellen mit Auflockerung der Interzellularkontakte (Engelhardt, Wolburg 2004; Molteni et al. 2006). Eine weitere Möglichkeit der Extravasation ist der transzelluläre Weg (Luster et al. 2005), bei dem sich die Leukozyten durch die Endothelzellen hindurch bewegen. Auch hierfür sind sowohl endotheliale als auch leukozytäre Aktivierungen und Bewegungsvorgänge nötig (Molteni et al. 2006).

Für die anschließende Fortbewegung in der extrazellulären Matrix (ECM: *extracellular matrix*) sind wiederum verschiedene Integrine (insbesondere auch Integrin α -4/ β -1) auf der Leukozytenoberfläche nötig, die z.B. an Fibronectin und Laminin binden können (Molteni et al. 2006).

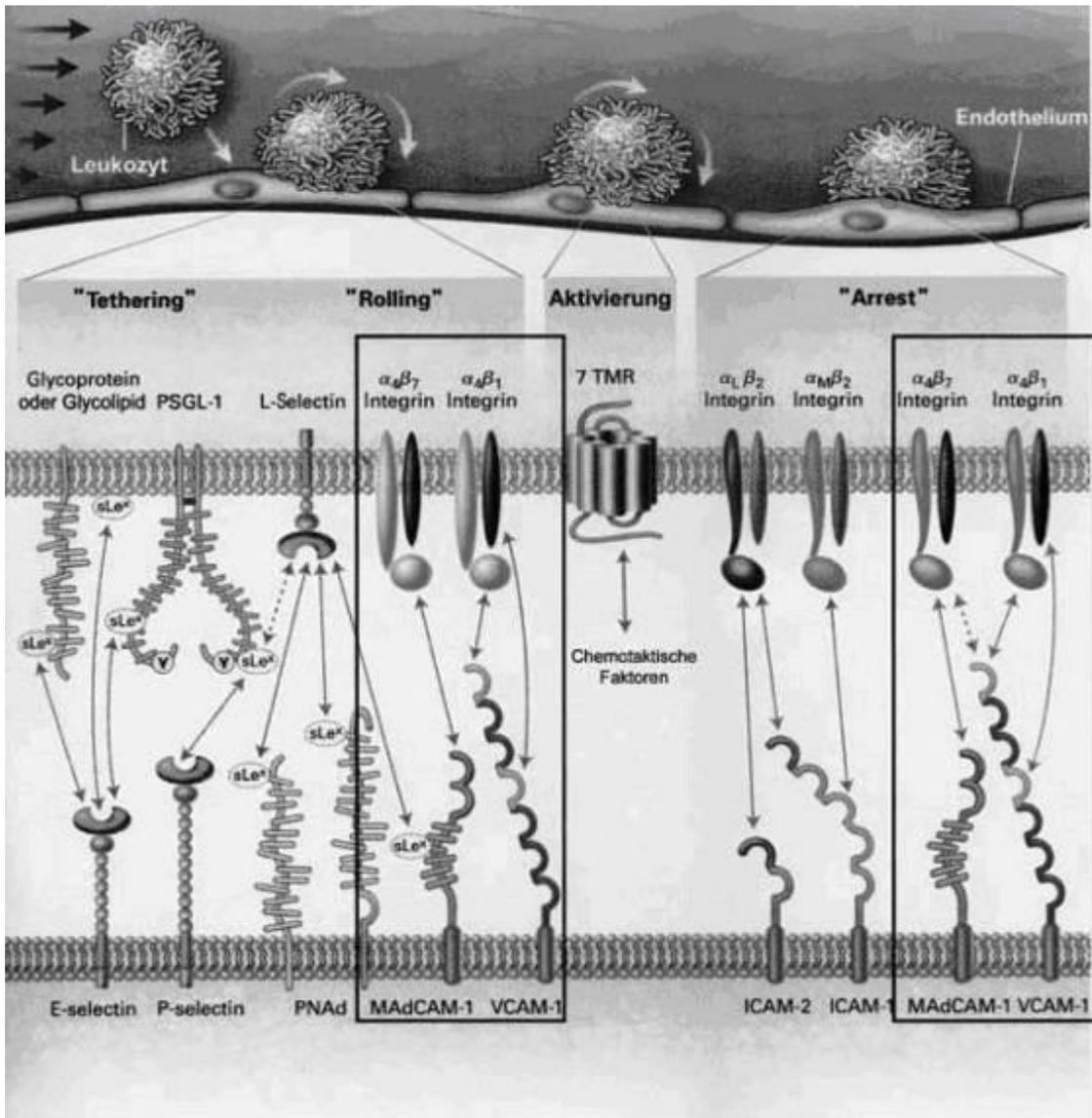


Abbildung 1 Leukozytenextravasation am Endothel und daran beteiligte Adhäsionsmoleküle
 (Quelle: von Andrian, Mackay 2000, modifiziert von Kämpfel et al. 2002)

Entzündungsreaktionen im ZNS werden aufgrund der speziellen Anatomie und Histologie des Nervengewebes separat betrachtet. Für Leukozyten gibt es nach Rebenko-Moll et al. 2006 folgende Eintrittspforten in das Nervengewebe: Der Übertritt aus dem Blut kann über den Plexus choroideus in den Liquor cerebrospinalis erfolgen oder aber direkt in das perivaskuläre Hirn- bzw. Rückenmarksgewebe. Die jeweils zu überwindende Struktur ist dabei einerseits die Blut-Liquorschranke und andererseits die Blut-Hirn- bzw. Blut-Rückenmarkschranke.

Die BHS (s. Abbildung 2) stellt eine Barriere dar, die die Extravasation von Leukozyten ins Gewebe im Vergleich zur Peripherie deutlich erschwert: Zwischen den einzelnen zerebralen Endothelzellen finden sich besonders dichte, mehrreihige Zonulae occludentes (ZO, oder *tight junctions*) (Benninghoff, Drenckhahn 2002). Diese Interzellular-

lularkontakte limitieren den Übertritt von zellulären und makromolekularen Bestandteilen aus dem Blut in das Gewebe. Außerdem besitzen diese Endothelzellen kaum die Fähigkeit zur Pinozytose, wodurch auch ein transzellulärer Transport erschwert wird (Ransohoff et al. 2003). Ein Stoffaustausch zwischen Blut und Hirngewebe findet daher nur streng reguliert mit Hilfe von spezifischen Transportsystemen statt (Ransohoff et al. 2003). An den abluminalen Pol der Endothelzellen schließen sich wie in der Peripherie die Basalmembran und ECM, bestehend aus Collagen, Elastin, Laminin und Fibronectin, sowie die Perizyten an (Man et al. 2007). Daran anliegend findet sich im ZNS eine Schicht aus Astrozyten, die mit ihren Fortsätzen die sog. Glia limitans (oder membrana limitans glialis perivascularis) ausbilden und für den Erhalt der BHS von Bedeutung sind (Rebenko-Moll et al. 2006; Benninghoff, Drenckhahn 2002).

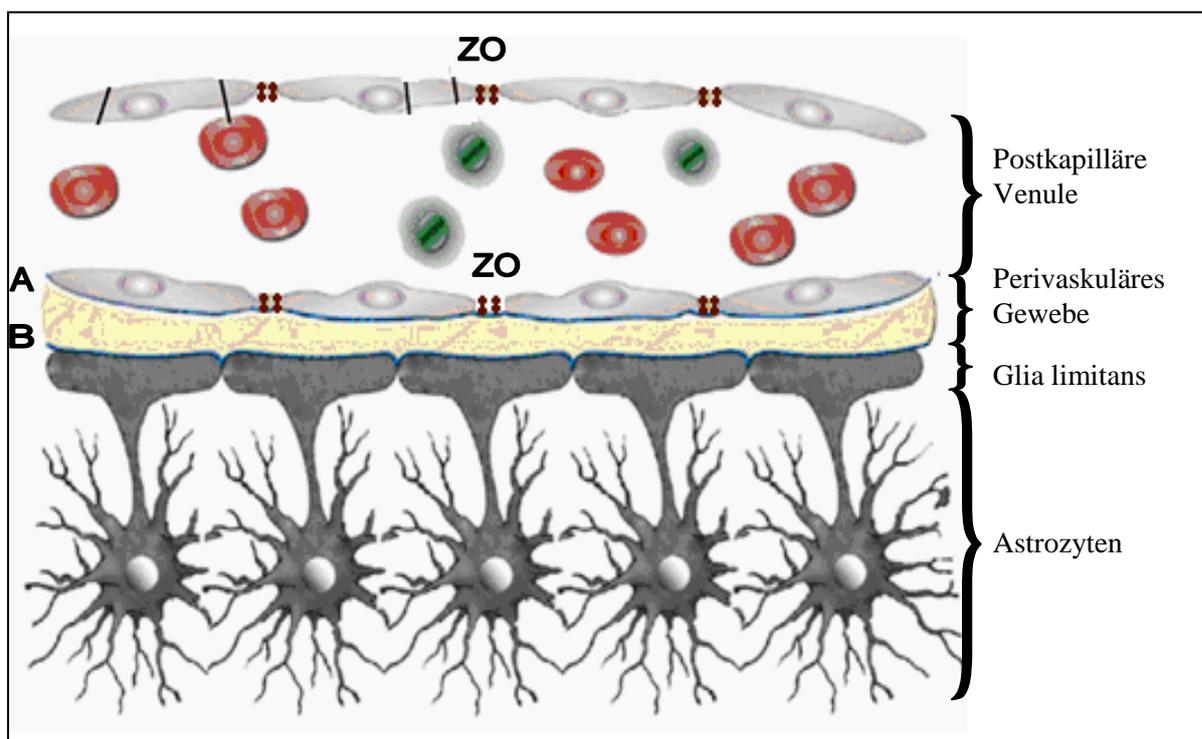


Abbildung 2 Aufbau der Blut-Hirnschranke

A: Endotheliale Basalmembran. B: Gliale Basalmembran. ZO: Zonula occludens (modifiziert nach Rebenko-Moll et al. 2006)

In einigen Punkten unterscheidet sich die Entzündungsreaktion innerhalb des ZNS von dem bereits beschriebenen Ablauf. Die Expression der E- und P-Selectine auf zerebralen Endothelzellen beispielsweise erfolgt nicht konstant und ist nach Döring et al. 2007 auch nicht essentiell für die Ausbildung einer EAE. Während daher die Bedeutung der Selectine im Rahmen der Inflammation im ZNS derzeit noch unklar ist, scheint die Bindung zwischen Integrin α -4/ β -1 und VCAM-1 umso wichtiger: Diese Moleküle vermitteln im ZNS sowohl kurze Interaktionen mit niedriger Affinität als auch die stabile G-

Protein-abhängige Adhäsion der Leukozyten am Endothel (Engelhardt, Ransohoff 2005; Kerfoot et al. 2006; Engelhardt 2008).

Eine Extravasation im ZNS erfolgt hauptsächlich an den Interzellularkontakten unter Einwirkung des chemotaktischen Gradienten; transzelluläre Migrationsvorgänge wurden jedoch *in vivo* ebenfalls beobachtet (Engelhardt, Wolburg 2004; Petri, Bixel 2006). Für die Durchwanderung des perivaskulären Gewebes sowie zur Lösung der Astrozytenfußfortsätze produzieren die Leukozyten verschiedene Matrixmetalloproteasen (MMP; Man et al. 2007). Deren Konzentration im Liquor ist beispielsweise bei bakteriellen Meningitiden erhöht und korreliert mit der Höhe der Zellzahl im Liquor (Pedemonte et al. 2006).

Die Barriere zwischen Blut und Liquorraum am Plexus choroideus ist aufgrund von Fenestrae im Endothel und durch das Fehlen von ZO-Kontakten weniger dicht, wodurch die Leukozytenextravasation prinzipiell erleichtert wird (Man et al. 2007). Jedoch ist der Liquorraum wiederum zusätzlich mit einem dichten Rasen von Ependymzellen ausgekleidet, die untereinander durch ZO-Kontakten verknüpft sind, sodass auch hier die Barriere zum eigentlichen Hirngewebe gewährleistet ist (Ransohoff et al. 2003).

Weitere Besonderheiten des ZNS bezüglich der Immunologie sind der fehlende Lymphabfluss sowie die geringe Dichte von APC und damit auch von MHC II-Molekülen (MHC: *major histocompatibility complex*; Ransohoff et al. 2003).

1.3 Entzündungsgeschehen bei Multipler Sklerose

Unter physiologischen Bedingungen finden aufgrund der dargestellten Barrieren immunologische Prozesse im Nervengewebe nur streng kontrolliert statt, sodass das Hirnparenchym normalerweise nahezu frei von zirkulierenden Leukozyten ist (Rebenko-Moll et al. 2006). Die für die Integrität des ZNS nötigen Immunreaktionen zur Erregerabwehr laufen hauptsächlich im Subarachnoidalraum ab (Pedemonte et al. 2006).

Bei der MS als neuroinflammatorische Erkrankung hingegen tritt eine Schrankenstörung auf, wodurch das ZNS im Vergleich zu Gesunden eine deutlich gesteigerte Leukozytenkonzentration aufweist (Rice et al. 2005). Die erhöhte Zellzahl beruht neben der vermehrten Invasion vermutlich auch auf einer intrazerebralen Proliferation und einer längeren Überlebensdauer (Rice et al. 2005).

Die ZNS-Läsionen bei MS bestehen bei näherer Betrachtung hauptsächlich aus T-Lymphozyten (sowohl CD8⁺- als auch CD4⁺-T-Zellen), einigen B-Lymphozyten und

Plasmazellen sowie zahlreichen Makrophagen und Mikrogliazellen (Pittock, Lucchinetti 2007; Dhib-Jalbut 2007). Auch proinflammatorische Zytokine wie Interleukine, Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) sind in aktiven Entzündungsarealen zu finden (Pittock, Lucchinetti 2007). Die endotheliale Reaktion auf die Entzündung besteht in der Expression von Adhäsionsmolekülen, Fibronectin, sowie Chemokinen und deren Rezeptoren (Pittock, Lucchinetti 2007).

Bei den Zielstrukturen der autoreaktiven Immunzellen handelt es sich wahrscheinlich um myelinassoziierte Proteine, wie z.B. das Myelin-Oligodendrozyten-Glycoprotein (MOG) oder das Myelin-basische Protein (MBP; Dhib-Jalbut 2007). Diese Antigene liegen normalerweise geschützt hinter der BHS. Die Ursache für das Vorhandensein dieser autoreaktiven Immunzellen ist vermutlich ein Fehler in der Aussortierung in peripheren Lymphknoten: Statt einer Elimination läuft eine Aktivierung ab, wodurch auf den Leukozyten die Expression von Zytokin- und Chemokinrezeptoren hochreguliert und damit ihre Extravasation begünstigt wird (Dhib-Jalbut 2007). Bei der Überwindung der BHS spielen außerdem die MMP eine wichtige Rolle. Diese werden normalerweise von Inhibitoren im Gewebe inaktiviert (TIMP: *tissue inhibitors of MMP*). Bei der MS scheint ein Ungleichgewicht in diesem System vorzuliegen, das eine erhöhte Konzentration und damit auch eine gesteigerte Aktivität von MMP zur Folge hat (Dhib-Jalbut 2007).

Auf die besondere Rolle der Th-Zellen wurde bereits in Abschnitt 1.1.2 näher eingegangen. Die in den Läsionen ebenfalls in großer Zahl vorhandenen CD8⁺-T-Zellen sollen bei der antigenspezifischen Proliferation eine wichtige Rolle spielen (Lassmann et al. 2007; Dhib-Jalbut 2007). Plasmazellen hingegen nehmen erst im Rahmen der Chronifizierung der Erkrankung zu (Lassmann et al. 2007).

1.4 Natalizumab und Integrin α -4

Die Kenntnisse über die Leukozytenextravasation und deren Bedeutung für die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen veranlassten zur Suche nach blockierenden Substanzen, die die Interaktion zwischen Immunzellen und Endothel verhindern sollten. Von besonderem Interesse war aufgrund seiner zentralen Stellung im Entzündungs geschehen das Integrin α -4/ β -1 auf T-Zellen, gegen das ein therapeutischer Antikörper entwickelt werden konnte: Natalizumab (Kummer, Ginsberg 2006; Rice et al. 2005).

1.4.1 Herstellung und Zulassung von Natalizumab

Natalizumab (Handelsname Tysabri®) ist ein rekombinanter monoklonaler Antikörper der Klasse IgG4κ (Buttmann, Rieckmann 2008). Der Antikörper gehört zur Gruppe der selektiven Adhäsionsmolekül- (SAM-) Inhibitoren und richtet sich spezifisch gegen das Transmembranprotein Integrin α -4 (Rudick, Sandrock 2004).

Der ursprünglich in der Maus gewonnene Antikörper wurde humanisiert, um die Immunreaktion im menschlichen Körper gegen murines Immunglobulin (Ig) zu minimieren und damit die Halbwertszeit zu verlängern (Kümpfel et al. 2002). Hierfür wurden die variablen Bindungsregionen (CDR: *complementary determining regions*) mit einem humanen Immunglobulingerüst des Subtyps G4 unter Durchführung eines sog. *CDR3-Graftings* (Staelens et al. 2006) auf Genebene kombiniert. Antikörper der Klasse IgG4 aktivieren das Komplementsystem in geringerem Maß als andere Immunglobuline und zeichnen sich durch eine längere Persistenz im Blut aus (Rice et al. 2005).

Die im Tierversuch bei EAE experimentell nachweisbare entzündungshemmende Wirkung einer Integrin α -4-Blockade versprach Fortschritte in der Therapie von Autoimmunerkrankungen wie MS und Morbus Crohn (Schreiner et al. 2005).

Vor der Zulassung von Natalizumab waren für die Behandlung der MS nur die weniger spezifisch immunmodulatorisch bzw. immunsuppressiv wirkenden Substanzen Interferon- (IFN-) β , Glatirameracetat, Azathioprin und Mitoxantron verfügbar. Diese Wirkstoffe beeinflussen im Sinne einer „krankheitsmodifizierenden Therapie“ (*disease-modifying therapy* bzw. DMT; Coyle 2007) Schubrate, Progression und kernspintomographische Krankheitsaktivität günstig. Steroide sind vor allem zur Kurzzeittherapie im akuten Schub indiziert und besitzen keine sichere Wirkung auf den langfristigen Krankheitsverlauf (Beck, Gal 2008). Durch monoklonale Antikörper wie Natalizumab erhoffte man sich zusätzliche Fortschritte in der MS-Therapie mittels der Blockade spezifischer immunologischer Vorgänge. Weitere zur MS-Therapie in fortgeschrittener klinischer Entwicklung befindliche monoklonale Antikörper sind Alemtuzumab (Anti-CD52), Rituximab, Ocrelizumab und Ofatumumab (alle Anti-CD20) sowie Daclizumab (Anti-CD25, Buttmann, Rieckmann 2008).

Nach Prüfung der Verträglichkeit von Natalizumab-Infusionen und Bestimmung der therapeutischen Dosis (Kümpfel et al. 2002) konnte in darauf folgenden klinischen Studien eine überzeugende Wirksamkeit gezeigt werden, die zu einer beschleunigten Zulassung des Medikaments Ende des Jahres 2004 in den USA führte (Rudick, Sandrock

2004; Buttmann, Rieckmann 2008, Bartt 2006). Bei MS-Patienten (insbesondere bei RRMS) wurde durch die intravenöse Gabe von Natalizumab eine signifikante Reduktion der Schubrate sowie der Krankheitsprogression erzielt (Rice et al. 2005). Die Studien (u.a. AFFIRM: plazebokontrollierte Studie der Phase III; Polman et al. 2006) zeigten eine deutliche klinische Verbesserung, die außerdem durch die MRT-Bildgebung gestützt wurde: Unter Therapie mit Natalizumab verringerte sich die Anzahl und Ausdehnung der Gd-anreichernden Läsionen. Das Auftreten neuer Entzündungsherde wurde durch die Therapie ebenso günstig beeinflusst wie die Aktivität bereits bestehender Foci (Rudick, Sandrock 2004; Rice et al. 2005). Die Kombination des Antikörpers mit der bis dahin gängigen IFN-Therapie (Avonex®: IFN- β -1a) zeigte schließlich einen zusätzlichen Nutzen durch Natalizumab im Vergleich zur IFN-Monotherapie (SENTINEL-Studie: Rudick et al. 2006). Nachdem jedoch in der Natalizumab-Interventionsgruppe zwei Fälle einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML, Bartt 2006) auftraten, erfolgte eine vorübergehende Rücknahme des Wirkstoffs. PML ist eine JC-Virus (JCV) assoziierte Enzephalopathie, die hauptsächlich im Rahmen eines Immundefektes (z.B. bei AIDS oder medikamentöser Immunsuppression) auftritt. Die Durchseuchung mit JCV beträgt ca. 50-90% der Bevölkerung, wobei die Seroprävalenz bei Immungesunden keine pathologische Bedeutung hat. Die Erkrankung hingegen beruht auf einer vermutlich endogenen Infektion des Gehirns, insbesondere der Oligodendrozyten. Multiple, teils konfluierende Läsionen im ZNS verursachen neurologische und kognitive Symptome (Hemiparese, Ataxie, Aphasie und Konzentrationsverlust). Der Virus-Nachweis erfolgt meist im Liquor (alle Informationen zu PML aus Bartt 2006).

Eine PML unter Natalizumab kann schwere bleibende Behinderungen verursachen und verläuft in etwa 20 % der Fälle letal (Buttmann 2010). Sie wird bei MS-Patienten derzeit durch Plasmapheresen zur raschen Wirkstoffentfernung und antivirale Therapeutika behandelt, ohne dass diese Ansätze bislang in ihrer Wirksamkeit belegt sind (Buttmann 2010).

Nach einer anschließenden erneuten Sicherheitsprüfung wurde Natalizumab im Juni 2006 wieder zugelassen (Buttmann, Rieckmann 2008). Jedoch beschränkt sich aufgrund des geschätzten Risikos für eine PML von 1:330 (Stand Juni 2013, www.tysabri.de) die streng überwachte Anwendung auf schwere, therapieresistente schubförmige Verläufe der MS (Weissert 2006).

1.4.2 Vermutete Wirkung von Natalizumab bei Multipler Sklerose unter Darstellung der möglichen Bindungspartner von Integrin α -4

Obwohl es sich bei Natalizumab um einen gezielt hergestellten Antikörper gegen ein definiertes Oberflächenantigen menschlicher Immunzellen handelt, ist seine Wirkung *in vivo* vielfältig und bisher nur zum Teil aufgeklärt. Bevor auf die derzeit vermuteten Wirkprinzipien von Natalizumab bei MS eingegangen wird, sollen zunächst das zugehörige Antigen und seine Bindungspartner vorgestellt werden.

Die spezifische Bindungsstelle von Natalizumab befindet sich am Integrin α -4-Molekül, das hauptsächlich in den Heterodimeren α -4/ β -1 und α -4/ β -7 vorliegt (Rice et al. 2005). Der Antikörper bindet dabei unabhängig von der jeweils assoziierten β -Kette (Schreiner et al. 2005). Integrine sind transmembranäre Rezeptormoleküle aus jeweils einer α - und einer β -Untereinheit und finden sich in unterschiedlichen Kombinationen auf allen Körperzellen, ausgenommen den Erythrozyten (Yang, Hagmann 2003). Als Adhäsionsmoleküle, bestehend aus einem extrazellulären Anteil, einer Transmembrandomäne und einem intrazellulären Anteil (Kummer, Ginsberg 2006), vermitteln Integrine über entsprechende Liganden die direkte Interaktion zwischen Zellen untereinander sowie zwischen Zellen und ECM (Rice et al. 2005). Außerdem sind sie Bestandteil wichtiger Signalwege der Zelle: Einerseits können durch intrazelluläre Signale Aktivierungszustand und Affinität zu den Bindungspartnern modifiziert werden („inside-out signaling“), andererseits vermittelt eine extrazelluläre Ligandenbindung wiederum intrazelluläre Signale („outside-in signaling“) (Hynes 2002; Kummer, Ginsberg 2006). Die verschiedenen Aktivierungszustände der Integrine werden durch bestimmte Stimuli, wie z.B. immobilisierte Chemokine auf Endothelzellen im Entzündungsgebiet, reguliert (Hynes 2002). Über G-Protein-gekoppelte Chemokinrezeptoren wird die üblicherweise niedrige Affinität der Integrine durch Konformationsänderung oder Modifikation in der Zytoskelettbindung hochreguliert (Molteni et al. 2006; von Andrian, Mackay 2000). Integrinabhängige Signalkaskaden steuern wiederum die intrazelluläre Anordnung des Zytoskeletts, wodurch Migrationsvorgänge im Gewebe möglich werden (Kummer, Ginsberg 2006; Hynes 2002). Integrine greifen außerdem in die Regulation der Proliferation, Differenzierung und Transkription ein und beeinflussen hierdurch das Überleben der Zelle (Molteni et al. 2006; Rice et al. 2005).

Die Integrine α -4/ β -1 und α -4/ β -7 finden sich vor allem auf Lymphozyten und Monozyten, seltener auf neutrophilen Granulozyten (Hemler 1990). Darüber hinaus konnte

Integrin α -4/ β -1 auf endothelialen Progenitorzellen aus Nabelschnurblut (Duan et al. 2006) sowie aus peripherem Blut nach Stimulation mit dem Cytokin G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*; Prosper et al. 1998) nachgewiesen werden. An umbilicalen Venenendothelzellen (HUVEC, *human umbilical vein endothelial cells*; Calzada et al. 2004) konnte außerdem gezeigt werden, dass Integrin α -4/ β -1 sowohl an der Adhäsion an Fibronectin (Massia, Hubbell 1992) als auch an der Zellmigration und Angiogenese beteiligt war (Nakao et al. 2003; Vanderslice et al. 1998). Hierbei wurde auch ein Zusammenspiel von Integrin α -4 mit einer löslichen Form des VCAM-1-Moleküls (*soluble VCAM-1* oder sVCAM-1) beobachtet (Nakao et al. 2003).

Außerdem scheinen die Integrine der Subgruppe β -1 wie z.B. Integrin α -4/ β -1 speziell bei der Entwicklung des Gefäßsystems innerhalb des ZNS bei Mäusen eine wichtige Rolle zu spielen (Milner, Campbell 2002). Ein weiterer Nachweis der Integrine α -4 sowie β -1 erfolgte auf hippokampalen Endothelzellen der Ratte (Fasen et al. 2003).

Integrin α -4/ β -1 interagiert mit dem Oberflächenadhäsionsmolekül VCAM-1 sowie mit Fibronectin und Osteopontin (OPN) in der ECM (Kümpfel et al. 2002). Zwischen Integrin α -4/ β -7 und VCAM-1 bzw. Fibronectin ist ebenfalls eine Bindungsreaktion möglich, die jedoch etwas schwächer ausgeprägt ist (Yang, Hagmann 2003). Der hauptsächliche Bindungspartner von Integrin α -4/ β -7 ist MAdCAM (*mucosal addressin cell adhesion molecule*), ein Adhäsionsmolekül, das sich v.a. im lymphatischen Gewebe des Darmes befindet und dort der Rekrutierung von Lymphozyten dient (Kummer, Ginsberg 2006).

Von besonderem Interesse für das Entzündungsgeschehen im Rahmen der MS sowie für die Wirkweise von Natalizumab ist die Bindung der Leukozyten über Integrin α -4/ β -1 an endothelständige VCAM-1-Moleküle und an Fibronectin im Rahmen der Extravasation und Migration im Gewebe.

VCAM-1 ist ein Zelladhäsionsmolekül aus der Immunglobulin-Superfamilie und besitzt sieben extrazelluläre, immunglobulinähnliche Domänen (Kilger et al. 1997). Die Bindungsstellen für Integrin α -4 benötigen meist eine zusätzliche Aktivierung (Kilger et al. 1995). VCAM-1 wird auf Endothelzellen exprimiert, normalerweise jedoch nicht intrazerebral (Elovaara et al. 2000). Bei MS-Patienten hingegen ist VCAM-1 im Bereich der Entzündungsreaktion auf mikrovaskulären Endothelzellen sowie auf Gliazellen nachweisbar (Cannella, Raine 1995). Bemerkenswert sind hier außerdem die deutlich höhe-

ren Konzentrationen in chronisch-aktiven Plaques im Vergleich zu akuten Läsionen (Cannella, Raine 1995).

Von den membranständigen VCAM-1-Molekülen können bei Bindung des Liganden Signalkaskaden im Sinne eines „outside-in signaling“ ausgelöst werden (Lee, Benveniste 1999). So werden in Endothelzellen beispielsweise die p38 MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase bzw. *mitogen activated protein kinase*) aktiviert, reaktive Sauerstoffspezies gebildet und Modifikationen im Actin-Zytoskelett bzw. an Interzellularkontakten gesteuert (Hordijk 2006).

Zusätzlich zu den membranständigen Molekülen ist in Liquor und Serum bei MS-Patienten auch die lösliche Variante des VCAM-1 (sVCAM-1) nachweisbar, die von proinflammatorisch aktivierten Endothelzellen freigesetzt wird (Droogan et al. 1996; Hartung et al. 1995). Die gemessenen Konzentrationen variieren je nach Aktivität und klinischem Verlauf der Erkrankung, wobei vermutlich die Liquorspiegel eine höhere Aussagekraft besitzen als die Serumspiegel (Elovaara et al. 2000). Es können jedoch nicht nur im akuten, entzündlichen Schub sondern auch unter Behandlung mit IFN- β (Rieckmann et al. 1998; Rieckmann et al. 2005; Kallmann et al. 2000) bzw. Methylprednisolon (Elovaara et al. 2000) erhöhte Konzentrationen von sVCAM-1 gemessen werden.

Ein Anstieg der sVCAM-1-Konzentration kann als Indikator für eine Störung der BHS im Sinne einer erhöhten Durchlässigkeit während eines akuten Schubes gesehen werden (Kallmann et al. 2000). sVCAM-1 wirkt dann als chemotaktisches Signal für aktivierte T-Lymphozyten und steuert so deren Migration im Gewebe (Kitani et al. 1998). Darüber hinaus ist sVCAM-1 ein wichtiges kostimulatorisches Signal bei der Aktivierung von T-Lymphozyten und könnte bei der Initiation lokaler Autoimmunprozesse eine Rolle spielen (Hartung et al. 1995).

Die hohen Konzentrationen von sVCAM-1 unter Therapie hingegen könnten bereits Teil eines Gegenregulationsmechanismus sein: In diesem Fall scheint der hohe Spiegel an sVCAM-1 im Blut den Übertritt aktivierter Leukozyten ins Gewebe zu blockieren und somit einen antiinflammatorischen Effekt zu bewirken (Dhib-Jalbut 2007; Kallmann et al. 2000). In vitro zeigte sich eine besonders ausgeprägte Freisetzung von sVCAM-1 durch zerebrale Endothelzellen unter gleichzeitiger Stimulation mit TNF- α und dem MS-Therapeutikum IFN- β (Dhib-Jalbut 2007; Kallmann et al. 2000).

Weitere wichtige Bindungspartner von Integrin α -4/ β -1 sind beiden Bestandteile der ECM Fibronectin und OPN (Rice et al. 2005).

Die Interaktion zwischen Fibronectin und Integrin α -4/ β -1 ist essentiell für eine zum Entzündungsgebiet hin gerichtete Migration aktivierter Leukozyten im Gewebe (Hemler 1990). Darüber hinaus werden durch die Bindung weitere kostimulatorische Signale vermittelt, die zu einer verstärkten Aktivierung und Proliferation der Entzündungszellen beitragen (Rice et al. 2005).

