

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Klaus V. Toyka

**Regulation der Chemokinexpression in humanen
zerebralen Endothelzellen**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Oliver Klein,
Hamburg

Würzburg, September 2004

Referent: Prof. Dr. P. P. Rieckmann
Koreferent: Prof. Dr. K. Toyka
Dekan: Prof. Dr. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Januar 2005

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis	Seite
1 Einleitung	1
1.1. Zerebrale Endothelzellen und die Blut-Hirn-Schranke	3
1.1.1. Eigenschaften der zerebralen Endothelzellen und Aufbau der Blut-Hirn-Schranke	3
1.1.2. Entwicklung der Blut-Hirn-Schranke	5
1.1.3. Die Astrozyten - Endothelzellinteraktion	5
1.1.4. Das Zentrale Nervensystem als ein immunpriviligiertes Organ	5
1.2. Chemokine	7
1.2.1. Klassifikation der Chemokine	7
1.2.2. Chemokinrezeptoren	7
1.2.3. Funktion der Chemokine	10
1.3. Das Mehrstufenmodell der Leukozytenextravasation	12
1.4. Chemokine und inflammatorische Prozesse im Zentralen Nervensystem	14
1.4.1. Experimentell-autoimmune Enzephalomyelitis und Multiple Sklerose	14
1.4.2. Zerebrale Ischämie	15
1.4.3. Trauma	16
1.4.4. Bakterielle und virale Infektionen	17
2. Material und Methoden	19
2.1. Material	19
2.1.1. Chemikalien und Reagentien	19
2.1.2. Antikörper	21
2.1.3. Enzyme	22
2.1.4. Nukleinsäuren	22
2.1.5. Puffer und Medien	22

	Seite
2.1.6. Kits	23
2.1.7. Verbrauchsmaterialien	24
2.1.8. Geräte	24
2.2. Methoden	25
2.2.1. Endothelzellkultur	25
2.2.1.1. Isolierung von humanen zerebralen Endothelzellen	25
2.2.1.2. Charakterisierung der zerebralen Endothelzellen mittels Immunfluoreszenz	26
2.2.1.3. Stimulation der Endothelzellen mit inflammatorischen Mediatoren	30
2.2.2. ELISA	30
2.2.3. Molekularbiologische Methoden	31
2.2.3.1. RNA - Isolierung	31
2.2.3.2. Reverse Transkription	32
2.2.3.3. Klonierung von cDNA	32
2.2.3.4. Real-Time-Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	35
3. Ergebnisse	37
3.1. Nachweis von inflammatorischen Chemokinen	37
3.1.1. MCP-1	40
3.1.2. RANTES	40
3.1.3. MIP-1 α	40
3.1.4. IL 8	41
3.1.5. IP-10	43
3.2. Modulation der Chemokinexpression	44
3.2.1. Estradiol und Progesteron	44
3.2.2. Pentoxifyllin	47
3.3.3. Neutrophine	48
	Seite

4.	Diskussion	52
5.	Zusammenfassung	59
6.	Literaturverzeichnis	60

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Aquired immunodeficiency syndrome
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
cAMP	Cyclic adenosine mono phosphate
cDNA	Copy- Desoxyribonucleic acid
EAE	Experimentell autoimmune Enzephalitis
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase
GFAP	Gliafilament acid protein
IFN γ	Interferon gamma
IL 1	Interleukin 1
IL 8	Interleukin 8
IP-10	Interferon inducible protein-10
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MCP-3	Monocyte chemoattractant protein 3
MHC	major histocompatibility complex
MIG	Monokine induced by interferon
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein 1 alpha
MIP-1 β	Macrophage inflammatory protein 1 beta
MIP-2	Macrophage inflammatory protein 2
NGF	Nerve growth factor
RANTES	Regulated on activation normal T cell expressed and secreted
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse transcript polymerase chain reaction
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Entzündung ist ein Prozess im menschlichen Organismus, mit dem dieser versucht, auf gewebeschädigenden Reize, die aus der Umwelt auf ihn eintreffen, zu reagieren und die Gewebeintegrität wieder herzustellen. Stimuli, die eine Entzündung hervorrufen, können physikalischer und chemischer Natur sein oder infektiöse Agentien. Des weiteren können entzündliche Prozesse durch endogene Ereignisse hervorgerufen werden, wie in postischämischen oder autoimmunologisch bedingten Entzündungsreaktionen.

Das Endothel ist ein sehr wichtiger Teil in der Regulation von Entzündungen. Es nimmt Einfluss darauf, ob Leukozyten die Blutbahn verlassen und in das geschädigte Gewebe auswandern können. Der Prozess der Extravasation ist nicht zufällig, sondern erfordert Mechanismen der Leukozyten - Endothelzellerkennung. Diese wird durch verschiedene Gruppen von Adhäsionsmolekülen und chemotaktisch wirkenden Zytokinen vermittelt: den Chemokinen. Durch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen am Ort der Entzündung werden die Endothelzellen in einen Zustand versetzt, die für die Leukozyteninteraktion wichtigen Molekülgruppen zu exprimieren; es kommt zur so genannten Endothelzellaktivierung.

Entzündungsreaktionen zeigen Unterschiede hinsichtlich der beteiligten Leukozytensubtypen und damit der Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrats sowie des zeitlichen Ablaufes.

Das Endothel zeigt in den verschiedenen Organsystemen eine ausgeprägte Heterogenität in strukturellen und funktionellen Eigenschaften, die Auswirkungen auf den Ablauf der Inflammation haben und die den regionalen Charakter der Entzündungsreaktion definieren. Eine besondere Spezialisierung besitzen zerebrale Endothelzellen als Teil der Blut-Hirn- Schranke, so dass angenommen werden kann, dass sie eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung der Gewebespezifität der Entzündung im zentralen Nervensystem spielen.

In dieser Arbeit wird untersucht, in welchem Umfang diese spezialisierten Zellen unter unterschiedlichen proinflammatorischen Bedingungen als

Produzenten von Chemokinen auftreten können und ob die Expression dieser Moleküle durch Einwirkung weiterer biologischer Faktoren modulierbar ist.

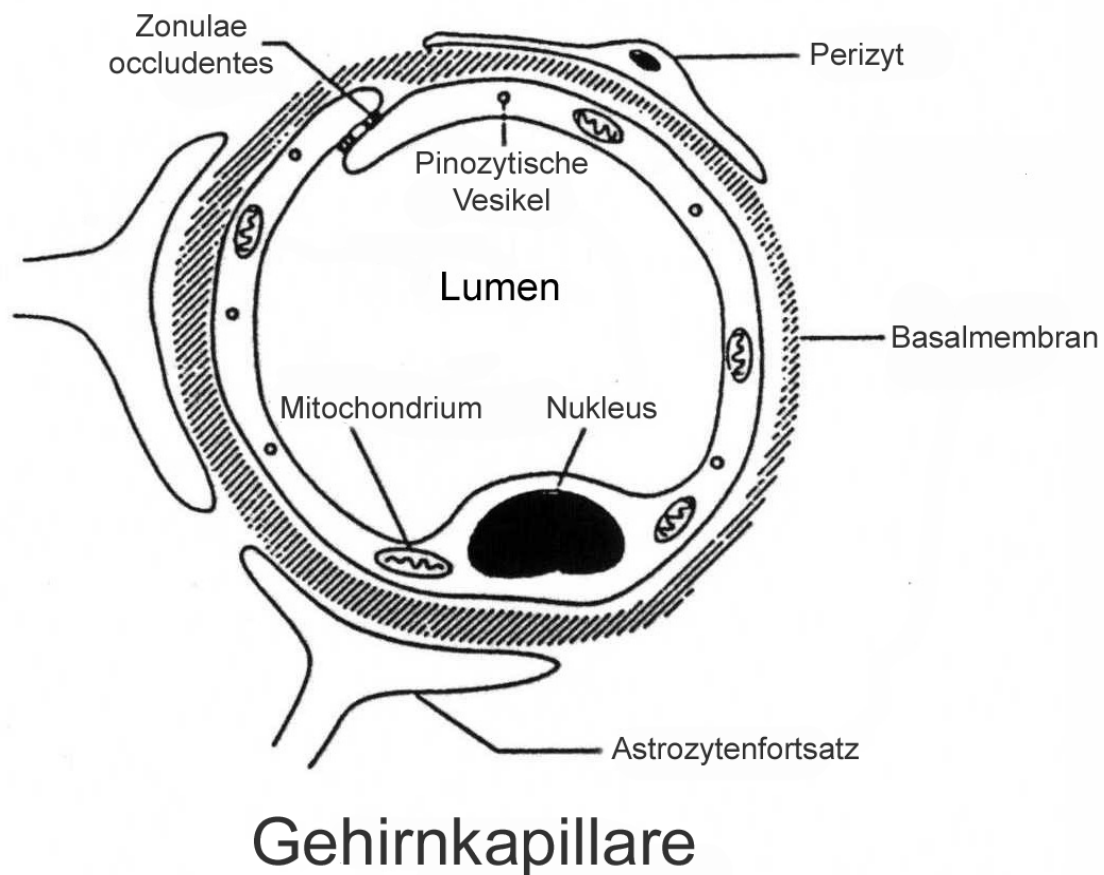
1.1. Zerebrale Endothelzellen und Blut-Hirn-Schranke

1.1.1. Eigenschaften der zerebralen Endothelzellen und Aufbau der Blut-Hirn-Schranke

Das Endothel besitzt eine bemerkenswerte Heterogenität, so bestehen strukturelle und funktionelle Unterschiede zwischen arteriellen, venösen, lymphatischen und kapillären Endothelzellen. Zudem existieren jedoch ausgeprägte Unterschiede zwischen Endothelzellen aus unterschiedlichen Organsystemen (Risau, 1995; Garlanda et al, 1997). Ein besonderes Beispiel für diese Spezifität stellt die zerebrale Endothelzelle als Teil der Blut-Hirn-Schranke dar (Joo, 1996). Die Regulation des Austausches von Makromolekülen und Flüssigkeit zwischen Blut und dem extravasalen Raum stellt eine Schlüsselfunktion des Endothels dar. In besonderer Weise kommt dies zum Ausdruck in der Blut-Hirn-Schranke. Diese sorgt dafür, dass Fluktuationen in der Plasmazusammensetzung und Fremdstoffe, die in der Lage wären die Funktion von Nervenzellen zu stören, nicht auf das ZNS einwirken können.

Die Blut-Hirn-Schranke besteht aus drei zellulären Komponenten: Der Endothelzelle, die das Gefäßinnere auskleidet, dem Astrozyten, der mit Zellfortsätzen mit der abluminalen Zellmembran der Endothelzelle kommuniziert und der Perizyt, eine Zelle mesenchymalen Ursprungs, die in regelmäßigen Abständen die Endothelzelle umgreift. Einen weiteren Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke stellt die zwischen der abluminalen Endothelzellmembran und den Astrozytenfortsetzen gelegene Basalmembran dar. Eine Reihe von Eigenschaften ermöglichen es den zerebralen Endothelzellen die Homöostase des ZNS-Milieus zu gewährleisten. Die Gehirnkapillaren sind hundertmal undurchlässiger als Kapillaren aus peripheren Geweben durch die Ausbildung komplexer Zellverbindungen zwischen den benachbarten Endothelzellen, den Zonulae occludentes. Dies bedingt eine sehr niedrige parazelluläre Permeabilität für hydrophile Substanzen. Sie besitzen außerdem im Gegensatz zu Endothelzellen von Kapillaren außerhalb des Gehirns keine Fenestrations und eine niedrigere Rate von Endozytose und Transzytose, es besteht jedoch eine höhere Rate Carrier-vermittelter Transportprozesse und rezeptorvermittelter Transzytoseprozesse. So werden kleine polare Substanzen über spezifische Carriersysteme transportiert, zum

Beispiel Glukose mittels des GLUT-1-Transportproteins, das spezifisch in zerebralen Endothelzelle exprimiert wird. Ähnliche Transportsysteme existieren für Aminosäuren , so dass ein geregelter Transport für die Substanzen besteht, die für die Aufrechterhaltung der Gehirnfunktion benötigt werden. Als weitere Schutzfunktion neben der durch die Zonulae occludentes stark eingeschränkte parazellulären Permeabilität besitzen die zerebralen Endothelzellen Carrierproteine mit breiter Spezifität, die Xenobiotika und hydrophobe Moleküle , die durch die Zellmembran diffundieren können, aus den Zellen heraustransportieren. Diese Transportproteine sind an der luminalen Zellmembran lokalisiert (Pardridge, 1999).



Gehirnkapillare

Abb.1: (Nach D. W. Miller, 1999)

1.1.2. Entwicklung der Blut-Hirn-Schranke

Die erwähnten speziellen Eigenschaften der zerebralen Endothelzellen, die einen bedeutenden Teil der Blut-Hirn-Schranke darstellen, entwickeln sich im Laufe der Reifung des zentralen Nervensystems. So wird die Blut-Hirn-Schranke relativ undurchlässig für große Proteine wie Albumin oder die Meerrettichperoxidase bevor sie in der Lage ist kleinere Substanzen wie Mannitol aus dem Gehirn zurückzuhalten. Entsprechend kommt es im Vergleich der Expressionsmuster der Transportproteine zwischen den zerebralen Endothelzellen im Embryonalstadium, dem Neugeborenen und dem Erwachsenen zu einer schrittweisen Zunahme der Carrierproteine. Es findet somit in der menschlichen Entwicklung eine kontinuierliche Heranreifeung dieser Schutzbarriere des Gehirns statt (Abbott, 2002; Risau et al, 1990).

1.1.3. Die Astrozyten-Endothelzellinteraktion

Die räumliche Nähe zwischen den zerebralen Endothelzellen und den Zellfortsetzungen der Astrozyten legte den Verdacht nahe, dass diese den spezialisierten Blut-Hirn-Schranken Phänotyp des zerebralen Endothels induzieren (Abbott, 2002; Beuckmann et al, 1998). Dies konnte durch Experimente untermauert werden, die zeigen konnten, dass periphere Gefäße, die in avaskuläres Hirngewebe einwachsen, phänotypische Merkmale von zerebralen Endothelzellen zeigen (Janzer et al, 1987). Des Weiteren lassen sich in Kokultorexperimenten mit Astrozyten oder durch Kultivierung mit Astrozyten-konditioniertem Medium in Endothelzellen Blut-Hirn-Schranken-Eigenschaften induzieren. Diese Experimente belegen, dass Astrozyten eine Rolle in der Induktion dieses besonderen Endothelphänotyps spielen, entweder durch den direkten Zell-Zell-Kontakt oder die Freisetzung löslicher induktiver Faktoren.