OPN wird hauptsächlich von Epithelzellen sezerniert, im Rahmen einer Entzündung auch von Makrophagen (Bayless, Davis 2001). Hier wirkt das Protein als proinflammatorisches Zytokin, wodurch es ebenfalls zur Rekrutierung von T-Lymphozyten, insbesondere Th₁-Zellen, beiträgt (Bayless, Davis 2001; Bayless et al. 1998)

Bei MS-Patienten und auch bei EAE-Mäusen ist die Expression von OPN im Vergleich zu Kontrollen von gesunden Individuen gesteigert (Chabas et al. 2001). OPN ist hier in den entzündlichen Plaques auf Endothelzellen, Makrophagen, in der Weißen Substanz sowie auf Astrozyten und Mikrogliazellen nachweisbar (Chabas et al. 2001).

Der Wirkmechanismus von Natalizumab wird derzeit hauptsächlich in der spezifischen Blockade des Integrin α -4 auf Leukozyten vermutet (Steinman 2005). Dabei werden zwei Effekte beobachtet: Einerseits kann die Entstehung neuer Entzündungsreaktionen verhindert werden, während andererseits die bereits bestehende inflammatorische Aktivität gemindert wird (Rudick, Sandrock 2004). Im Speziellen wurden nach Rudick, Sandrock 2004 folgende Mechanismen postuliert: Natalizumab verhindert die Extravasation aktivierter Leukozyten und deren Migration im Gewebe, da die Interaktion zwischen Integrin α -4/ β -1 und VCAM-1 bzw. Fibronectin durch den Antikörper blockiert wird. Darüber hinaus wird verhindert, dass inflammatorische Stimuli wie OPN und VCAM-1 über ihre Bindung an Integrin α -4/ β -1 zu einer weiteren Aktivierung der Leukozyten beitragen können. Durch fehlende Proliferationssignale wiederum kann sogar eine verstärkte Apoptose der Entzündungszellen vermittelt werden (Rudick, Sandrock 2004).

1.5 Fragestellung

Die bisherigen Modelle zur Wirkungsweise von Natalizumab erklären die Effekte bei MS-Patienten noch nicht hinreichend, zumal es auch Hinweise auf weitere Zelltypen mit Integrin α -4-Expression gibt: Es liegen bereits Daten zum positiven Nachweis von Integrin α -4 auf humanen endothelialen Progenitorzellen (Duan et al. 2006) sowie murinen zerebralen Endothelzellen (Milner, Campbell 2002) vor. Erste laborinterne Befunde aus Würzburg legten außerdem die Vermutung nahe, dass auch auf adulten, zerebralen Endothelzellen eine Integrin α -4-Expression erfolgt. Da Natalizumab systemisch angewendet wird, könnte es nicht nur mit leukozytären sondern auch mit endothelialen Integrin α -4-Molekülen interagieren, wodurch sich eine neue Sicht auf die Wirkweise ergeben würde.

Im Rahmen eines umfassenden Forschungsprojektes sollten die verschiedenen Zelltypen, die das Antigen Integrin α -4 tragen, identifiziert sowie auf eine Interaktion mit Natalizumab geprüft werden. Die vorliegende Arbeit ist Teil dieses Projektes und befasst sich in erster Linie mit der Bestätigung der vorläufigen Ergebnisse zur Integrin α -4-Expression auf zerebralen Endothelzellen. Weiterhin sollten die genaue Lokalisation des Moleküls erfasst und die Expressionsraten unter Zytokinstimulation untersucht werden.

Bei einem positiven Nachweis von Integrin α -4 auf zerebralen Endothelzellen stellte sich darüber hinaus die Frage, ob Natalizumab auch hier Auswirkungen hat. Ein wahrscheinlicher Interaktionspartner des endothelialen Integrins α -4 ist Fibronectin in der ECM. Welche Folgen die Blockade dieser Interaktion durch Natalizumab hat, sollte mit Hilfe von Adhäsionsversuchen abgeklärt werden.

Von besonderem Interesse war außerdem der Bindungspartner VCAM-1, da dieses Molekül in löslicher Form (sVCAM-1) als Signalmolekül (Hartung et al. 1995; Nakao et al. 2003) wirken kann und bei der MS in erhöhter Konzentration vorliegt. Im Vorfeld war bereits bekannt, dass die Sekretion von sVCAM-1 durch Endothelzellen mit TNF- α stimuliert werden kann (Kallmann et al. 2000; Calabresi et al. 2001). Die Frage, ob sich bestimmte Signalkaskaden durch VCAM-1 bzw. sVCAM-1 in Endothelzellen aktivieren lassen, sollte durch Proteinanalysen getestet werden. Dies würde die Vermutung nahelegen, dass sich Endothelzellen über die Sekretion von sVCAM-1 und die gleichzeitige Expression von Integrin α -4 selbst stimulieren können. Auch auf diese Interaktion könnte Natalizumab Auswirkungen haben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Materialien und Chemikalien wurden von den in der Liste genannten Firmen bezogen. Weitere Angaben zu deren Sitz sind im Anhang (s. Abschnitt 8) aufgeführt.

Material	Hersteller
Blotting Papier	Hartenstein
Brutschrank	Heraeus
Deckgläschen	Hartenstein
Durchflusszytometer (FACS: <i>fluorescence activated cell sorting</i>)	BD
Einmalküvetten	Hartenstein
Eismaschine	Scotsman Ice Systems
Elektrophoresekammern, Western-Blot-Zubehör	Bio-Rad
ELISA-Reader (ELISA: <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)	Labsystems
Fluoreszenzmikroskop	Olympus
Kühlzentrifuge	Heraeus
Kühlzentrifuge für Zellkultur	Heraeus
Lichtmikroskop	Hund
Mikrozentrifuge	Hartenstein
Nitrozellulose-Transfermembran	Schleicher & Schuell
pH-Meter	InoLab
Photometer	Eppendorf
Pipetten	Gilson, Eppendorf
Plastikpipetten, Pipettenspitzen	Hartenstein

Material	Hersteller
Reaktionsgefäße (Plastikmaterial)	Nunc, Hartenstein, CellStar
Röntgenfilme	Fujifilm
Schüttler	Janke & Kunkel
Sterilbank	NuAire
Thermoblock	Biosan
Vortexer	Hecht-Assistent
Waage	Mettler-Toledo
Zählkammer (Neubauer)	Hartenstein
Zellkulturschalen, -flaschen	Nunc

2.1.2 Chemikalien und Lösungen

Material	Hersteller
β -Mercaptoethanol	Merck
Accutase	PAA
Acrylamid/Bisacrylamid (40 %)	Roth
Amphotericin B	Gibco
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck
BCA (Bicinchoninsäure)	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Roth
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich
Collagen (Ratte)	Roche
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth
EBM-2 (endotheliales Basalmedium)	Cambrex
ECGS (<i>endothelial cell growth supplement</i>)	Sigma-Aldrich
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich

Material	Hersteller
Elektrophoresepuffer (10 x)	Bio-Rad
Ethanol (70 %)	J. T. Baker
FCS (<i>fetal calf serum</i>)	Biochrom
Fibronectin	Sigma-Aldrich
Formaldehyd	AppliChem
Gelatine (<i>gelatin from cold water fish skin</i>)	Sigma-Aldrich
Gentamicin	Gibco
Glycerol	Merck
HCl	Merck
Heparin-Ammonium-Salz	Sigma-Aldrich
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethanesulfonsäure)	Sigma-Aldrich
Ionomycin	Sigma-Aldrich
Kupfer (II) Sulfat	Sigma-Aldrich
Laminin (Maus)	Roche
L-Glutamin	Gibco
Medium 199	Cambrex
MEM-Vitamine	Biochrom
Methanol	J. T. Baker
Mowiol 4-88 Reagenz	Calbiochem
Na-Azid	Merck
NaCl	Merck
NaOH	Merck
Natriumpyruvat	Biochrom
NP-40 (Nonyl-Phenol-Derivat)	Calbiochem
PBS (<i>phosphate buffered saline</i> ; 1 x; ohne Ca^{2+} ; Mg^{2+})	Biochrom

Material	Hersteller
Penicillin	Serva
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set III	Calbiochem
Protease Inhibitor Cocktail Tablets- Complete Mini	Roche
Roti-Block (10 x)	Roth
RPMI-1640 Zellkulturmedium	Sigma-Aldrich
SDS (Sodiumduodecylsulfat)	Sigma-Aldrich
Streptomycin	Serva
TEMED (N, N, N', N' Tetramethyle- thylendiamin)	Sigma-Aldrich
TPA (12-O-Tetradecanoyl-Phobol-13- Acetat)	Sigma-Aldrich
Transferpuffer (10 x)	Bio-Rad
Tris-Hydrochlorid	Roth
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypanblau	AppliChem
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich

2.1.3 Rekombinante Proteine

Name	Hersteller
IL-6	PeptoTech
rh* IFN- γ	PeptoTech
rh IFN- β 1a (Rebif®)	Merck Serono
rh OPN	R&D
rh TGF- β	PeptoTech
rh TNF- α	Strathmann Biotec
rh VCAM-1	R&D
rh VEGF	PeptoTech

(* rh: Abkürzung für recombinant, human)

2.1.4 Reaktionslösungen und spezielle Reagenzien

Name	Hersteller
CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS-Lösung: 3(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-Salz)	Promega
ECL- (Elektrochemolumineszenz-) Reagenz	Amersham Biosciences
EGM (<i>endothelial growth medium</i>)-2 Single Quots	Cambrex

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Therapeutische Antikörper

Name	Hersteller
Alemtuzumab (MabCampath®)	Schering
Efalizumab (Raptiva®)	Merck Serono
Natalizumab (Tysabri®)	Biogen Idec
Sandoglobulin	Sandoz

Für die Experimente wurde freundlicherweise von Priv.-Doz. Dr. rer. nat. A. Weishaupt speziell gereinigtes Sandoglobulin zur Verfügung gestellt. Das Sandoglobulin wurde hierfür zunächst im Herstellerpuffer gelöst und viermal für mindestens 6 h gegen 10 Liter Bidest dialysiert, um die vorhandenen Salze (Pufferbestandteile) zu entfernen. Der Dialyseschlauch besaß ein Ausschlussvolumen von 10 bis 12 kDa, d.h. Substanzen bis zu dieser Größe konnten durch die Poren nach außen diffundieren und somit entfernt werden. Anschließend wurde der Inhalt des Dialyseschlauches, der nun ausschließlich aus Immunglobulinen bestand, eingefroren und danach gefriergetrocknet (lyophilisiert). Die erhaltenen Immunglobuline lagen nun als Festsubstanz vor und konnten in einem beliebigen Puffer (im vorliegenden Fall PBS) gelöst werden.

2.1.5.2 Immunzytochemie

a) Primärantikörper

Zielstruktur (Antigen)	Antikörpertyp	Klon	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
humanes Integrin α -4 (VLA- α 4; CD49d)	monoklonal, IgG1	2B4	Maus	1:50	R&D	BBA37
humanes Integrin α -4	monoklonal, IgG1	HP2/1	Maus	1:50	Immuno-tech	IM0764
humanes Integrin α -4	monoklonal, IgG2b, κ	L25	Maus	1:50	BD	340967
humanes Integrin β -1 (CD29)	monoklonal, IgG2a, κ	mAb13	Ratte	1:100	BD	552828
humanes α -Actin des glatten Muskels	monoklonal, IgG2a	ASM-1	Maus	1:200	Chemicon	CBL171
humanes GFAP	polyklonal, IgG		Kaninchen	1:500	Dako	Z 0334
humane Galactocerebroside	monoklonal, IgG3		Maus	1:100	Chemicon	MAB342
humaner vWF	polyklonal, IgG		Kaninchen	1:200	Dako	A 0082
humanes ZO-1-Protein	polyklonal, IgG		Kaninchen	1:100	Zymed	61-7300
humanes ZO-1-Protein	monoklonal, IgG1, κ	ZO1-1A12	Maus	1:100	Zymed	33-9100
Isotyp-Kontrolle	gereinigtes IgG1, κ	MOPC-21	Maus	* s.u.	Sigma	M 5284
Isotyp-Kontrolle	gereinigtes IgG2b, κ	MOPC-141	Maus	* s.u.	Sigma	M 5534
Isotyp-Kontrolle	gereinigtes IgG2a, κ	UPC 10	Maus	* s.u.	Sigma	M 9144

Material und Methoden

Zielstruktur (Antigen)	Antikörpertyp	Klon	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
Isotyp-Kontrolle	gereinigtes IgG		Kaninchen	* s.u.	Sigma	I 5006
Isotyp-Kontrolle	gereinigtes IgG1	43414	Ratte	* s.u.	R&D	MAB005

* *Anmerkung:* Die Verdünnung der Isotypkontrolle entsprach jeweils derjenigen des Primärantikörpers.

b) Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
Esel-anti-Maus-IgG Cy3 (Indocarbocyanin)	1:300	Chemicon	AP192C
Esel-anti-Ratte-IgG Cy3	1:300	Chemicon	AP189C
Kaninchen-anti-Maus-IgG Cy3	1:300	Chemicon	AP160C
Ziege-anti-Kaninchen-IgG Cy2 (Carbocyanin)	1:100 - 1:300	Chemicon	AP132J
Ziege-anti-Kaninchen-IgG Cy3	1:300	Chemicon	AP132C

c) Kernfärbung

Substanz	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
DAPI (4', 6 Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid)	1:3000	Sigma	D 8417

2.1.5.3 Analysen am Durchflusszytometer

a) Primärantikörper

Zielstruktur (Antigen)	Antikörper-typ	Klon	Spezies	Verdünnung & Konjugat	Hersteller	Katalog-nummer
humanes Integrin α -4	monoklonal IgG2b, κ	L25	Maus	1:50	BD	340967
humanes Integrin β -1	monoklonal IgG1, κ	MAR4	Maus	1:50 PE	BD	555443
humanes Integrin β -7	monoklonal IgG2a, κ	FIB504	Ratte	1:50 PE	BD	555945
Isotyp-Kontrolle	gereinigtes IgG1, κ	MOPC-21	Maus	1:50 PE	BD	555749
Isotyp-Kontrolle	gereinigtes IgG2a, κ	G155-178	Maus	1:50 FITC	BD	556652
Isotyp-Kontrolle	gereinigtes IgG2a, κ	R35-95	Ratte	1:50 PE	BD	555844

b) Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Katalog-nummer
Ziege-anti-Maus-IgG FITC	1:50	R&D	F0103
Ziege-anti-Maus-IgG PE	1:50	R&D	F0102B

2.1.5.4 Western Blot

a) Primärantikörper

Zielstruktur (Antigen)	Antikörper-typ	Klon	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Katalog-nummer
ERK 1	polyklonal, IgG		Kaninchen	1:1000	Santa Cruz	sc-94
GAPDH	monoklonal, IgG1	2D4A7	Maus	1:2000	Santa Cruz	sc-59541
JNK 1	polyklonal, IgG	C-17	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz	sc-474
p38 MAPK	polyklonal, IgG		Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	9212

Zielstruktur (Antigen)	Antikörpertyp	Klon	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
p-ERK	monoklonal, IgG2a	E-4	Maus	1:1000	Santa Cruz	sc-7383
phosphorylierte p38 MAPK	polyklonal, IgG		Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	9211
phosphorylierte p38 MAPK	polyklonal, IgG		Kaninchen	1:1000	Promega	V1211
p-JNK	monoklonal, IgG1	G-7	Maus	1:1000	Santa Cruz	sc-6254

b) Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Peroxidase-konjugiert	1:5000	Jackson Immuno-Research	111-035-003
Ziege-anti-Maus-IgG, Peroxidase-konjugiert	1:5000	Jackson Immuno-Research	115-035-003

2.1.6 Proteinmarker

Name	Hersteller
PageRuler Prestained Protein Ladder (170, 130, 95, 72, 56, 43, 34, 26, 17, 11 kDa)	Fermentas

Darstellung des verwendeten Proteinmarkers s. Abbildung 3:

Mit Hilfe eines Proteinmarkers können die im Western Blot angefärbten Proteine nach ihrem Molekulargewicht in kDa (Kilodalton) differenziert werden.

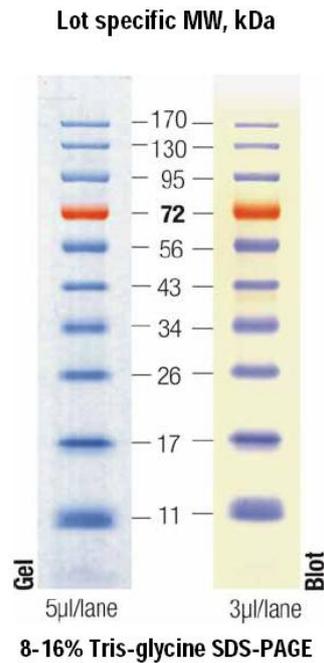


Abbildung 3 Verwendeter Proteinmarker für die Western-Blot-Analysen
 (Quelle: Fermentas: PageRuler Prestained Protein Ladder; Datenblatt 2006)

2.1.7 Zellen

2.1.7.1 Endothelzelllinien

Bezeichnung der Zelllinien	Freundlicherweise bereitgestellt durch
Immortalisierte, humane mikrovaskuläre Endothelzellen "HBMEC" (human brain microvascular endothelial cells)	KWANG S. KIM (The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA, Stins et al. 1997, Khan et al. 2007)
Immortalisierte humane zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen "hCMEC/D3"	P. O. COURAUD (Institut Cochin, Université René Descartes, Paris, Weksler et al. 2005)

Vorteile der immortalisierten Zelllinien sind ihre relativ rasche Vermehrung und die lange Kulturfähigkeit. Auch in hohen Passagen verändern sich die Zellen kaum. Im Laufe der Experimente erwiesen sich diese Zellen jedoch als ungeeignet für die geplanten Versuche, da sie sich in wichtigen Punkten von den primären Zellen unterschieden.

2.1.7.2 Primäre Endothelzellen

Bezeichnung	Herkunft
Primäre humane zerebrale Endothelzellen (HCEC)	Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, USA

Details zu den verwendeten Präparationen:

Präparation	Alter (Jahre)	Geschlecht	Isolationsort
376	24	unbekannt	Frontaler Cortex
379	27	weiblich	Frontaler Cortex
404	20	männlich	Cortex
419	31	männlich	Cortex

Bezeichnung	Herkunft
Primäre humane zerebrale Endothelzellen aus laborinternen Isolationen („171001“ III und IV)	Blut-Hirnschrankenlabor Neurologische Klinik, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Die primären humanen zerebralen Endothelzellen (HCEC: *human cerebral endothelial cell*) stammen direkt aus Hirngewebe. In ihren Zellzyklus wurde nicht eingegriffen, sodass sie ihre ursprünglichen Teilungseigenschaften behielten. Sie sollten möglichst genau das Verhalten vitaler Endothelzellen *in vivo* repräsentieren und wurden daher in den Versuchsreihen bevorzugt.

2.1.8 Protokolle

2.1.8.1 Nährmedien für Zellkultur

a) Nährmedium mit 10 % FCS für primäre Endothelzellen:

Bestandteile	Menge	Endkonzentration
M199	ad 100 ml	
Penicillin (5000 U/ml) - Streptomycin (5000 µg/ml) - Lösung	1 ml	50 U/ml bzw. 50 µg/ml
ECGS (2 mg/ml)	1 ml	20 µg/ml
Amphotericin B (250 µg/ml)	1 ml	2,5 µg/ml
Gentamicin (50 mg/ml)	100 µl	50 µg/ml
Heparin (100 mg/ml)	100 µl	100 µg/ml
FCS (Inaktivierung: 30 min bei 56°C)	10 ml	10 %

b) Nährmedium mit 10% FCS für Endothelzelllinie "hCMEC/D3":

Bestandteile	Menge	Endkonzentration
EBM-2 Basalmedium	ad 500 ml	
EGM-2 Single Quots	1 x	
FCS (Inaktivierung: 30 min bei 56°C)	50 ml	10 %

c) Nährmedium mit 10 % FCS für Endothelzelllinie "HBMEC":

Bestandteile	Menge	Endkonzentration
RPMI-1640 Zellkulturmedium	100 ml	
Penicillin (5000 U/ml) - Streptomycin (5000 µg/ml) - Lösung	1 ml	50 U/ml bzw. 50 µg/ml
ECGS (2 mg/ml)	1 ml	20 µg/ml
L-Glutamin (200 mM)	1 ml	2 mM
MEM-Vitamine	1 ml	

Bestandteile	Menge	Endkonzentration
Natriumpyruvat (100 mM)	1 ml	1 mM
Heparin (5000 U/ml)	100 µl	5 U/ml
FCS (Inaktivierung: 30 min bei 56°C)	10 ml	10 %

2.1.8.2 Gele

a) Sammelgel (4 %)

Chemikalien	Menge für 2 Gele (8 ml)
A. dest. (Aqua destillata)	5,5 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)	1,3 ml
1 M Tris (pH 6,8)	1,0 ml
SDS (10 %)	80 µl
APS (10 %)	80 µl
TEMED (zum Schluss)	8 µl

b) Trenngel (12 %)

Chemikalien	Menge für 2 Gele (20 ml)
A. dest.	13,2 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)	16,0 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	10,0 ml
SDS (10 %)	400 µl
APS (10 %)	400 µl
TEMED (zum Schluss)	16 µl

Nach Zugabe von TEMED wurde zunächst das Trenngel in die Gelkammer gegossen und mit Methanol überschichtet. Nach einer Polymerisationszeit von ca. 15 min wurde nach Abgießen des Methanols das Trenngel aufgefüllt, und die Kämme konnten einge-

setzt werden. Im weniger dichten Sammelgel sollten die Proteine zunächst konzentriert werden bevor sie im Trenngel nach dem Molekulargewicht sortiert wurden.

2.1.8.3 Pufferlösungen

a) Sammelpuffer Tris-HCl pH 6,8

Chemikalien	Menge
Tris	15,15 g
SDS	1 g
HCl (1 M)	pH 6,8
A. dest.	ad 500 ml

Der pH-Wert wurde mit HCl bzw. NaOH auf 6,8 eingestellt.

b) Trennpuffer: Tris-HCl pH 8,8

Chemikalien	Menge
Tris	45 g
SDS	1 g
HCl (1 M)	pH 8,8
A. dest	ad 500 ml.

Der pH-Wert wurde mit HCl bzw. NaOH auf 8,8 eingestellt.

c) 4 x Tris-HCl-Puffer (pH 6,8)

Chemikalien	Menge
Tris	30,25 g
SDS	2 g
HCl (1 M)	pH 6,8
A. dest.	ad 500 ml

Der pH-Wert wurde mit HCl bzw. NaOH auf 6,8 eingestellt.

d) 1 x Elektrophoresepuffer

Chemikalien	Menge
10 x Elektrophoresepuffer	100 ml
A. dest.	900 ml

e) 1 x Transferpuffer

Chemikalien	Menge
10 x Transferpuffer	100 ml
Methanol	200 ml
A. dest.	700 ml

f) 1 x Roti-Block

Chemikalien	Menge
10 x Roti-Block	10 ml
A. dest.	90 ml

g) 10 x TBS (*tris buffered saline*) (pH 7,5)

Chemikalien	Menge
NaCl	40 g
Tris	12,1 g
A. dest	ad 500 ml.

Der pH-Wert wurde mit HCl bzw. NaOH auf 7,5 eingestellt.

Material und Methoden

h) 1 x TBS, 0,05 % Tween

Chemikalien	Menge
10 x TBS	100 ml
Tween	500 µl
A. dest.	900 ml

i) Lysepuffer für Proteinextraktion (10 ml)

Chemikalien	Menge
10 % NP-40	1 ml
125 mM NaCl	0,25 ml
50 mM HEPES	1 ml
1 mM EDTA (pH 7,4)	0,1 ml
A. dest.	8,55 ml
Protease Inhibitor	1 Tablette
Phosphatase Inhibitor	200 µl

j) BCA-Proteinbestimmung (für 9 Proben)

Chemikalien	Menge
BCA	10 ml
Kupfer (II) Sulfat	200 µl

k) Ladepuffer (6 x) für Proteinextraktionen auf Polyacrylamidgel

Chemikalien	Menge
4 x Tris-HCl (pH 6,8)	7 ml
Glycerol	3 ml
SDS	1 g
Bromphenolblau	1,2 mg
jeweils frisch dazu geben: β-Mercaptoethanol	50 µl in 1ml Ladepuffer

l) FACS-Puffer

Chemikalien	Menge
Na-Azid (NaN ₃)	0,1 %
BSA	0,1 %
	in PBS (1 x)

2.1.9 Standard-Zentrifugenprogramm für Zellkultur

Dauer	5 min
Geschwindigkeit	150 g
Temperatur	+4°C

2.1.10 Computerprogramme

Programm	Funktion	Hersteller
AnalySIS	Fluoreszenzmikroskop	Softimaging Software GmbH (SIS)
BD CellQuest Pro 4.0.2	FACS-Gerät	BD Biosciences
GraphPad Prism 4	Statistik	GraphPad Software Inc.
Microsoft Office Excel 2003	Statistik	Microsoft Corporation
WCIF ImageJ 1.37c	Bildauswertung	National Institute of Health

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten mit lebenden Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an der Sterilbank durchgeführt.

Die in den Versuchen verwendeten primären humanen zerebralen Endothelzellen (HCEC) sowie die Zelllinien (hCMEC/D3: Weksler et al. 2005, HBMEC: Stins et al. 1997) konnten über längere Zeiträume hinweg in flüssigem Stickstoff in einem Einfriermedium aus 90 % FCS und 10 % DMSO gelagert werden.

Zur Anzucht in Kulturflaschen wurden die Röhrchen mit den eingefrorenen Zellen für einige Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmt. Die angetaute Zellsuspension wurde in 10 ml frisches, auf 37°C erwärmtes Nährmedium mit 10 % FCS gegeben und anschließend zentrifugiert, um das DMSO möglichst vollständig zu entfernen. Die Zellen wurden nun in 4 ml frischem Medium aufgenommen und auf eine kleine Zellkulturflasche ausgesät. Für ein besseres Anhaften der Zellen auf dem Kunststoffuntergrund wurden diese Kulturflaschen im Falle der HCEC und HBMEC mindestens 30 min vor Zugabe der Zellsuspension mit einer Lösung aus 2 % Gelatine in PBS bei 37°C vorinkubiert. Der Überstand wurde vor Zugabe der Zellen abgesaugt.

Für die Zelllinie hCMEC/D3 erfolgte die Beschichtung der Platten mit einer Lösung aus Rattenschwanz-Collagen (0,13 mg/ml in A. dest.).

Zur Kultivierung wurden die Zellen bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgte ca. alle zwei Tage. Bei konfluentem Wachstum wurden die Zellen auf neue Flaschen aufgeteilt („Passagieren“). Zelllinien konnten normalerweise unbeschränkt geteilt und weiter verwendet werden. Die primären Zellen zeigten sich weniger beständig und verloren in den höheren Passagen (ab Passage 6) zum Teil ihre ursprünglichen Eigenschaften.

Um die adhärennten Zellen vom Untergrund zu lösen, wurde eine Trypsin-EDTA-Lösung verwendet. Die Zellen wurden nach Absaugen des Mediums einmal mit PBS gewaschen, mit der Trypsinlösung bedeckt und für 5 bis 10 min im Brutschrank inkubiert. Unter dem Lichtmikroskop konnte zwischendurch kontrolliert werden, ob die Zellen bereits ihre Haftung an der Kulturschale verloren hatten. Das Trypsin wurde dann durch Zugabe von 10 % FCS in PBS inaktiviert. Die Zellsuspension wurde in ein geeignetes Reaktionsröhrchen überführt und zentrifugiert. Nach Absaugen des Über-

standes konnten die Zellen in frischem Medium aufgenommen und auf neue Kulturflaschen aufgetragen werden bzw. für andere Versuche weiterverwendet werden.

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit Trypanblau und mit Hilfe der Zählkammer nach Neubauer durchgeführt. Bei Trypanblau (AppliChem: Trypanblau; Datenblatt 2007) handelt es sich um eine Vitalfärbung der Zellen: Der saure Farbstoff wird von toten Zellen aufgenommen, die sich dann unter dem Lichtmikroskop dunkelblau gefärbt darstellen. Lebende Zellen hingegen schließen den Farbstoff aus und erscheinen weiß vor blauem Hintergrund.

Auf eine Zählkammer wurden 10 μ l einer Mischung aus Trypanblau und Zellsuspension im Verhältnis 1:1 gegeben. Nach Auszählung der vitalen Zellen in mehreren großen Quadraten wurde daraus der Mittelwert gebildet und somit die durchschnittliche Zellzahl pro Quadrat errechnet. Mit Hilfe des Verdünnungsfaktors sowie des Kammerfaktors 10^4 erhielt man dann die Anzahl lebender Zellen pro Milliliter.

2.2.2 Immunzytochemische Färbungen

Zur Bestimmung der Lokalisation von Zellstrukturen bietet sich die Immunzytochemie an. Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen können zelluläre Antigene unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Die zu färbenden Zellen wurden auf speziellen Schälchen mit jeweils vier Näpfen (je 10 mm Durchmesser) kultiviert, die für die spätere Arbeit am Mikroskop geeignet waren. In die einzelnen Näpfe wurden je 5×10^4 Zellen ausgesät. Bei Erhalt einer konfluenten Zelllage konnte mit der Färbung begonnen werden.

Nach Absaugen des Nährmediums wurden die Zellen zunächst drei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Fixierung der Zellen auf dem Untergrund mit Formaldehyd (3,7 % in PBS) für 10 min bei +4°C. Für eine bessere Durchgängigkeit der Antikörper durch die Zellmembran wurden die Zellen nach zwei weiteren PBS-Waschschritten mit Triton X (0,1 % in PBS; 7 min bei +4°C) behandelt. Auch hierauf folgten wieder zwei Waschvorgänge. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen 15 min bei +4°C mit einer Blocklösung inkubiert. Diese bestand aus 10 % FCS in PBS oder aus 5 % BSA in PBS. BSA ermöglichte vor allem bei Doppelfärbungen und bei Antikörpern aus Kaninchen ein klareres Färbungsmuster. Nach Absaugen der Blocksubstanz wurde sofort der Primärantikörper auf die Zellen gegeben und für mehrere Stunden oder über Nacht bei +4°C inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte jeweils in 10 % FCS bzw. in 1 % BSA in PBS.

Vor Zugabe der Sekundärantikörper wurden erneut drei Waschschritte durchgeführt. Die Bindung zwischen Sekundär- und Primärantikörper erfolgte innerhalb von 2 bis 4 h im Dunklen bei +4°C. Für eine Kernfärbung wurde danach der Farbstoff DAPI-Blau (Verdünnung 1:3000 in 10 % FCS bzw. 1 % BSA in PBS) nach dreimaligem Waschen für 5 min auf die Zellen gegeben. Nach erneutem Waschen und gründlicher Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in Mowiol gebettet und mit einem Deckgläschen geschützt. In dieser Form waren die Färbungen mehrere Tage bei Lagerung im Kühlschrank stabil und konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

Reinheitsprüfung der laboreigenen Zellisolationen:

Zur Überprüfung des Reinheitsgrades der laboreigenen Zellisolationen (III und IV) wurden ebenfalls immunzytochemische Färbungen durchgeführt. Die verwendeten Antikörper richteten sich dabei gegen Zellstrukturen, die für bestimmte Zellen des Hirngewebes typisch waren. So wurde zunächst das α -Actin von glatten Muskelzellen angefärbt, um Myozyten bzw. Myofibroblasten nachweisen zu können. Auch Galactocerebroside, die vor allem in Oligodendrozyten und Schwann-Zellen vorkommen, wurden durch den entsprechenden Antikörper detektiert. Astrozyten sollten durch eine Färbung gegen GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) identifiziert werden. Als Positivkontrolle für den spezifischen Nachweis von Endothelzellen wurde eine Färbung gegen vWF (von-Willebrand-Faktor) durchgeführt.

Die Auswertung der Färbungen durch Zählungen ergab eine Kontamination mit Myozyten bei beiden Zellpräparationen von durchschnittlich ca. 5 % (4 % bei III; 6 % bei IV). In der Isolation IV konnten außerdem Astrozyten (ca. 8 %) nachgewiesen werden. Der Antikörper gegen Galactocerebroside ergab keine positiven Zellfärbungen. Insgesamt wurde somit bei Präparation III eine Verunreinigung von weniger als 5 % ermittelt; bei Präparation IV hingegen zeigte sich ein Fremdzellanteil von knapp 15 % (s. Tabelle 1).

Zelltyp	Antigen	Kontamination in Präparation III	Kontamination in Präparation IV
Myozyten	ASM	4,1 %	6,4 %
Oligodendrozyten und Schwann-Zellen	Galactocerebroside	0 %	0 %
Astrozyten	GFAP	0 %	8,5 %
gesamt		4,1 %	14,9 %

Tabelle 1 Ergebnisse der Färbungen hinsichtlich der Verunreinigung des Endothelzellpräparationen III und IV

ASM: humanes α -Actin des glatten Muskels (*actin smooth muscle*)

Aufgrund der Feststellung, dass sich in der laborinternen Isolation eine Kontamination mit anderen zerebralen Zelltypen nachweisen ließ, wurde auch die HCEC-Präparation 404 hinsichtlich ihrer Reinheit untersucht. Hierbei zeigten sich keine positiven Färbereaktionen, die auf das Vorhandensein anderer Zelldifferenzierungen schließen ließen.

2.2.3 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie bzw. der FACS- (*fluorescence activated cell sorting*) Analyse können Zellen anhand morphologischer und struktureller Eigenschaften differenziert werden. Dabei werden die Zellen in Kapillaren durch einen Laserstrahl geschickt, während die Emission von Streulicht gemessen wird (*forward scatter*: Beugung, *side scatter*: Brechung). Ein Versuchsansatz enthält daher jeweils eine Negativkontrolle, um daran die spezifische Emission der verwendeten Zellpopulation messen zu können. Zur weiteren Differenzierung stehen Antikörper zur Verfügung, die gegen bestimmte Strukturen der Zellmembran gerichtet sind und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Binden diese an die jeweilige Zielstruktur, so können sie durch Laserstrahlen angeregt werden. Anhand der gemessenen Fluoreszenzsignale lassen sich dann Aussagen über die Expression verschiedener Oberflächenantigene treffen. Zur Beurteilung der Spezifität dieser Antikörperbindung ist jeweils eine Isotypkontrolle, bestehend aus dem entsprechenden Immunglobulinsubtyp, notwendig (Melamed, Lindmo 1990).

Die in der Durchflusszytometrie verwendeten Zellen wurden mindestens 24 h vor der Messung bzw. mindestens 24 h vor einer Stimulation ausgesät. Für die Messung wurde die Zellschicht mit Hilfe der sog. Accutase von der Kulturschale abgelöst. Diese Lösung aus mehreren proteolytischen und collagenolytischen Enzymen schont bei der Ablösung besonders die zellulären Oberflächenstrukturen. Nach Abnahme des Mediums wurde die Zellschicht zunächst mit der Enzymlösung bedeckt und für 10 min im Brutschrank

inkubiert. Die in eine Suspension übergegangenen Zellen wurden anschließend in geeignete Analyseröhrchen überführt und zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes und Durchführung eines Waschschrilles mit FACS-Puffer, konnte die eigentliche Antikörperfärbung (Verdünnung 1:50 in FACS-Puffer) für 30 min bei +4°C durchgeführt werden. Danach folgten zwei weitere Waschschrille mit FACS-Puffer. Im Falle der mit einem Farbstoff konjugierten Antikörper wurden die Zellen abschließend in einer kleinen Menge FACS-Puffer aufgenommen und bis zu Messung am Durchflusszytometer bei +4°C gelagert. Bei unkonjugierten Antikörpern folgte vorher noch ein zweiter Inkubationsschritt mit dem Sekundärantikörper.

Für die Messung am FACS-Gerät wurden die entsprechenden Wellenlängen eingestellt, um die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe (FITC: Fluoresceinisothiocyanat; PE: Phycoerythrin) messen zu können. Anhand der Negativkontrolle und der Isotypfärbung wurden die Parameter Beugung und Brechung so eingestellt, dass beide Kurven möglichst dicht am Wert eins lagen. Dann wurden, ohne die Einstellungen zu verändern, die gefärbten Proben gemessen. Bei vorhandener Fluoreszenz ergab sich eine Verschiebung der Kurve. Insgesamt wurden pro Messung zwischen 20 000 und 50 000 Zellen analysiert.

2.2.4 Untersuchungen zum Adhäsionsverhalten

Zur Gewinnung erster Anhaltspunkte der Funktion von Integrin α -4 auf zerebralen Endothelzellen wurde das Adhäsionsverhalten der Zellen in Gegenwart von Natalizumab untersucht. Mit Hilfe der blockierenden Wirkung des Antikörpers sollten Erkenntnisse über die Bedeutung von Integrin α -4/ β -1 bei der Zellanheftung gewonnen werden.

2.2.4.1 Vorbereitungen zum Adhäsionsversuch

Die Untersuchung der Adhäsion erfolgte bei verschiedenen Bedingungen auf Reaktionsplatten mit 96 Vertiefungen. Die Außenreihen dieser Platten wurden mit je 200 μ l PBS pro Vertiefung aufgefüllt, da sich in früheren Versuchen bereits gezeigt hatte, dass die Zellen in den randständigen Näpfen schlechter anwachsen. Vertiefungen, die keine Beschichtung erhalten sollten, wurden zunächst mit 50 μ l PBS aufgefüllt. Für die Beschichtung mit Fibronectin wurden jeweils 50 μ l in einer Konzentration von 50 μ g/ml verwendet. Nach einer 60-minütigen Inkubation bei 37°C wurde von einer ausreichenden Beschichtung der Kulturfläche ausgegangen.

Die Reaktionsplatte wurde dann so aufgeteilt, dass jeweils eine senkrechte Reihe für eine Stimulationsbedingung stand. Daraus folgte, dass jeweils sechs Vertiefungen mit denselben Konditionen für die Auswertung zur Verfügung standen.

Die für den Versuch benötigten Zellen wurden zunächst mit Trypsin von der Kulturschale abgelöst und anschließend in frischem Medium aufgenommen. Um später etwa 6000 Zellen pro Vertiefung in 200 µl Medium aussäen zu können wurde eine Suspension mit 3×10^4 Zellen pro Milliliter hergestellt.

Diese Zellen wurden dann für 30 min mit verschiedenen Konzentrationen von Natalizumab bzw. von Sandoglobulin, Efalizumab und Alemtuzumab als jeweilige Kontrollantikörper bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen in die entsprechenden Näpfe gegeben. Die Auswertung fand nach einer Adhäsionsdauer von jeweils 2 h statt.

2.2.4.2 Auswertung mit CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay

Für die Auswertung wurde anfangs die MTS-Reaktionslösung verwendet. Es handelt sich hierbei um den Farbstoff MTS (3 (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-Salz), der von lebenden Zellen aufgenommen wird.

Die verwendungsfähige Reaktionslösung wurde zunächst gemäß Protokoll aus den beiden Bestandteilen MTS- und PMS-Flüssigkeit (Verhältnis 20:1) hergestellt.

Der Inhaltsstoff MTS wird durch lebende Zellen zu einem löslichen Formazan-Farbstoff reduziert. Dessen Absorption kann bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen werden. Die Menge des entstandenen Farbstoffes entspricht der Höhe der Absorption und ist direkt proportional zur Zahl lebender, metabolisch aktiver Zellen.

Zur Unterbrechung der Adhäsion nach 2 h wurden die Näpfe zunächst einmal mit warmem Medium (ohne FCS bzw. Antibiotika) gewaschen. In einem zweiten Schritt wurden 20 µl der vorbereiteten MTS-Lösung zu 100 µl Medium gegeben. Wichtig für die spätere Auswertung war die Berücksichtigung des Leerwertes, d.h. die Absorption von MTS im entsprechenden Medium ohne Zellen. Die Farbreaktion fand für 3 h im Brutschrank bei 37°C im Dunklen statt. Anschließend wurde am ELISA-Messgerät die Absorption in den einzelnen Näpfen bei 490 nm gemessen. Daraus konnten dann am Computer die entsprechenden Graphen erstellt werden.

Nach mehreren Experimenten unter gleichzeitiger Beobachtung des Adhäsionsverhaltens am Lichtmikroskop schien diese Methode jedoch für den beschriebenen Versuchsaufbau unzuverlässig zu sein. Zur Überprüfung wurde daher eine zweite Form der Auswertung mit Hilfe einer DAPI-Kernfärbung etabliert.

2.2.4.3 Auswertung nach DAPI-Kernfärbung und Zellzählung mit ImageJ

Zur Durchführung der DAPI-Kernfärbung wurden die Zellen ebenfalls zunächst einmal mit Medium gewaschen. Fixierung und Permeabilisierung erfolgte wie im Protokoll der immunzytochemischen Färbung. Im Anschluss an die Triton-Behandlung wurde sofort mit der DAPI-Kernfärbung fortgefahren. Nach einem letzten Waschschriff und Absaugen des Überstandes folgte die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop. Unter der kleinsten Vergrößerung (40-fach) wurde von jedem Napf ein Bild aus der Mitte aufgenommen und gespeichert. Von diesen Bildern (Größe 8 bit) konnte dann im Computerprogramm ImageJ mit Hilfe der Zusatzfunktion der Kernzählung („Plugins“ > „Particle Analysis“ > „Nucleus Counter“) die Anzahl der Zellkerne ermittelt werden (s. Abbildung 4).

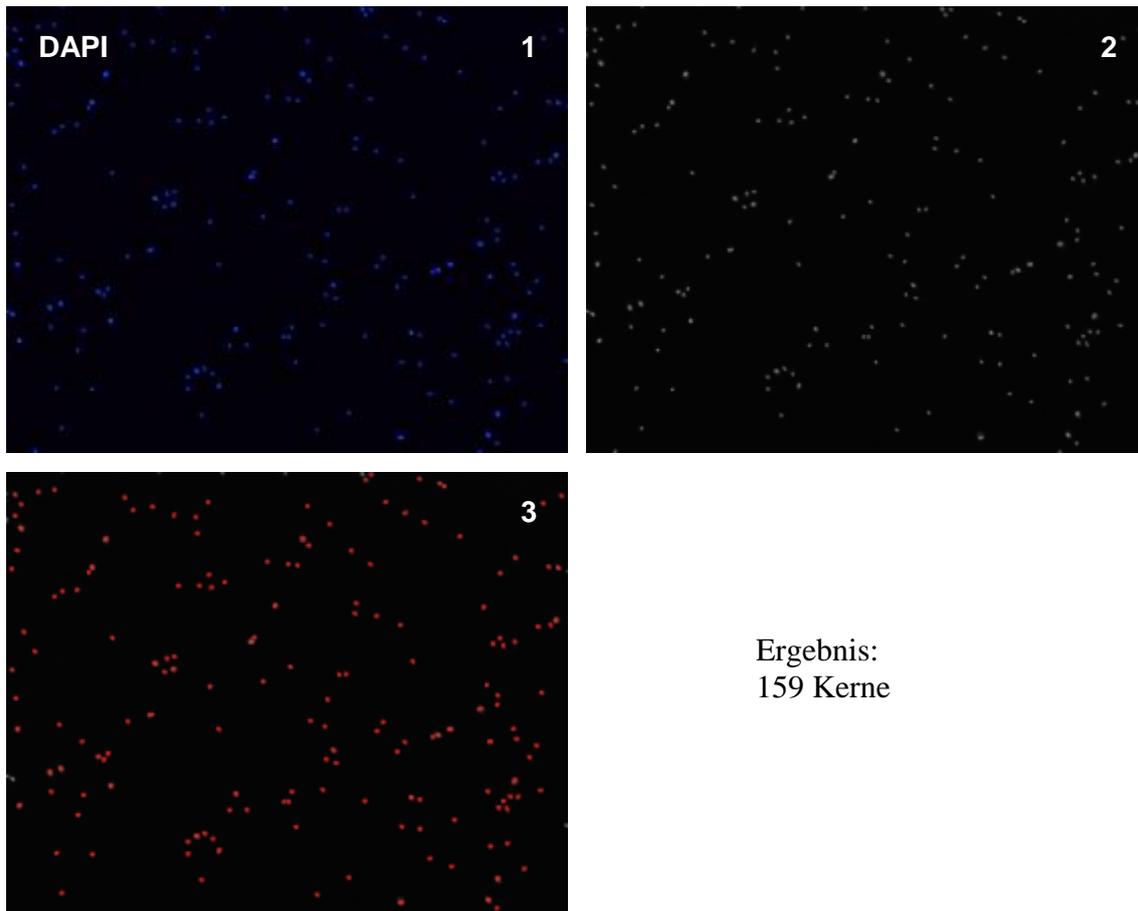


Abbildung 4 Bildbeispiel zur Auswertung am Computer mit ImageJ:

(1): Originalbild der DAPI-Kernfärbung; (2): Umwandlung in 8 bit; (3): automatische Zählung aller rot umrandeten Objekte

Bei einem direkten Vergleich zwischen den beiden angeführten Methoden zur Zellzahl-ermittlung zeigten sich große Unterschiede. Aufgrund der besseren Übereinstimmung der DAPI-Färbung mit den subjektiven Beobachtungen am Lichtmikroskop sowie der mangelnden Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit der MTS-Lösung wurde für die gezeigten Versuche ausschließlich die Methode der Kernfärbung angewendet.

2.2.4.4 Statistische Auswertung

Die durch das Programm ImageJ gewonnenen absoluten Zahlenwerte bildeten den Datensatz, der zunächst mit Hilfe des Computerprogramms Excel für die graphische Darstellung in Form von Säulendiagrammen weiter verarbeitet wurde. Einzelne Experimente wurden jeweils mit den absoluten Zahlenwerten dargestellt, wobei von jeder Subgruppe das arithmetische Mittel gebildet wurde. Zusätzlich wurde die entsprechende Standardabweichung ermittelt und graphisch dargestellt.

Um die Daten aus mehreren Versuchen mit den gleichen Stimulationsbedingungen zusammenfassen zu können, wurden nicht die absoluten Zahlen verwendet sondern prozentuale Werte gebildet. Dabei diente die unbehandelte Subgruppe als Referenzwert (100 %). Auch hier zeigen die zugehörigen Säulendiagramme jeweils das arithmetische Mittel aus den zusammengefassten Versuchen mit den entsprechenden Standardabweichungen.

Darüber hinaus wurde nach signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen Subgruppen einer Versuchsreihe gesucht. Hierfür wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA, *Analysis of variance*) verwendet, mit deren Hilfe man mehr als zwei unabhängige Stichproben untereinander vergleichen kann. Für den Fall, dass die Nullhypothese („es liegen keine Unterschiede zwischen den Mittelwerten der einzelnen Gruppen vor“) zu mehr als 95 % abgelehnt werden konnte, wurden die Effekte als signifikant bezeichnet ($p < 0,05$).

2.2.5 Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren zur Auftrennung und zum Nachweis von Proteinen. Mit Hilfe von Acrylamidgelen, die bei Polymerisation Poren unterschiedlicher Größe bilden, können Proteine im Laufe einer Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht (in Dalton) aufgetrennt werden. Große Bestandteile wandern hierbei schlechter, während kleinere Proteine leichter und schneller bewegt werden. Für die Auftrennung wird häufig die sog. SDS-PAGE (Sodium-Duodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese) genutzt. Die Proteine werden dabei zunächst denaturiert und ihre vorhandenen Ladun-

gen durch ein Salz (SDS) maskiert, sodass alle Proteine zu Anionen werden und im elektrischen Feld zur Anode wandern. Das Salz bindet proportional zur Proteingröße, wodurch eine von der ursprünglichen Ladung unabhängige Auftrennung rein nach der Molekülgröße möglich ist.

Zur weiteren Untersuchung der Proteine erfolgt der eigentliche „Blot“, d.h. die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Danach können mit Hilfe von speziell markierten Antikörpern die gesuchten Proteine sichtbar gemacht werden (Towbin et al. 1979; Burnette 1981).

2.2.5.1 Gewinnung der Proteinlysate

Mit Hilfe des Western Blots sollten Proteine der Signalkaskade unter verschiedenen Stimulationsbedingungen untersucht werden. Die anfänglichen Versuchsergebnisse legten nahe, dass die Zellen stark auf einen Mediumwechsel reagierten. Daher wurde das Nährmedium ca. 14 h vor der Stimulation durch ein Minimalmedium mit 0,5 % FCS ersetzt. Entsprechend der Dauer der Stimulation wurden die Zellen dann geerntet. Zur Gewinnung der Proteine mussten die Zellen zunächst lysiert werden. Hierfür wurden sie nach Ende der Stimulation drei Mal mit kaltem PBS gewaschen und auf Eis gestellt. Der Lysepuffer mit dem frisch zugefügten Phosphataseinhibitor wurde dazu pipettiert (ca. 16 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$). Mit einem Zellschaber wurden die Zellen sorgfältig vom Boden gelöst, im Puffer aufgenommen und in ein kleines Reaktionsgefäß überführt. Im Kühlraum folgte eine Inkubation auf dem Schüttler für ca. 45 min. In dieser Phase sollten die Proteine in Lösung gehen. Anschließend folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit (15 000 rpm). Der Überstand mit den Proteinen wurde dann vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.2.5.2 Photometrische Ermittlung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer BCA-Lösung nach Zugabe von Kupfer (II) Sulfat am Photometer vorgenommen. Proteine reagieren mit den zweiwertigen Kupferionen, wobei sich die dabei entstehenden stabilen, farbigen Komplexverbindungen aus Kupfer (I) und BCA direkt proportional zur Konzentration der Proteine verhalten. Die Absorption kann dann bei 562 nm gemessen werden (Smith et al. 1985).

Zunächst wurde für diesen Messvorgang eine ausreichende Menge des BCA-Kupfer-II-Sulfat-Gemischs hergestellt. Zu je 1 ml fertiger Lösung wurden 5 μl der zu messenden Proteinlysate gegeben. Außerdem wurde bei jeder Messung ein Leerwert durch Zugabe

von 5 µl A. dest. hergestellt. Der für die Auswertung weiterhin notwendige Standardwert wurde erstellt, indem 5 µl einer BSA-Lösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml zugefügt wurden. Alle Proben wurden für 30 min bei 37°C inkubiert und schließlich 5 min auf Eis gestellt. Nach Überführen in Einmalküvetten konnte die Messung am Photometer erfolgen. Hierfür wurde das BCA-Programm genutzt. Auf die Eingabe der Verdünnung (5 µl in 1 ml) folgte die Ausmessung des Leerwertes bei 562 nm. Nach der Bestimmung des BSA-Standardwertes konnte eine Kurve berechnet werden, anhand derer die Proteinkonzentration der einzelnen Proben ermittelt wurde.

Mit Hilfe der Konzentrationen konnten später von den verschiedenen Proben jeweils genau gleiche Proteinmengen auf das Gel geladen werden. Durchschnittlich wurden hierfür abhängig vom vermuteten Expressionslevel der zu detektierenden Substanz zwischen 20 und 50 µg Gesamtprotein geladen.

2.2.5.3 Gelelektrophorese und Western Blot auf Nitrozellulosemembran

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE. Die Gele hierfür wurden gemäß Protokoll gegossen und in die mit Elektrophoresepuffer gefüllten Kammern eingebracht. Zur späteren Größenbestimmung wurde außerdem je Gel ein Proteinmarker aufgetragen (10 µl pro Tasche). Da die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld vom Molekulargewicht bestimmt wird, liefert der Proteinmarker eine Skala, anhand derer das Molekulargewicht der gefärbten Strukturen abgeschätzt werden kann.

Die errechnete Probenmenge wurde vor dem Auftragen mit dem 6-fach Ladepuffer (incl. Mercaptoethanol) vermischt und für 5 min bei 100°C denaturiert.

Während des Durchlaufens des Sammelgels (Dauer ca. 30 bis 45 min) wurde an der Elektrophoresekammer eine Spannung von 30 Volt angelegt. Anschließend wurde die Spannung für die Trennphase (ca. 2 h) auf 60 Volt erhöht. War die Auftrennung der einzelnen Banden, die anhand des Markers kontrolliert werden konnte, ausreichend, wurde die Elektrophorese gestoppt.

Der Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran erfolgte ebenfalls mittels Elektrophorese. Durch die angelegte Spannung sollten die negativ geladenen Proteine vom Gel auf die Membran übergehen und dort für eine Antikörperfärbung zugänglich gemacht werden. Hierfür wurde die Membran direkt auf das Gel gelegt und zwischen eine Lage aus Blotting Papier und Schwämmen gebettet. Nach Zugabe des Transferpuffers lief die Elektrophorese bei 85 mA und +4°C über Nacht.

2.2.5.4 Färbung der Membranen

Die fertigen Membranen wurden in Petrischalen gegeben. Vor der eigentlichen Färbung wurden zunächst unspezifische Bindungsstellen mit einer Blocklösung abgesättigt. Hierfür wurde eine 1 x Roti-Block Lösung hergestellt, mit der die Membran für 2 h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert wurde. Anschließend wurde der jeweilige Primärantikörper (Verdünnung in 1 x Roti-Block) auf die Membran gegeben und unter Schwenken für 2 h bei Raumtemperatur bzw. alternativ über Nacht bei +4°C dort belassen. Zur Entfernung des überschüssigen Antikörpers wurde die Membran im Anschluss drei Mal für ca. 10 min in 1 x TBS unter Schwenken gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem peroxidasekonjugierten Sekundärantikörper (Verdünnung in 1 x Roti-Block) für 1 h bei Raumtemperatur. Danach wurde wiederum ein Waschvorgang durchgeführt.

Die Entwicklung des Films erfolgte durch die ECL-Lösung. Das an den Sekundärantikörper gebundene Enzym Meerrettichperoxidase katalysiert die Oxidation des im Entwickler enthaltenen Luminols. Bei dieser Reaktion entsteht ein intermediäres Zwischenprodukt, das unter Aussendung von Licht in den Grundzustand zurückfällt. Das hiervon ausgehende Lichtsignal (Chemolumineszenz, s. Abbildung 5) kann am Ort des gebundenen Sekundärantikörpers mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert werden. Die Stärke des Signals ist proportional zur Menge an gebundenem Enzym (Amersham Biosciences: ECL Western blotting detection reagents and analysis system; Datenblatt 2002).

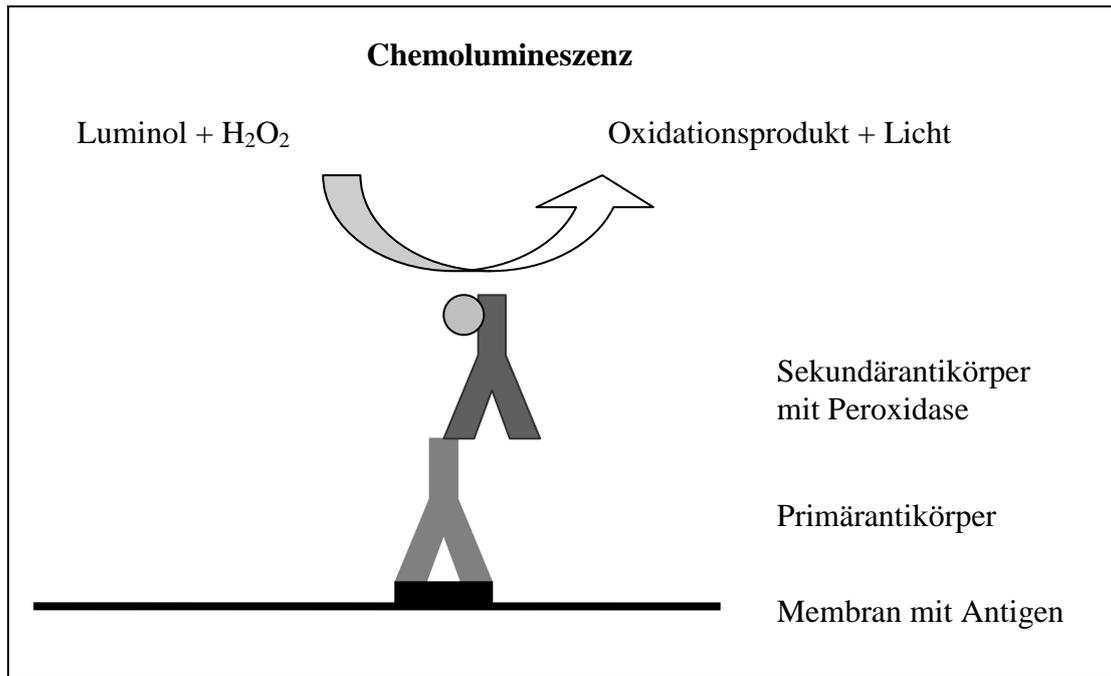


Abbildung 5 Skizze zur Chemolumineszenz
Luminolreaktion in Gegenwart der Meerrettichperoxidase

Der Entwickler wurde frisch aus den beiden Lösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:1 hergestellt und für 60 s auf die Membran gegeben. Nach dem Abtropfen überschüssiger Flüssigkeit wurde die Membran in eine Röntgenkassette gegeben. In der Dunkelkammer wurde der Röntgenfilm aufgelegt und je nach Signalstärke einige Sekunden bis zu 60 min darauf belassen. Anschließend wurde der Film entwickelt. An den Stellen mit gebundener Peroxidase zeigten sich dunkle Banden.

3 Ergebnisse

In den durchgeführten Versuchen war zunächst die Expression des durch Natalizumab gebundenen Antigens, Integrin α -4, von Interesse. Dessen Nachweis war bereits auf endothelialen Progenitorzellen (Duan et al. 2006) und HUVEC (Calzada et al. 2004; Massia, Hubbell 1992) erfolgt sowie auf zerebralen Endothelzellen bei Mäusen (Milner, Campbell 2002) und Ratten (Fasen et al. 2003). Daher sollte nun geklärt werden, ob dieses Molekül auch auf adulten HCEC exprimiert wird. Im Anschluss an diese Fragestellung sollte die funktionelle Bedeutung des Integrins α -4 sowohl auf zellbiologischer als auch auf molekularer Ebene näher untersucht werden.

3.1 Subzelluläres Verteilungsmuster von Integrin α -4 und β -1 in zerebralen Endothelzellen mittels immunzytochemischer Färbung

Erste Darstellungen der Expression des gesuchten Integrins α -4 und dessen Dimerisierungspartners Integrin β -1 erfolgten auf adulten, primären HCEC (404) mit Hilfe der immunzytochemischen Färbung. Am Fluoreszenzmikroskop zeigten sich mit den Antikörpern gegen die Integrine α -4 und β -1 bestimmte, konstant wiederkehrende Färbungsmuster, auf die im Folgenden noch näher eingegangen wird. Da stets ein deutlicher Unterschied der Fluoreszenzmuster zwischen den Integrinfärbungen und den Kontrollen mit dem jeweiligen Isotyp sichtbar war, konnte von einer spezifischen Bindung zwischen Antikörper und Zielstruktur ausgegangen werden. Aufgrund des immer ähnlichen Signalmusters war somit ein erster Beweis für die tatsächliche Expression der Integrine α -4 und β -1 auf primären Endothelzellen erbracht.

Zusätzlich zu dem ersten Expressionsnachweis stand im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie vor allem die genaue Lokalisation der Moleküle im Mittelpunkt. In den insgesamt mehr als zehn Versuchsreihen konnte bezüglich der beiden Integrine α -4 und β -1 jeweils ein recht einheitliches Bild der zellulären Verteilung gewonnen werden.

Bei den Färbungen gegen Integrin β -1 zeigte sich meist eine deutliche Betonung der Zellgrenzen, während das von den Zellkörpern ausgehende Fluoreszenzsignal in den einzelnen Versuchen unterschiedlich stark ausgeprägt war. In den Experimenten mit den kommerziell erhältlichen HCEC war meist eine leichte bis mittelstarke Anfärbung der gesamten Zelle sichtbar (s. Abbildung 6 und Abbildung 7). Die Versuche mit den labor-

internen Präparationen hingegen wiesen einen noch deutlicheren Kontrast zwischen Zellrand und -körper auf (s. Abbildung 8).