1.1.4. Das zentrale Nervensystem als ein immunprivilegiertes Organ

Lange Zeit galt das ZNS, als ein Ort, der besonders vor immunologischen Reaktionen geschützt ist; bedingt unter anderem durch die Blut-Hirn-Schranke, die Entzündungszellen das Eindringen in das Gehirn erschwert. Zudem fehlten

Hinweise auf eine Expression von antigenpräsentierenden Molekülen der MHC-Klasse, sowie auf eine lymphatische Drainage des ZNS (Leibowitz, 1983). In der Zwischenzeit kam es jedoch zu einem Wandel dieser Vorstellung. So konnte nachgewiesen werden, dass aktivierte Lymphozyten unabhängig von ihrer Spezifität bei intakter Blut-Hirn-Schranke in das ZNS einwandern (Hickey et al, 1991) und ZNS-ständige Zellen, wie Neurone und Mikroglia unter bestimmten Umständen MHC-Moleküle exprimieren können (Neumann et al, 1995). Zudem kann Antigen aus dem Hirnparenchym und dem Liquor in die tiefen Halslymphknoten gelangen und dort eine spezifische Immunantwort ausgelöst werden (Harling-Berg et al, 1999). Die Blut-Hirn-Schranke definiert so eher den regionalen Charakter der Entzündung im Gehirn als diese zu verhindern (Ransohoff et al, 2003).

1.2. Chemokine

Chemokine sind eine große Gruppe funktionell und strukturell verwandter, 8000 bis 16000 kDa schwerer Peptide, deren Hauptaufgaben, die homöostatische und inflammatorische Chemoattraktion der Leukozyten darstellt.

1.2.1. Klassifikation der Chemokine

Aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften teilt man die Chemokine in vier Subgruppen ein. Die meisten Chemokine besitzen zwei oder drei Paare von Cysteinresten in ihrer Aminosäuresequenz, die intramolekulare Disulfidbrücken bilden, zwischen dem ersten und dem dritten und zwischen dem zweiten und dem vierten Cysteinrest. In einer Untergruppe werden die ersten beiden Cysteinreste durch eine Aminosäure voneinander getrennt und als CXC oder α - Chemokine bezeichnet, in einer zweiten befinden sich die ersten beiden Cysteinreste in der Aminosäuresequenz nebeneinander, diese bezeichnet man als CC - Chemokine oder β - Chemokine. Die χ - Subgruppe besteht bisher nur aus einem Mitglied, dem sogenannten Lymphotoctin, das nur eine Disulfidbrücke in seiner Aminosäuresequenz enthält. Die ersten beiden Cysteinreste des größten Chemokins, Fraktalkine, sind durch drei Aminosäurereste voneinander getrennt, man bezeichnet es deshalb als CX3C - Chemokin oder δ - Subfamilie(Baggiolini et al, 1997; Zlotnik et al, 2000).

1.2.2. Chemokinrezeptoren

Bisher sind sechzehn Chemokinrezeptoren bekannt. Diese gehören einer größeren Superfamilie von Rezeptoren an, die strukturell dadurch gekennzeichnet sind, dass sie in sieben Schleifen die Plasmazellmembran als integrales Membranprotein durchsetzen und G - Protein gekoppelt sind, einem Signaltransduktionselement, das die Bindung des Liganden an den Rezeptor an weitere intrazelluläre Signalwege weiterleitet und dadurch einen biologischen Effekt hervorruft. Von den bisher bekannten sechzehn Rezeptoren gehören fünf zur Gruppe der CXC - Chemokine, neun zu den CC und jeweils einer zu den CX3C und der XC - Gruppe. Jeder dieser Rezeptoren bindet nur

die entsprechende Subgruppe an Chemokinen, einige binden jedoch mehrere Chemokine einer Gruppe mit hoher Affinität. Ähnlich können einige Chemokine mehr als einen Rezeptor einer Untergruppe binden. So bindet zum Beispiel das CC - Chemokin RANTES die Rezeptoren CCR 1, 3 und 5 (Murdoch et al, 2000). Die Expression bestimmter Chemokinrezeptoren ist auf bestimmte Leukozytensubtypen beschränkt und erlaubt es Lymphozyten nach ihrem Aktivierungs- und funktionellen Status zu unterteilen (Sallusto et al, 1998).

Chemokinsystem:

Systematischer Name	Allgemeiner Name (Mäuseprotein)	Rezeptor	Zielzellen
CC chemokine			
CCL1	1-309 (TCA-3)	CCR8	DC, T (Th2)
CCL2	MCP-1 (JE)	CCR2	Mo, Ba, T, NK, DC
CCL3	MIP-1a	CCR1, CCR5	Mo, T, NK, Eo, DC
CCL4	MIP-1 β	CCR5	Mo, T(Th1), DC, NK
CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5	T, Mo, Eo, Ba, NK, DC
CCL6	(C10, MRP-1)	CCR1, CCR3, CCR5	Mo
CCL7	MCP-3	CCR1, CCR2, CCR3	Mo, T, Eo, Ba, NK, DC
CCL8	MCP-2 (MARC)	CCR2, CCR3, CCR5	Mo, T, Ba, NK, DC
CCL9/10	MIP-1 $^{\wedge}$	CCR1	Neut, T
CCL11	Eotaxin	CCR3	Eo, Ba, T (Th2), DC
CCL12	(MCP-5)	CCR2	T, Mo, DC, Ba, NK
CCL13	MCP-4	CCR1, CCR2, CCR3	Mo, T, Eo, NK, DC, Ba
CCL14	HCC-1	CCR1	Eo, Mo
CCL15	HCC-2/Lkn-1/MIP-18	CCR1, CCR3	Neut, Eo, Mo
CCL16	HCC-4/LEC	CCR1	Mo, T
CCL17	TARC	CCR4	T(Th2)
CCL18	DC-CK1/ PARC	Not known	T, DC
CCL19	MIP-3 β /ELC/exodus-3	CCR7	T, DC
CCL20	MIP-3a/LARC/exodus-1	CCR6	T, B, DC
CCL21	6Ckine/SLC/exodus-2	CCR7	T, DC
CCL22	MDC/STCP-1	CCR4	T (Th2), DC
CCL23	MPIF-1	CCR1	Neut, Mo, T
CCL24	MPIF-2/Eotaxin-2	CCR3	T, NK
CCL25	TECK	CCR9	T
CCL26	Eotaxin-3	CCR3	Eo, Ba, T (Th2), DC
CCL27	CTACK/ILC (ALP)	CCR2, CCR3, CCR10	T
CCl28	MEC	CCR10	T
CXC chemokine			
CXCL1	GRO α /MGSA-a (MIP-2)	CXCR2, CXCR1	Neut
CXCL2	GRO β /MGSA- β (MIP-2a)	CXCR2	Neut
CXCL3	GROVMGSA-7 (MIP-2 β)	CXCR2	Neut
CXCL4	PF-4	Not known	Fibroblast
CXCL5	ENA78 (LIX)	CXCR2	Neut
CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2	Neut
CXCL7	NAP-2	CXCR2	Neut
CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2	Neut
CXCL9	Mig (MuMig)	CXCR3	T(Th1), NK
CXCL10	IP-10(Crg-2)	CXCR3	T(Th1), NK
CXCL11	I-TAC	CXCR3	T(Th1), NK
CXCL12	SDF-1a/ β	CXCR4	Neut, Mo, DC, T, B
CXCL13	BCA-1(BLC)	CXCR5	B, T
CXCL14	BRAK/bolekine	Not known	Mo
CXCL15	(Lungkine)	Not known	Neut
CXCL16	Small inducible cytokine B6	CXCR6	T
C chemokine			
CXCL1	Lymphotactic-a/SCM-1a	XCR1	T, NK
CXCL2	Lymphotactic- β /SCM-1 β	XCR1	T, NK
CX3C			
CX3CL1	Fractalkine/neurotactin	CX3CR1	Mo, T, NK

Abkürzungen: **DC** (Dentritische Zellen), **Mo** (Monozyten), **Neut** (Neutrophile Granulozyten), **Eo** (Eosinophile Granulozyten), **Ba** (Basophile Granulozyten), **T** (T-Lymphozyten), **B** (B-Lymphozyten), **NK** (Natürliche Killerzellen)
(nach Mahalingam et al, 2003)

1.2.3. Funktion der Chemokine

Chemokine stellen zusammen mit den Adhäsionsmolekülen die entscheidenden Komponenten des molekularen Erkennungsmechanismus zwischen Leukozyten und Endothelzellen dar. Die regulierte Expression von Chemokinen im Gewebe definiert die an der Entzündung beteiligten Leukozytensubtypen und deren Verteilung in dem Gebiet der Entzündung. Stimuli, die die Freisetzung der Chemokine aus einer Reihe von Zelltypen hervorrufen, sind bakterielle Zellwandbestandteile wie Lipopolysaccharid, proinflammatorische Zytokine wie TNF α und IL 1 oder das Vorliegen einer Hypoxie. Welche Form der Inflammation sie hervorrufen hängt von der Affinität der induzierten Chemokine zu einem bestimmten Chemokinrezeptor ab. Die CXC - Chemokine lassen sich aufgrund des Aminosäuremotifs Glutamat - Leuzin - Arginin (ELR) weiter unterteilen in eine ELR - positive und negative Gruppe. Diejenigen, die diese ELR-Sequenz besitzen sind in der Lage an den CXCR2 - Rezeptor zu binden, der stark von neutrophilen Granulozyten exprimiert wird. Aus diesem Grund spielt diese Chemokine eine besondere Rolle bei der akuten Entzündung, ein Beispiel dafür stellt das IL8 dar. Die meisten CXC-Chemokine besitzen dieses Aminosäuremotiv jedoch nicht, sie binden bevorzugt den CXCR3 Rezeptor, der sich auf aktivierten T - Zellen, B-Zellen, Monozyten und Natürlichen Killerzellen befindet. Indem sie diese Zelltypen anlocken , spielen Chemokine wie MIG oder IP 10 eine wichtigere Rolle in der Entwicklung der chronischen Entzündungsreaktionen, bei denen mononukleäre Zellen im Vordergrund stehen. (Rollins, 1997; Luster, 1998).

Die CC - Chemokine erzielen ihren Effekt durch die Bindung an Rezeptoren, die sich auf aktivierten T-Zellen, unreifen dendritischen Zellen und anderen mononukleären Zellen befinden. Deshalb sind Chemokine aus dieser Subfamilie wie RANTES, MIP1 α oder MCP 1 von größerer Bedeutung für erworbene Immunreaktionen und chronische Entzündungsreaktionen.

Wie schon oben erwähnt stellen die Chemokine ein wichtiges Element des Erkennungsmechanismus zwischen Leukozyten und Endothelzellen dar. Die

Interaktion zwischen den beiden Zelltypen bei der Leukozytenextravasation lässt sich in einem Mehrstufenmodell beschreiben (Springer, 1994).

1.3. Chemokine und das Mehrstufenmodell der Leukozytenextravasation

Im Rahmen der Entzündungsreaktion werden in Reaktion auf den Schädigungsreiz eine Reihe von inflammatorischen Mediatoren, zum größten Teil Zytokine, freigesetzt, die eine Veränderung des Phänotyps von Leukozyten und Endothelzellen hinsichtlich der Expression von Adhäsionsmolekülen an ihren Oberflächen bewirken.

Der erste Schritt der Leukozytentransmigration beinhaltet ein reversibles Rollen des Leukozyten entlang der Gefäßwand mit kurzfristiger Bindung und lösen derselben. Diese Interaktion wird vermittelt durch Adhäsionsmoleküle vom Typ der Selektine und ihre entsprechenden glykolisierten Liganden. Die Selektin-Superfamilie besteht aus drei Mitgliedern, wobei L-Selektin auf Leukozyten, P- und E-Selektin auf Endothelzellen exprimiert wird. Ziel dieser Interaktion ist die Leukozyten im Blutstrom abzubremsen(Piccio et al, 2002).

Im zweiten Schritt der Transmigrationskaskade sind die Chemokine involviert. Sie entstehen am Ort der Entzündung, induziert durch proinflammatorische Zytokine und werden dann mittels einer Heparin-bindenden Domäne an Proteoglykane an der Oberfläche der Endothelzellen gebunden (Tanaka, 1993). Die gebundenen Chemokine stimulieren die entsprechenden Chemokinrezeptoren auf den Leukozyten und sorgen damit für eine Affinitätssteigerung der Integrine, eine Gruppe von Oberflächenmolekülen auf den Leukozyten, für ihren entsprechenden Gegenpart auf den Endothelzellen, den Adhäsionsmolekülen aus der Immunglobulinsuperfamilie (Laudana, 2002). Die Interaktion zwischen den in ihrer Affinität gesteigerten Integrinen und den Adhäsionsmolekülen aus der Immunglobulinsuperfamilie sorgt daraufhin für eine feste Adhäsion des Leukozyten an der Endothelzelle, der Voraussetzung für den letzten Schritt der Extravasation, der Diapedese durch die Gefäßwand.

Auf welche Weise die Leukozyten diesen letzten Schritt bewerkstelligen, ist noch größtenteils unklar (McIntyre, 2003). Nach der Transmigration durch die Gefäßwand werden sie durch lokale Chemokingradienten an den Ort der Schädigung gelockt.

Im Rahmen autoimmunologisch bedingter entzndlicher ZNS-Erkrankungen scheint der erste Schritt des Mehrstufrnmodells unter Beteiligung der Selektine von geringerer Bedeutung zu sein, wie vor kurzem in einem Tiermodell der EAE gezeigt werden konnte (Vajkoczy et al., 2001).