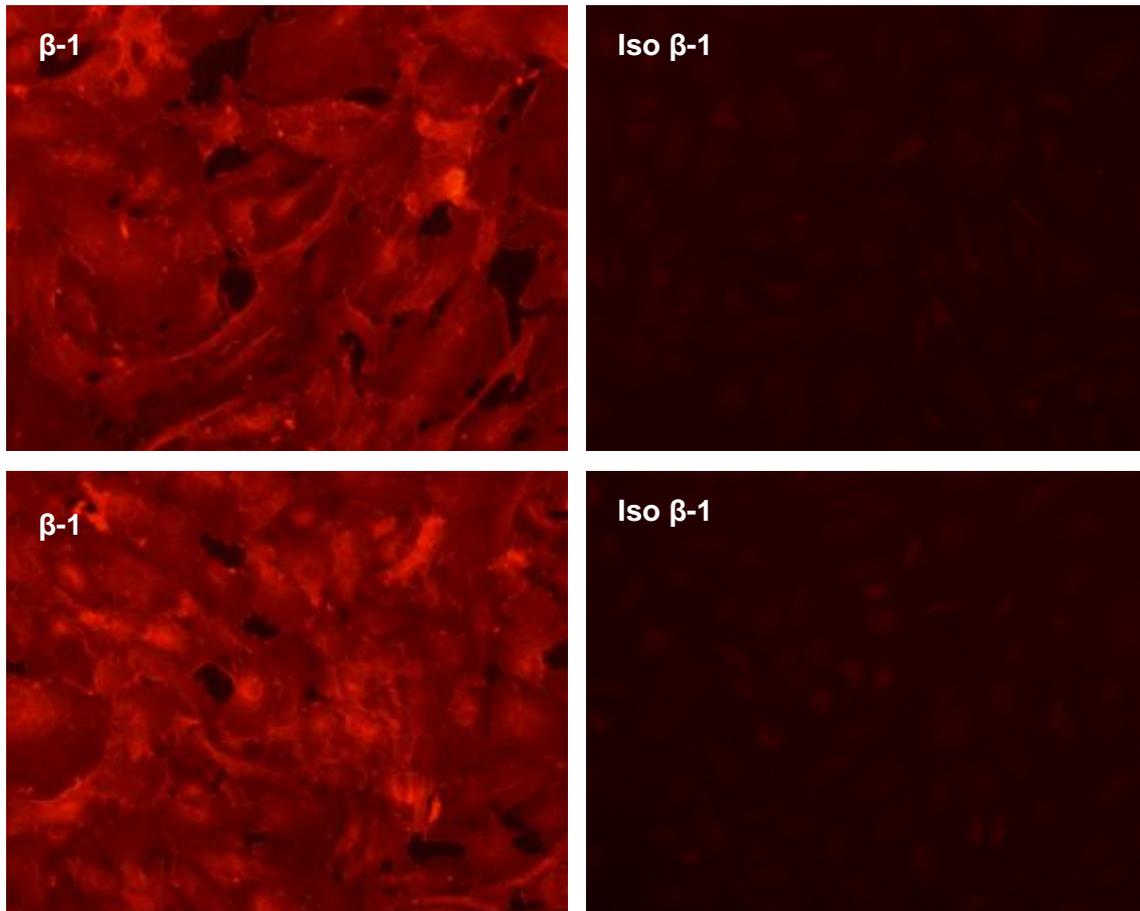


Abbildung 6 Integrin β -1-Färbung auf HCEC 404 (Vergrößerung: 200x)

Im Vergleich zum Isotyp (Iso β -1) zeigt sich bei der Färbung gegen Integrin β -1 (β -1) ein sehr kräftiges Fluoreszenzsignal im Bereich der Zellgrenzen sowie in geringerem Maße im Bereich des Zelleibes.
Fluoreszenz: Cy3 (rot)

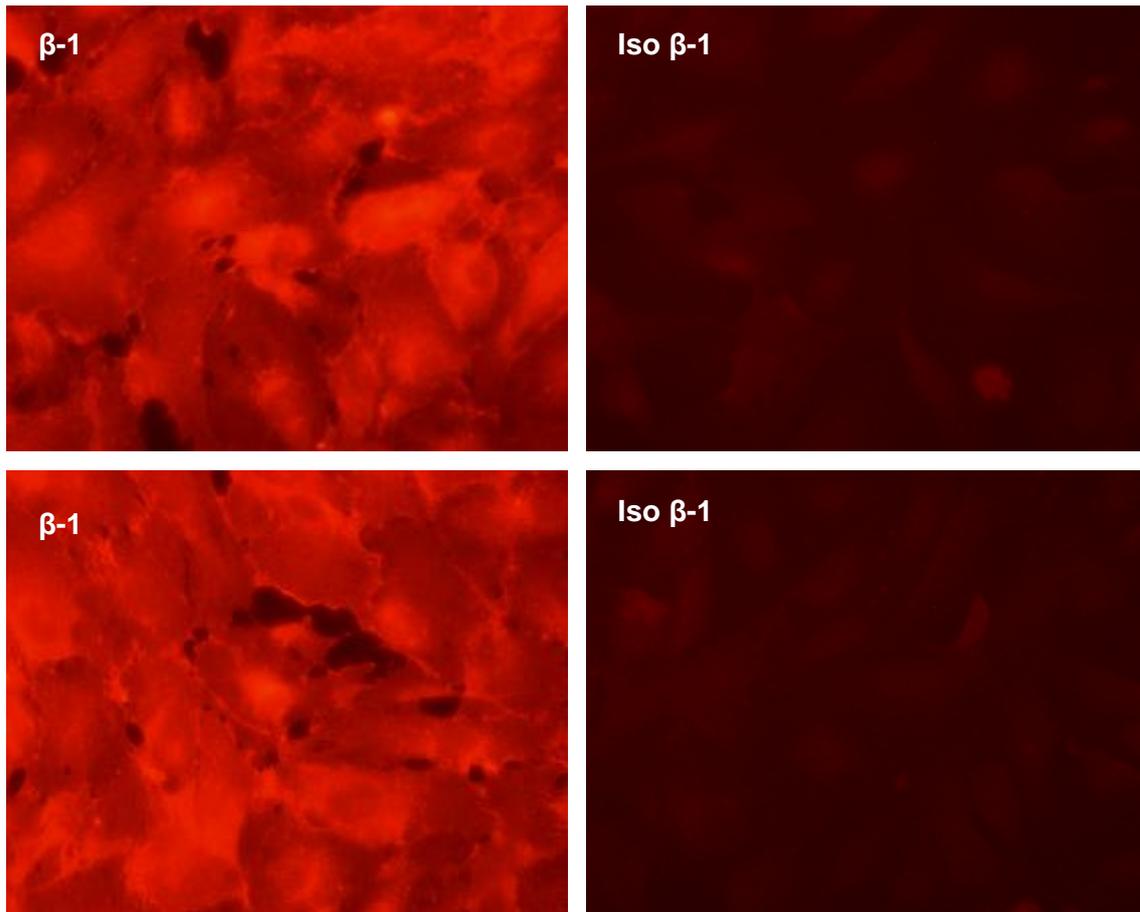


Abbildung 7 Integrin β -1-Färbung auf HCEC 404 (Vergrößerung: 400x)

Im Vergleich zum Isotyp (Iso β -1) zeigt sich bei der Färbung gegen Integrin β -1 (β -1) ein sehr kräftiges Fluoreszenzsignal im Bereich der Zellgrenzen sowie in geringerem Maße im Bereich des Zellleibes.
Fluoreszenz: Cy3 (rot)

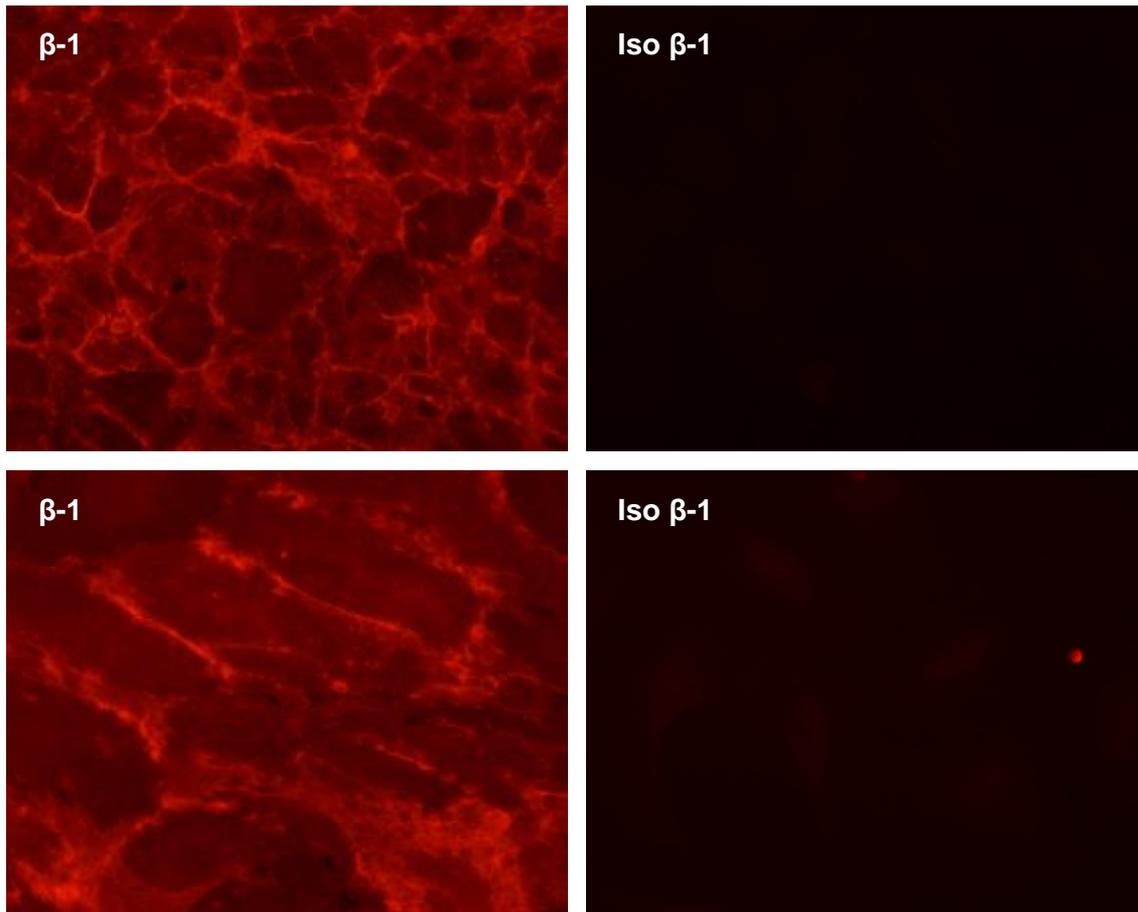


Abbildung 8 Integrin β -1-Färbung der laborinternen Zellisolation (III)

Im Vergleich zu den HCEC-Präparationen zeigt sich bei der Färbung gegen Integrin β -1 (β -1) hier eine deutlichere Betonung der Zellgrenzen. Kontrollfärbung mit Isotyp (Iso β -1). Vergrößerung oben 200x; unten 400x, Fluoreszenz: Cy3 (rot)

Bei einer gleichzeitigen Färbung gegen Integrin β -1 und ZO-1, ein intrazellulär liegendes Protein der Zonulae occludentes zwischen Endothelzellen, konnten zum Teil deutliche Überlagerungen der beiden Strukturen beobachtet werden. Während die ZO-1-Färbung jedoch ein sehr feines Muster aufwies und besonders an den Interzellularkontakten zu finden war, zeigte sich Integrin β -1 sowohl an den Interaktionsstellen als auch an den freien Zellrändern. Insgesamt schien Integrin β -1 auf der gesamten Oberfläche der Endothelzellen verteilt zu sein, wobei jedoch die Zellränder die bevorzugte Lokalisation waren (s. Abbildung 9).

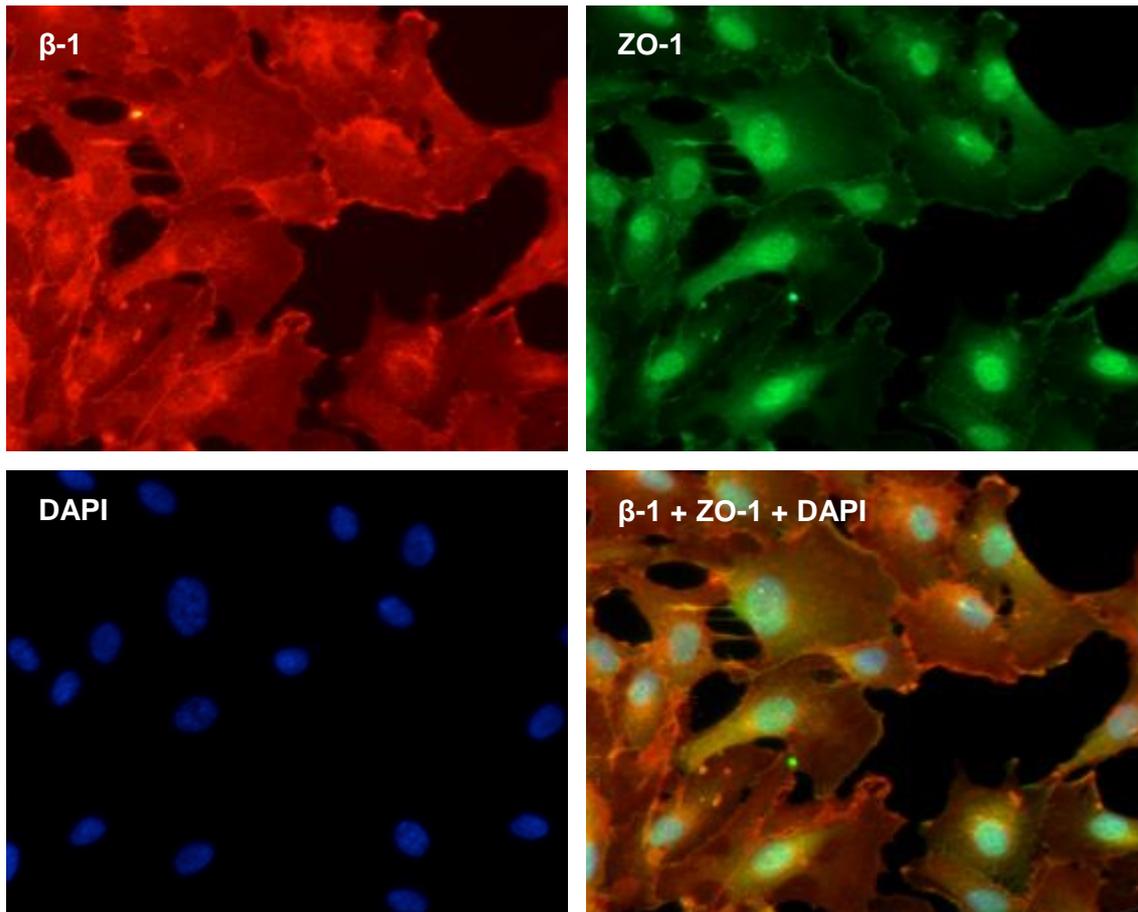


Abbildung 9 Doppelfärbung gegen Integrin β -1 und ZO-1

Im Bereich der Zellgrenzen finden sich zum Teil Überlappungen (orange) von Integrin β -1 und ZO-1. Vergrößerung 400x, Fluoreszenz bei Integrin β -1: Cy3 (rot), Fluoreszenz bei ZO-1: Cy2 (grün), zusätzlich DAPI-Kernfärbung (blau)

Für die Färbungen gegen Integrin α -4 standen insgesamt drei Antikörper von unterschiedlichen Herstellern als Primärantikörper zur Verfügung. In einem Vergleichsexperiment ergaben sich die besten Ergebnisse mit den Antikörpern der Firmen BD bzw. R&D, die dann auch für die weiteren Versuche verwendet wurden.

Das von Integrin α -4 ausgehende Fluoreszenzsignal war in allen Färbungsansätzen schwächer als bei Integrin β -1. Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigte sich eine relativ diffuse Verteilung von Integrin α -4 über die gesamte Zelle. Obwohl die Fluoreszenzfärbung zum Teil nur sehr leicht ausgeprägt war, unterschied sich das granuläre Muster unter Aussparung des Kerns stets deutlich von der Isotypkontrolle. Insgesamt schien Integrin α -4 nicht wie Integrin β -1 vorrangig an den Zellgrenzen lokalisiert zu sein, sondern zeigte sich vielmehr in einer schollenartigen Anordnung über den Zelleib verteilt (s. Abbildung 10 und Abbildung 11). Eine Doppelfärbung mit ZO-1 zeigte keine Überlappungen der beiden Zielmoleküle (s. Abbildung 12).

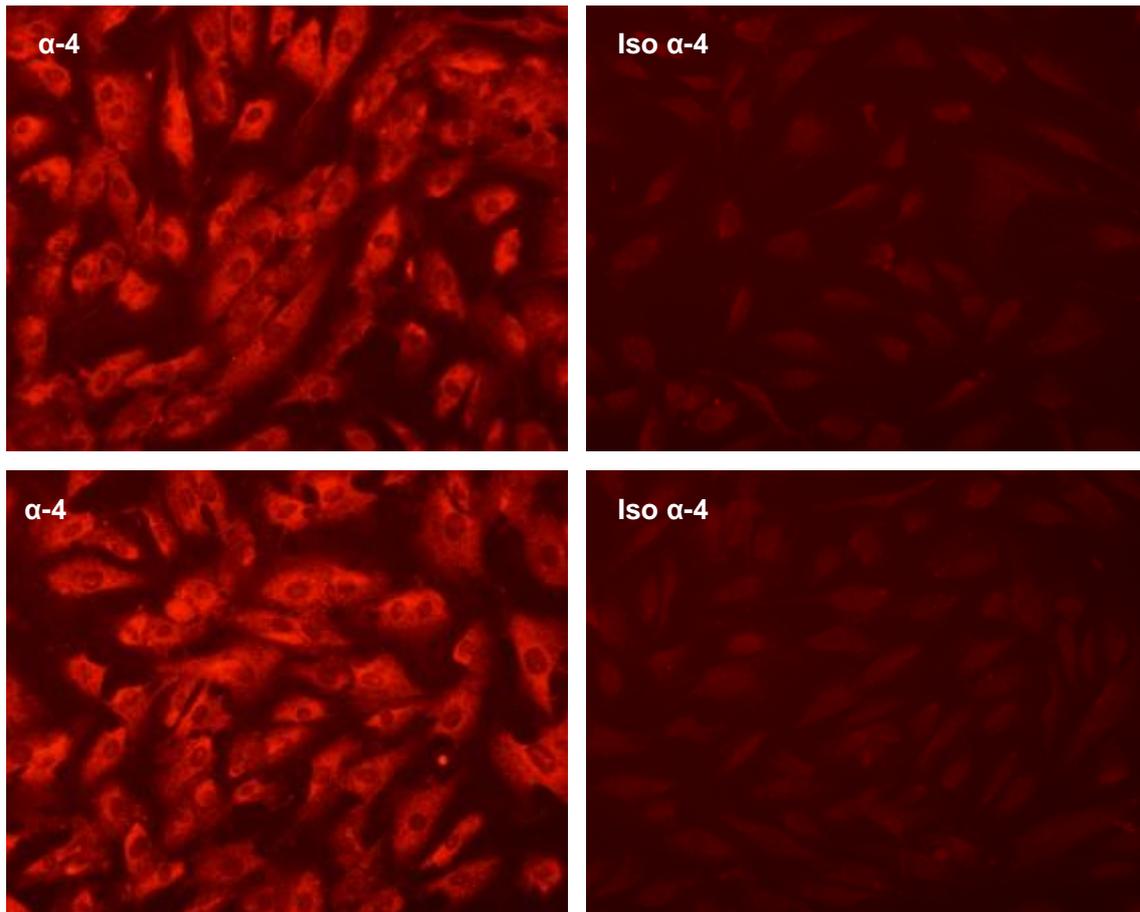


Abbildung 10 Integrin α -4-Färbung auf HCEC 404 (Vergrößerung: 200x)

Im Vergleich zum Isotyp (Iso α -4) zeigt sich bei der Färbung gegen Integrin α -4 (α -4) ein kräftigeres, granuläres Fluoreszenzsignal mit Aussparung im Bereich des Zellkerns.

Fluoreszenz: Cy3 (rot)

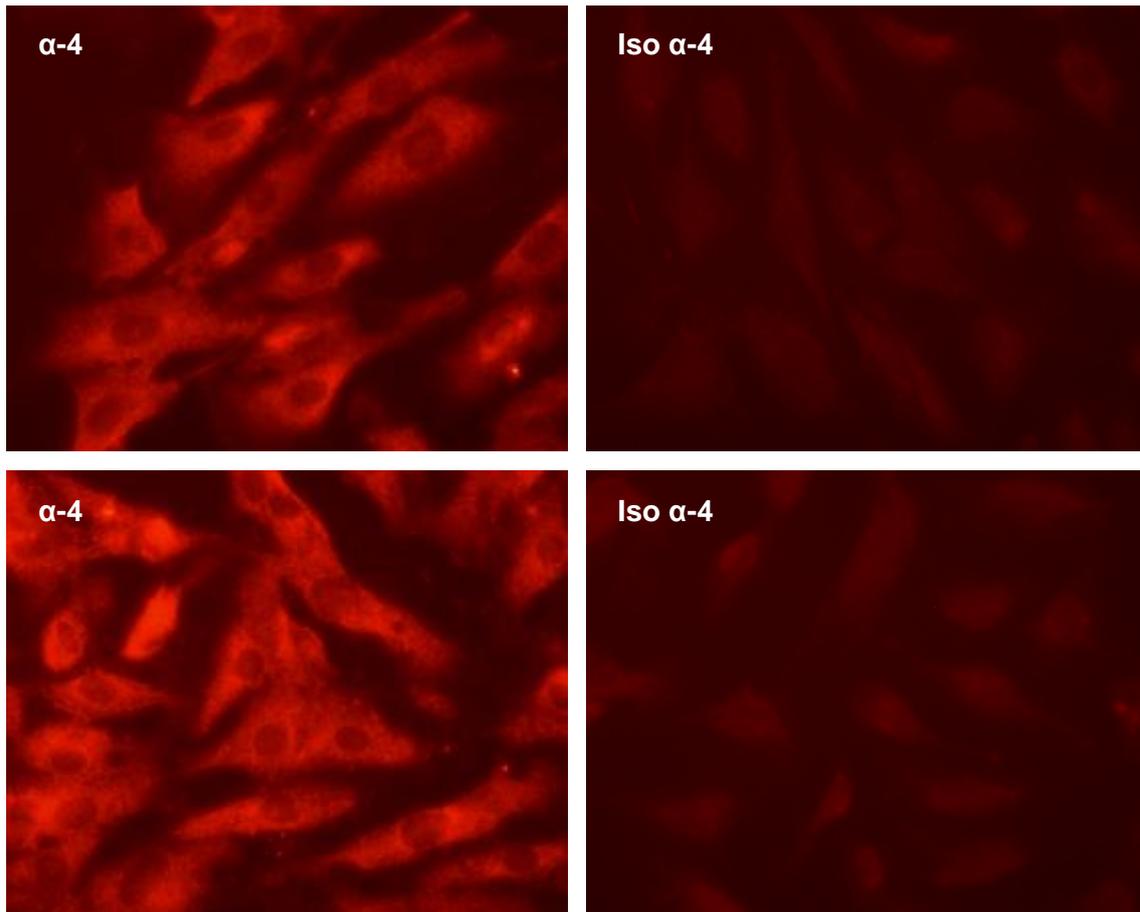


Abbildung 11 Integrin α -4-Färbung auf HCEC 404 (Vergrößerung: 400x)

Im Vergleich zum Isotyp (Iso α -4) zeigt sich bei der Färbung gegen Integrin α -4 (α -4) ein kräftigeres, granuläres Fluoreszenzsignal mit Aussparung im Bereich des Zellkerns.

Fluoreszenz: Cy3 (rot)

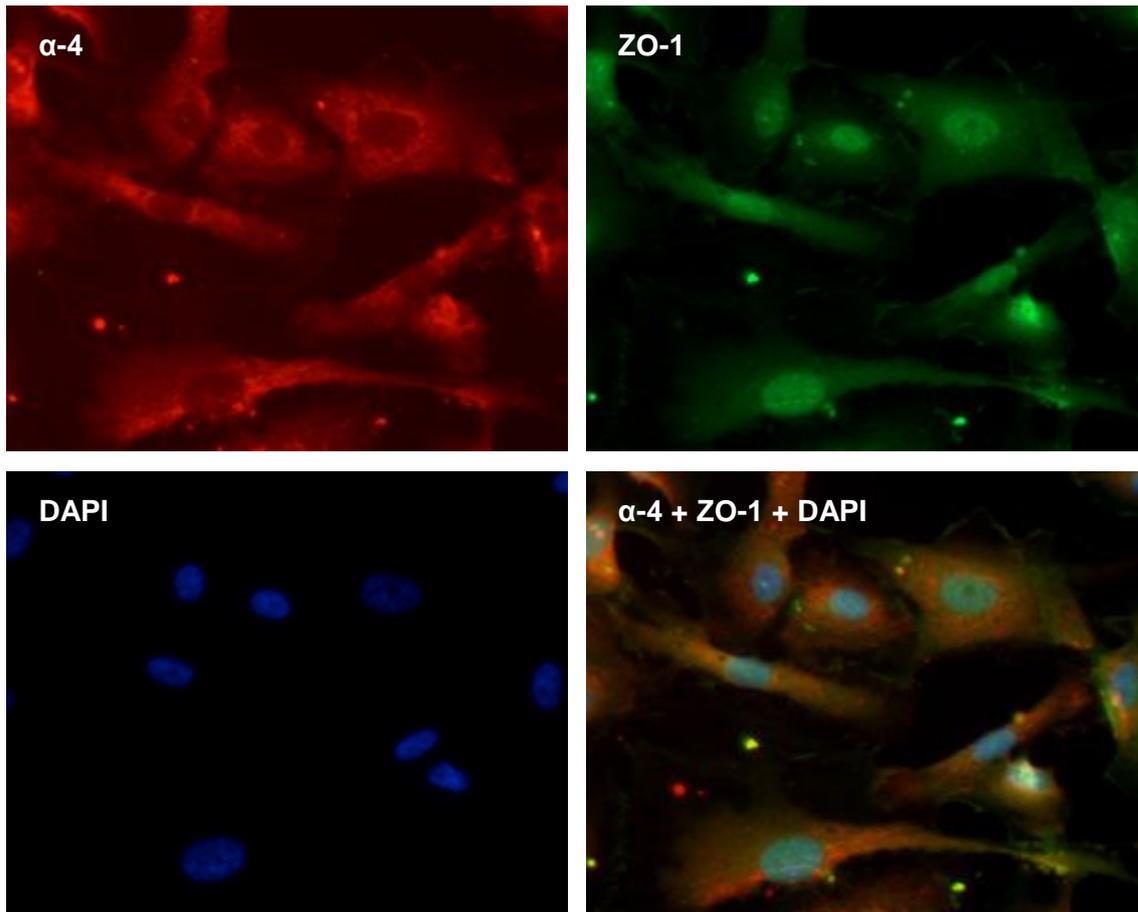


Abbildung 12 Doppelfärbung gegen Integrin α -4 und ZO-1

Die Fluoreszenzsignale, die von Integrin α -4 bzw. ZO-1 ausgehen, scheinen in unterschiedlichen Arealen lokalisiert zu sein.

Vergrößerung 400x, Fluoreszenz bei Integrin α -4: Cy3 (rot), Fluoreszenz bei ZO-1: Cy2 (grün), zusätzlich DAPI-Kernfärbung (blau)

Die Ergebnisse mit den laborinternen Präparationen waren hinsichtlich des Verteilungsmusters von Integrin α -4 vergleichbar. Der zweite Dimerisierungspartner von Integrin α -4, das Integrin β -7, konnte durch die Fluoreszenzfärbungen auf den HCEC nicht nachgewiesen werden.

3.2 Untersuchungen am Durchflusszytometer hinsichtlich der basalen und stimulierten Expression der Integrine α -4 und β -1

Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob es sich bei der Expression von Integrin α -4 auf den adulten zerebralen Endothelzellen um ein konstantes Phänomen handelte oder ob eine Induktion durch Zytokine möglich war. Hierzu wurden Untersuchungen am Durchflusszytometer durchgeführt, die zunächst die in den Färbungen bereits sichtbare Expression der Integrine α -4 und β -1 auf HCEC belegten. Die Analyse der Expressionsstärke zeigte in Analogie zu den immunzytochemischen Färbungen eine konstant hohe

Konzentration von Integrin β -1 sowie ein deutlich schwächeres Signal von Integrin α -4. Integrin β -7 konnte auf keiner Zellpopulation entdeckt werden (s. Abbildung 13).

Im Laufe der Versuche zeigte sich, dass sich nicht alle primären Zellen in gleicher Weise verhielten. Von den vier getesteten HCEC-Präparationen wiesen in den im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Experimenten nur zwei (404 und 419) eine Expression von Integrin α -4 auf. Aber auch innerhalb einer Präparation konnte die Beobachtung gemacht werden, dass frisch aufgetaute Zellpopulationen unterschiedliche Eigenschaften hatten. So gab es insbesondere im Wachstumsverhalten eine Variationsbreite von extrem langsam wachsenden und verstreut liegenden Zellpopulationen bis hin zu sehr schnell und dicht wachsenden. Neben diesen sichtbaren Unterschieden erwies sich auch die Expression von Integrin α -4 als sehr variabel. Einige der in Stickstoff gelagerten Zellpopulationen waren von Anfang an auch in den niedrigen Passagen (3-5) in den FACS-Analysen negativ bezüglich Integrin α -4. Andere wiederum zeigten nach einer anfänglich guten Expression einen Abfall in hohen Passagen. Diese inkonstante Integrin α -4-Expression (s. Abbildung 14) machte einen konsequenten FACS-Nachweis bei allen in den anderen Experimenten verwendeten Zellen nötig, um Fehlinterpretationen zu vermeiden. Hierbei stellte sich gleichzeitig heraus, dass Integrin β -1 völlig konstant nachweisbar war.

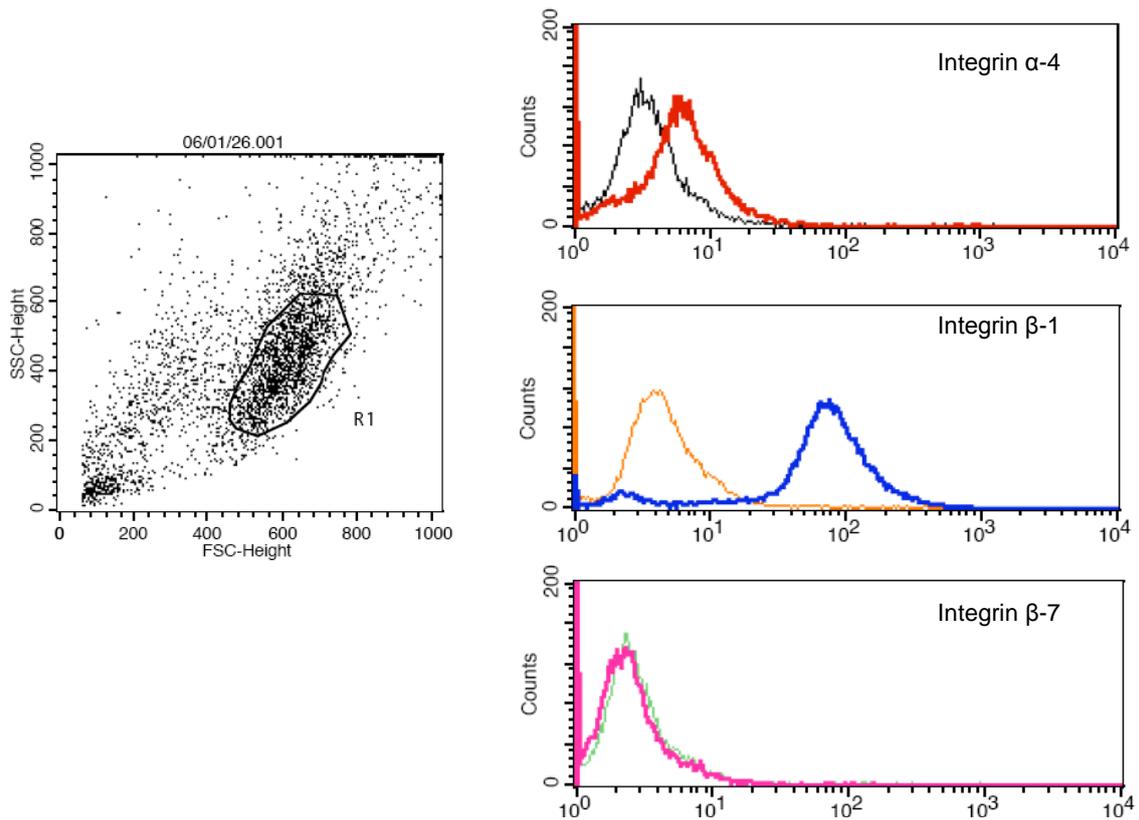


Abbildung 13 Expressionsanalyse von Integrin α -4, β -1 und β -7 auf HCEC 404

Deutliche Expression von Integrin α -4 sowie von Integrin β -1. Kein Nachweis von Integrin β -7.

Links: Darstellung der ungefärbten Zellpopulation.