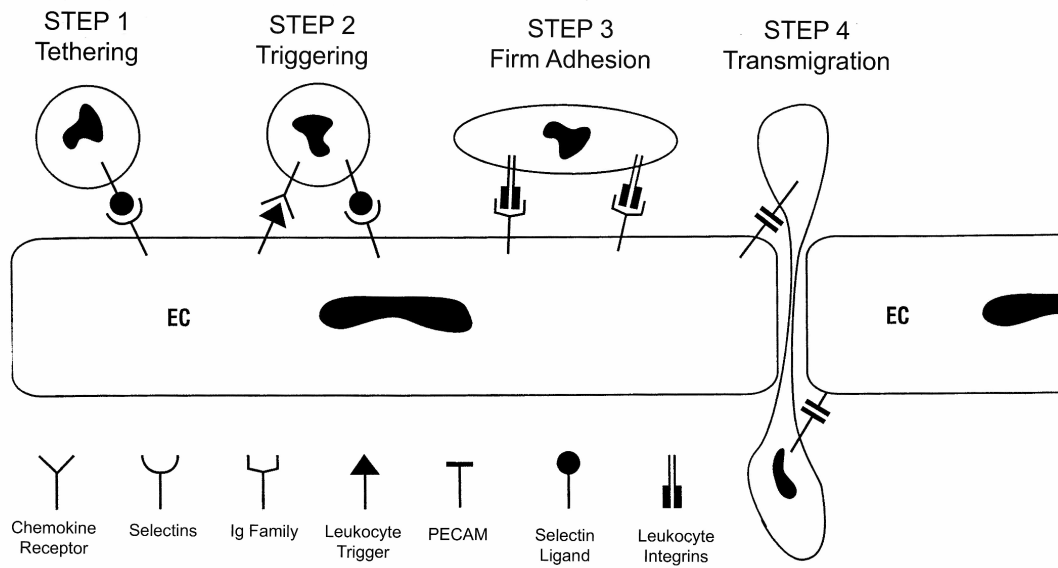


Abb. 2: (Nach R. L. Silverstein, 1999)

1.4. Chemokine und inflammatorische Prozesse im zentralen Nervensystem

Die Leukozyteninfiltration als Teil einer entzündlichen Reaktion ist ein zentraler Bestandteil einer Reihe von neurologischen Erkrankungen, von infektiösen über autoimmunologisch entzündliche Erkrankungen bis zu der zerebralen Ischämie. In ihrer Funktion als chemoattraktive Stoffe für Leukozyten spielen Chemokine eine bedeutende Rolle bei diesen Erkrankungen (Glabinski et al, 1999; Hesselgesser et al, 1999).

1.4.1. Experimentell-autoimmune Enzephalomyelitis und Multiple Sklerose

Multiple Sklerose stellt eine autoimmunologisch vermittelte entzündliche ZNS-Erkrankung dar, deren pathogenetischen Mechanismen im Tiermodell der experimentell-autoimmunen Enzephalomyelitis partiell untersucht werden können. Es wird angenommen, dass aktivierte myelinspezifische T-Zellen die intakte Blut-Hirn-Schranke überwinden, ihr Autoantigen erkennen und über die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen den Entzündungsprozeß in Gang setzen, in dessen Folge eine große Anzahl von Leukozyten, insbesondere mononukleäre Zellen in die Läsionen einwandern (Hemmer et al, 2001; Martino et al, 2002). Dabei scheint die Expression von Chemokinen für die weitere Einwanderung von Leukozyten in das ZNS bedeutsam (Glabinski et al, 1996). In der EAE konnte gezeigt werden, dass Astrozyten in der Nähe der entzündlichen Herde als Produzenten des CXC-Chemokins IP 10 und des CC-Chemokins MCP 1 auftreten (Ransohoff et al, 1993). In der Folge konnte die Expression einer Reihe weiterer Chemokine während der akuten Krankheitsphase nachgewiesen werden (Godiska et al, 1995). Einige Zeit später zeigte sich in einer anderen Form der EAE, die den schubförmigen Verlauf der Multiplen Sklerose besser wiedergibt, dass unterschiedliche Chemokine für die einzelnen Krankheitsphasen bedeutsam sind. Das CC-Chemokin MIP 1 α war notwendig für die initiale Leukozytenrekrutierung zu Beginn der Erkrankung, der Rückfall mit Auftreten neuer Symptome war jedoch mit einer starken Expression von MCP 1 assoziiert (Karpus et al, 1997). Mit Antikörperstudien, bei denen durch Blockade der Chemokine die

Krankheitsentstehung verhindert oder die Erkrankung abgemildert werden konnte, unterstrichen die funktionelle Bedeutung der initialen deskriptiven Experimente. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden Mäuse, denen der MCP 1- Genlocus oder der des Chemokin-Rezeptor CCR 2 fehlte, untersucht. Es zeigte sich, dass diese Tiere vor der EAE-Induktion geschützt waren, deren T-Zellen jedoch selber eine EAE induzieren konnten. MCP-1 scheint damit wichtig zu sein, um CCR 2 exprimierende Effektorzellen wie Makrophagen an den Ort der Entzündung zu bringen (Fife et al, 2000; Huang et al, 2001).

Ein großer Teil dieser im EAE- Modell gewonnen Ergebnisse kann auch in Beobachtungen an Gehirngewebe an Multipler Sklerose Erkrankter wiedergefunden werden. Eine Reihe von Chemokinen konnte in aktiven Läsionen von Gehirnen autopsierter MS-Kranker immunhistologisch nachgewiesen werden. So fand sich die Expression des Chemokins RANTES in perivaskulär gelegenen Lymphozyten(Hvas et al, 1997), zudem konnte man MCP-1 and IP-10 in reaktiven Astrozyten in aktiven MS-Läsionen nachweisen (Balashov et al, 1999; van der Voorn et al, 1999). Die diese Chemokine bindenden Rezeptoren CXCR3 und CCR5 waren auf Makrophagen und T-Zellen in den Läsionen exprimiert (Soerensen et al, 1999; Simpson et al, 2000). Im Liquor von Patienten, die sich in einem aktiven Krankheitsschub befanden, konnten erhöhte Spiegel von IP-10, MIG und RANTES gefunden werden. Der Rezeptor für IP 10, CXCR3, befand sich auf dem größten Teil der perivaskulär liegenden T-Zellen (Soerensen et al, 1999, 2002).

1.4.2. Zerebrale Ischämie

In den letzten Jahren gibt es immer stärkere Hinweise, dass inflammatorische Prozesse zur ZNS-Schädigung bei zerebraler Ischämie beitragen. So konnte in tierexperimentellen Studien gezeigt werden, dass es durch eine Leukozytendepletion zu einer Verkleinerung des Infarktareals kommen kann. Eine Expression von Chemokinen im ZNS konnte bei einer Reihe von Tiermodellen der zerebralen Ischämie beobachtet werden. Diese im ischämischen Hirnareal produzierten Chemokine scheinen für die Anlockung von Leukozyten in das infarzierte Areal verantwortlich zu sein und damit zu einer sekundären Gewebeschädigung beizutragen.

In einem Tiermodell mit einem andauernden Verschluss der mittleren Zerebralarterie konnte eine MCP-1 Expression sechs Stunden nach Zerebralverschluss in Astrozyten, die das ischämische Areal umgaben, beobachtet werden (Wang et al., 1995). Wenige Tage später nach Eintreten der zerebralen Ischämie ließ sich das entsprechende Chemokin in Makrophagen und Mikrogliazellen im Ischämieareal nachweisen (Gourmala et al., 1997). Bei der vorübergehenden zerebralen Ischämie spielt die Reperfusion eine bedeutende Rolle bei der Entstehung des Gewebeschadens. Durch Depletionsexperimente konnte nachgewiesen werden, dass insbesondere die neutrophilen Granulozyten dafür verantwortlich sind (Romson et al., 1983). Im Tiermodell kommt es bei der Reperfusion des vorübergehend minderperfundierten Gewebes zur lokalen Expression von IL 8, dessen Neutralisation zu einer deutlichen Reduktion der Infarktgröße führte (Matsumoto et al., 1997).

1.4.3. Trauma

Auch bei traumatischen ZNS-Schädigungen scheinen sekundäre Entzündungsreaktionen zu einem über das primäre Trauma hinausgehende Gewebeschädigung zu führen. Dabei stellen Chemokine gemäß tierexperimenteller Daten wiederum ein wichtiges Element zur Entwicklung der Inflammation dar. So war wenige Stunden nach einem das Gehirn penetrierenden Trauma das CC-Chemokin MCP-1 in der Nachbarschaft der Läsion in Astrozyten nachweisbar (Glabinski et al., 1996). Ein Influx von Leukozyten folgte der Chemokinexpression. In einem weiteren nicht penetrierenden Traumamodell fand man eine Beteiligung der CC-Chemokine RANTES und MIP-1 β an der nachfolgenden Entzündungsreaktion (Ghirnikar et al., 1996). Es kam zu einer MIP-1 β -Expression in Astrozyten und Makrophagen, während RANTES diffus im nekrotischen Gewebe exprimiert wurde. Bei einem experimentellem Tiermodell der Rückenmarksverletzung zeigte sich eine Synthese von MIP-1 α und MIP-1 β im verletzten Gewebe. Zuerst kam es zu einer diffusen Expression in der grauen Substanz und darauffolgend zu einer eingeschränkter Produktion der entsprechenden Chemokine durch die Leukozyten in der Nähe des geschädigten Bereiches (Bartholdi et al., 1997). Des weiteren konnten in einer klinischen Studie bei Patienten mit schwerem

Schädeltrauma signifikant höhere IL 8 -Serumspiegel im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gemessen werden (Kossmann et al., 1997).

1.4.4. Bakterielle und virale Infektion

Bei Infektionen und den damit verbundenen Aktivierung der Abwehrfunktionen des Organismus kommt es zur Expression bestimmter Chemokine und damit zu einer auf den Infektionserreger abgestimmten Abwehrreaktion. Die Infektion des zentralen Nervensystems durch verschiedene Virus-Spezies stimuliert die lokale Chemokinexpression. In dem Hirngewebe von Mäusen, die mit dem lymphozytären Chorionmeningitisvirus infiziert wurden beobachtete man zum Beispiel die Transkription der RNA der CC-Chemokine IP-10, MCP-1, MIP-1 β und von MCP-3, im späteren Infektionsverlauf erfolgte der Nachweis der mRNA Transkripte von Lymphotactin, C10, MIP-2 und MIP-1 α (Asensio et al, 1999). In einem anderen Tiermodell ließ sich in der akuten und chronischen Krankheitsphase von Hunden mit dem Staupevirus eine erhöhte IL-8 Aktivität im Liquor nachweisen (Tipold et al, 1999). Ein Primaten-Modell der AIDS-Enzephalitis zeigt eine verstärkte Expression der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, MC-3 und von IP-10. Die Chemokinproduktion erfolgte vorrangig in den Endothelzellen und der perivaskulären Mikroglia (Sasseville et al, 1996). Bezogen auf bakterielle ZNS-Infektionen konnte in Gehirnen von Mäusen mit einer experimentellen Listerienmeningoenzephalitis die mRNA der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und MIP-2 nachgewiesen werden (Seebach et al, 1995). In einem anderen Modell, der experimentellen Pneumokokkenmeningitis, verzögert die intrazisternale Applikation von anti-MIP-1 Antikörpern den Beginn der ZNS-Inflammation (Saukkonen et al, 1990).

In Untersuchungen bei Patienten mit eitriger Meningitis konnte man erhöhte Spiegel von IL-8, GRO- α , MCP-1, MIP-1 α und MIP-1 β nachweisen. Die chemotaktische Aktivität der Liquorproben für Neutrophile Granulozyten ließ sich durch die Zugabe von anti-IL-8 und anti-GRO- α Antikörpern unterbinden. In ähnlicher Weise war durch Zugabe von anti-MCP-1, anti-MIP-1 α und anti-MIP-1 β Antikörpern eine Blockade der Migration von mononukleären Zellen möglich (Spanaus et al, 1997).

Bei an HIV-Enzephalopathie erkrankten Patienten gelang der Nachweis von MCP-1 aus dem Liquor (Conant et al, 1998), in den Gehirnen an AIDS verstorbener Patienten konnten die Chemokine MCP-1, MIP-1 α und RANTES

in Makrophagen nachgewiesen werden (Sanders et al, 1998). So dass auch bei dieser Form der Enzephalitis die Chemokinexpression eine wichtige pathophysiologische Rolle zu spielen scheint.

Unter Berücksichtigung der in den vorangegangenen Abschnitten dargestellten Bedeutung von Chemokinen bei inflammatorischen ZNS-Prozessen und des spezifischen Phänotyps der humanen zerebralen Endothelzellen als Teil der Blut-Hirn-Schranke erfolgte eine Untersuchung, ob humane zerebrale Endothelzellen ein spezifisches Muster an Chemokinen unter inflammatorischen Bedingungen produzieren können und ob die Chemokinsynthese unter dem Einfluß bestimmter bioaktiver Substanzen, für die eine Beeinflussung inflammatorischer Reaktionen bekannt ist oder angenommen werden kann, modulierbar ist.