Antikörper: Integrin α -4 (rot) und Isotyp IgG2b Maus (schwarz), Fluoreszenz: FITC
 Integrin β -1 (blau) und Isotyp IgG1 Maus (gelb), Fluoreszenz: PE
 Integrin β -7 (rosa) und Isotyp IgG2a Ratte (grün), Fluoreszenz: PE

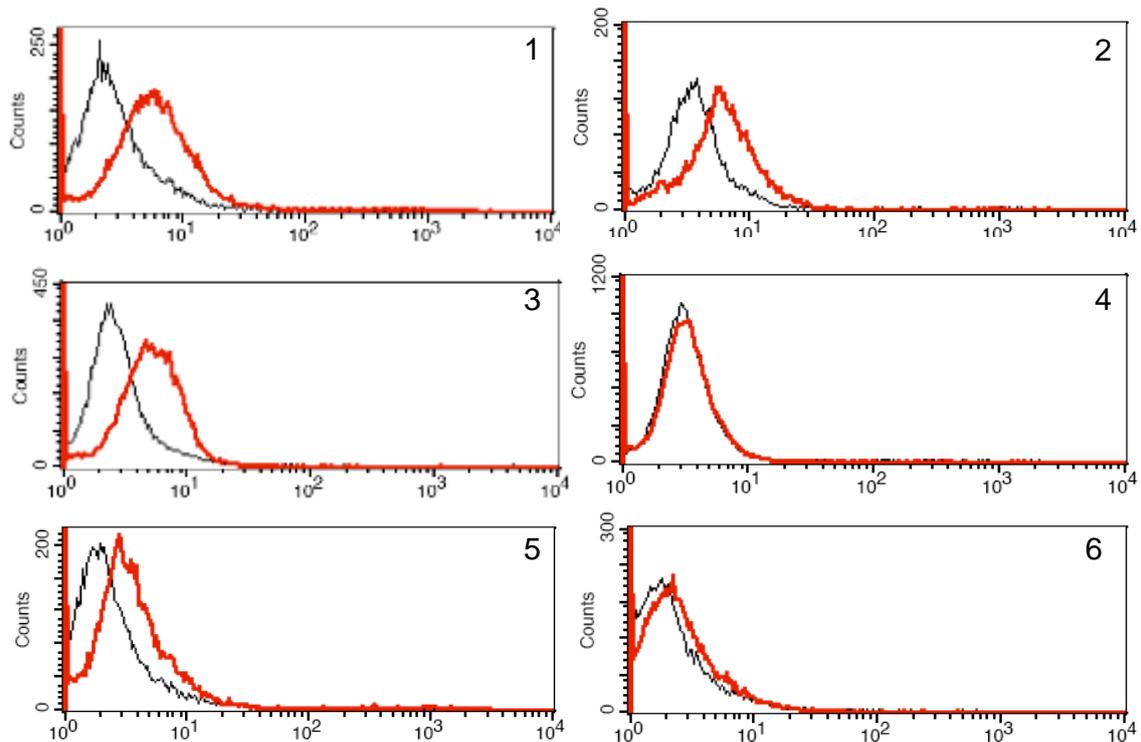


Abbildung 14 Beispiele zur variablen Integrin α -4-Expression auf verschiedenen HCEC

1-4: Untersuchung von HCEC 404: guter bzw. nahezu fehlender Nachweis von Integrin α -4;

5: Untersuchung von HCEC 419; 6: Untersuchung von HCEC 379

Antikörper: Integrin α -4 (rot) und Isotyp IgG2b Maus (schwarz), Fluoreszenz: FITC

Die Expression von Integrin α -4 war außerdem unabhängig von der Wachstumsphase zum Zeitpunkt des Nachweises. Hierfür wurden einerseits Zellen untersucht, die sich noch in der Proliferation befanden. Dies wurde dadurch gewährleistet, dass die Färbung begonnen wurde, bevor sich die Zellen in ihrer Kulturschale zu einer konfluenten Zelllage verdichtet hatten. Die Ergebnisse wurden mit Zellen verglichen, die am Messtag bereits eine durchgehende Zellschicht auf der Kulturschale zeigten. Bei der Auswertung konnten keine Unterschiede in der Expressionsstärke von Integrin α -4 bzw. β -1 zwischen den beiden Zellpopulationen festgestellt werden (s. Abbildung 15).

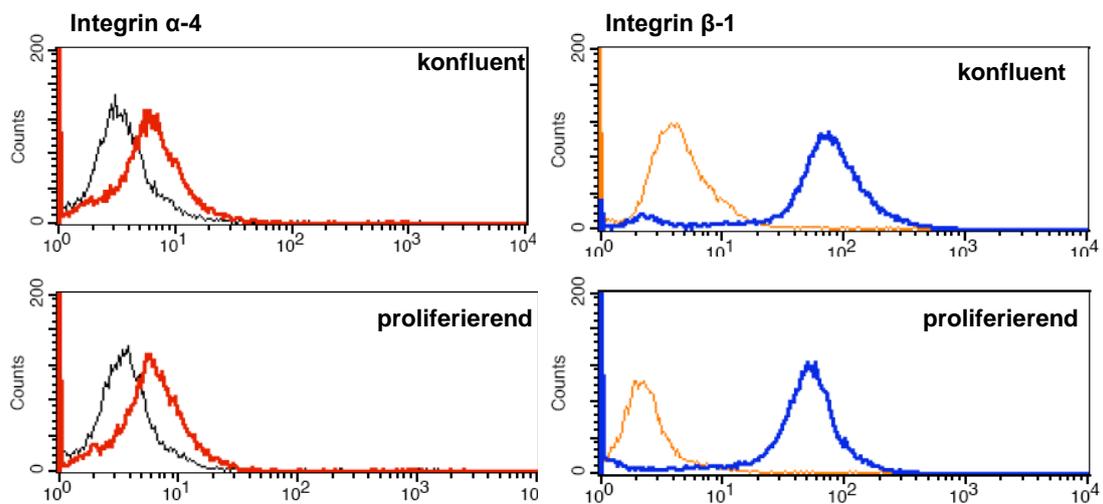


Abbildung 15 Darstellung der Expression der Integrine α -4 bzw. β -1 in Abhängigkeit vom Proliferationszustand

Die Wachstumsphase scheint keinen Einfluss auf die Expression von Integrin α -4 bzw. β -1 zu haben.

Antikörper: Integrin α -4 (rot) und Isotyp IgG2b Maus (schwarz), Fluoreszenz: FITC
Integrin β -1 (blau) und Isotyp IgG1 Maus (gelb), Fluoreszenz: PE

Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob sich die Konzentration der untersuchten Integrine durch äußere Stimuli beeinflussen ließe. Für diesen Versuchsteil wurden die im Durchflusszytometer gemessenen Zellen 24 h vor der FACS-Färbung mit verschiedenen Substanzen wie Zytokinen und Wachstumsfaktoren stimuliert, die die Expression von Integrienen beeinflussen können.

Die verwendeten Stimulantien TNF- α (100 ng/ml), TGF- β (2 ng/ml), IFN- γ (100 U/ml) IFN- β (100 U/ml), VEGF (*vascular endothelial growth factor*; 10 ng/ml), VCAM-1 (10 ng/ml und 1 μ g/ml) und IL-6 (10 ng/ml) zeigten in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten keinen messbaren Einfluss auf die Spiegel von Integrin β -1. Die Expression von Integrin α -4 hingegen schien durch die Zugabe von VCAM-1 leicht anzusteigen (s. Abbildung 16).

Anmerkung: In einer weiteren Versuchsreihe außerhalb des Rahmens dieser Arbeit ließ sich eine Modulation der Integrin α -4-Expression durch VEGF in Form einer Expressionssteigerung nachweisen.

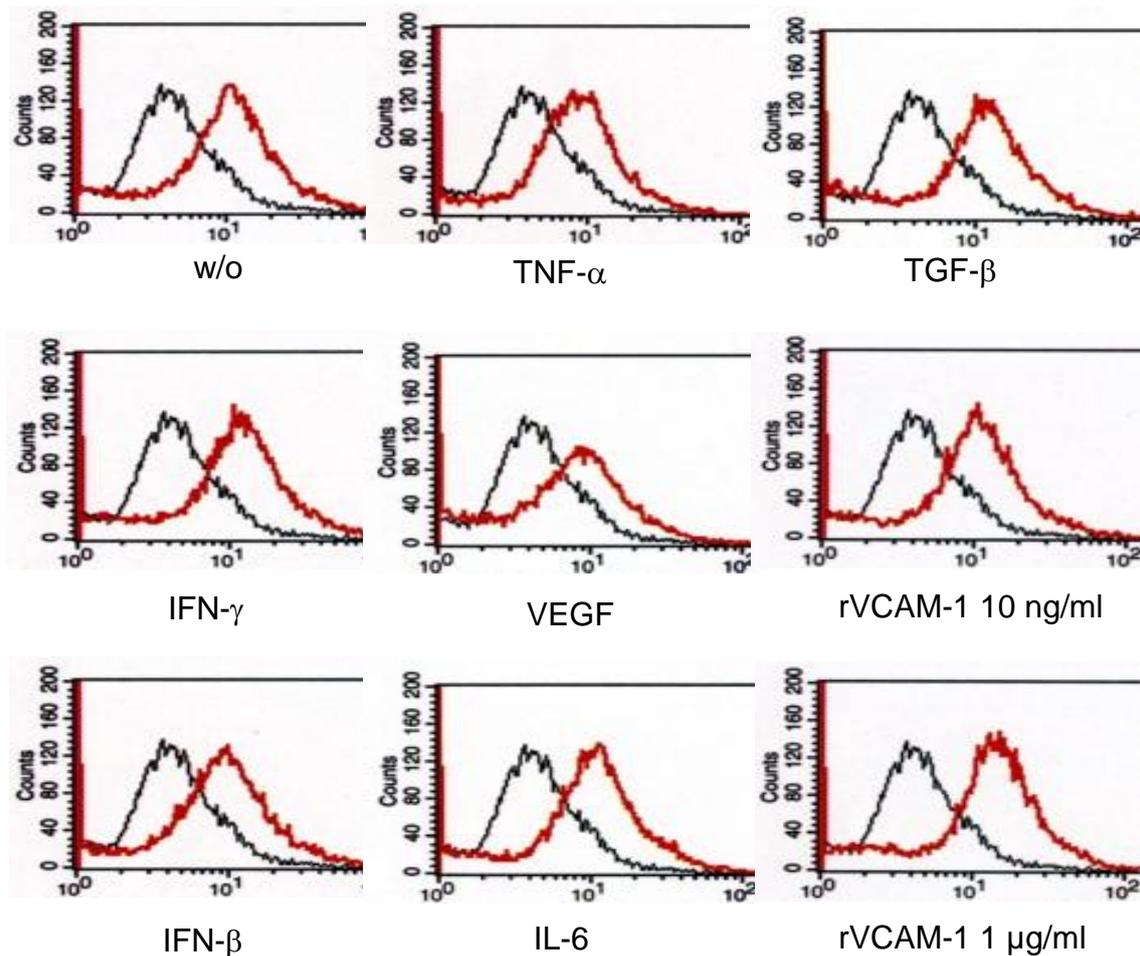


Abbildung 16 Integrin α -4-Expression auf HCEC 404 bei unterschiedlichen Stimulationsbedingungen für jeweils 24 h

Es findet sich im Vergleich zur Negativkontrolle ein leicht erhöhtes Fluoreszenzsignal bei Stimulation mit VCAM-1 in einer Konzentration von 1 μ g/ml.

Antikörper: Integrin α -4 (rot) und Isotyp IgG2b Maus (schwarz), Fluoreszenz: FITC

Neben den kommerziell erhältlichen Zellpräparationen wurden auch die laborinternen Endothelzellisolationen auf ihre Integrinexpression hin untersucht. Hier zeigte sich zuverlässig eine gute Expression von Integrin α -4 und β -1 (s. Abbildung 17).

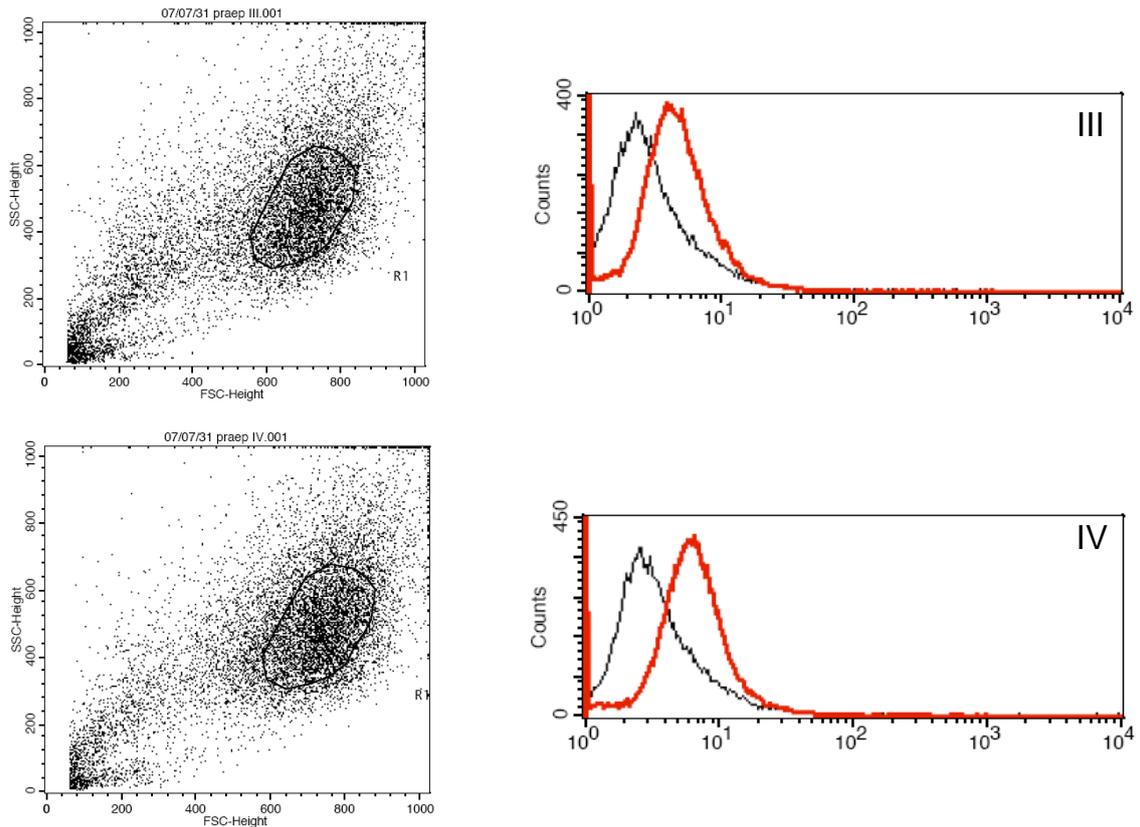


Abbildung 17 Integrin α -4-Expression auf den laborinternen Endothelzellisolationen III und IV
 Diese Darstellung zeigt die deutliche Expression von Integrin α -4 auf beiden untersuchten Präparationen.
 Links: Darstellung der jeweiligen ungefärbten Zellpopulation.
 Antikörper: Integrin α -4 (rot) und Isotyp IgG2b Maus (schwarz), Fluoreszenz: FITC

Abgesehen von den erwähnten primären Zellen standen für den Laborgebrauch auch einige immortalisierte Endothelzelllinien zur Verfügung. Um ein möglichst umfassendes Bild der Expression der Integrine α -4 und β -1 auf den verschiedenen Labor-Kulturzellen zu erhalten, wurden auch die Zelllinien hCMEC/D3 (s. Abbildung 18) sowie HBMEC (s. Abbildung 19) durchflusszytometrisch untersucht. Während sich die Integrin β -1-Expression hier wiederum konstant hoch zeigte, ließ sich Integrin α -4 auf immortalisierten Zellen zwar nachweisen, jedoch in geringerer Ausprägung und weniger zuverlässig als auf den primären Zellen.

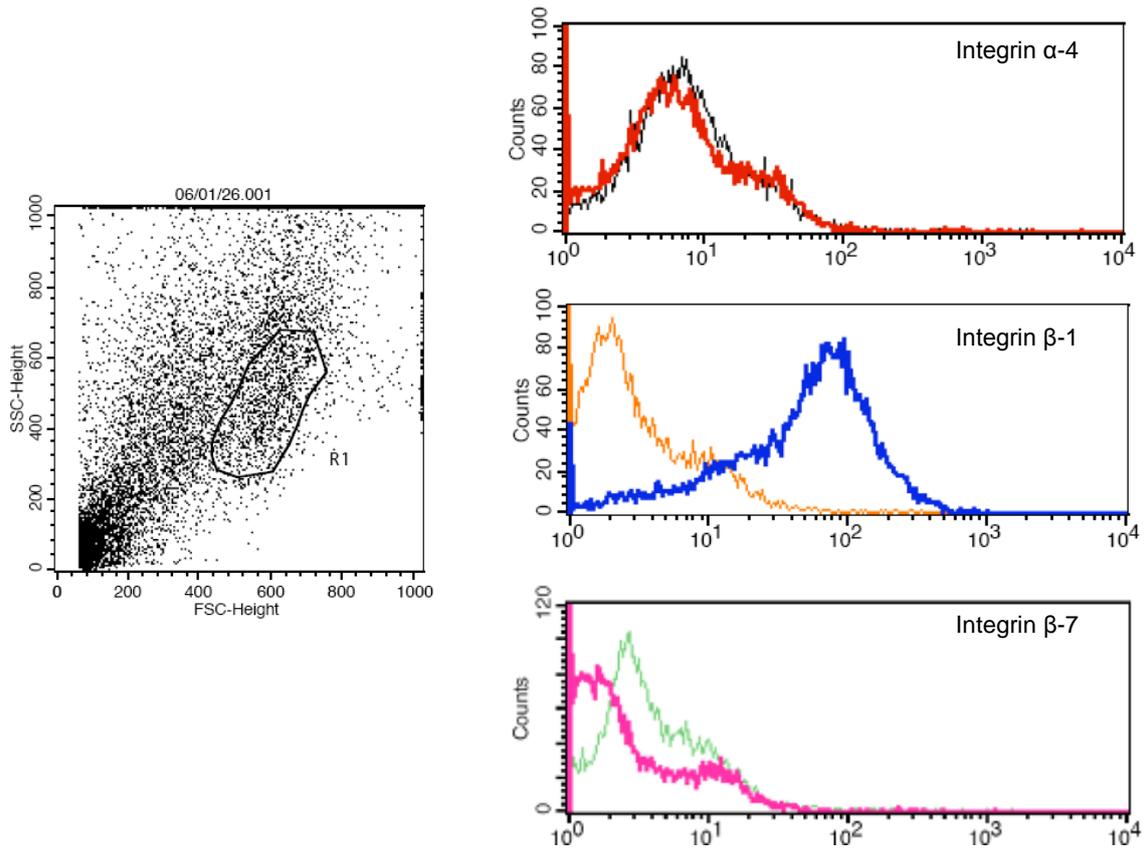


Abbildung 18 Integrin-Expression auf der Zelllinie hCMEC/D3

Dieser Versuch zeigt auf den untersuchten Zellen keine Expression von Integrin α -4 und β -7, jedoch eine deutliche Expression von Integrin β -1.

Anmerkung: In weiteren Experimenten konnte auch auf hCMEC/D3 Integrin α -4 nachgewiesen werden.

Links: Darstellung der ungefärbten Zellpopulation.

Antikörper: Integrin α -4 (rot) und Isotyp IgG2b Maus (schwarz), Fluoreszenz: FITC
 Integrin β -1 (blau) und Isotyp IgG1 Maus (gelb), Fluoreszenz: PE
 Integrin β -7 (rosa) und Isotyp IgG2a Ratte (grün), Fluoreszenz: PE

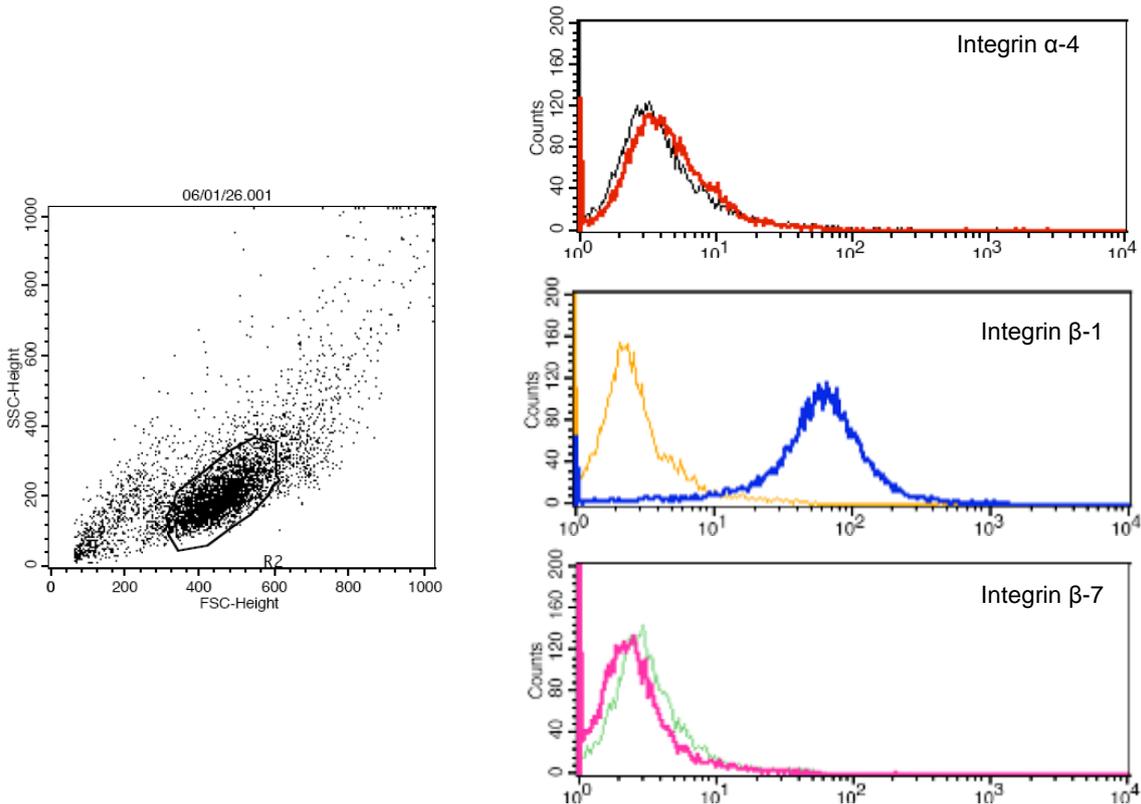


Abbildung 19 Integrin-Expression auf der Zelllinie HBMEC

Dieser Versuch zeigt auf den untersuchten Zellen eine geringe Expression von Integrin α -4 sowie die deutliche Expression von Integrin β -1. Integrin β -7 fehlt.

Links: Darstellung der ungefärbten Zellpopulation.

Antikörper: Integrin α -4 (rot) und Isotyp IgG2b Maus (schwarz), Fluoreszenz: FITC
 Integrin β -1 (blau) und Isotyp IgG1 Maus (gelb), Fluoreszenz: PE
 Integrin β -7 (rosa) und Isotyp IgG2a Ratte (grün), Fluoreszenz: PE

Aus diesem Grund wurde in den folgenden Versuchen auf die primären Zellen zurückgegriffen, um an ihnen mögliche Auswirkungen einer Integrin α -4-Blockade durch Natalizumab zu klären. Außerdem wurden parallel zu den Versuchen auch FACS-Analysen der verwendeten Zellen durchgeführt, um die exakten Expressionsmuster der jeweiligen Isolation zu dokumentieren.

3.3 Beobachtung der Adhäsion von Endothelzellen nach Zugabe von Natalizumab und Kontrollantikörpern

Da das zu Natalizumab gehörende Antigen Integrin α -4 u.a. an Fibronectin bindet, das in der Basalmembran vorkommt, könnte es bei der Adhäsion der Zellen am Untergrund von Bedeutung sein. Die Fähigkeit der Anheftung von Endothelzellen an Fibronectin sollte daher in Gegenwart von Natalizumab untersucht werden. Hierzu wurden Adhäsionsversuche durchgeführt, bei denen die Vertiefungen der Analyseplatten mit einer Fibronectinlösung beschichtet wurden. Zum Ausschluss einer unspezifischen Wirkung

des Antikörpers auf die Interaktion zwischen Endothelzellen und Fibronectin wurde parallel eine Kontrollbedingung in Form von unbeschichteten Näpfen eingeführt.

In den Experimenten sollten vor allem dosisabhängige Effekte seitens des Antikörpers überprüft werden. Wichtige Konzentrationen bei einem therapeutischen Einsatz von Natalizumab (Einzeldosis maximal 300 mg i.v.) sind die Plasmaspiegel *in vivo* unmittelbar nach Injektion (100 µg/ml) sowie im Gleichgewichtszustand (30 µg/ml; Rudick, Sandrock 2004). Zusätzlich wurden noch niedrigere Konzentrationen in den Versuchsaufbau eingebaut (0,3 µg/ml; 1 µg/ml; 3 µg/ml; 10 µg/ml), um einen möglichen Zusammenhang in einer Kurve darstellen zu können.

Ein weiterer wichtiger Aspekt in der Versuchsplanung war die Suche nach einem geeigneten Kontrollantikörper. Dieser sollte möglichst kein endothelzellständiges Antigen binden, damit unspezifische Immunglobulinwirkungen untersucht werden konnten. Der ideale Vergleichsantikörper sollte wie Natalizumab dem Subtyp IgG4κ angehören, da sich auch die einzelnen Klassen untereinander durch ihre immunologischen Eigenschaften unterscheiden. Zum Zeitpunkt der Versuchsreihe stand ein derartiger Antikörpertyp jedoch nicht zur Verfügung. Daher wurden folgende Kontrollantikörper verwendet: Sandoglobulin, Efalizumab und Alemtuzumab.

Sandoglobulin beinhaltet in konzentrierter Form alle IgG-Antikörper, die normalerweise im Blut des Menschen vorhanden sind. Es wird therapeutisch eingesetzt, um bei Patienten mit erniedrigtem IgG-Spiegel die humorale Abwehr wieder zu verbessern. Indikationen sind primäre Immundefizienzsyndrome wie beispielsweise Agammaglobulinämie oder schwere, kombinierte Immundefekte (SCID: *severe combined immunodeficiency*). Für die Experimente wurde das von Priv.-Doz. Dr. rer. nat. A. Weishaupt zur Verfügung gestellte, gereinigte und lyophilisierte Sandoglobulin verwendet. Diese Mischung aus verschiedenen, nicht endothelspezifischen Antikörpern schien als Kontrollantikörper geeignet.

Efalizumab (Raptiva®) ist ein humanisierter, monoklonaler Antikörper des Subtyps IgG1 gegen die CD11a-Untereinheit (α -Kette) des LFA-1-Rezeptors. Dieses Molekül kommt auf der Oberfläche von aktivierten T-Lymphozyten vor und dient der Interaktion mit ICAM auf Endothelzellen. Durch Bindung werden verschiedene immunologische Vorgänge wie z.B. die Extravasation von Leukozyten gesteuert. Die blockierenden Eigenschaften zwischen LFA-1 und ICAM durch Efalizumab werden im Rahmen der Psoriasis-Therapie genutzt, um die durch ausgewanderte T-Zellen verursachte Hyperkerato-

se der Haut zu verhindern (Serono: Raptiva® Efalizumab; Packungsbeilage 2007). LFA-1 wird von Endothelzellen nicht exprimiert.

Beim dritten Kontrollantikörper Alemtuzumab (MabCampath®) handelt es sich ebenfalls um einen humanisierten, monoklonalen IgG1-Subtyp. Er richtet sich gegen das Oberflächenantigen CD52 auf normalen sowie auf maligne transformierten Lymphozyten. Die Bindung des Antikörpers bewirkt über Komplementaktivierung und zytotoxische Immunabwehr eine Lyse der CD52⁺-Zellen (in erster Linie T- und B-Lymphozyten). Indikation für die Therapie mit MabCampath® ist die chronisch lymphatische Leukämie (CLL). Unter Gabe von Alemtuzumab kann eine Remission unter Schonung der hämatopoietischen Stammzellen erreicht werden (Bayer Schering: MabCampath® Alemtuzumab; Packungsbeilage 2006). Eine weitere Indikation für die Gabe von Alemtuzumab könnte in Zukunft die MS sein. Derzeit zeigen klinische Studien mit diesem Antikörper vielversprechende Ergebnisse (Buttmann, Rieckmann 2008).

Bei der Versuchsplanung und -auswertung spielte außerdem die in der Durchflusszytometrie gewonnene Beobachtung, dass Zellen einer Präparation keine kontinuierliche Integrin α -4-Expression zeigten, eine Rolle. Die bei der Adhäsion verwendeten Zellen wurden daher stets zeitnah einer FACS-Analyse unterzogen.

Um mehrere Einzelergebnisse zusammenfassen zu können, wurden die absoluten Zahlen, die bei der Auszählung am Mikroskop gewonnen wurden, in Prozentangaben umgerechnet. Dies war notwendig, da diese Zahlen trotz gleicher Versuchsdurchführung großen Schwankungen unterlagen. So ergaben sich beispielsweise auf unbeschichteten Näpfen bei Zählungen zwischen 0 und ca. 1000 Zellen pro Bildausschnitt, während die Spannweite auf Fibronectin ca. 150 bis 2000 betrug. Insgesamt konnte jedoch in jedem Einzelversuch ein deutlicher Unterschied zwischen der Anheftung auf Fibronectin und auf unbeschichtetem Kunststoff festgestellt werden (s. Tabelle 2 und Abbildung 20).

Ergebnisse

Einzelexperiment	Integrin α -4-Nachweis	ohne Beschichtung*	Fibronectin*	Faktor**
A1	negativ	478,58	573,42	1,20
A2	negativ	779,83	1080,83	1,39
A3	negativ	217,25	504,25	2,32
A4	negativ	20,25	1072,58	52,97
A5	negativ	233	884,75	3,80
A6	negativ	216,5	845,33	3,90
A7	negativ	135	773,33	5,73
Mittelwert				10,19
B1	positiv	242,5	760,33	3,14
B2	positiv	186	1149,83	6,18
B3	positiv	185,67	1579,83	8,51
B4	positiv	674,5	1377	2,04
B5	positiv	865	1319,5	1,53
B6	positiv	171	733,5	4,29
B7	positiv	164,17	716	4,36
B8	positiv	46	540,5	11,75
B9	positiv	84,83	467	5,50
B10	positiv	2	193,67	96,83
B11	positiv	5,33	188	35,25
B12	positiv	4,33	392,83	90,65
B13	positiv	10,5	339,33	32,32
B14	positiv	416,33	483,33	1,16
B15	positiv	404,17	459,67	1,14
Mittelwert				20,31
Mittelwert gesamt				17,09

Tabelle 2 Adhäsionsversuche: Vergleich der Nullwerte aller Experimente in absoluten Zahlen zwischen unbeschichteten und fibronectinbeschichteten Näpfen (nur HCEC 404 und 419)

(A): Zellen negativ für Integrin α -4; (B): Zellen positiv für Integrin α -4

* Mittelwert der absoluten Zellzahl pro Bildausschnitt ohne Antikörperzugabe aus je 6 oder 12 Einzelwerten

** Faktor, um den sich die Adhäsion auf Fibronectin im Vergleich zur unbeschichteten Kontrolle erhöht

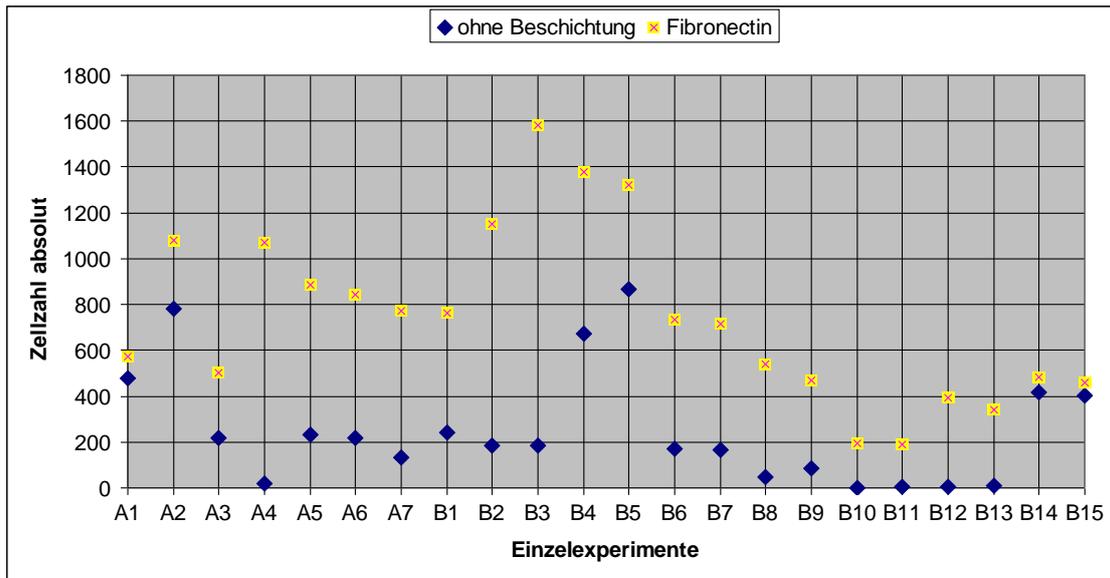


Abbildung 20 Darstellung der absoluten Zellzahl bei Adhäsion auf unbeschichtetem bzw. fibronectinbeschichtetem Untergrund

A1-7: Zellen negativ für Integrin α -4; B1-15: Zellen positiv für Integrin α -4

Trotz großer Schwankung der Absolutwerte in den Einzelexperimenten war eine durchwegs bessere Anheftung der Zellen auf Fibronectin zu beobachten. So ergab sich im Durchschnitt auf den fibronectinbeschichteten Näpfen eine knapp 20-fach höhere Adhäsion als auf den unbehandelten Näpfen.