.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Reagentien

- Agarose	Sigma, Deisenhofen
- Ammoniumpersulfat (.APS), 10%	Merck
- Amphotericin (250 ug/ml)	Gibco-BRL-Life-Technologies, Eggenstein
- Bis-Acrylamid, 30%	Gibco-BRL-Life-Technologies, Eggenstein
- Borsäure	Merck, Darmstadt
- Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
- Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
- Calcein Acetoxymethylester (calcein AM)	Molecular Probes, Eugene, U.S.A.
- Casein	Sigma, Deisenhofen
- Dextran	Sigma, Deisenhofen
- 4, 6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI)	Sigma, Deisenhofen
- Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisenhofen
- Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
- Di-Natriumdihydrogenphosphat (NaHPO ₄)	Merck, Darmstadt
- Dulbeccos's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Biowhittaker, Verviers, Belgien
- Eisessig (100% Essigsäure)	Merck, Darmstadt
- Endothelial cell growth supplement ECGS(15mg)	Sigma, Deisenhofen
- Ethanol, absolut	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
- Ethylendinitrilotetraacetat-dinath'imsalz (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
- Fetales Kälberserum (PCS)	Boehringer Ingelheim, Heidelberg Seromed, Berlin
- Formaldehyd, 37%	Merck, Darmstadt
- Formamid	Gibco-BRL-Life-Technologies, Eggenstein

- Gelatine	Sigma, Deisenhofen
- Gentamicin (10 mg/ml)	Gibco-BRL-Life-Technologies, Eggenstein
- Glycerin	Merck, Darmstadt
- Heparin (100000 U)	Sigma, Deisenhofen
- M199 (10x)	Biowhittaker, Verviers, Belgien
- M199	Biowhittaker, Verviers, Belgien
- MgCl ₂ -Lösung (25 mM)	AmershamLifeScience, Braunschweig
- 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Sigma, Deisenhofen
- NaN ₃	Sigma, Deisenhofen
- Natriumacetat	Merck, Darmstadt
- Natriumchlorid	Sigma, Dcisenhofen
- Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
- Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
- Natronlauge (NaOH)	Merck, Dannstadt
- PCR-Optimizer Kit	Invitrogen, De Scheelp, N L
- IOxPCR-Puffer	AmershamLifeScience, Braunschweig
- Penicillin (5000 U)/Streptomycin (5 mg/ml)	Gibco-BRL-Life-Technologies, Eggenstein
- Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom, Berlin
- Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
-Rekombinantes humanes TNF α	Genzyme, Cambridge, U.S.A., bzw. Strathmann Biotech GmbH, Hannover
-Rekombinantes humanes IFN γ	Endogen
- Rekombinantes humanes IL 1 β	
- LPS	
- Rekombinantes humanes NGF	Amgen
- Rekombinantes humanes BDNF	Amgen
- RPMI 1640 (mit HEPES/L-Glutamin)	Gibco-BRL-Life-Technologies, Eggenstein
- Proteasen-Inhibitoren	Boehringer Mannheim, Mannheim
- Saccharose	Merck, Darmstadt
- Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt

- SeeBlue™Pre-Stained Standards	Novex, San Diego, U.S.A.
- SYTOX Green nucleic acid stain (SYTOX)	Molecular Probes, Eugene, U.S.A.
-TEMED	Sigma, Deisenhofen
-Tris	Sigma, Deisenhofen
-Triton-X-100	Sigma, Deisenhofen
- Tween 20	Sigma, Deisenhofen
- Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
- Trypsin-EDTA (1x Lsg. für EC-Kulturen)	Sigma, Deisenhofen
-Wasserstoffperoxid, 30 %	Sigma, Deisenhofen
- Xylene Cyanole FF	Sigma, Deisenhofen
- β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen

2.1.2. Antikörper

- Anti Galactocerebroside (GalC)	Boehringer Mannheim, Mannheim
- Anti Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	Dako, Glostrup, Dänemark
- Anti goat IgG, Peroxidase konjugiert	Dianova, Hamburg
- Anti mouse IgG, Peroxidase konjugiert	Dianova, Hamburg
- Anti von-Willebrand-Faktor (vWF)	Dako, Glostrup, Dänemark
- Anti α-Actin	Röche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Biotinyliertes <i>Ulex europaeus</i> Agglutinin I	Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A.
- Cyanine Konjugate (Cy3) Anti Rabbit IgG	Biotrend, Köln Eggenstein
- Fluorescein Isothiocyanate (FITC) Anti mouse IgG2b, κ	Sigma, Deisenhofen
- Cyanine Konjugate (Cy3) Anti Mouse IgG	Chemicon, Temecula, U. S. A.
- Rabbit bzw. Anti Mouse IgG I,κ ,	
- Streptavidin Cy3 Konjugate	Sigma, Deisenhofen
- Streptavidin-Fluorescein	Boehringer Mannheim, Mannheim
- Tricolor Konjugat anti mouse IgG	Caltag Laboratories, Burlingame, U.S.A

2.1.3. Enzyme

- Collagenase/Dispase	Boehringer Mannheim, Mannheim
- Klenow-Enzym	Boehringer Mannheim, Mannheim
- M-MLV-Reverse Transkriptase	Gibco-BRL-Life Technologies
- Taq-DNA-Polymerase	AmershamLifeScience, Braunschweig, USA

2.1.4. Nukleinsäuren

- 0,2-10.0 kb DNA Leiter	Eurogenlec, Köln
- Oligo-p-d(T) _{i2-i8}	Pharmacia-Biotech, Freiburg
- Random primed DNA labeling	Boehringer Mannheim, Mannheim
- Random-Hexamer-Primer (50mM)	Promega, Heidelberg
- Salmon sperm DNA Solution	Giix-BRL-Life-Technobgies, Eggenstein
- Ultrapure dNTP Set (je 100mM)	Promega, Heidelberg

2.1.5. Puffer und Medien

-Zellkulturmedium	10 ml FCS 1 ml Amphotericin (250 µg/ml) 1 ml Penicillin/Streptomycin (5mg/ml) 1 ml endothelial cell groth supplement (3mg/ml) 500 µl Gentamicin (10 mg/ml) 100 µl Heparin (100mg/ml) ad 100 ml M199
-Coating Medium (Zellkultur)	1 ml Gelatine ad 50 ml DPBS (Ca ²⁺ /Mg ²⁺)

-Waschmedium (Zellkultur)	M199 mit 10% FCS
-Waschpuffer (Immunfluoreszenz)	10% FCS in DPBS
-Zellfixanz (Immunfluoreszenz)	3,7% Formaldehyd in DPBS
-DEPC - H ₂ O (RNA-Isolierung)	1 ml DEPC auf 1 l H ₂ O
-50x TBE-Puffer (Agarose-Gelelektrophorese)	108 g Tris 55 g Borsäure 40 ml EDTA (0,5M;pH 8,0) ad 1l H ₂ O
-6x DNA-Ladepuffer (Agarose-Gelelektrophorese)	30 % Glycerin 0,25% BPB 0,25% XC
-LB-Medium (Transformation kompetenter Bakterien)	25 g LB ad 1l H ₂ O Ampicillin (50 µg/ml Endkonzentration)

2.1.6. Assay Systeme

- Dneasy Mini Kit	Qiagen, Heidelberg
- RNeasy Mini/Midi Kit	Qiagen, Heidelberg
- ELISA Kit Quantikine human IL 8	R&D Systems, Minneapolis, USA
- ELISA Kit Quantikine human MCP-1	R&D Systems, Minneapolis, USA
- ELISA Kit Quantikine human MIP-1 α	R&D Systems, Minneapolis, USA
- ELISA Kit Quantikine human RANTES	R&D Systems, Minneapolis, USA

2.1.7. Verbrauchsmaterialien

- Kryo-Röhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
- Multi-well-Platten	Nunc, Roskilde, Dänemark
- PCR-Reaktionsgefäße(200µl)	Biozym Hess, Oldendorf
- Pipettenspitzen (10, 20,200, 1000 µl)	Greiner, Würzburg
- Pipettenspitzen mit Filter Safe Seal Tips (10,100,1000 µl)	Biozym, Hess. Oldendorf
- Reaktionsgefäße 0,7,1,5, 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
- Sephadex Säulen	Amersham Pharmacia, Upsala, Schweden
- Sterilfilteraufsätze 0.2 µm	Schleicher&Schuell, Dassel
- Whatman-Papier, 3 mm	Schleicher&Schull, Dassel
- X-Omat AR-Film	Kodak, New York, U.S.A.
- Zellkulturschalen 24-well	Nunc, Roskilde, Dänemark
- Zellkulturschalen 6-well	Nunc, Roskilde, Dänemark
- Zentrifugenröhrchen, Polypropylen 15 bzw. 50ml	Falcon, München

2.1.8. Geräte

- Biofuge 15 bzw. 15R	Heraeus, Osterode
- Fluoreszenz-Mikroskop IX 70	Olympus, Hamburg
- Digitale Kamera mit Software-System	Olympus, Hamburg
- Feinwaage PB	Mettler-Toledo AG, Greifensee, Schweiz
- Fluoroscanner	Labsystems, Helsinki, Finnland
- Gelelektrophorese-Apparatur Mini-V8-10Vertical	Gibco-BRL-Life-Technologies, Eggenstein
- Gelelektrophorese-Kammern Horizon 11.14 und 58	Gibco-BRL-Life-Technologies, Eggenstein
- ABI Prism 7700 Sequence Detection System	Perkin Elmer, Weiterstadt
- Mikropipetten	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
- Multiskan Photometer, ELISA	Labsystems, Helsinki, Finnland
- Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
- Nuair Autoflow CO ₂ water-jacketed Incubator	Zapf, Sarstedt, Nümbrecht

- Sicherheitswerkbank Laminar Flow Klasse II	Nuaire-Zapf, Sarstedt, Nümbrecht
- Ultrazentrifugenröhrchen 9 ml für Rotor TI-75	Beckmann, München
- Ultrazentrifuge Sorvall Discovery 90	Kendro, Newtown, U.S. A.
- Utraspec III Photometer	Pharmacia, Uppsala, Schweden
- UV-Stratalinker 2400	Stratagene, La Jolla, U.S.A.
- Zentrifuge CR422	Jouan, Unterhaching

2.2. Methoden

2.2.1. Endothelzellkultur

2.2.1.1. Isolierung der humanen zerebralen Endothelzellen

Die humanen zerebralen Endothelzellen wurden aus Hirngewebe Verstorbener gewonnen, deren Autopsie nicht länger als acht Stunden zurücklag. In einem ersten Schritt werden die weichen Hirnhäute, die Pia mater und die Arachnoidea, von dem Gewebe entfernt. Im nächsten Schritt erfolgt die Trennung der weißen Substanz von der Hirnrinde und die graue Hirnsubstanz wird in Sucrosebuffer homogenisiert. Es folgten nun mehrere Zentrifugationsschritte. Zweimal erfolgt eine Zentrifugation des mit gekühlten Sucrosebuffers homogenisierten Hirngewebes bei 1000 g über 10 Minuten in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in Sucrosebuffer resuspendiert. Es schließen sich nun zwei weitere Zentrifugationsschritte mit 100 x g über 45 Sekunden an. Dabei erfolgt eine Anreicherung der Hirnkapillaren in dem Überstand. Nach der Vereinigung der in diesen beiden Zentrifugationsschritten gewonnen Überständen erfolgt eine nochmalige Zentrifugation über zehn Minuten bei 1000 x g. Der Überstand wird verworfen und das gewonnene Pellet mehrmals mit Calcium und Magnesium freien PBS gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgt nun die Inkubation der im Pellet enthaltenen Kapillaren mit 0,075% Kollagenase Typ I in Ca/Mg freiem PBS für fünfzehn Minuten bei 37°C. Dies dient zur Dissoziation des Zellverbandes in einzelne Endothelzellen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Zellsuspension mehrmals mit dem mit 10% fötalem Kälberserum

angereicherten Medium M 199 gewaschen und schließlich in das mit Wachstumsfaktoren und Antibiotika angereicherte Kulturmedium aufgenommen. Der Boden von 6 well Kulturschalen wird mit 1% Gelatine beschichtet, das den Zellen als Haftsubstrat dient. In einer Zelldichte von 2×10^4 /ml wird die Zellsuspension in die Kulturplatten aufgebracht. Ein Wechsel des Nährmediums erfolgt jeden zweiten Tag, wobei die Konzentration des fötalen Kälberserums auf 5% verringert wird. Im subkonfluenten Zustand, der nach etwa fünf bis sieben Tagen erreicht ist, erfolgt die weitere Zellpassage, dabei wird ein 0,1% Trypsin/EDTA haltige Lösung auf die Kulturplatten aufgebracht und nach einer kurzen Inkubation die Zellen von der Platte abgenommen und mehrmals mit PBS oder Medium M199 gewaschen. Nach mehreren Waschsritten wird das Zellpellet erneut mit dem Kulturmedium resuspendiert und in der gewünschten Zelldichte von 2×10^4 /ml auf 24 Well Platten aufgetragen.

2.2.1.2. Charakterisierung der zerebralen Endothelzellen mittels Immunfluoreszenz

Zum Nachweis des speziellen Phänotyps der zerebralen Endothelzellen und zum Ausschluss einer ausgeprägten Verunreinigung der Endothelzellkulturen mit Astrozyten und Perizyten erfolgt die Durchführung des Immunfluoreszenznachweis entsprechender zelltypspezifischer Moleküle. Dabei folgt dem Abkippen des Nährmediums aus den Zellkulturplatten das zweimalige Waschen mit einer Lösung aus PBS mit einem Gehalt von 0,2% Gelatine. In einem zweiten Schritt werden die Zellen mit einer Ethanol/Eisessigsäure- Lösung fixiert, wobei diese für zehn Minuten bei -20°C auf den Kulturplatten belassen wird. Daraufhin wird die Lösung entfernt und die Zellen wiederum zweimal mit PBS mit 0,2% Gelatine gewaschen. Nun erfolgt die Auftragung des ersten zelltypspezifischen Antikörpers.

Zum Nachweis der Endothelzellen war dieser gegen den von-Willebrand Faktor gerichtet, ein Protein, das intrazellulär in Vesikeln gespeichert wird. Er vermittelt die Adhäsion von Thrombozyten an die Basalmembran einer geschädigten Gefäßwand. Der von-Willebrand-Faktor ist jedoch ein Pan-Endothelzellmarker, so dass mit dem Nachweis des Gehirnendothelzell-spezifischen Transportmoleküls Glukosetransporter 1, ein Transmembranprotein, das den

Transport von Glukose über die Blut-Hirn-Schranke erleichtert, das Vorliegen des speziellen Phänotyps der zerebralen Endothelzelle erfolgt. Für die Anfärbung von Astrozyten wurde ein Anti-GFAP Antikörper verwendet, ein in Gliazellen exprimiertes Zytoskelettprotein. Ein Antikörper, der das glatte Muskelantigen erkennt, dient zum Nachweis von Perizyten.

Der entsprechende erste Antikörper wird für sechzig Minuten bei Raumtemperatur auf den fixierten Zellen belassen und die nicht gebundene Antikörperfraktion dann mittels zweimaligen Waschen mit PBS/0,2% Gelatine von den Zellen entfernt. Als Detektionshilfe für den Nachweis der Bindung des ersten Antikörpers und damit des entsprechenden Antigens dient ein zweiter Antikörper, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelt ist. Da der Anti-GFAP-Antikörper ein im Kaninchen und der Anti-sm-Antikörper ein in der Maus generierter Antikörper ist, besitzen die Detektionsantikörper eine Spezifität für Kaninchen oder Maus Immunglobulin G. Es folgt eine Inkubation mit dem entsprechenden Zweitantikörper für sechzig Minuten bei Raumtemperatur und nach Entfernen desselben ein nochmaliges zweimaliges Waschen mit der PBS/0,2% Gelatine-Lösung.

Als Negativkontrolle, um eine unspezifische Färbung auszuschließen, dient der Einsatz eines Maus Immunglobulin G - Antikörpers unbekannter Spezifität als Erstantikörper. Beobachtet wird die Fluoreszenzfärbung des entsprechenden Antigens unter einem Fluoreszenzmikroskop. Dabei wird bei den zu den Versuchen herangezogenen Endothelzellen darauf geachtet, dass vor dem Versuchsansatz die Endothelzellkulturen mit weniger als 5% Astrozyten oder Perizyten verunreinigt sind und, dass über die Glukosetransporter 1-Expression in den Endothelzellen gezeigt wird, dass auch unter Kulturbedingungen in den Endothelzellen ein Phänotyp erhalten bleibt, der den Eigenschaften der zerebralen Endothelzellen *in vivo* ähnelt.

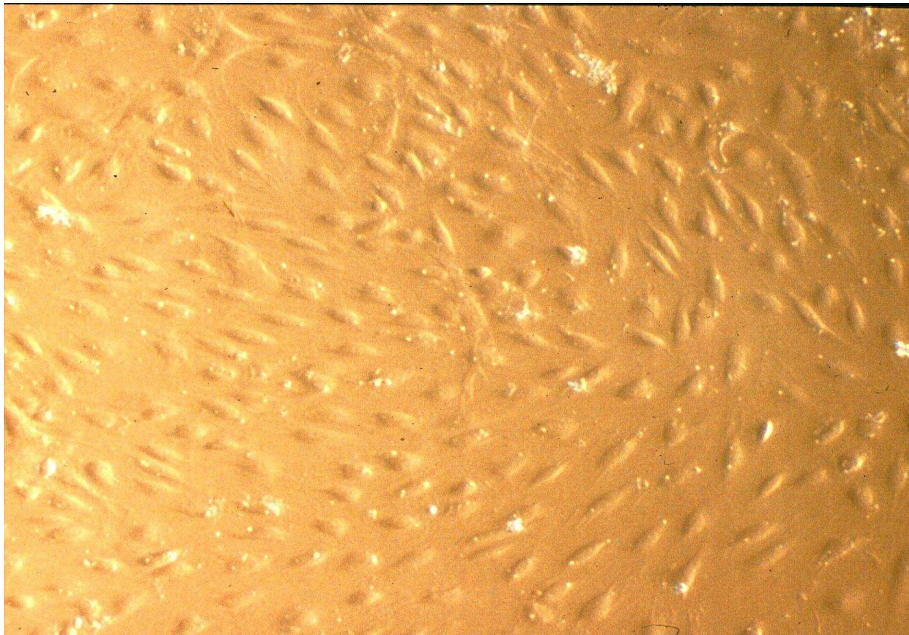


Abb. 3: Humane zerebrale Endothelzellen nach 10 Tagen Kultur als konfluentes Monolayer (Vergrößerung 200x)

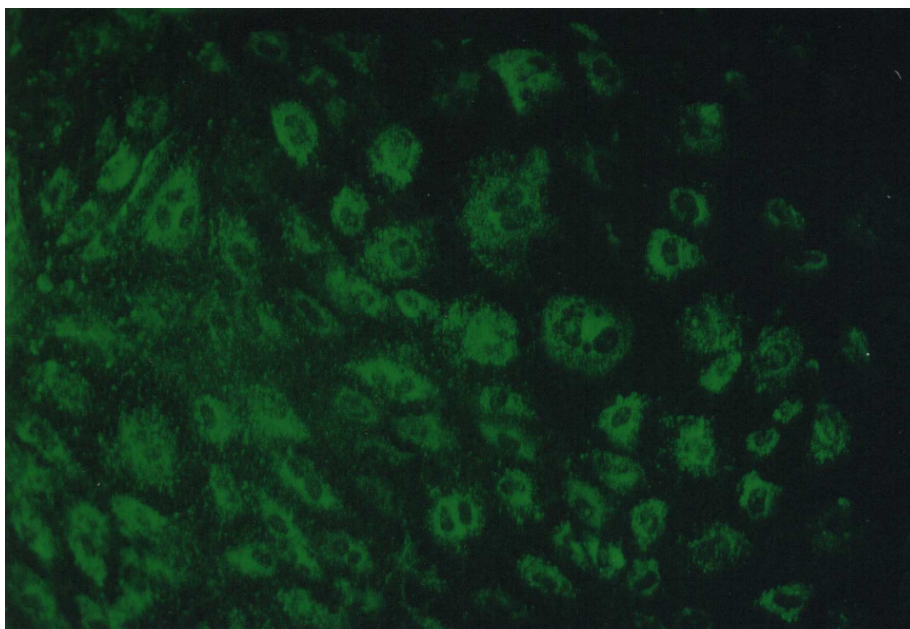


Abb. 4: Immunfluoreszenzfärbung zerebraler Endothelzellen gegen den von-Willebrand-Faktor (Vergrößerung 200x)

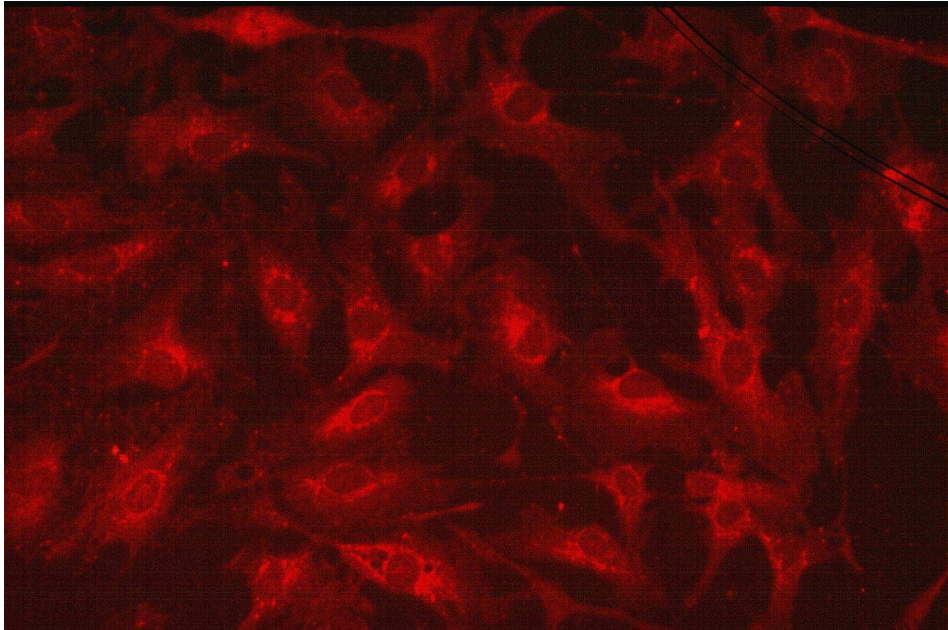


Abb. 5: Immunfluoreszenzfärbung humaner zerebraler Endothelzellen gegen das Glukosetransportprotein GLUT-1 (Vergrößerung 200x)

2.2.1.3 Stimulation der Endothelzellen mit inflammatorischen Mediatoren

Nachdem die Endothelzellen innerhalb von fünf bis sieben Tagen zu einem subkonfluenten Zustand herangewachsen sind, erfolgt die Zugabe von rekombinantem $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$, $\text{INF}\chi$ und von LPS, entweder allein oder in Kombination mit einer modulierenden Substanz. Der Einsatz von $\text{TNF}\alpha$ erfolgt in den Konzentrationen von 10 U/ml und 100 U/ml, der von $\text{IL-1}\beta$ in den Konzentrationen von 1 und 10 U/ml. $\text{INF}\chi$ wurde in den Konzentrationen von 100 U/ml und 500 U/ml und LPS in der Konzentration von $1\mu\text{g/ml}$ als proinflammatorischer Stimulus verwendet. Nach Inkubationszeiten von 4, 12, und 24 Stunden werden die Überstände aus den Zellkulturplatten entnommen und bei -70°C gelagert. Nach Entnahme des Überstandes erfolgt die Zugabe eines Lysepuffers und die freigesetzte RNA wird mittels eines RNA-Extraktionssystem (Qiagen, Hilden) isoliert. Unter diesen Inkubationsbedingungen erfolgten zwei getrennte Versuche mit Endothelzellkulturen, die aus einer Endothelzellseparation stammten.

Bei den Experimenten mit den immunmodulierenden Substanzen erfolgte vor Hinzugabe der proinflammatorischen Stimuli eine Vorinkubation mit der entsprechenden Substanz über eine Stunde. Es wurden für Pentoxifyllin und die weiblichen Steroidhormone insgesamt zwei Versuche und für die neurotrophen Faktoren drei Versuche aus zwei verschiedenen Endothelzellisolierungen vorgenommen.

2.2.2. ELISA

Mittels dieser Methode erfolgt die Bestimmung der Chemokinexpression im Überstand der Zellkultur. Dabei erfolgt der Nachweis des Chemokins immunologisch und photometrisch. Es befinden sich an dem Boden einer Mikrotiterplatte Antikörper mit der Spezifität für das entsprechende Chemokin. Nach Auftragen des Zellkulturüberstandes und einer Inkubation für zwei Stunden erfolgt ein mehrmaliges Waschen der Mikrotiterplatten und die Hinzugabe eines biotinylierten Antikörpers mit einer gegen ein weiteres Epitop des Chemokins gerichteten Spezifität. Nun folgt eine zweistündige Inkubation mit diesem zweiten Antikörper. Nach erneutem mehrmaligem Waschen wird

Streptavidin-Peroxidase hinzugegeben, die an die biotinylierten Antikörper bindet. Nach wiederholtem Waschen zur Entfernung von überschüssigem Enzym, erfolgt das Auftragen des Substrates Tetramethylbenzidins, das von der Peroxidase umgesetzt wird. Es kommt zu einem der Chemokinkonzentration entsprechenden Farbumschlag. Die Absorption wird mittels einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen. Die Menge an Chemokin im Überstand kann über Standardkurven von entsprechend vorliegender Standardlösungen bekannter Konzentration bestimmt werden. Die Durchführung der Versuche erfolgte gemäß den Instruktionen des Herstellers der ELISA-Kits. Das untere Detektionslimit war für RANTES < 8 pg/ml, für MIP-1 α < 4 pg/ml, für IL-8 und MCP-1 < 5 pg/ml.

2.2.3. Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1. RNA-Isolierung

Zur Bestimmung der mRNA-Expression von Chemokinen unter den oben genannten Stimulationsbedingungen erfolgt der Nachweis über RT-PCR. Die Extraktion der RNA aus den entsprechend der jeweiligen Versuchsansätzen vorbehandelten Endothelzellen wird mit dem RNeasy Mini Kit (Quiagen) durchgeführt. Unmittelbar nach Abnehmen des Zellkulturüberstandes wird der RLT Lysispuffer aufgetragen und diese Lösung bei -70° C eingefroren. Nach dem Auftauen werden die lysierten Zellbestandteile mit einer 20G-Kanüle geschert und drei Minuten bei 15 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird dann in ein neues Gefäß überführt und mit dem gleichen Volumen an 70% EtOH vermengt. Diese Lösung wird auf eine Durchlaufsäule aufgetragen und für 30 Sekunden bei 10 000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wird verworfen und die Säule ein zweites Mal mit der Ausgangslösung beschichtet. Im nächsten Schritt wird der Waschpuffer RW1 auf die Säule aufgetragen und es erfolgt eine Zentrifugation wie in den vorangegangenen Schritten. Daraufhin wird der RPE Waschpuffer auf die Säule gegeben und wie oben zentrifugiert. Bei beiden Zentrifugationsschritten wird das Eluat verworfen. Es folgt ein zweiter Waschschritt mit dem RPE Waschpuffer und eine Zentrifugation der Säule bei 10 000 rpm über zwei Minuten. Die Extraktionssäulen werden dann in ein neues Gefäß überführt und RNase freies Wasser auf die Säule aufgetragen,, die Säulen werden fünf Minuten stehen gelassen und dann für eine Minute bei

10 000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wird in der Folge ein weiteres Mal wiederholt. Im Eluat befindet sich dann die zu isolierende mRNA.

2.2.3.2. Reverse Transkription

Es erfolgt daraufhin die reverse Transkription der extrahierten RNA in cDNA, es entsteht somit eine cDNA-Bibliothek der lysierten Endothelzellen. Ausgeführt wird diese Reaktion von einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, einer sogenannten reversen Transkriptase, wobei die RNA -Moleküle dem Enzym als Vorlage der DNA-Synthese dienen.

Zuerst wird die in 30µl DEPC gelöste RNA mit 20µl oligo-(dT) Primern (0,1µg/µl) vermischt und für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Nachdem die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt ist, werden 15µl 5x Reverse Transkriptase Puffers, 7,5µl dNTP (10mM), 1,5µl rekombinater RNase-Inhibitor sowie 2µl M-MLV Reverse Transkriptase (200U/µl) hinzugegeben. Die enzymatische Reaktion wird für 60 Minuten bei 37°C durchgeführt und gestoppt durch eine Erhitzung der Lösung auf 95°C für 10 Minuten zur Denaturierung der Enzyme.

2.2.3.3. Klonierung von cDNA

Zur Klonierung von cDNA-Molekülen, die für GAPDH, MCP-1 und IL-8 kodieren, wird die RNA von peripheren mononukleären Blutzellen, die für 24 Stunden mit dem Mitogen PHA stimuliert werden, isoliert und wie oben beschrieben revers transkribiert. Es erfolgt dann eine Amplifizierung der entsprechenden cDNA mittels PCR und die PCR-Produkte werden zur weiteren Klonierung in den Vektor pCR-Script Amp SK eingebaut. Bei diesem Vektor handelt es sich um den Abkömmling eines bakteriellen Plasmids, das mit zusätzlichen Restriktionsenzymstellen sowie Antibiotikaresistenzgenen ausgestattet ist, so dass fremde DNA-Moleküle mit kompatiblen Restriktionsschnittstellen in das Plasmid eingebaut und vermehrt werden können. Wird das Plasmid mit dem Restriktionsenzym inkubiert, dessen Schnittstelle es enthält, entstehen zwei freie Plasmidenden, die mit dem zu klonierenden DNA-Molekül ligiert werden können. Es erfolgt daraufhin das

Einbringen der Vektoren durch eine sogenannte Transformation in kompetente Bakterienzellen.

40 µl kompetente Zellen werden vorsichtig auf Eis aufgetaut und mit 0,7 µl 2-Mercaptoethanol für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl Plasmidvektor erfolgt eine weitere Inkubation für 30 Minuten auf Eis. Zum Einbringen des Plasmids erfolgt dann ein Erhitzen auf 42° C für 45 Sekunden und anschließend eine Inkubation für zwei Minuten auf Eis. Die transformierten Bakterien werden mit 450 µl SOC-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37°C und bei 225 rpm geschüttelt.