Bei einer Auftrennung dieser Experimente in die beiden Gruppen „positive“ bzw. „negative“ Expression von Integrin α -4 zeigte sich außerdem ein Unterschied im Faktor, um den sich die Anheftung auf Fibronectin erhöht. Während die durchschnittliche Adhäsion bei Zellen ohne Integrin α -4 auf Fibronectin um den Faktor 10 anstieg, erhöhte sie sich bei Zellen mit Integrin α -4 um den Faktor 20. Insgesamt war dieser Unterschied jedoch aufgrund der großen Variation der Einzelwerte nicht signifikant ($p > 0,05$).

Auch die weiteren Ergebnisse zum Adhäsionsverhalten können in die zwei Gruppen aufgeteilt werden: Auf der einen Seite in die Experimente mit Zellen ohne Integrin α -4 sowie auf der anderen Seite die Versuche mit positiv getesteten Zellen.

Anmerkung: Diese beiden unterschiedlichen Serien von Experimenten kamen dadurch zustande, dass die FACS-Analyse erst im Anschluss an den jeweiligen Adhäsionsversuch durchgeführt wurde.

3.3.1 Adhäsionsverhalten bei Integrin α -4-Nachweis

Bei den Untersuchungen des Adhäsionsverhaltens der Endothelzellen in Gegenwart von Natalizumab ergab sich bei Integrin α -4-exprimierenden Zellen stets ein ähnliches Bild: Die Anheftung der Zellen an Fibronectin konnte durch steigende Antikörperkonzentrationen blockiert werden. Dieser Effekt durch Natalizumab hingegen fehlte bei den Zellen, die auf einem unbeschichteten Untergrund adhärieren sollten (s. Abbildung 21).

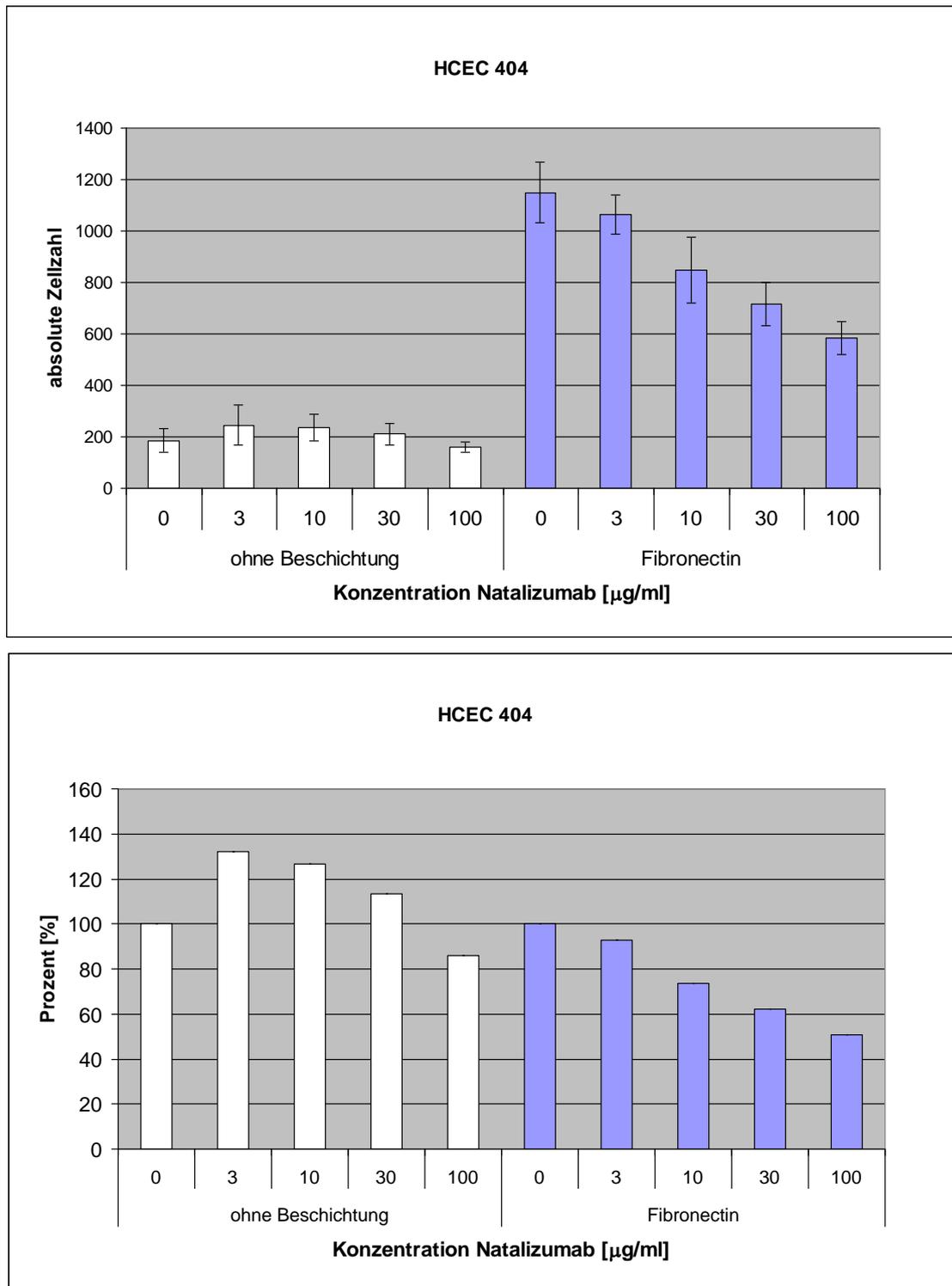


Abbildung 21 Adhäsion in Gegenwart von steigenden Konzentrationen von Natalizumab

Beispiel eines Einzelexperimentes mit Integrin α -4-exprimierenden HCEC 404. Auf Fibronectin zeigt Natalizumab insgesamt einen konzentrationsabhängigen hemmenden Effekt auf die Adhäsion der Integrin α -4-exprimierenden Zellen

Oben: Darstellung der durchschnittlichen absoluten Zahlen adhärenter Zellen pro Bildausschnitt auf Fibronectin sowie auf unbeschichtetem Untergrund

Die Standardabweichung errechnet sich aus sechs ausgezählten Einzelwerten.

Unten: Die in der Graphik verwendeten Prozentangaben beziehen sich jeweils auf den Kontrollwert ohne Antikörper auf dem entsprechenden Untergrund. Dieser wurde als Ausgangswert (= 100 %) herangezogen. So konnten anschließend auch mehrere Einzelexperimente vergleichbar gemacht werden.

Insgesamt zeigte sich bei den anfänglichen Versuchen mit vier verschiedenen Konzentrationen von Natalizumab (3, 10, 30 und 100 $\mu\text{g/ml}$) eine Hemmung der Adhäsion auf Fibronectin in Abhängigkeit zur zugegebenen Menge an Antikörper. Die Kontrolle auf unbeschichteten Näpfen legte keinen eindeutigen Bezug nahe. In den folgenden Experimenten wurden noch zwei schwächere Konzentrationen (0,3 und 1 $\mu\text{g/ml}$) eingefügt, um auch in diesem niedrigen Bereich eventuelle Auswirkungen des Antikörpers zu erkennen (s. Abbildung 22).

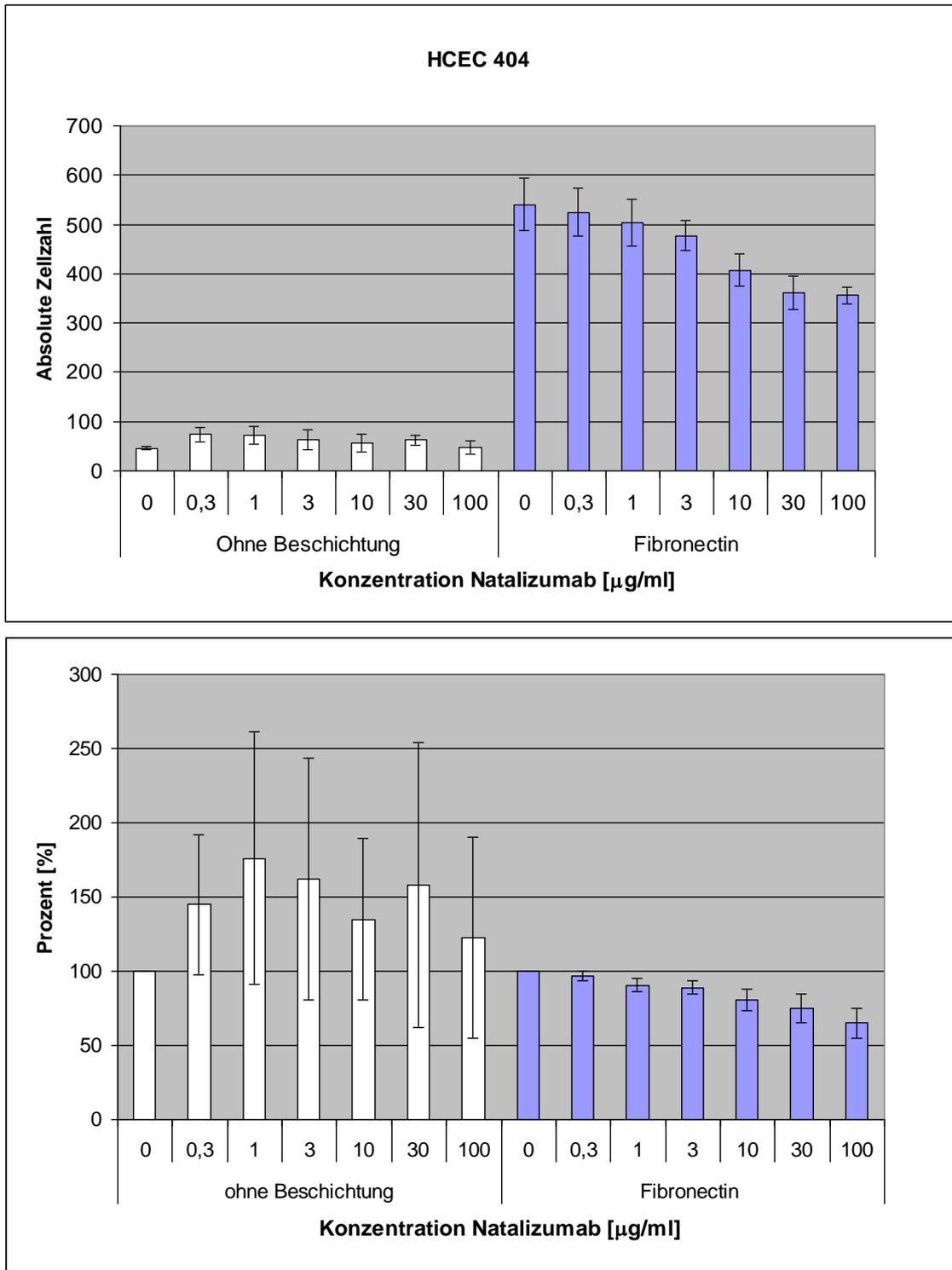


Abbildung 22 Darstellung der Adhäsionsversuche mit zusätzlichen Konzentrationen von Natalizumab

Auf Fibronectin zeigt Natalizumab insgesamt einen konzentrationsabhängigen hemmenden Effekt auf die Adhäsion der Integrin α -4-exprimierenden Zellen. Auf unbeschichtetem Untergrund findet sich keine Korrelation zwischen Adhäsion und Antikörperkonzentration.

Oben: Beispielexperiment: Darstellung der durchschnittlichen absoluten Zahlen adhärenter Zellen pro Bildausschnitt auf Fibronectin sowie auf unbeschichtetem Untergrund

Die Standardabweichung errechnet sich aus sechs ausgezählten Einzelwerten

Unten: Zusammenfassung von insgesamt fünf Einzelexperimenten mit HCEC 404 nach Umrechnung in prozentuale Angaben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei allen Einzelexperimenten mit Natalizumab bei vorhandenem Integrin α -4 ein hemmender Effekt auf die Adhäsion erkennbar war. Obwohl das Ausmaß der Hemmung in den verschiedenen Versuchen schwankte, blieb der Effekt auch bei einer Zusammenfassung aller Einzeldaten deutlich sichtbar. Die Versuche wurden hauptsächlich mit der Präparation HCEC 404 durchgeführt, da sie sich in Hinblick auf die Integrin α -4-Expression als relativ konstant erwies. Von den insgesamt 13 Versuchsansätzen mit zeitgleich getesteten Vergleichsantikörpern waren sieben positiv und sechs negativ für Integrin α -4. Ein Experiment fand außerdem mit der Präparation HCEC 419 statt. Auch hier konnte tendenziell die gleiche Beobachtung der Adhäsion in Gegenwart von Natalizumab gemacht werden (s. Abbildung 23).

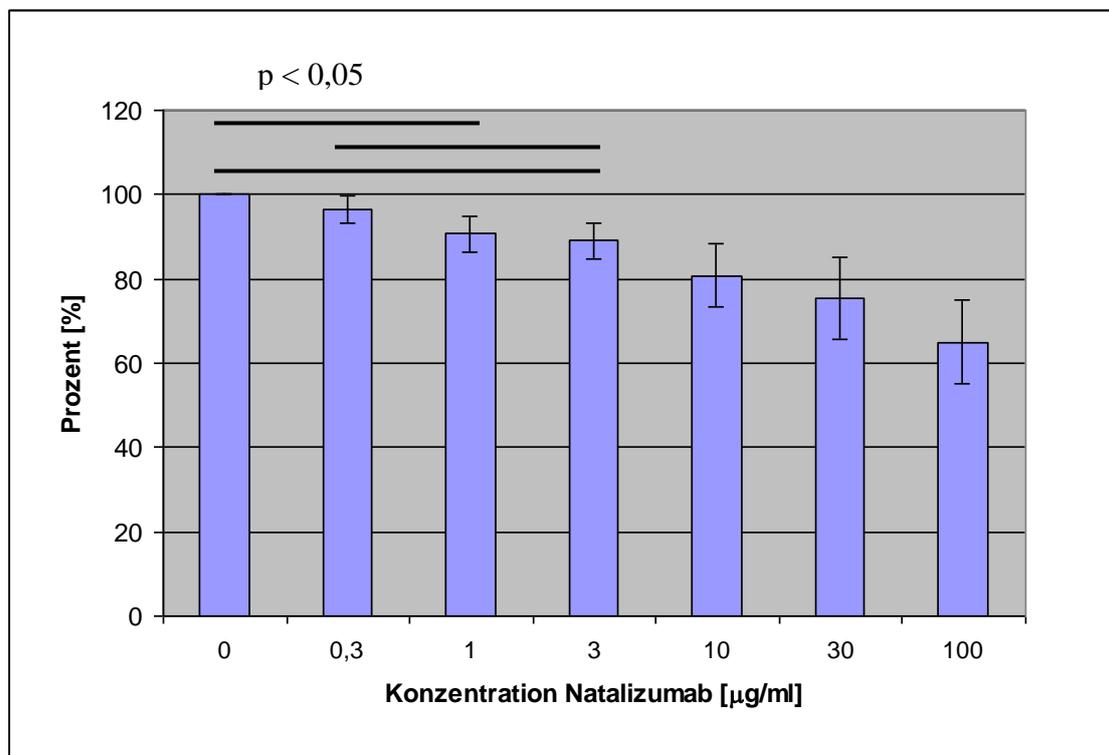


Abbildung 23 Zusammenfassung aller Adhäsionsversuche mit Natalizumab

Bei Auswertung der insgesamt acht Einzelexperimente (HCEC 404 und 419) zur Adhäsion Integrin α -4-positiver Zellen auf Fibronectin unter Zugabe von Natalizumab zeigen sich bereits im niedrigen Konzentrationsbereich von 0 bis 3 $\mu\text{g/ml}$ signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

Anmerkung: Die Zellpräparationen HCEC 376 und 379 zeigten in den FACS-Analysen keine deutliche Integrin α -4-Expression, daher wurden die Adhäsionsversuche mit diesen Zellen hier nicht aufgeführt.

Zur Beurteilung, ob es sich bei der Wirkung von Natalizumab um einen spezifischen Effekt handelte, wurde gleichzeitig jeweils einer der Kontrollantikörper verwendet. Zunächst wurde hauptsächlich Sandoglobulin getestet. Diese Mischung aus humanen Im-

munglobulinen der Klasse IgG bewirkte in höheren Konzentrationen prinzipiell eine ähnliche konzentrationsabhängige Hemmung der Adhäsion wie Natalizumab, nicht jedoch in niedrigen Konzentrationen (s. Abbildung 24). In der Summe der Experimente war die Wirkung des spezifischen Antikörpers Natalizumab stärker.

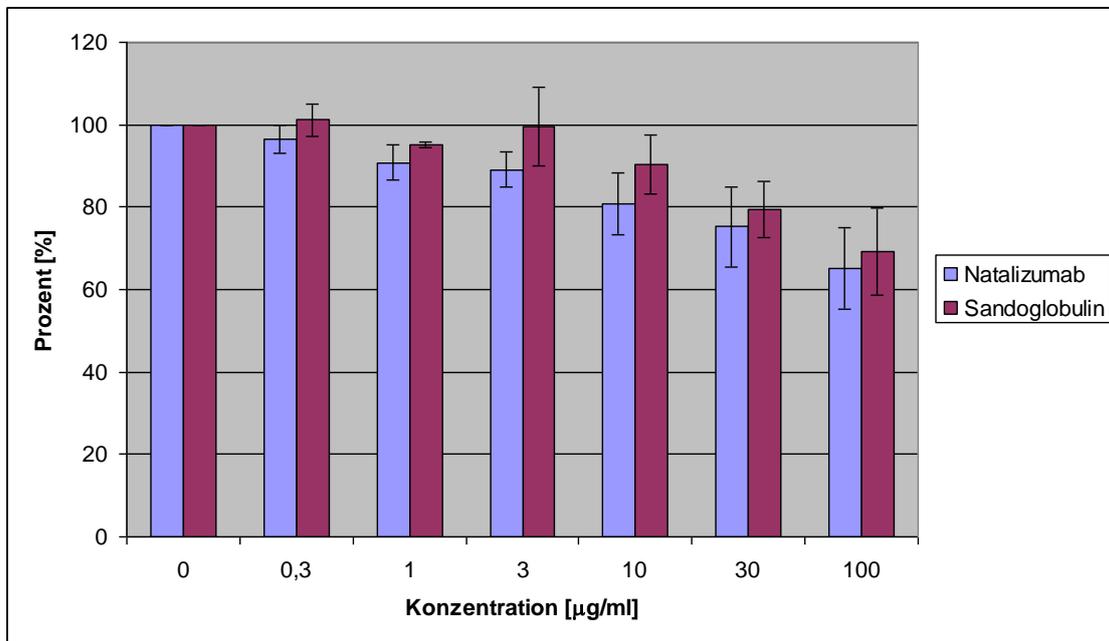


Abbildung 24 Zusammenfassung aller Experimente mit HCEC 404 und 419 bei positiver Integrin α -4-Expression

Dargestellt ist der Vergleich der Adhäsion auf Fibronectin unter Zugabe von Natalizumab (acht Einzelexperimente) und Sandoglobulin (vier Einzelexperimente) bei positiver Integrin α -4-Expression. Die Unterschiede im niedrigen Konzentrationsbereich sind bei Sandoglobulin nicht signifikant.

Auch Efalizumab konnte die Zellen daran hindern, auf Fibronectin zu haften. Die hier entstandene konzentrationsabhängige Hemmung zeigte sich ebenfalls hauptsächlich bei den hohen Konzentrationen (10 bis 100 μ g/ml, s. Abbildung 25).

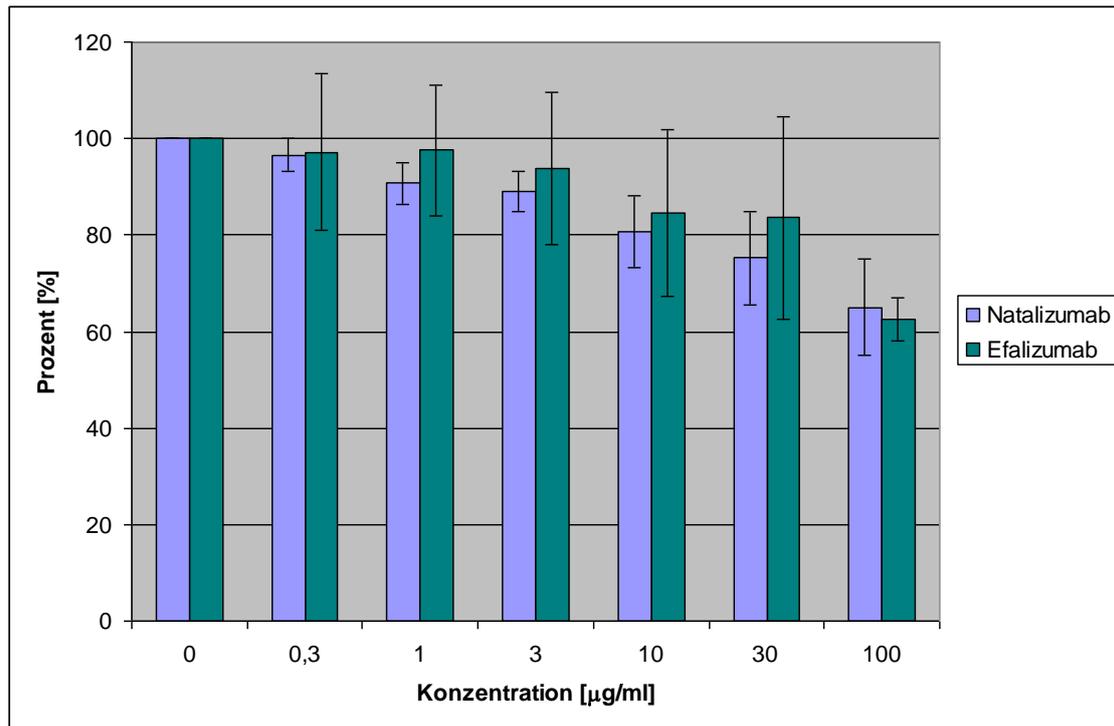


Abbildung 25 Vergleich der Adhäsion unter Zugabe von Natalizumab und Efalizumab

Dargestellt ist der Vergleich der Adhäsion auf Fibronectin unter Zugabe von Natalizumab (acht Einzelexperimente) und Efalizumab (zwei Einzelexperimente) bei positiver Integrin α -4-Expression. Im niedrigen Konzentrationsbereich hat Efalizumab keinen signifikanten Effekt.

Ein letzter Vergleichsantikörper war Alemtuzumab. Er schien die Kriterien einer „Negativkontrolle“ am besten zu erfüllen. In den Versuchen konnte keine spezifische Wirkung festgestellt werden, während die gleichen Zellen auf Natalizumab konzentrationsabhängig reagierten (s. Abbildung 26).

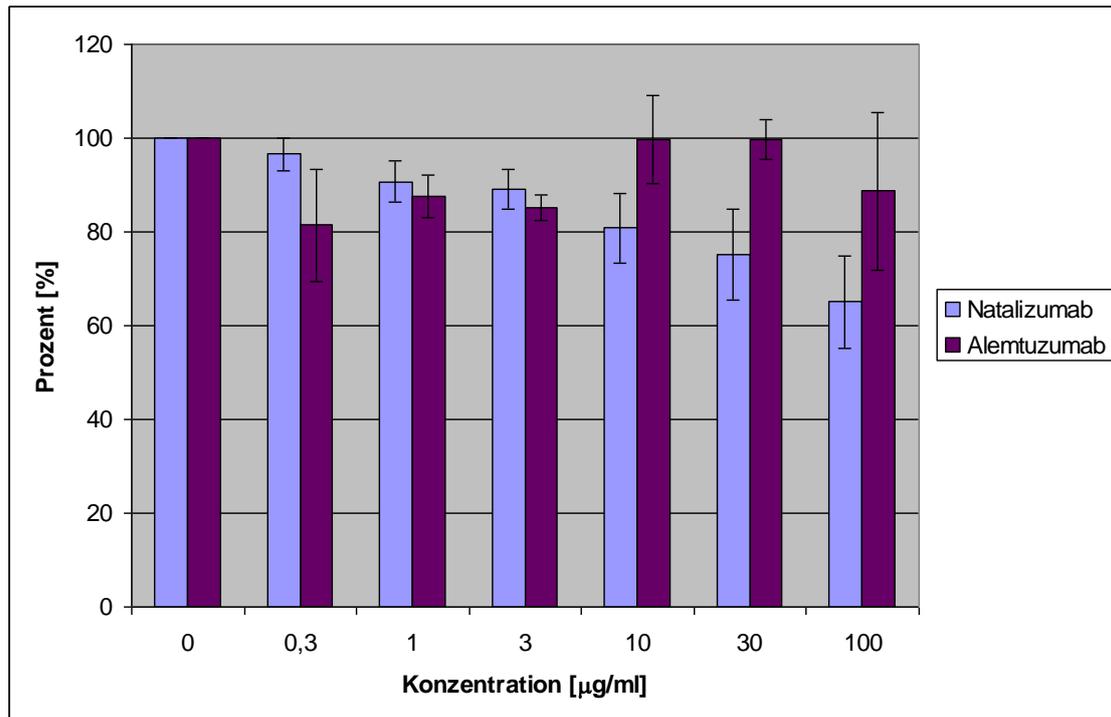


Abbildung 26 Vergleich der Adhäsion unter Zugabe von Natalizumab und Alemtuzumab

Dargestellt ist der Vergleich der Adhäsion auf Fibronectin unter Zugabe von Natalizumab (acht Einzelexperimente) und Alemtuzumab (zwei Einzelexperimente) bei positiver Integrin α -4-Expression. Alemtuzumab scheint keinen spezifischen Effekt auf das Adhäsionsverhalten der Zellen zu haben.

3.3.2 Adhäsionsverhalten bei fehlendem Nachweis von Integrin α -4

Die Expression von Integrin α -4 auf den HCEC in unterschiedlichen Passagen und Populationen erwies sich als inkonstant. Daher wurde auch eine Reihe von Adhäsionsversuchen mit Zellen durchgeführt, bei denen in der anschließenden FACS-Analyse kein Integrin α -4 nachweisbar war. Die Zusammenfassung dieser Ergebnisse ergab ebenfalls ein recht einheitliches Bild. Statt der zuvor bei vorhandenem Integrin α -4 beobachteten Hemmung der Adhäsion auf Fibronectin mit steigender Natalizumabkonzentration schien sich in diesem Fall eine verbesserte Anheftung der Zellen in Gegenwart des Antikörpers einzustellen (s. Abbildung 27).

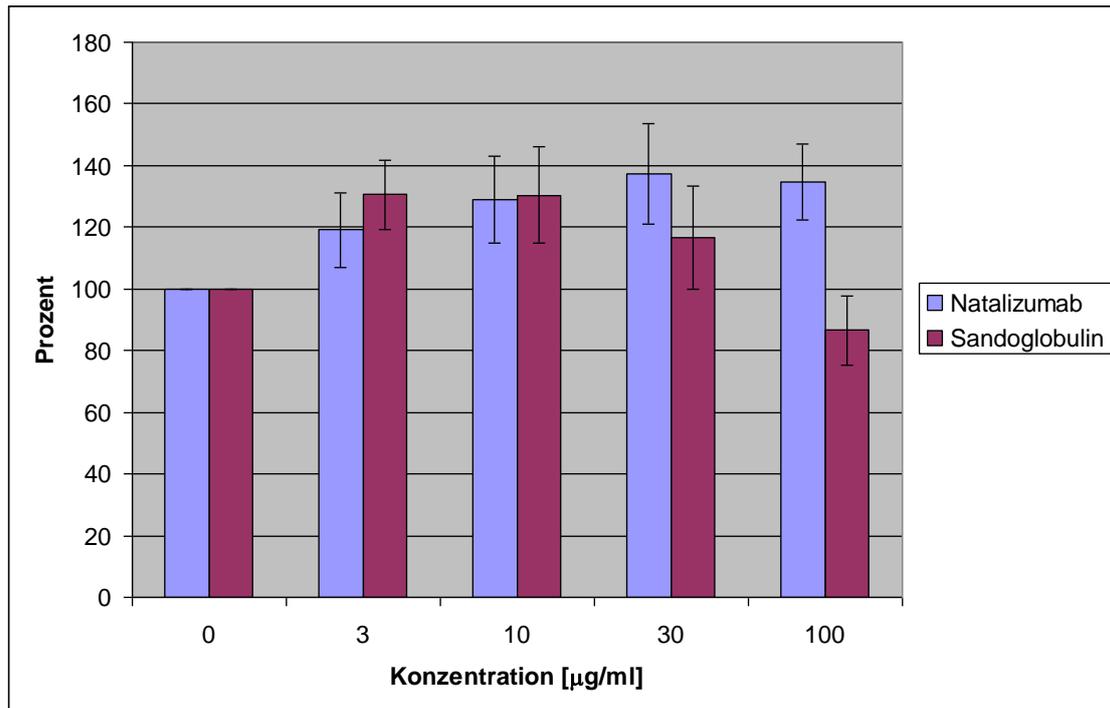


Abbildung 27 Zusammenfassung aller Experimente mit HCEC 404 und 419 ohne Integrin α -4.
 Dargestellt ist die Adhäsion auf Fibronectin unter Zugabe von Natalizumab (sechs Einzelexperimente) und Sandoglobulin (vier Einzelexperimente). Natalizumab in steigender Konzentration hat keinen hemmenden Effekt auf die Adhäsion der Zellen an Fibronectin.

3.4 Western-Blot-Analyse von Proteinen verschiedener Signalkaskaden nach Stimulation mit löslichem VCAM-1

Durch die Adhäsionsversuche sollte geklärt werden, inwiefern das Oberflächenmolekül Integrin α -4 an der Haftung der zerebralen Endothelzellen am Untergrund beteiligt ist. In einem parallelen Versuchsansatz sollte nun auf Proteinebene weiter nach der funktionellen Bedeutung des Integrinkomplexes gesucht werden. Besonders interessant schien es, die Reaktion der Zellen auf VCAM-1, einem möglichen Bindungspartner von Integrin α -4/ β -1 zu testen, da dieses Molekül in Form von sVCAM-1 im Serum der MS-Patienten in erhöhtem Maß (s. Abschnitt 1.4.2) vorkommt. Hierzu wurde die Technik des Western Blots ausgewählt, um die Aktivierung einzelner Proteine aus unterschiedlichen Signalkaskaden untersuchen zu können. Dabei geht man davon aus, dass bei Aktivierung bestimmter Signalwege die beteiligten Proteine in erhöhtem Maß produziert bzw. durch Phosphorylierung aktiviert werden.

Die möglichen MAPK-Signalwege sollten durch die Proteine ERK (*extracellular signal related kinase*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und p38 MAPK identifiziert werden. Dabei waren vor allem Veränderungen in deren Expressionsstärke sowie im Aktivierungszustand nach Stimulation mit löslichem VCAM-1 interessant.