Sie werden dann auf ein Nährmedium ausgestrichen, das ein Antibiotikum enthält, so dass nur die Zellen, die das Plasmid mit dem Resistenzgen aufgenommen haben, wachsen können.

Die transformierten Zellen werden in unterschiedlichen Verdünnungen von 1:10 bis 1:100 auf mit Ampicillin versetztem Nähragar ausplattiert. Es erfolgt daraufhin die Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht im Brutschrank.

Durch die Isolierung einzelner Kolonien und deren Expansion in Kulturmedien erfolgt eine Amplifizierung des DNA-Moleküls, die Klonierung. Dazu werden je 10 ml LB-Medium mit einer Kolonie angeimpft, gefolgt von einer Inkubation bei 37°C über Nacht.

Um sicherzustellen, dass die Transformation erfolgreich war, wird in der Folge eine Plasmidpräparation aus den transformierten Zellen durchgeführt. Nach Isolierung der klonierten DNA erfolgte eine Kontrolle des Amplifikates über eine Agarose-Gelelektrophorese, bei der ersichtlich wird, ob das Amplifikat die gewünschte Basenlänge der cDNA besitzt.

Von jedem Kulturansatz werden 875 µl abgetrennt und mit 125 µl 86% Glycerin versetzt und bei - 70°C asserviert, so dass bei erfolgreicher Transformation weitere erfolgreich transformierte Bakterien vorhanden sind. Mit der restlichen Kultur erfolgt eine Plasmidpräparation mittels des MiniPräp Kits (Quiagen). Zuerst werden die Kulturen zehn Minuten bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert und das entstandene Pellet in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Daraufhin folgt die Hinzugabe von 250 µl Puffer P2 und eine fünfminütige Inkubation. Nach Zugabe von 500 µl Puffer N3 erfolgt eine Zentrifugation (10 min, 13 000rpm, 4°C). Die Zentrifugationsüberstände werden auf QIAprep-Säulen aufgetragen und unter Anlegen eines Vakuums werden die Plasmide an die Säulen gebunden. Die Säulen werden je einmal mit PB- und mit PE-Puffer

nachgewaschen und die gebundenen Plasmide mit 100 µl 10 mM TrisHCl(pH 8,5) eluiert.

In einem nächsten Schritt erfolgt die Spaltung der isolierten Plasmide mit einem Restriktionsenzym, EcoRI. Dabei wird der Plasmidlösung das Enzym sowie ein Reaktionspuffer beigesetzt und anschließend bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

Im letzten Schritt erfolgt dann die Auftrennung der Plasmidvektor-DNA in einer Agarose-Gelelektrophorese. An ein Agarosegel wird ein elektrisches Feld angelegt und die Nukleinsäuremoleküle werden bei unterschiedlicher Basenlänge aufgrund der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit aufgetrennt. Je kleiner ein DNA-Molekül desto schneller wandert es im Gel. So kann bei bekannter Basenlänge des DNA-Klons über eine Kontroll-DNA, einen Molekulargewichtsmarker, nachgewiesen werden, ob das zu klonierende DNA-Molekül in den Plasmidvektor ligiert wurde. Zur Herstellung des Gels wird 1 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer gegeben und die Lösung in der Mikrowelle aufgeköcht bis sie klar ist. Man lässt die Lösung abkühlen und versetzt sie mit Ethidiumbromid, das die DNA-Banden später unter dem UV-Licht sichtbar werden lässt (0,5µg/ml Agarose). Die Lösung wird in die Gelkammer gegossen, man lässt sie abkühlen und füllt Laufpuffer (1x TBE-Puffer+0,005% Ethidiumbromid) in die Kammer bis das Gel mit dem Puffer bedeckt ist. Die Plasmidlösung wird mit einem sechsfach konzentrierten DNA-Ladepuffer gemischt und in die Geltaschen gefüllt. Nach Anlegen einer Spannung von 80-100 V erfolgt die Auftrennung. Unter einer UV-Lampe kann dann sichtbar gemacht werden, ob der Klon in dem erwarteten DNA-Längenbereich liegt.

2.2.3.4. Real-Time-RT-Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode, mit der es möglich ist, DNA-Sequenzen mit hoher Spezifität und Sensitivität zu vervielfältigen. Notwendig dazu ist eine spezielle hitzestabile DNA-Polymerase, die Taq-Polymerase, eine DNA-Vorlage, Nukleotide sowie geeignete Reaktionsbedingungen. Der Ablauf einer PCR besteht aus einem Denaturierungsschritt, einem sogenannten "Annealingschritt" und einem Elongationsschritt. Initial werden die beiden Stränge der Ausgangs-DNA bei 94° C getrennt, denaturiert. Anschließend wird die Temperatur auf 55°C gesenkt, so dass es zum Anliegen der im Überschuß vorhandenen Oligonukleotidprimer an die nun einzelsträngige Ausgangs-DNA kommt, dem "Annealing". Im Anschluß wird die Temperatur auf 72° C erhöht, wobei die Primer über die Taq-Polymerase verlängert werden bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die der Ausgangs-DNA gleicht. Nach einem Zyklus erfolgte somit eine Verdoppelung der Ausgangs-DNA, über weitere Zyklen kommt es zu einer weiteren Amplifizierung.

Die cDNA Quantifizierung erfolgt mittels einer Methode, dem TaqMan-Prinzip, das die 5'-Nuklease Aktivität der DNA-Polymerase nutzt. Die erfolgreiche Quantifizierung erfordert die Hybridisierung von drei Oligonukleotiden an die zu amplifizierende DNA. Zwei musterspezifische Primer setzen den Endpunkt der Amplifizierung fest. Um Probleme durch eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, rahmen die Primer mindestens ein Intron der gewünschten Gensequenz ein. Ein drittes Oligonukleotid hybridisiert an die zu amplifizierende Sequenz während der Hybridisierungs/Verlängerungsphase der PCR. Dieses Oligonukleotid enthält einen Fluoreszenzfarbstoff an seinem 5' Ende, dessen Emissionsspektrum von einem zweiten Fluoreszenzfarbstoff am 3' Ende neutralisiert wird. Wenn die Polymerase die Primer extendiert, verdrängt und hydrolisiert sie das markierte Oligonucleotid und der Fluoreszenzfarbstoff am 5'Ende wird freigesetzt. Die gemessene Fluoreszenz ist direkt proportional zur Anzahl der Moleküle am Ende eines Zyklus. Zuerst erfolgt eine Bestimmung der Anzahl des konstitutiv exprimierten Gens GAPDH, um die Proben entsprechend auf gleiche cDNA Konzentration zu verdünnen und dann zu vermessen. Bei dem Ct-Wert handelt es sich um den Amplifikationszyklus, bei dem das Zehnfache der Hintergrundfluoreszenz überschritten wird.

Primersequenzen:

GAPDH: 5'GCAGGGGGGAGCCAAAAGGG3'
5'TGCCAGCCCCAGCGTCAAAG3'

IL-8: 5'CTCTTGGCAGCCTTCCTGATT3'
5'AGACATACTCCAAACCTTTCCACCC3'

MCP-1: 5'GCTCGCTCAGCCAGATGCAAT3'
5'TGGGTTGTGGAGTGAGTGTCC3'

3. Ergebnisse

3.1. Nachweis von inflammatorischen Chemokinen

In dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass humane zerebrale Endothelzellen unter Stimulation mit verschiedenen Substanzen in der Lage sind inflammatorische Chemokine zu produzieren. Die Endothelzellen wurden allein oder unter Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$, $\text{IFN}\gamma$ oder LPS kultiviert. Nach einer Inkubationsdauer von 4, 12 und 24 Stunden erfolgte eine Untersuchung der Chemokinexpression im Zellkulturüberstand. Für alle untersuchten Chemokinen war bekannt, dass sie eine bedeutende Rolle bei einer Reihe von neurologischen Erkrankungen spielen. Durch immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurde die Reinheit der Zellkulturansätze sichergestellt und mit dem Nachweis des für zerebrale Endothelzellen typischen Transportmoleküls für Glukose, Glut1-Transporter, konnte gezeigt werden, dass der zerebrale Endothelzellphänotyp auch während der Phase der Zellkultivierung erhalten blieb. Sowohl die Form des stärksten Stimulus als auch die Kinetik des Anstieges waren für jedes untersuchte Chemokin unterschiedlich und deuten damit auf eine regulierte Expression dieser Substanzen hin. Für die Chemokine MCP-1 und IL8 erfolgte zudem eine Untersuchung der mRNA-Expression mittels RT-PCR, um Unterschiede hinsichtlich der Transkription und Proteinsynthese und eventuell vorhandene regulatorische Mechanismen zu entdecken.

Die daran anschließende Untersuchungen zeigten, dass es sowohl unter Einfluss von weiblichen Steroidhormonen als auch von neurotrophen Faktoren aus der Gruppe der Neutrophine zu keiner Modulation der Chemokinexpression kommt. Ähnliche Beobachtungen konnten für den Phosphodiesterasehemmer Pentoxifyllin gemacht werden.

3.1.1. MCP-1

MCP-1 ist ein Chemokin aus der CC-Subfamilie, das hauptsächlich eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten und T-Lymphozyten ausübt. Im ELISA konnte eine spontane MCP-1 Freisetzung in den Zellkulturüberstand beobachtet werden. Eine Expression dieser Chemokine, die über die spontane

Sekretion hinausging, zeigte sich unter Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$, LPS und $\text{IFN}\gamma$. Für jede dieser proinflammatorischen Substanzen konnte über eine Steigerung der Konzentration auch eine verstärkte Expression von MCP-1 erreicht werden. Der Einsatz von $\text{TNF}\alpha$ erfolgte in den Konzentrationen von 10 bis 100 U/l, von $\text{IL1}\beta$ in 1 und 10 U/ml, für $\text{IFN}\gamma$ in 100 und 500 U/l und für LPS in der Konzentration von 1 mg/ml. Bei der MCP-1-Freisetzung zeigte sich eine zunehmende Synthese nach dem ersten Untersuchungszeitpunkt, vier Stunden nach der initialen Stimulation, dies zeigte sich bei der Stimulation mit sämtlichen proinflammatorischen Stoffen. Der stärkste Induktor der MCP-1 Freisetzung war $\text{IFN}\gamma$.

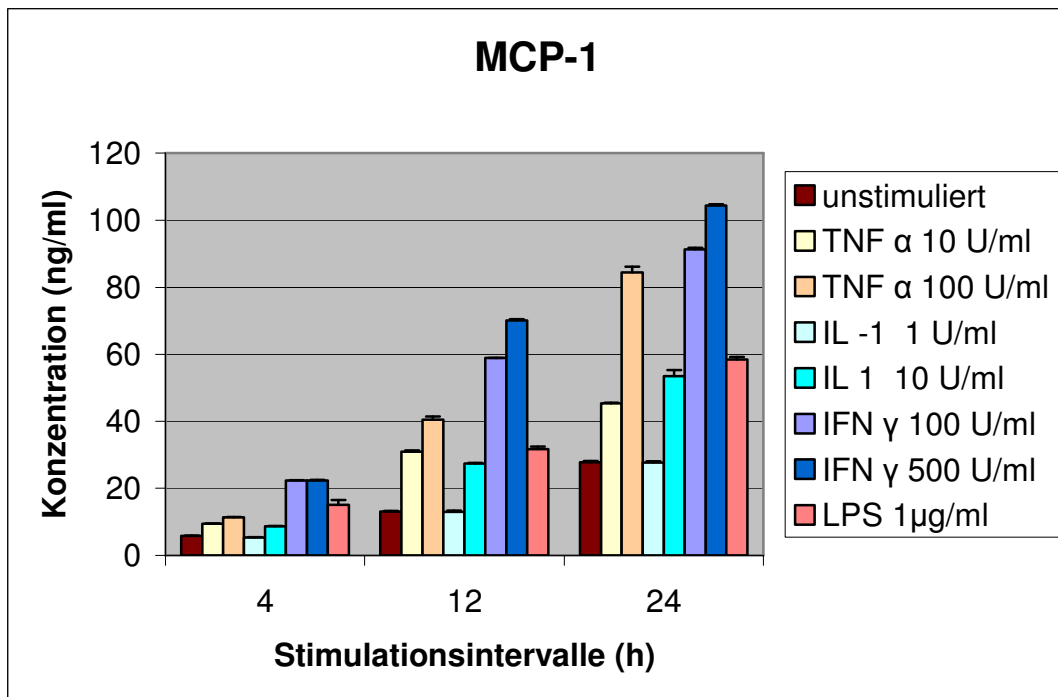


Abb. 6: MCP-1 aus dem Überstand von humanen zerebralen Endothelzellen nach 4,12,24 h Inkubation unter den oben angegebenen Bedingungen; eine Säule stellt exemplarisch den Mittelwert \pm Standardabweichung aus einem Duplikatansatz dar, vergleichbare Resultate zeigten sich in weiteren Experimenten

Des weiteren bestand eine gute Korrelation zwischen der mRNA Expression und der im Zellkulturüberstand gemessenen Proteinkonzentration.

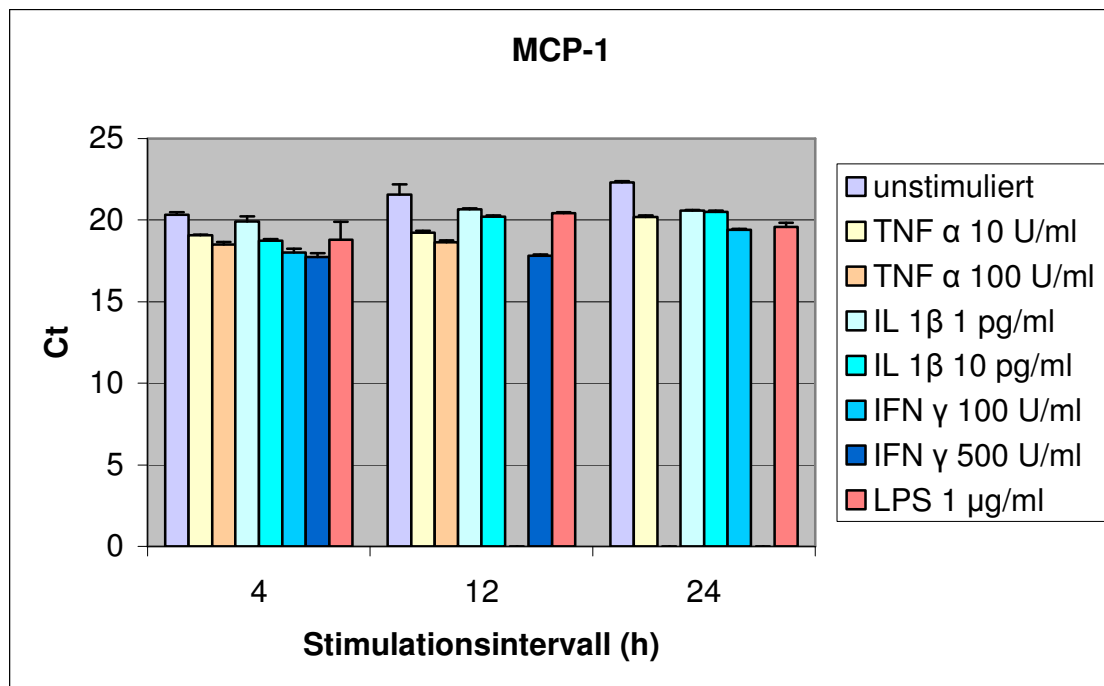


Abb. 7: MCP-1 mRNA aus dem Überstand von humanen zerebralen Endothelzellen, nach Inkubation über 4, 12 und 24 Stunden unter den oben angegebenen Stimulationsbedingungen mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt; Ct-Wert: je niedriger desto höher cDNA-Konzentration der Probe

3.1.2. RANTES

Dieses Chemokin stammt ebenfalls aus der CC-Subfamilie. Eine chemoattraktive Aktivität besteht gegenüber T- Lymphozyten, basophilen und eosinophilen Granulozyten. Im Gegensatz zu MCP-1 wurde RANTES von den zerebralen Endothelzellen nicht spontan produziert. Nach einer Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ oder LPS war RANTES Protein im Kulturüberstand detektierbar. Eine Kultivierung mit $\text{IL}1\beta$ oder $\text{IFN}\gamma$ erbrachte nur einen minimalen Effekt. Die RANTES Expression erfolgte mit Verzögerung und es konnte erstmals 12 Stunden nach Inkubation mit LPS oder $\text{TNF}\alpha$ Protein im Überstand gemessen werden.

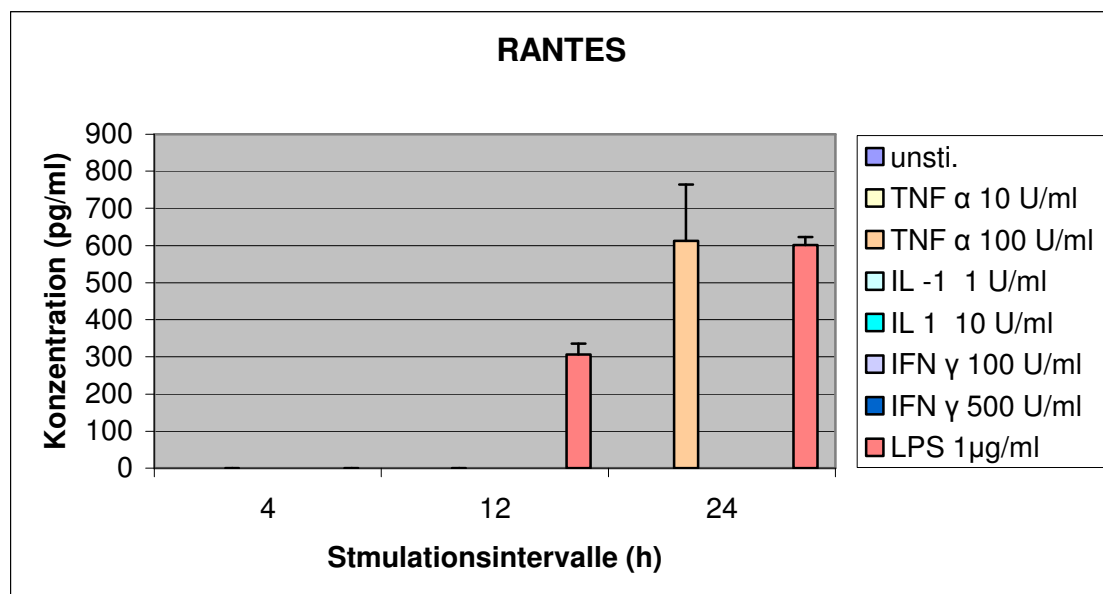


Abb. 8 RANTES aus dem Überstand von humanen zerebralen Endothelzellen, nach Inkubation über 4, 12 und 24 Stunden unter den oben angegebenen Stimulationsbedingungen.

3.1.3. MIP1 α

MIP1 α ist ebenfalls ein Chemokin aus der Gruppe der CC-Chemokine, es übt seine chemoattraktive Wirkung auf mononukleäre Zellen, insbesondere T-Lymphozyten aus.

Weder spontan noch unter den oben genannten Stimulationsbedingungen konnte eine Expression dieses Chemokins in den Zellkulturüberständen gemessen werden.

3.1.4 IL 8

IL8 ist einer der wichtigste Vertreter aus der Gruppe der CXC-Chemokine und ist über die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 chemoattraktiv auf neutrophile Granulozyten.

Unstimulierte humane zerebrale Endothelzellen exprimieren relativ niedrige IL8-Spiegel, es kam jedoch zu einem signifikanten Anstieg der Konzentration im Zellkulturüberstand unter Stimulation mit LPS oder TNF α in der Konzentration von 100U/l. Ein schwächerer Stimulus war IL1 β (10 U/ml). Unter Stimulation mit IFN γ war keine IL8 Expression zu beobachten. Die Geschwindigkeit, mit der es nach der Inkubation der Zellen mit TNF α oder LPS zu einem Anstieg der IL8 Produktion kam, war ähnlich: die Konzentrationen stiegen stetig an und erreichten ihren Höhepunkt nach 24 Stunden nach Inkubation.

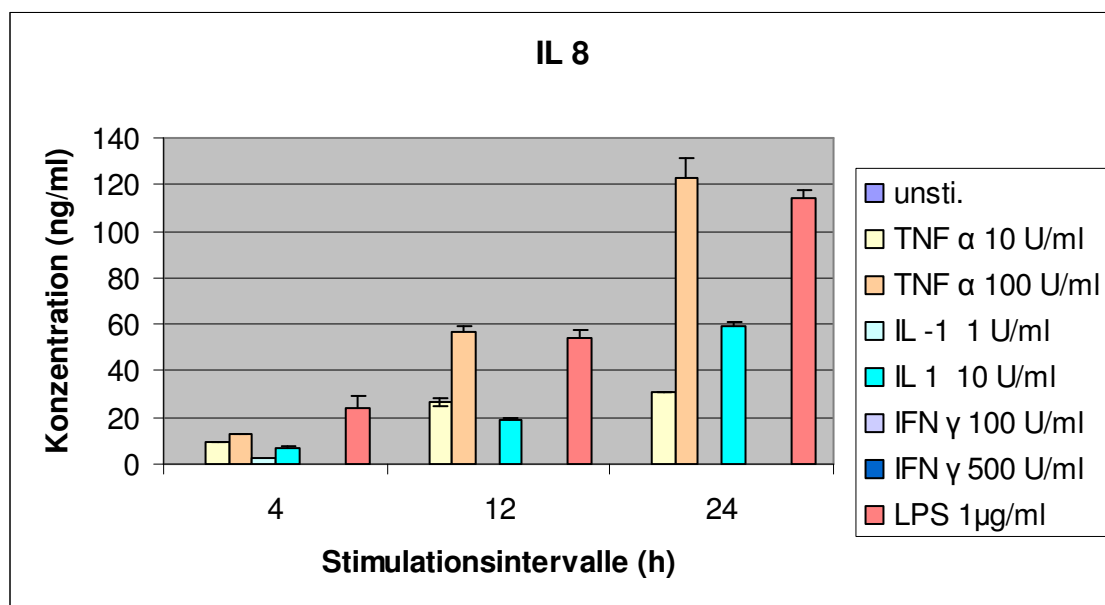


Abb. 9 IL 8 aus dem Überstand von humanen zerebralen Endothelzellen, nach Inkubation über 4, 12 und 24 Stunden unter den oben angegebenen Stimulationsbedingungen.

Die in einer semiquantitativen PCR gemessene Menge an IL8-Transkripten korrelierte gut mit den im ELISA gemessenen Werten.

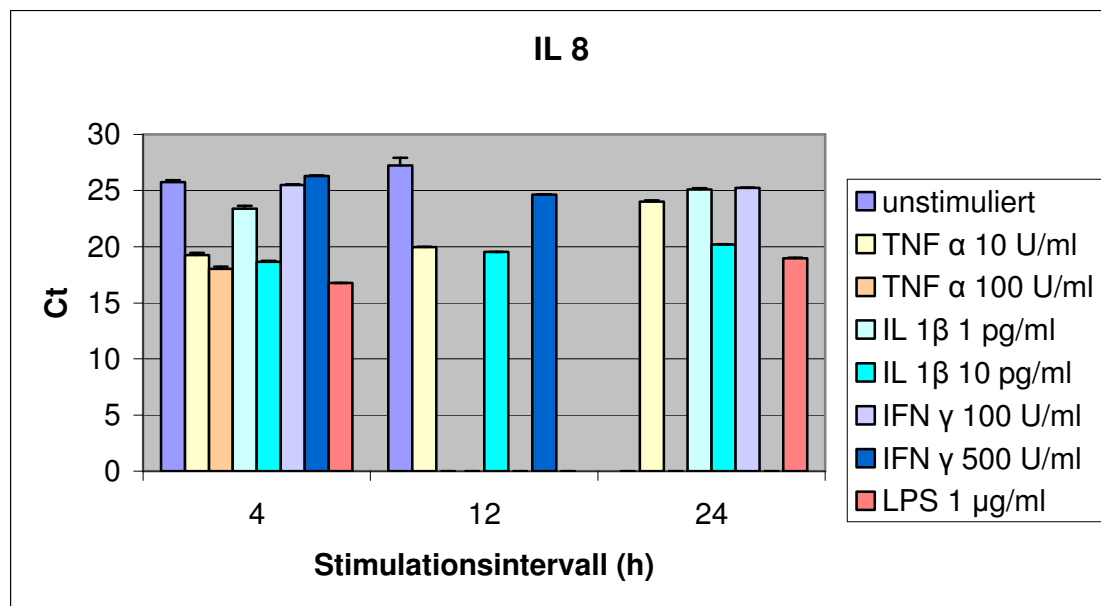


Abb. 10 IL 8 mRNA aus dem Überstand von humanen zerebralen Endothelzellen, nach Inkubation über 4, 12 und 24 Stunden unter den oben angegebenen Stimulationsbedingungen; mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt Ct-Wert: je niedriger desto höher cDNA Konzentration der Probe

3.1.5. IP-10

IP-10 ist ein weiterer Vertreter aus der Gruppe der CXC-Chemokine, seine Hauptwirkung ist auf aktivierte T-Lymphozyten gerichtet. Zudem ist es chemoattraktiv für NK-Zellen und Monozyten.

IP 10 konnte erstmals im Zellkulturüberstand 12 Stunden nach Stimulationsbeginn gemessen werden und stieg in der Folge weiter an. IFN γ war der stärkste Induktor dieses Chemokins; die Stimulation mit TNF α erbrachte nur einen geringen Effekt. Unter Inkubation mit IL 1 β oder LPS konnte kein IP-10 im Überstand nachgewiesen werden.

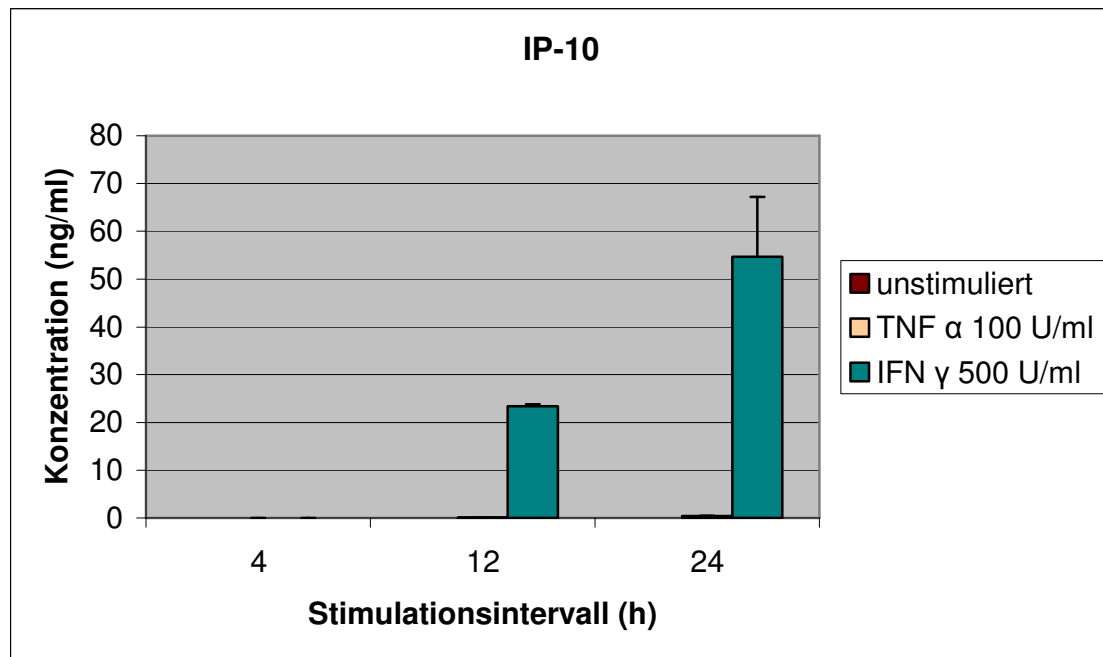


Abb. 11 IP-10 aus dem Überstand von humanen zerebralen Endothelzellen, nach Inkubation über 4, 12 und 24 Stunden unter den oben angegebenen Stimulationsbedingungen.

3.2. Modulation der Chemokinexpression

In einem zweiten Schritt wurde untersucht, ob unter der Einwirkung von weiblichen Geschlechtshormonen, dem Phosphodiesterasehemmer Pentoxyphillin oder Wachstumsfaktoren aus der Gruppe der Neutrophine eine Veränderung des beobachteten Chemokinexpressionsmusters festzustellen ist. Für alle drei Substanzgruppen ist entweder aus epidemiologischen Untersuchungen bekannt oder konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass sie immunmodulierende Eigenschaften besitzen und darüber entzündliche ZNS-Erkrankungen, in Ihrer Krankheitsaktivität beeinflussen könnten.