Die verschiedenen Formen konnten dann auf den Western-Blot-Membranen durch die entsprechenden Antikörper detektiert werden.

Der verwendete ERK-Antikörper reagierte sowohl mit ERK 1 (p44) als auch mit ERK 2 (p42) und war zur Erfassung der Gesamtmenge des gesuchten Proteins im Lysat geeignet. Durch das unterschiedliche Molekulargewicht von ERK 1 und 2 ergab sich im Western Blot eine Doppelbande bei 42 und 44 kDa. Zur Darstellung der aktivierten Formen von ERK wurde ein weiterer Antikörper verwendet, der sich speziell gegen die phosphorylierten Moleküle richtete (p-ERK 1 und 2). Mit Hilfe dieser Antikörper konnte dann beispielsweise eine Aktivierung der ERK-abhängigen Signalkaskade anhand der Bandenstärke von p-ERK bei einer bestimmten Stimulationsbedingung festgestellt werden (Santa Cruz Biotechnology: ERK 1 (K-23) bzw. p-ERK (E-4); Datenblätter).

Bezüglich der Detektion von JNK wurde ein Antikörper verwendet, der in erster Linie mit allen Isoformen von JNK 1 aber auch mit denen von JNK 3 reagierte. Die Bande von JNK 1 lag bei 46 kDa. In den hier angefertigten Färbungen zeigte sich meist zusätzlich eine weitere Bande mit niedrigerem Molekulargewicht. Der Nachweis der aktivier-

ten Form von JNK gelang mit Hilfe eines Antikörpers, der an alle phosphorylierten JNK-Proteine binden konnte (Santa Cruz Biotechnology: JNK 1 (G17) bzw. p-JNK (G-7); Datenblätter).

Eine Abschätzung der Aktivierung der p38 MAPK gelang durch Verwendung des Antikörpers gegen die phosphorylierte Form (Phospho-p38 MAPK). Die erhaltene Bandenstärke bei 43 kDa konnte mit der des Antikörpers gegen alle Isoformen von p38 MAPK verglichen werden (Cell Signaling Technology: p38 MAP Kinase Antibody bzw. Phospho-p38 MAP Kinase Antibody; Datenblatt 2002).

Für jedes Protein wurde je eine Membran angefertigt, die zuerst mit dem Antikörper gegen die phosphorylierte Form gefärbt wurde. Danach wurde zur Differenzierung zwischen erhöhter Expression und verstärkter Aktivierung der Antikörper verwendet, der die Gesamtmenge des gesuchten Proteins detektieren sollte.

Zur Überprüfung, ob bei der Beladung des Gels wirklich alle Taschen mit der gleichen Gesamtmenge an Protein befüllt wurden, fand zum Schluss noch eine Inkubation mit dem Antikörper gegen das Enzym GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) als sog. Ladungskontrolle statt. Dieses Protein wird in allen Zellen konstant exprimiert und sollte daher in den Lysaten jeweils auch in gleicher Menge vorhanden sein. Eine gleichmäßige Beladung kann dann auf der Membran durch eine einheitliche Bandenstärke nach GAPDH-Färbung (Molekulargewicht 37 kDa) dargestellt werden.

In den ersten Experimenten sollte untersucht werden, ob bzw. wann nach Stimulation mit sVCAM-1 eine Aktivierung in den untersuchten Signalkaskaden stattfand. Die verwendeten Zellen zeigten in einer parallelen FACS-Analyse immer eine gute Expression von Integrin α -4, sodass darüber zumindest theoretisch eine Bindung von sVCAM-1 möglich war. Zunächst sollte überprüft werden, ob es eher zu einer schnellen oder zu einer verzögerten Aktivierung durch sVCAM-1 kam. Für diesen Versuch wurden die Zeitpunkte 10 min bzw. 24 h gewählt sowie eine sVCAM-1-Konzentration von 5 μ g/ml. Neben der stimulierten Population wurde jeweils auch eine Kontrollpopulation zum gleichen Zeitpunkt lysiert um Nebeneffekte durch die unterschiedliche Kultivierungsdauer auszuschließen. In diesem Versuch konnte bei den Proteinen ERK, JNK und p38 MAPK zu keinem gewählten Zeitpunkt eine sichere Aktivierung erkannt werden. Um auszuschließen, dass es sich um ungeeignete Konzentrationen des Stimulus handelte, wurden in einem weiteren Versuchsansatz sowohl eine höhere als auch eine niedrigere Konzentration eingeschlossen (2,5 und 10 μ g/ml). Da hierbei nach 10 min keine deutli-

chen Unterschiede beobachtet werden konnten, wurde in den folgenden Versuchen mit der Anfangskonzentration von 5 µg/ml fortgeföhren.

In den weiteren Versuchen wurden zusätzliche Zeitpunkte (10, 30, 60 und 90 min, 4 und 24 h) eingeföhrt. Wiederum ergaben sich keine Aktivierungen bezüglich der Proteine ERK und JNK. Jedoch deutete sich eine Reaktion von p38 MAPK auf die Stimulation mit sVCAM-1 an. Am deutlichsten war dieser Effekt schließlich in einem Experiment mit der laborinternen Endothelzellisolation zu sehen. Hier wurde zusätzlich zu den bisherigen Versuchsbedingungen eine Positivkontrolle in Form von TPA/Ionomycin verwendet. Dies sollte zu einer schnellen Aktivierung der Signalkaskaden nach 10 min föhren. Untersucht wurden die Zellen zu den Zeitpunkten 10 und 60 min sowie 4 und 24 h nach der Stimulation.

Insgesamt konnte bei den Proteinen ERK und JNK zu keinem Zeitpunkt eine Aktivierung festgestellt werden (s. Abbildung 28 und Abbildung 29). Jedoch konnte durch sVCAM-1 eine höhere Konzentration der aktivierten Form von p38 MAPK (Phospho-p38 MAPK) besonders nach 60 min, 4 und 24 h erzielt werden (s. Abbildung 30). Die Stimulation mit TPA/Ionomycin föhrte hier zu einer ähnlich starken Aktivierung bereits nach 10 min. Zu diesem frühen Zeitpunkt schien sVCAM-1 noch keinen Effekt zu haben.

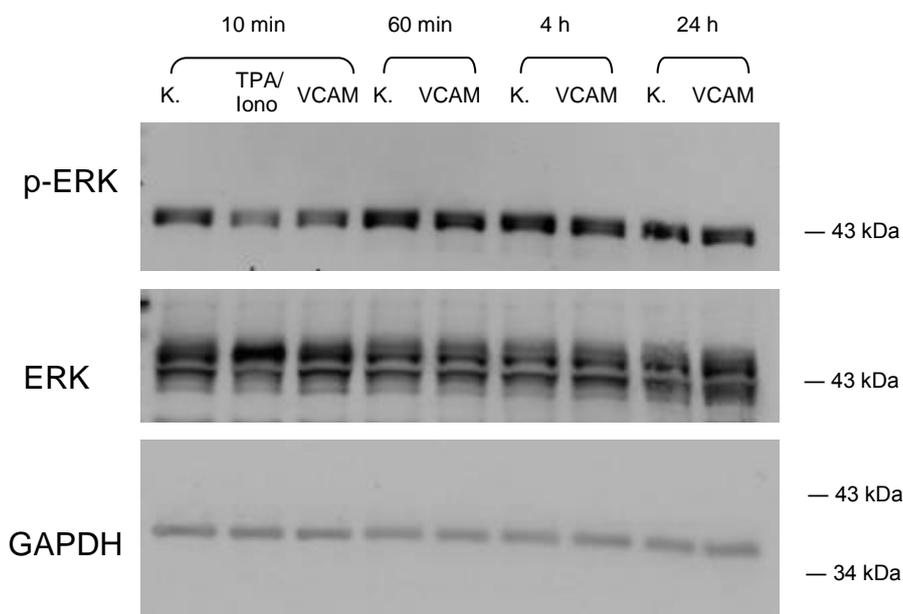


Abbildung 28 Western Blot zur Untersuchung der Aktivierung von ERK (42 und 44 kDa)
 Nach Stimulation laborinternen Endothelzellisolation mit sVCAM-1 (5 µg/ml) zu unterschiedlichen Zeitpunkten finden sich keine eindeutigen Aktivierungen von ERK oder p-ERK.
 Aufgetragene Proteinmenge pro Tasche: 20 µg
 Positivkontrolle: TPA/Iono
 K. = Kontrolle ohne Stimulation. GAPDH: Ladungskontrolle (Molekulargewicht 37 kDa)

Ergebnisse

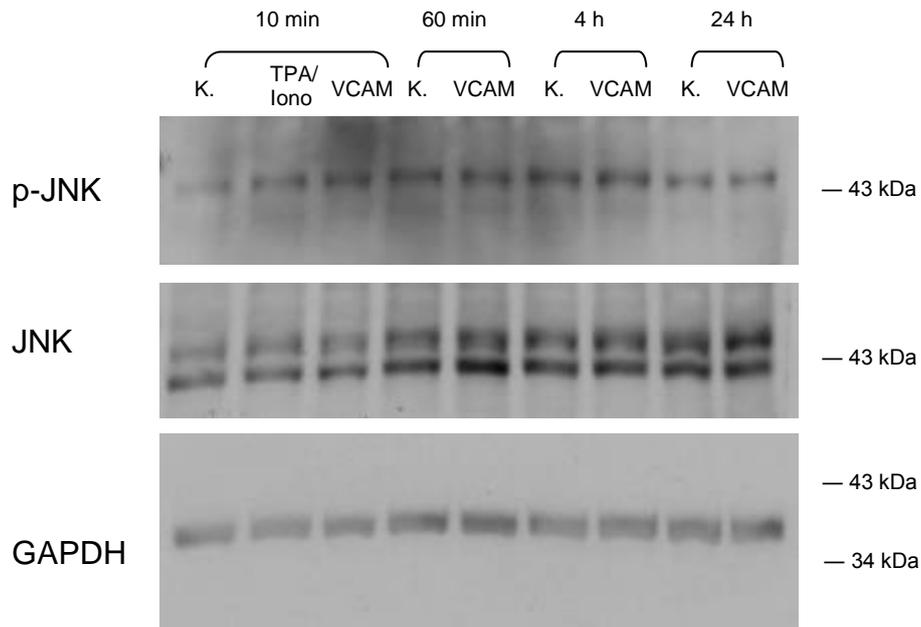


Abbildung 29 Western Blot zur Untersuchung der Aktivierung von JNK (46 kDa)

Nach Stimulation laborinternen Endothelzellisolation mit sVCAM-1 (5 µg/ml) zu unterschiedlichen Zeitpunkten finden sich keine eindeutigen Aktivierungen von JNK oder p-JNK.

Anmerkung: Die obere Bande entspricht hier JNK 1 mit einem Molekulargewicht von 46 kDa.

Aufgetragene Proteinmenge pro Tasche: 40 µg

Positivkontrolle: TPA/Iono

K. = Kontrolle ohne Stimulation. GAPDH: Ladungskontrolle (Molekulargewicht 37 kDa)

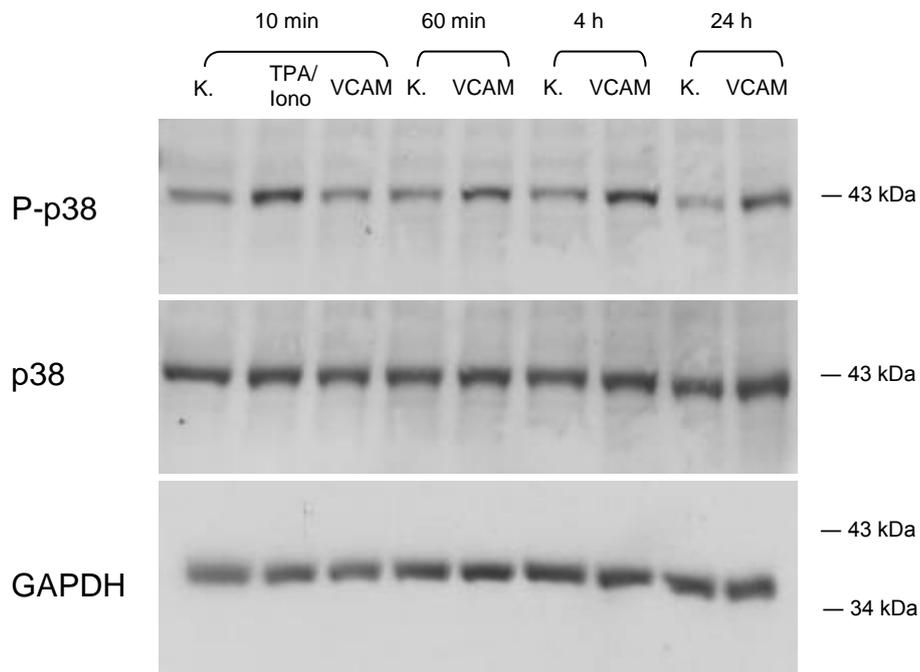


Abbildung 30 Western Blot zur Untersuchung der Aktivierung von p38 MAPK (43 kDa)

Nach Stimulation der laborinternen Endothelzellisolation mit sVCAM-1 (5 µg/ml) lässt sich v.a. zu den Zeitpunkten 60 min, 4 h und 24 h eine erhöhte Konzentration von Phospho-p38 MAPK erkennen, während die Bandenstärke von p38 MAPK weitgehend unverändert bleibt.

Aufgetragene Proteinmenge pro Tasche: 40 µg

Positivkontrolle: TPA/Iono

K. = Kontrolle ohne Stimulation. GAPDH: Ladungskontrolle (Molekulargewicht 37 kDa)

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, der möglichen Wirkweise von Natalizumab an der BHS durch die Untersuchung des dazugehörigen Antigens Integrin α -4 auf zerebralen Endothelzellen näher zu kommen. Hierzu wurde zunächst die Expression von Integrin α -4 auf HCEC bestätigt und durch immunzytochemische Färbungen sichtbar gemacht. Anschließend wurden funktionelle Untersuchungen auf zellulärer und molekularer Ebene durchgeführt.

4.1 Integrin α -4-Expression auf primären humanen zerebralen Endothelzellen

Durch die Untersuchungen am Durchflusszytometer sowie die immunzytochemischen Färbungen konnte gezeigt werden, dass das gesuchte Integrin α -4 auf primären HCEC *in vitro* exprimiert wird. Neben Integrin α -4 wurde auch der Dimerisierungspartner Integrin β -1 auf Endothelzellen nachgewiesen. Die Analysen am Durchflusszytometer bestätigten hierbei die in den Fluoreszenzfärbungen vermutete stärkere Integrin β -1-Expression im Vergleich zu der von Integrin α -4. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Integrin β -1 nicht nur als Dimer zusammen mit Integrin α -4 vorkommt, sondern auch in anderen Kombinationen. Außerdem zeigte sich in den Expressionsanalysen, dass Integrin α -4 hauptsächlich auf primären HCEC und nicht wie Integrin β -1 auch auf Endothelzelllinien (HBMEC, hCMEC/D3) vorkommt.

Insgesamt konnte Integrin α -4 weniger konstant nachgewiesen werden als Integrin β -1: Nicht alle primären HCEC zeigten eine klare Expression und auch anfänglich positive Zellpopulationen konnten das Molekül mit der Zeit wieder verlieren. In den Stimulationsversuchen unter Zugabe verschiedener Zytokine ergab sich bei Integrin α -4 eine Steigerung der Expression unter Einwirkung von VCAM-1. Integrin β -1 hingegen zeigte sich stets unabhängig von den Stimulationsbedingungen. Der Proliferationszustand zum Zeitpunkt der FACS-Analyse hatte keinen messbaren Einfluss auf die Expressionsstärke der Integrine α -4 und β -1.

Die starken und konstanten Integrin β -1-Spiegel passen gut zu den Beobachtungen von Milner und Campbell 2002 bei der Hirnentwicklung von Mäusen. Hier wurde u.a. gezeigt, dass die Integrin β -1-Expression mit zunehmender Hirnreife anstieg. Außerdem wurde die Bedeutung verschiedener Integrin β -1-Bindungspartner untersucht. Im Gehirn adulter Mäuse war in diesen Untersuchungen die Konzentration von Integrin α -4 deut-

lich reduziert, während die Integrine α -1 und α -6 zunehmend an Bedeutung gewannen. Für die frühe Angiogenese jedoch war Integrin α -4/ β -1 ein essentielles Molekül (Milner, Campbell 2002).

Parallel zu den Untersuchungen an Endothelzellkulturen wurden auch *in situ*-Färbungen an Gewebeschnitten aus verschiedenen Hirnarealen angefertigt (Mitarbeiter der Arbeitsgruppe). Zur Lokalisation der Blutgefäße wurde eine Färbung gegen vWF verwendet. Dabei zeigte sich eine deutliche Konzentration von Integrin α -4 im Bereich der Gefäße (s. Abbildung 31). Die Integrin β -1-Färbung war wiederum etwas kräftiger ausgeprägt und zeigte ebenfalls Überlagerungen mit vWF (s. Abbildung 32). Auch diese Ergebnisse bestätigen die Expression von Integrin α -4 auf adulten zerebralen Endothelzellen.

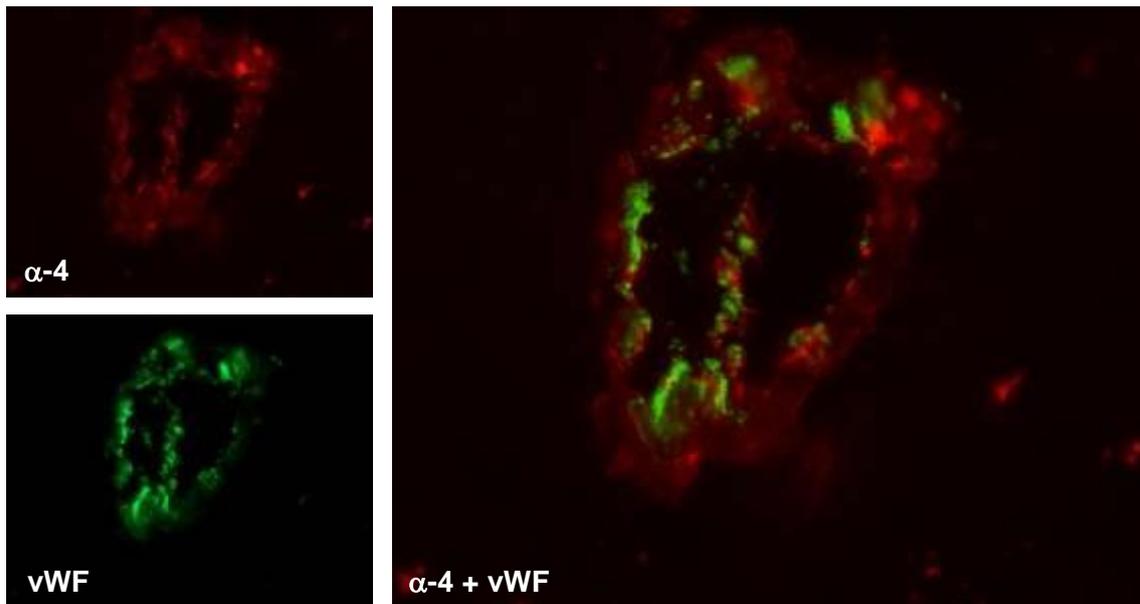


Abbildung 31 Gewebeschnitte aus humanem Cerebellum
Färbung der Endothelzellen durch vWF und Kollokalisierung mit Integrin α -4

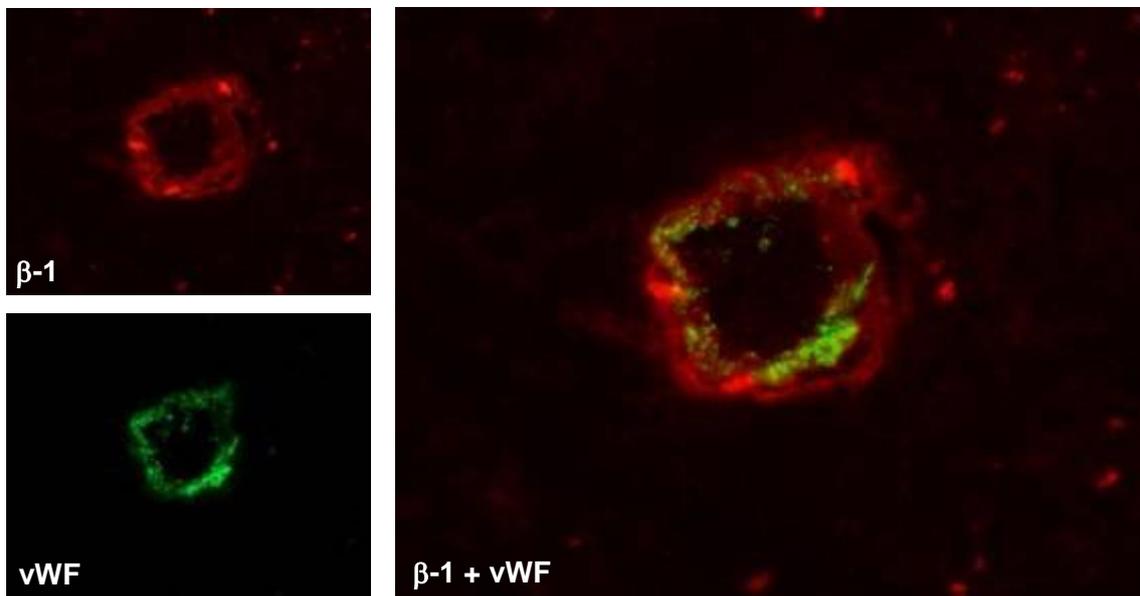


Abbildung 32 Gewebeschnitte aus humanem Cerebellum
Färbung der Endothelzellen durch vWF und Kollokalisierung mit Integrin β -1

Die Beobachtungen der variablen Expression von Integrin α -4 bei Kulturzellen im Gegensatz zum konstanten Nachweis in Gewebeschnitten könnten für einen Verlust unter kulturellen Bedingungen sprechen: Die deutliche Färbung in den Gewebeschnitten legt nahe, dass *in vivo* normalerweise eine Integrin α -4-Expression stattfindet. Diese kann auch auf primären HCEC noch nachgewiesen werden, ist jedoch empfindlich und kann durch Prozesse zur Immortalisierung von Zellen (HBMEC, hCMEC/D3) sogar ganz verschwinden. Auch auf primären HCEC kann es unter Kulturbedingungen zu einem Verlust von Integrin α -4 kommen.

Bezüglich der genauen Lokalisation der Integrine α -4 bzw. β -1 ließ sich in den immunzytochemischen Färbungen jeweils ein spezifisches Verteilungsmuster erkennen: Während Integrin α -4 relativ gleichmäßig über die Zellen verteilt in einem feingranulären Muster erschien, zeigte Integrin β -1 eine Betonung der Zellgrenzen. Ein ähnliches Bild der β -1-Lokalisation wurde bei Mandell et al. 2005 dargestellt, hier allerdings an Epithelzellen. Durch die gleichzeitige ZO-1-Färbung konnte außerdem gezeigt werden, dass Integrin β -1 wahrscheinlich nicht nur an den Zell-Zellkontakten, den Zonulae occludentes, sondern am gesamten Zellrand lokalisiert ist. Diese Beobachtung könnte dafür sprechen, dass Integrin β -1 auch eine Bedeutung für die Adhäsion an Proteinen der ECM (z.B. Collagen oder Fibronectin) besitzt. Hierzu passende Ergebnisse an Mausendothelzellen durch Milner und Campbell 2002 zeigen, dass bei der Hirnreifung die Interaktion zwischen Fibronectin und seinen Rezeptoren Integrin α -4/ β -1 bzw. Integrin α -5/ β -1 von Bedeutung für Adhäsion und Angiogenese ist. Im späteren Verlauf hingegen soll vor allem die Bindung an Laminin über die Integrine α -4/ β -1 und α -6/ β -1 im Vordergrund stehen. Bei Milner 2007 wird dargestellt, dass bei der Hirnentwicklung der Maus die Bindung der Endothelzellen an Fibronectin hauptsächlich über das Integrin α -5/ β -1 vermittelt wird. Für eine mögliche Beteiligung von Integrin α -4/ β -1 beim Menschen sprechen hingegen die Ergebnisse aus den Adhäsionsversuchen primärer Endothelzellen auf Fibronectin unter Zugabe des Integrin α -4-Inhibitors Natalizumab.

4.2 Blockade der Adhäsion primärer Endothelzellen an Fibronectin durch Natalizumab

Eine erste wichtige Beobachtung bei den Adhäsionsversuchen war, dass es nur dann zu einem hemmenden Effekt durch Natalizumab bei der Zellanheftung an Fibronectin kam, wenn die Zellen auch gleichzeitig Integrin α -4 exprimierten. Dies spricht einerseits für

eine Beteiligung von Integrin α -4 an der Adhäsion, andererseits auch für eine spezifische Bindung des Antikörpers und einen damit verbundenen Funktionsverlust des Antigens. Die Adhäsion an Fibronectin kann aber nicht ausschließlich von Integrin α -4 abhängig sein, da sie auch stabil war, wenn die Zellen keine Integrin α -4-Expression zeigten. Natalizumab hatte in diesem Fall keinen hemmenden Effekt, sondern wirkte teilweise sogar begünstigend auf die Anheftung. Die Adhäsion scheint daher auch durch Moleküle vermittelt zu werden, deren Bindung sich nicht durch Natalizumab hemmen lässt (z.B. Integrin α -5/ β -1 wie bei Milner 2007). Insgesamt hafteten die HCEC scheinbar besser auf der Fibronectinbeschichtung, wenn sie positiv für Integrin α -4 waren (s. Tabelle 2). Jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant.

Der Vergleich mit Sandoglobulin zeigte, dass dieses Gemisch aus verschiedenen Immunglobulinen der Klasse IgG ebenfalls in der Lage war, die Adhäsion der Endothelzellen an Fibronectin zu blockieren. Insgesamt war dieser Effekt über alle Versuche gesehen stets schwächer ausgeprägt als bei Natalizumab. Vor allem in den niedrigen Konzentrationsbereichen zwischen 0,1 und 3 μ g/ml war der Effekt von Sandoglobulin im Gegensatz zu dem von Natalizumab nicht signifikant. Interessanterweise schien auch die Adhäsionshemmung durch Sandoglobulin in gewissem Maße Integrin α -4-abhängig, da bei einer fehlenden Expression des Moleküls wie auch bei Natalizumab teilweise eine erhöhte Adhäsion beobachtet wurde. Zellen ohne Expression von Integrin α -4 zeigten somit bei Zugabe von Natalizumab und Sandoglobulin im niedrigeren Konzentrationsbereich durchaus ähnliche Adhäsionseigenschaften. Jedoch bewirkte Sandoglobulin in sehr hohen Konzentrationen (100 μ g/ml) auch bei Zellen ohne Integrin α -4 eine leicht verminderte Fähigkeit zur Adhäsion. Dies könnte Folge eines unspezifischen, hemmenden Effekts durch das Antikörpergemisch sein.

Insgesamt sprechen diese Ergebnisse für eine spezifische Bindung von niedrig konzentriertem Natalizumab an Integrin α -4 und eine damit verbundene Störung der Interaktion zwischen dem Oberflächenmolekül und Fibronectin.

Auch der Vergleichsantikörper Efalizumab konnte in hohen Konzentrationen (10 bis 100 μ g/ml) die Haftung der Zellen auf Fibronectin reduzieren, insgesamt gesehen aber weniger effektiv als Natalizumab. Alemtuzumab zeigte allenfalls in sehr hoher Konzentration (100 μ g/ml) einen hemmenden Effekt. Bei diesen beiden Vergleichsantikörpern ist lediglich ein unspezifischer, blockierender Effekt durch sehr hohe Konzentrationen anzunehmen.

4.3 Aktivierung der Proteinkinase p38 in Endothelzellen nach Stimulation mit löslichem VCAM-1

Da bei MS-Patienten der sVCAM-1-Spiegel im Serum erhöht ist und (s)VCAM-1 wiederum ein Bindungspartner von Integrin α -4/ β -1 ist, stellte sich die Frage nach einer möglichen Interaktion. Es wäre beispielsweise denkbar, dass durch sVCAM-1 über Bindung an endothelzellständiges Integrin α -4/ β -1 bestimmte Signalkaskaden aktiviert werden (VCAM-1-Autoloop). Um eine hieran beteiligte intrazelluläre Signaltransduktion zu erfassen, wurden die MAP-Kinasen ERK, JNK und p38 im Western Blot hinsichtlich ihrer Phosphorylierung in Gegenwart von sVCAM-1 untersucht.

Bei Hordijk 2006 wurden bereits verschiedene endotheliale Signalwege während der Transmigration von Leukozyten durch Endothelzellen im Entzündungsherd untersucht. Neben ERK 1, das beispielsweise bei Adhäsionsvorgängen über Selectine beteiligt ist, spielt auch die p38 MAPK eine wichtige Rolle bei der Lockerung der Interzellularkontakte und den Veränderungen im endothelialen Actinzytoskelett (Hordijk 2006).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche zeigten in den Western Blots in erster Linie eine Aktivierung der p38 MAPK durch eine Stimulation der Endothelzellen mit sVCAM-1. Der Effekt war besonders deutlich an der laborinternen Endothelzellisolation sichtbar.

Diese Beobachtung passt insgesamt gut zu den Ergebnissen von Nakao et al. 2003, die bei der Angiogenese von HUVEC eine Interaktion zwischen Integrin α -4 und sVCAM-1 über die p38 MAPK aufzeigen. sVCAM-1 vermittelt hier eine vermehrte Migration der Endothelzellen.

Die sVCAM-1-Spiegel sind bei MS-Patienten sowohl im akuten Krankheitsschub (Kallmann et al. 2000) als auch unter Therapie mit INF- β erhöht (Rieckmann et al. 2005). Es ist denkbar, dass unter beiden Bedingungen eine Interaktion mit endothelialen Integrin α -4-Molekülen stattfindet. In den aktiven Läsionen könnte es durch p38-MAPK-vermittelte Signalkaskaden in zerebralen Endothelzellen beispielsweise zu einer vermehrten Durchlässigkeit der BHS und damit zu einer Symptomverschlechterung kommen. Eine Therapie mit Natalizumab würde dann nicht nur die Aktivierung und Extravasation der Leukozyten durch Blockade des Integrin α -4/ β -1 auf den Immunzellen reduzieren, sondern könnte auch die Wirkung des sVCAM-1 auf das Endothel reduzieren und damit die BHS wieder stabilisieren. Eine erhöhte Ausschüttung von sVCAM-1 nach Therapie mit INF- β hingegen scheint einen protektiven Effekt auszu-

üben. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die vermehrte Bindung von sVCAM-1 an Integrin α -4/ β -1 auf Leukozyten in der Peripherie deren Fähigkeit zur Interaktion mit endotheliale VCAM-1 im ZNS verringert. Auch werden unter INF- β -Therapie die Spiegel von Integrin α -4/ β -1 insgesamt reduziert, woraus eine Reduktion der zerebralen Entzündung resultiert (Dhib-Jalbut 2007).

Ob die gezeigte Reaktion der Endothelzellen auf sVCAM-1 ausschließlich über Integrin α -4/ β -1 vermittelt ist, muss noch in einem weiteren Schritt überprüft werden. Hierzu bietet sich eine Blockade des Integrin α -4/ β -1 durch Natalizumab an. Eine ausbleibende Aktivierung des Signalweges würde dann für eine spezifische Interaktion zwischen Integrin α -4/ β -1 und sVCAM-1 sprechen. Auch sollte genauer überprüft werden, ob die Stimulation der Endothelzellen mit sVCAM-1 tatsächlich eine Veränderung der Durchlässigkeit der BHS bewirkt. Darüber hinaus könnte Natalizumab selbst ebenfalls Einfluss auf die Integrität der BHS nehmen.

5 Zusammenfassung

Natalizumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen das Oberflächenadhäsionsmolekül Integrin α -4, der zur Therapie von schweren Verlaufsformen der Multiplen Sklerose (MS) zugelassen ist. Integrin α -4/ β -1 wird durch Leukozyten exprimiert und steuert deren Extravasation über die Bindung an VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) auf Endothelzellen. Natalizumab wirkt über eine Blockade der Leukozytenadhäsion. In einigen Publikationen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Integrin α -4 auch auf zerebralen Endothelzellen von Mäusen und Ratten exprimiert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression und Funktion von Integrin α -4 in kultivierten primären humanen zerebralen Endothelzellen untersucht.

Die im Rahmen dieser Arbeit an verschiedenen Einzelspenderpräparationen durchgeführten FACS-Analysen zeigten, dass Integrin α -4 in unterschiedlicher Ausprägung auf primären zerebralen Endothelzellisolationen nachzuweisen war. Mit Hilfe immunzytochemischer Färbungen konnte ein spezifisches Verteilungsmuster des Integrin α -4 in Form eines feinen, granulären Musters im Bereich des Zelleibes dokumentiert werden.

In Adhäsionsversuchen zeigten Integrin α -4-exprimierende Endothelzellen nach Zugabe von Natalizumab in niedriger Konzentration eine verminderte Fähigkeit zur Haftung an Fibronectin, einem Bindungspartner in der extrazellulären Matrix. In hohen Konzentrationen dominierte im eingesetzten experimentellen System ein unspezifischer Blockadeeffekt, der auch mit Kontrollantikörpern zu beobachten war.

In MS-Läsionen findet sich auch die lösliche Form des VCAM-1 (sVCAM-1), die möglicherweise mit endothelialelem Integrin α -4 interagiert. Daher wurde mit Hilfe von Western-Blot-Untersuchungen die intrazelluläre Signaltransduktion unter Stimulation mit sVCAM-1 untersucht. Es zeigte sich wie in anderen Endothelarten vorbeschrieben eine Aktivierung des p38-MAP-Kinase-Signalweges.

Zusammenfassend wurde demonstriert, dass primäre humane zerebrale Endothelzellen Integrin α -4 exprimieren und dass dieses wahrscheinlich nicht nur für die mechanische Verankerung in der Extrazellulärmatrix eine Bedeutung besitzt, sondern auch als Induktor intrazellulärer Signaltransduktion fungiert, welche die Schrankeneigenschaften zerebraler Endothelzellen beeinflussen könnte.

6 Literaturverzeichnis

Bartt, Russell E (2006): Multiple sclerosis, natalizumab therapy, and progressive multifocal leukoencephalopathy. In: *Current opinion in neurology*, Jg. 19, H. 4, S. 341–349.

Bayless, K. J.; Davis, G. E. (2001): Identification of dual alpha 4beta1 integrin binding sites within a 38 amino acid domain in the N-terminal thrombin fragment of human osteopontin. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 276, H. 16, S. 13483–13489.

Bayless, K. J.; Meininger, G. A.; Scholtz, J. M.; Davis, G. E. (1998): Osteopontin is a ligand for the alpha4beta1 integrin. In: *Journal of cell science*, Jg. 111 (Pt 9), S. 1165–1174.

Beck, Roy W.; Gal, Robin L. (2008): Treatment of acute optic neuritis: a summary of findings from the optic neuritis treatment trial. In: *Archives of ophthalmology*, Jg. 126, H. 7, S. 994–995.

Benninghoff, A.; Drenckhahn, D. (2002): *Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie (Bd. 1). Zelle, Gewebe, Entwicklung, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem*: Urban & Fischer.

Burnette, W. N. (1981): "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. In: *Analytical biochemistry*, Jg. 112, H. 2, S. 195–203.

Buttmann, Mathias (2010): Treating multiple sclerosis with monoclonal antibodies: a 2010 update. In: *Expert review of neurotherapeutics*, Jg. 10, H. 5, S. 791–809.

Buttmann, Mathias; Rieckmann, Peter (2008): Treating multiple sclerosis with monoclonal antibodies. In: *Expert review of neurotherapeutics*, Jg. 8, H. 3, S. 433–455.

Calabresi, P. A.; Prat, A.; Biernacki, K.; Rollins, J.; Antel, J. P. (2001): T lymphocytes conditioned with Interferon beta induce membrane and soluble VCAM on human brain endothelial cells. In: *Journal of neuroimmunology*, Jg. 115, H. 1-2, S. 161–167.

- Calzada, Maria J.; Zhou, Longen; Sipes, John M.; Zhang, Jane; Krutzsch, Henry C.; Iruela-Arispe, M. Luisa et al. (2004): Alpha4beta1 integrin mediates selective endothelial cell responses to thrombospondins 1 and 2 in vitro and modulates angiogenesis in vivo. In: *Circulation research*, Jg. 94, H. 4, S. 462–470.
- Cannella, B.; Raine, C. S. (1995): The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. In: *Annals of neurology*, Jg. 37, H. 4, S. 424–435.
- Chabas, D.; Baranzini, S. E.; Mitchell, D.; Bernard, C. C.; Rittling, S. R.; Denhardt, D. T. et al. (2001): The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. In: *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 294, H. 5547, S. 1731–1735.
- Compston, Alastair; Coles, Alasdair (2002): Multiple sclerosis. In: *Lancet*, Jg. 359, H. 9313, S. 1221–1231.
- Coyle, Patricia K (2007): Evidence-based medicine and clinical trials. In: *Neurology*, Jg. 68, H. 24 Suppl 4, S. S3-7.
- Crayton, Heidi J.; Rossman, Howard S. (2006): Managing the symptoms of multiple sclerosis: a multimodal approach. In: *Clinical therapeutics*, Jg. 28, H. 4, S. 445–460.
- Dhib-Jalbut, Suhayl (2007): Pathogenesis of myelin/oligodendrocyte damage in multiple sclerosis. In: *Neurology*, Jg. 68, H. 22 Suppl 3, S. S13-21; discussion S43-54.
- Döring, Axinia; Wild, Martin; Vestweber, Dietmar; Deutsch, Urban; Engelhardt, Britta (2007): E- and P-selectin are not required for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 and SJL mice. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, Jg. 179, H. 12, S. 8470–8479.
- Droogan, A. G.; McMillan, S. A.; Douglas, J. P.; Hawkins, S. A. (1996): Serum and cerebrospinal fluid levels of soluble adhesion molecules in multiple sclerosis: predominant intrathecal release of vascular cell adhesion molecule-1. In: *Journal of neuroimmunology*, Jg. 64, H. 2, S. 185–191.
- Duan, Huaxin; Cheng, Lamei; Sun, Xuan; Wu, Yonggang; Hu, Liangshan; Wang, Jian et al. (2006): LFA-1 and VLA-4 involved in human high proliferative potential-endothelial progenitor cells homing to ischemic tissue. In: *Thrombosis and haemostasis*, Jg. 96, H. 6, S. 807–815.

- Dutta, Ranjan; Trapp, Bruce D (2007): Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis. In: *Neurology*, Jg. 68, H. 22 Suppl 3, S. S22-31; discussion S43-54.
- Elovaara, I.; Ukkonen, M.; Leppäkynnäs, M.; Lehtimäki, T.; Luomala, M.; Peltola, J.; Dastidar, P. (2000): Adhesion molecules in multiple sclerosis: relation to subtypes of disease and methylprednisolone therapy. In: *Archives of neurology*, Jg. 57, H. 4, S. 546–551.
- Engelhardt, Britta (2008): Immune cell entry into the central nervous system: Involvement of adhesion molecules and chemokines. In: *Journal of the neurological sciences*, Jg. 274, H. 1-2, S. 23–26.
- Engelhardt, Britta; Ransohoff, Richard M. (2005): The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. In: *Trends in immunology*, Jg. 26, H. 9, S. 485–495.
- Engelhardt, Britta; Wolburg, Hartwig (2004): Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? In: *European journal of immunology*, Jg. 34, H. 11, S. 2955–2963.
- Fasen, K.; Elger, C. E.; Lie, A. A. (2003): Distribution of alpha and beta integrin subunits in the adult rat hippocampus after pilocarpine-induced neuronal cell loss, axonal reorganization and reactive astrogliosis. In: *Acta neuropathologica*, Jg. 106, H. 4, S. 319–322.
- Hartung, H. P.; Reiners, K.; Archelos, J. J.; Michels, M.; Seeldrayers, P.; Heidenreich, F. et al. (1995): Circulating adhesion molecules and tumor necrosis factor receptor in multiple sclerosis: correlation with magnetic resonance imaging. In: *Annals of neurology*, Jg. 38, H. 2, S. 186–193.
- Hemler, M. E. (1990): VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. In: *Annual review of immunology*, Jg. 8, S. 365–400.
- Hordijk, Peter L. (2006): Endothelial signalling events during leukocyte transmigration. In: *The FEBS journal*, Jg. 273, H. 19, S. 4408–4415.
- Hynes, Richard O. (2002): Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. In: *Cell*, Jg. 110, H. 6, S. 673–687.

Kallmann, B. A.; Hummel, V.; Lindenlaub, T.; Ruprecht, K.; Toyka, K. V.; Rieckmann, P. (2000): Cytokine-induced modulation of cellular adhesion to human cerebral endothelial cells is mediated by soluble vascular cell adhesion molecule-1. In: *Brain: a journal of neurology*, Jg. 123 (Pt 4), S. 687–697.

Kerfoot, Steven M.; Norman, M. Ursula; Lapointe, Benoit M.; Bonder, Claudine S.; Zbytnuik, Lori; Kubes, Paul (2006): Reevaluation of P-selectin and alpha 4 integrin as targets for the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, Jg. 176, H. 10, S. 6225–6234.

Khan, Naveed Ahmed; Di Cello, Francescopaolo; Stins, Monique; Kim, Kwang Sik (2007): Gp120-mediated cytotoxicity of human brain microvascular endothelial cells is dependent on p38 mitogen-activated protein kinase activation. In: *Journal of neurovirology*, Jg. 13, H. 3, S. 242–251.

Kikly, Kristine; Liu, Ling; Na, Songqing; Sedgwick, Jonathon D. (2006): The IL-23/Th(17) axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. In: *Current opinion in immunology*, Jg. 18, H. 6, S. 670–675.

Kilger, G.; Clements, J.; Holzmann, B. (1997): Amino acid residues required for binding of vascular cell adhesion molecule-1 to integrin alpha 4 beta 7. In: *International immunology*, Jg. 9, H. 2, S. 219–226.

Kilger, G.; Needham, L. A.; Nielsen, P. J.; Clements, J.; Vestweber, D.; Holzmann, B. (1995): Differential regulation of alpha 4 integrin-dependent binding to domains 1 and 4 of vascular cell adhesion molecule-1. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 270, H. 11, S. 5979–5984.

Kitani, A.; Nakashima, N.; Izumihara, T.; Inagaki, M.; Baoui, X.; Yu, S. et al. (1998): Soluble VCAM-1 induces chemotaxis of Jurkat and synovial fluid T cells bearing high affinity very late antigen-4. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, Jg. 161, H. 9, S. 4931–4938.

Kummer, Christiane; Ginsberg, Mark H. (2006): New approaches to blockade of alpha4-integrins, proven therapeutic targets in chronic inflammation. In: *Biochemical pharmacology*, Jg. 72, H. 11, S. 1460–1468.

- Kümpfel, T; Heydari, N; Hohlfeld, R (2002): Antegren (natalizumab). A promising new approach to therapy of multiple sclerosis. In: *Der Nervenarzt*, Jg. 73, H. 6, S. 552–555.
- Langrish, Claire L.; Chen, Yi; Blumenschein, Wendy M.; Mattson, Jeanine; Basham, Beth; Sedgwick, Jonathan D. et al. (2005): IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. In: *The Journal of experimental medicine*, Jg. 201, H. 2, S. 233–240.
- Lassmann, Hans; Brück, Wolfgang; Lucchinetti, Claudia F (2007): The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. In: *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, Jg. 17, H. 2, S. 210–218.
- Lee, S. J.; Benveniste, E. N. (1999): Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system. In: *Journal of neuroimmunology*, Jg. 98, H. 2, S. 77–88.
- Luster, Andrew D; Alon, Ronen; von Andrian, Ulrich H (2005): Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. In: *Nature immunology*, Jg. 6, H. 12, S. 1182–1190.
- Man, Shumei; Ubogu, Eroboghene E; Ransohoff, Richard M (2007): Inflammatory cell migration into the central nervous system: a few new twists on an old tale. In: *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, Jg. 17, H. 2, S. 243–250.
- Mandell, Kenneth J.; Babbitt, Brian A.; Nusrat, Asma; Parkos, Charles A. (2005): Junctional adhesion molecule 1 regulates epithelial cell morphology through effects on beta1 integrins and Rap1 activity. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 280, H. 12, S. 11665–11674.
- Markowitz, Clyde E (2007): Interferon-beta: mechanism of action and dosing issues. In: *Neurology*, Jg. 68, H. 24 Suppl 4, S. S8-11.
- Massia, S. P.; Hubbell, J. A. (1992): Vascular endothelial cell adhesion and spreading promoted by the peptide REDV of the IIIICS region of plasma fibronectin is mediated by integrin alpha 4 beta 1. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 267, H. 20, S. 14019–14026.
- Melamed, Myron R; Lindmo, T (1990): *Flow Cytometry and sorting*. 2. ed. New York: Wiley-Liss.

- Milner, Richard (2007): A novel three-dimensional system to study interactions between endothelial cells and neural cells of the developing central nervous system. In: BMC neuroscience, Jg. 8, S. 3.
- Milner, Richard; Campbell, Iain L. (2002): Developmental regulation of beta1 integrins during angiogenesis in the central nervous system. In: Molecular and cellular neurosciences, Jg. 20, H. 4, S. 616–626.
- Molteni, Raffaella; Fabbri, Monica; Bender, Jeffrey R; Pardi, Ruggero (2006): Pathophysiology of leukocyte-tissue interactions. In: Current opinion in cell biology, Jg. 18, H. 5, S. 491–498.
- Nakao, Shintaro; Kuwano, Takashi; Ishibashi, Tatsuro; Kuwano, Michihiko; Ono, Mayumi (2003): Synergistic effect of TNF-alpha in soluble VCAM-1-induced angiogenesis through alpha 4 integrins. In: Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), Jg. 170, H. 11, S. 5704–5711.
- Nielsen, J.M.; Korteweg, T.; Polman C. H. (2007): Diagnosing MS: Recent Guidelines and Future Goals Focusing on Magnetic Resonance Imaging. In: The International MS Journal, Jg. 14, H 1, S. 29–34.
- Norman, M U; Hickey, M J (2005): Mechanisms of lymphocyte migration in autoimmune disease. In: Tissue antigens, Jg. 66, H. 3, S. 163–172.
- Noseworthy, J. H.; Lucchinetti, C.; Rodriguez, M.; Weinshenker, B. G. (2000): Multiple sclerosis. In: The New England journal of medicine, Jg. 343, H. 13, S. 938–952.
- Pedemonte, Enrico; Mancardi, Gianluigi; Giunti, Debora; Corcione, Anna; Benvenuto, Federica; Pistoia, Vito; Uccelli, Antonio (2006): Mechanisms of the adaptive immune response inside the central nervous system during inflammatory and autoimmune diseases. In: Pharmacology & therapeutics, Jg. 111, H. 3, S. 555–566.
- Petri, Björn; Bixel, M. Gabriele (2006): Molecular events during leukocyte diapedesis. In: The FEBS journal, Jg. 273, H. 19, S. 4399–4407.
- Pittock, Sean J; Lucchinetti, Claudia F (2007): The pathology of MS: new insights and potential clinical applications. In: The neurologist, Jg. 13, H. 2, S. 45–56.

Polman, Chris H; O'Connor, Paul W; Havrdova, Eva; Hutchinson, Michael; Kappos, Ludwig; Miller, David H et al. (2006): A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. In: The New England journal of medicine, Jg. 354, H. 9, S. 899–910.

Prosper, F.; Stroncek, D.; McCarthy, J. B.; Verfaillie, C. M. (1998): Mobilization and homing of peripheral blood progenitors is related to reversible downregulation of alpha4 beta1 integrin expression and function. In: The Journal of clinical investigation, Jg. 101, H. 11, S. 2456–2467.

Ransohoff, Richard M; Kivisäkk, Pia; Kidd, Grahame (2003): Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. In: Nature reviews. Immunology, Jg. 3, H. 7, S. 569–581.

Rebenko-Moll, Natalia M; Liu, Liping; Cardona, Astrid; Ransohoff, Richard M (2006): Chemokines, mononuclear cells and the nervous system: heaven (or hell) is in the details. In: Current opinion in immunology, Jg. 18, H. 6, S. 683–689.

Rice, George P A; Hartung, Hans-Peter; Calabresi, Peter A (2005): Anti-alpha4 integrin therapy for multiple sclerosis: mechanisms and rationale. In: Neurology, Jg. 64, H. 8, S. 1336–1342.

Rieckmann, P.; Altenhofen, B.; Riegel, A.; Kallmann, B.; Felgenhauer, K. (1998): Correlation of soluble adhesion molecules in blood and cerebrospinal fluid with magnetic resonance imaging activity in patients with multiple sclerosis. In: Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England), Jg. 4, H. 3, S. 178–182.

Rieckmann, Peter; Kruse, N.; Nagelkerken, L.; Beckmann, K.; Miller, D.; Polman, C. et al. (2005): Soluble vascular cell adhesion molecule (VCAM) is associated with treatment effects of interferon beta-1b in patients with secondary progressive multiple sclerosis. In: Journal of neurology, Jg. 252, H. 5, S. 526–533.

Rudick, Richard A.; Sandrock, Alfred (2004): Natalizumab: alpha 4-integrin antagonist selective adhesion molecule inhibitors for MS. In: Expert review of neurotherapeutics, Jg. 4, H. 4, S. 571–580.

Rudick, Richard A; Stuart, William H; Calabresi, Peter A; Confavreux, Christian; Galetta, Steven L; Radue, Ernst-Wilhelm et al. (2006): Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. In: The New England journal of medicine, Jg. 354, H. 9, S. 911–923.

- Schreiner, B.; Kieseier, B. C.; Hartung, H-P; Hohlfeld, R.; Wiendl, H. (2005): Blocking adhesion molecules with natalizumab in multiple sclerosis. In: *Der Nervenarzt*, Jg. 76, H. 8, S. 999–1005.
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D. et al. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: *Analytical biochemistry*, Jg. 150, H. 1, S. 76–85.
- Staelens, Stephanie; Desmet, Johan; Ngo, Thu Hoa; Vauterin, Stephan; Pareyn, Inge; Barbeaux, Philippe et al. (2006): Humanization by variable domain resurfacing and grafting on a human IgG4, using a new approach for determination of non-human like surface accessible framework residues based on homology modelling of variable domains. In: *Molecular immunology*, Jg. 43, H. 8, S. 1243–1257.
- Steinman, Lawrence (2005): Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab. In: *Nature reviews. Drug discovery*, Jg. 4, H. 6, S. 510–518.
- Stins, M. F.; Gilles, F.; Kim, K. S. (1997): Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells. In: *Journal of neuroimmunology*, Jg. 76, H. 1-2, S. 81–90.
- Tesmer, Laura A.; Lundy, Steven K.; Sarkar, Sujata; Fox, David A. (2008): Th17 cells in human disease. In: *Immunological reviews*, Jg. 223, S. 87–113.
- Thrower, Ben W (2007): Clinically isolated syndromes: predicting and delaying multiple sclerosis. In: *Neurology*, Jg. 68, H. 24 Suppl 4, S. S12-5.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 76, H. 9, S. 4350–4354.
- Vanderslice, P.; Munsch, C. L.; Rachal, E.; Erichsen, D.; Sughrue, K. M.; Truong, A. N. et al. (1998): Angiogenesis induced by tumor necrosis factor- α ; is mediated by α_4 integrins. In: *Angiogenesis*, Jg. 2, H. 3, S. 265–275.
- von Andrian, U H; Mackay, C R (2000): T-cell function and migration. Two sides of the same coin. In: *The New England journal of medicine*, Jg. 343, H. 14, S. 1020–1034.

Weissert, Robert (2006): The curtain is drawn for both natalizumab and fingolimod (FTY720): a new era of multiple sclerosis therapy has arrived. In: Expert review of neurotherapeutics, Jg. 6, H. 11, S. 1587–1590.

Weksler, B. B.; Subileau, E. A.; Perrière, N.; Charneau, P.; Holloway, K.; Leveque, M. et al. (2005): Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. In: The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, Jg. 19, H. 13, S. 1872–1874.

Yang, Ginger X.; Hagmann, William K. (2003): VLA-4 antagonists: potent inhibitors of lymphocyte migration. In: Medicinal research reviews, Jg. 23, H. 3, S. 369–392.

Zhang, Guang-Xian; Gran, Bruno; Yu, Shuo; Li, Jifen; Siglienti, Ines; Chen, Xiaohan et al. (2003): Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor-beta 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. In: Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), Jg. 170, H. 4, S. 2153–2160.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Leukozytenextravasation am Endothel und daran beteiligte Adhäsionsmoleküle.....	7
Abbildung 2 Aufbau der Blut-Hirnschranke.....	8
Abbildung 3 Verwendeter Proteinmarker für die Western-Blot-Analysen	28
Abbildung 4 Bildbeispiel zur Auswertung am Computer mit ImageJ:.....	42
Abbildung 5 Skizze zur Chemolumineszenz.....	47
Abbildung 6 Integrin β -1-Färbung auf HCEC 404 (Vergrößerung: 200x)	49
Abbildung 7 Integrin β -1-Färbung auf HCEC 404 (Vergrößerung: 400x)	50
Abbildung 8 Integrin β -1-Färbung der laborinternen Zellisolation (III)	51
Abbildung 9 Doppelfärbung gegen Integrin β -1 und ZO-1	52
Abbildung 10 Integrin α -4-Färbung auf HCEC 404 (Vergrößerung: 200x)	53
Abbildung 11 Integrin α -4-Färbung auf HCEC 404 (Vergrößerung: 400x)	54
Abbildung 12 Doppelfärbung gegen Integrin α -4 und ZO-1	55
Abbildung 13 Expressionsanalyse von Integrin α -4, β -1 und β -7 auf HCEC 404	57
Abbildung 14 Beispiele zur variablen Integrin α -4-Expression auf verschiedenen HCEC	57
Abbildung 15 Darstellung der Expression der Integrine α -4 bzw. β -1 in Abhängigkeit vom Proliferationszustand	58
Abbildung 16 Integrin α -4-Expression auf HCEC 404 bei unterschiedlichen Stimulationsbedingungen für jeweils 24 h.....	59
Abbildung 17 Integrin α -4-Expression auf den laborinternen Endothelzellisolationen III und IV	60
Abbildung 18 Integrin-Expression auf der Zelllinie hCMEC/D3	61
Abbildung 19 Integrin-Expression auf der Zelllinie HBMEC	62
Abbildung 20 Darstellung der absoluten Zellzahl bei Adhäsion auf unbeschichtetem bzw. fibronectinbeschichtetem Untergrund	66
Abbildung 21 Adhäsion in Gegenwart von steigenden Konzentrationen von Natalizumab	68
Abbildung 22 Darstellung der Adhäsionsversuche mit zusätzlichen Konzentrationen von Natalizumab ..	70
Abbildung 23 Zusammenfassung aller Adhäsionsversuche mit Natalizumab	71
Abbildung 24 Zusammenfassung aller Experimente mit HCEC 404 und 419 bei positiver Integrin α -4- Expression	72
Abbildung 25 Vergleich der Adhäsion unter Zugabe von Natalizumab und Efalizumab	73
Abbildung 26 Vergleich der Adhäsion unter Zugabe von Natalizumab und Alemtuzumab.....	74
Abbildung 27 Zusammenfassung aller Experimente mit HCEC 404 und 419 ohne Integrin α -4.	75
Abbildung 28 Western Blot zur Untersuchung der Aktivierung von ERK (42 und 44 kDa).....	78
Abbildung 29 Western Blot zur Untersuchung der Aktivierung von JNK (46 kDa)	79
Abbildung 30 Western Blot zur Untersuchung der Aktivierung von p38 MAPK (43 kDa).....	79
Abbildung 31 Gewebeschnitte aus humanem Cerebellum.....	82
Abbildung 32 Gewebeschnitte aus humanem Cerebellum.....	82

8 Herstellerverzeichnis

Hersteller	Mutterkonzern bzw. Vertriebsgesellschaft	Standort, Land
A. Hartenstein GmbH		Würzburg, D
Amersham Biosciences	GE Healthcare Buchler GmbH & Co. KG	München, D
AppliChem GmbH		Darmstadt, D
BD Pharmingen GmbH		Heidelberg, D
Bio-Rad Laboratories GmbH		München, D
Biochrom AG		Berlin, D
Biogen Idec GmbH		Ismaning, D
Biosan Laboratories Inc.		Warren, USA
Carl Roth GmbH & Co. KG		Karlsruhe, D
Cambrex	Lonza Verviers S.p.r.l.	Verviers, B
Calbiochem	Merck	Darmstadt
Cell Signaling Technology	New England Biolabs GmbH	Frankfurt am Main, D
Chemicon	Millipore	Schwalbach, D
Dako Deutschland GmbH		Hamburg, D
Eppendorf AG		Wesseling-Berzdorf, D
Fermentas GmbH		St. Leon-Rot, D
Fujifilm Europe GmbH,		Düsseldorf, D
Gibco BRL	Invitrogen GmbH	Karlsruhe, D
Gilson International B.V.		Bad Camberg, D
Hecht-Assistent KG		Sondheim, D
Helmut Hund GmbH		Wetzlar, D
Heraeus GmbH		Hanau, D

Herstellerverzeichnis

Hersteller	Mutterkonzern bzw. Vertriebsgesellschaft	Standort, Land
Immunotech S.A.S.	Beckman Coulter GmbH	Krefeld, D
InoLab	Wissenschaftlich- Technische Werkstätten (WTW) GmbH & Co. KG	Weilheim, D
Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.		Newmarket Suffolk, UK
Janke & Kunkel GmbH & Co. KG		Staufen, D
J. T. Baker	Mallinckrodt Baker B.V.	Deventer, NL
Labsystems	Thermo Fisher Scientific Inc.	Langenselbold, D
Merck KGaA		Darmstadt, D
Mettler-Toledo GmbH		Giessen, D
NuAire Corp.		Plymouth, USA
Nunc GmbH & Co. KG		Wiesbaden, D
Olympus GmbH		Hamburg, D
PAA Laboratories GmbH		Pasching, A
PeproTech Inc.	Tebu-bio	Offenbach, D
Promega GmbH		Mannheim, D
R&D Systems GmbH		Wiesbaden-Nordenstadt, D
Roche Pharma AG		Basel, CH
Santa Cruz Biotechnology, Inc.		Heidelberg, D
Sandoz International GmbH		Holzkirchen, D
Schleicher & Schuell GmbH		Dassel, D
Scotsman Ice Systems		Milan, IT
Schering AG	Bayer Schering Pharma AG	Berlin, D
Serono GmbH	Merck Serono	Unterschleißheim, D

Herstellerverzeichnis

Hersteller	Mutterkonzern bzw. Vertriebsgesellschaft	Standort, Land
Serva Elektrophoresis GmbH		Heidelberg, D
Sigma-Aldrich Chemie GmbH		Steinheim, D
Strathmann Biotec GmbH & Co. KG		Hamburg, D
Zymed Laboratories	Invitrogen	Karlsruhe, D

9 Abkürzungen

A. dest.	aqua destillata
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
APC	antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen-presenting cell</i>)
APS	Ammoniumpersulfat
ASM	humanes α -Actin des glatten Muskels (<i>actin smooth muscle</i>)
BCA	Bicinchoninsäure (<i>bicinchoninic acid</i>)
BHS	Blut-Hirnschranke
BSA	bovines Serumalbumin
CD	zellulärer Oberflächenmarker (<i>cluster of differentiation</i>)
CDR	komplementaritätsbestimmende Region (<i>complementary determining region</i>)
CIS	klinisch isoliertes Syndrom (<i>clinically isolated syndrome</i>)
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
Cy2	Carbocyanin (Cyaninfarbstoff)
Cy3	Indocarbocyanin (Cyaninfarbstoff)
DAPI	4', 6 Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
DMT	krankheitsmodifizierende Therapie (<i>disease modifying therapy</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis
EBM	endotheliales Basalmedium (<i>endothelial basal medium</i>)
ECGS	Wachstumszusatz für Endothelzellen (<i>endothelial cell growth supplement</i>)
ECL	Elektrochemolumineszenz
ECM	extrazelluläre Matrix (<i>extracellular matrix</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

Abkürzungen

EGM	endotheliales Wachstumsmedium (<i>endothelial growth medium</i>)
ELISA	antikörperbasiertes Nachweisverfahren (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
ERK	Proteinkinase (<i>extracellular signal related kinase</i>)
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor (<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Gd	Gadolinium
GFAP	saures Gliafaserprotein (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)
HCEC	humane zerebrale Endothelzelle (<i>human cerebral endothelial cell</i>)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethanesulfonsäure
HUVEC	humane venöse Nabelschnurendothelzellen (<i>human umbilical vein endothelial cells</i>)
ICAM-1	interzelluläres Zelladhäsionsmolekül (<i>intercellular adhesion molecule-1</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JCV	JC Virus (humanes Polyomavirus 2 benannt nach John Cunningham)
JNK	Proteinkinase (<i>c-Jun N-terminal kinase</i>)
LFA-1	Lymphozytenantigen (<i>lymphocyte function-associated antigen-1</i>)
kDa	Kilodalton
MAdCAM	mukosales Zelladhäsionsmolekül (<i>mucosal addressin cell adhesion molecule</i>)

Abkürzungen

MAG	myelinassoziiertes Glycoprotein
MAP	mitogenaktiviertes Protein (<i>mitogen activated protein</i>)
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase (<i>mitogen activated protein kinase</i>)
MBP	Myelin-basisches Protein (<i>myelin basic protein</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MMP	Matrixmetalloprotease
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glycoprotein
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MTS	3(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-Salz
NP	Nonyl-Phenol
OPN	Osteopontin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PE	Phycoerythrin
PML	Progressive Multifokale Leukenzephalopathie
PPMS	primär-progressive (<i>primary-progressive</i>) MS
RRMS	schubförmig-remittierende (<i>relapsing-remitting</i>) MS
SAM	selektives Adhäsionsmolekül
SCID	schweres Immundefektsyndrom (<i>severe combined immunodeficiency</i>)
SDS	Sodiumduodecylsulfat
SPMS	schubförmig-progrediente (<i>secondary-progressive</i>) MS
sVCAM-1	lösliches vaskuläres Zelladhäsionsmolekül (<i>soluble vascular cell adhesion molecule-1</i>)
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>tris buffered saline</i>)

Abkürzungen

TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
Th	T-Helferzelle
TIMP	Gewebsinhibitor der MMP (<i>tissue inhibitor of MMP</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
TPA	12-O-Tetradecanoyl-Phobol-13-Acetat
VCAM-1	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül (<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>)
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
VLA-4	Oberflächenantigen (<i>very late antigen-4</i>)
vWF	von-Willebrand-Faktor
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO	zonula occludens

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Mathias Buttmann für die Bereitstellung des interessanten Themas, für seine intensive Betreuung und das große Interesse, das er dieser Arbeit bis zum Schluss entgegenbrachte.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Nadine Kehl für ihre Unterstützung bei allen Arbeiten im Labor bedanken.

Besonderen Dank möchte ich auch an meine Eltern richten, ohne die ich nie so weit gekommen wäre.