3.2.1. Estradiol und Progesteron

Es erfolgte eine Inkubation der Zellen mit Estradiol in den Konzentrationen von 0,2, 1 und 10 ng/ml und mit Progesteron in Konzentrationen von 0,2, 2 und 20 ng/ml, als inflammatorischer Stimulus diente $TNF\alpha$. Die hier verwendeten Steroidhormonkonzentrationen liegen im Rahmen der im Menschen physiologischer Weise vorkommenden Spiegel (Mendelsohn et al., 1999).

Für MCP-1 zeigte sich die schon beobachtete Spontansekretion und eine weitere deutliche Steigerung der Expression unter $TNF\alpha$. Die Vorinkubation der Zellen mit Progesteron oder Estradiol in den beschriebenen Konzentrationen erbrachte keine Veränderung der MCP-1 Expression. Die Spontansekretion blieb unverändert und der induktive Effekt von $TNF\alpha$ blieb konstant.

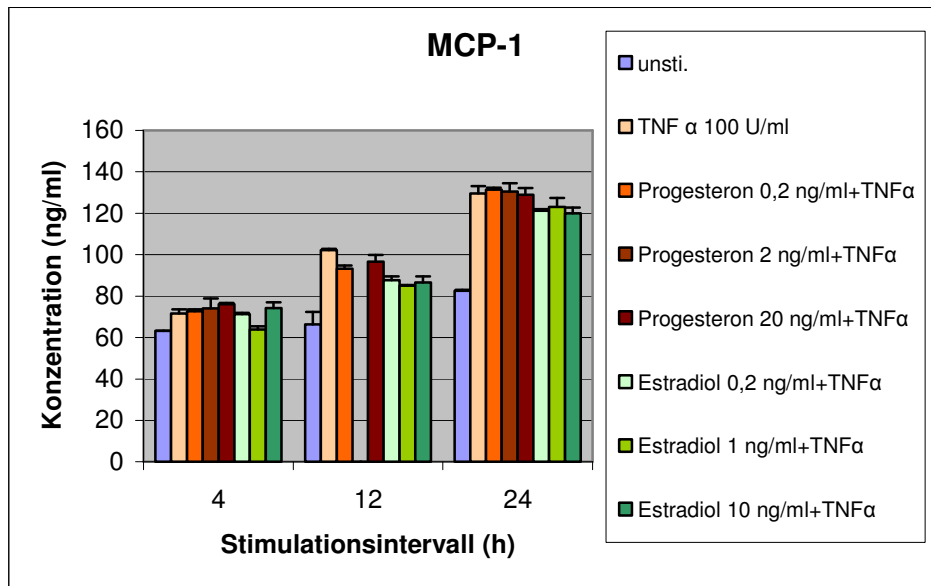


Abb. 12: MCP-1 aus dem Überstand humaner zerebraler Endothelzellen unter Inkubation mit Progesteron/Estradiol; eine Säule stellt exemplarisch den Mittelwert+/-Standardabweichung aus einem Duplikatansatz dar, weitere Experimente zeigten vergleichbare Resultate

Für die IL8 Expression zeigte sich wiederum der deutliche stimulatorische Effekt durch $\text{TNF}\alpha$, durch die Vorbehandlung der Endothelzellen mit den weiblichen Steroidhormonen kam es nur zu einer geringen Veränderung des Expressionsmusters.

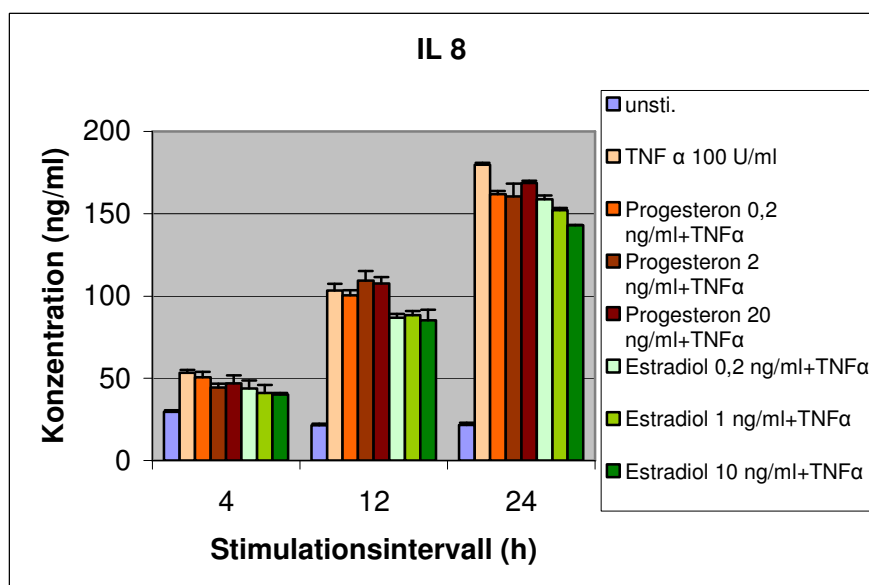


Abb. 13: IL 8 aus dem Überstand humaner zerebraler Endothelzellen unter Inkubation mit Progesteron/Estradiol

Auch für das CC-Chemokin RANTES zeigte sich das vorher beschriebene Expressionverhalten mit einem späten Anstieg der Chemokinexpression im Überstand nach Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ und unveränderter Sekretion unter Einwirkung von Progesteron oder Estradiol.

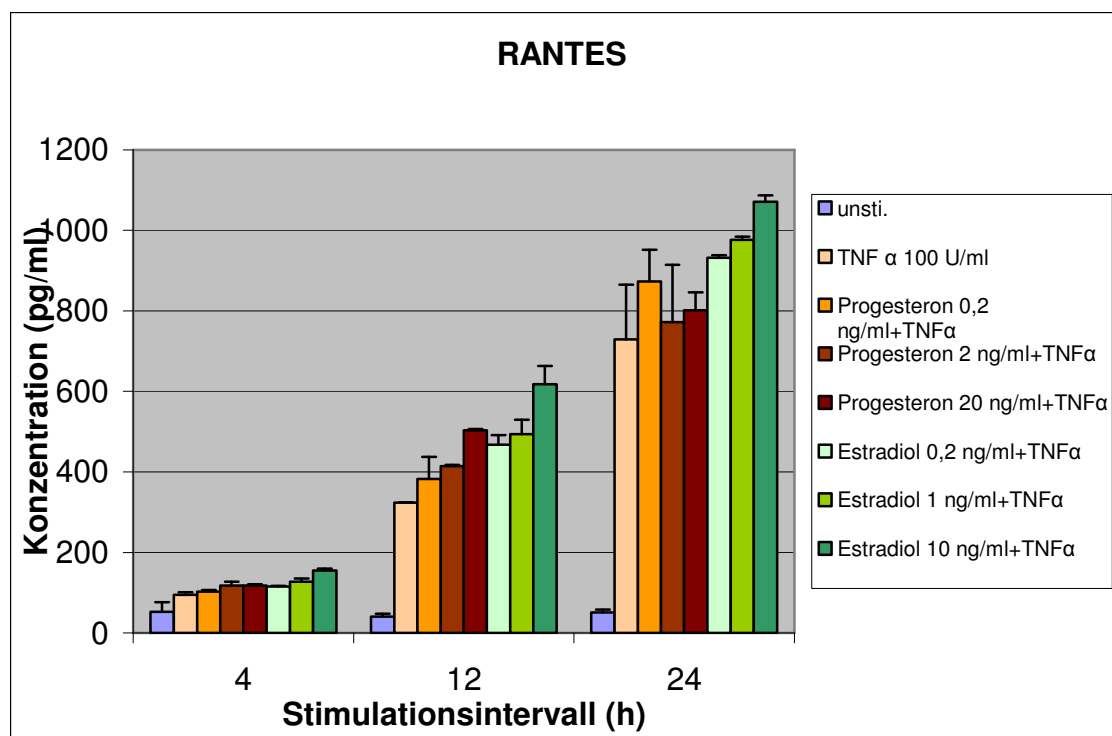


Abb. 14 RANTES aus dem Überstand humaner zerebraler Endothelzellen unter Inkubation mit Progesteron/Estradiol

3.2.2. Pentoxifyllin

Auch durch die Zugabe des Phosphodiesterasehemmers Pentoxifyllin konnte keine Modulation der Chemokinexpression erreicht werden. Pentoxifyllin ist ein nicht-selektiver Phosphodiesterasehemmer, der immunregulatorische und antiinflammatorische Eigenschaften besitzt. Pentoxifyllin wurde in den Konzentrationen von 1, 10 und 100 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Weder für die RANTES noch für MCP-1 oder IL8 zeigte sich ein Unterschied in der Expression im Vergleich zu einer isolierten Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ ohne Vorinkubation mit Pentoxifyllin.

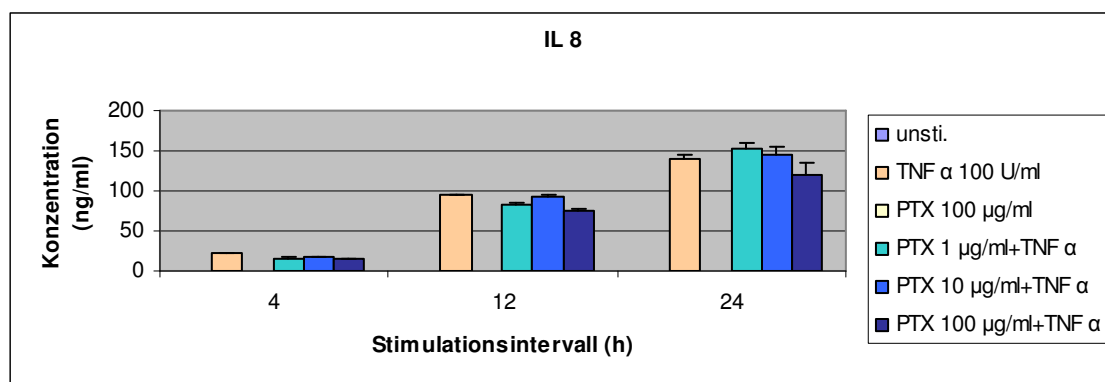


Abb. 15: IL 8 aus dem Überstand humaner zerebraler Endothelzellen unter Inkubation mit Pentoxifyllin

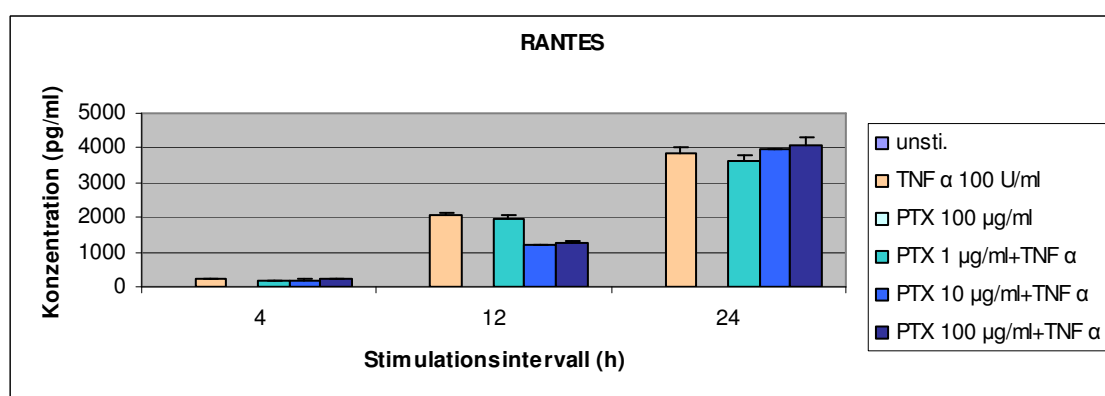


Abb. 16: RANTES aus dem Überstand humaner zerebraler Endothelzellen unter Inkubation mit Pentoxifyllin

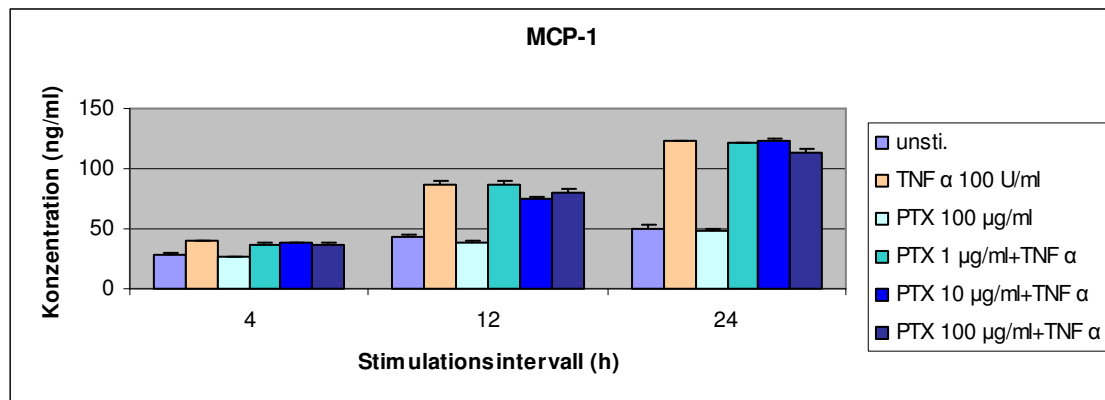


Abb. 17: MCP-1 aus dem Überstand humaner zerebraler Endothelzellen unter Inkubation mit Pentoxifyllin

3.3.3. Neutrophine

Eine weitere Substanzgruppe, die hinsichtlich einer Modulation der Chemokinexpression der zerebralen Endothelzellen untersucht wurde, waren die Neutrophine NGF und BDNF. Eine Gruppe von Wachstumsfaktoren, deren bekanntester Effekt, die Förderung des Wachstums und des Überlebens von Neuronen ist. Es erfolgte der Einsatz von NGF und BDNF in den Konzentrationen von 0,1, 1, 10 und 100 ng/ml.

Unter Vorinkubation mit NGF oder BDNF in den angegebenen Konzentrationen konnte keine Veränderung in der Chemokinexpression beobachtet werden.

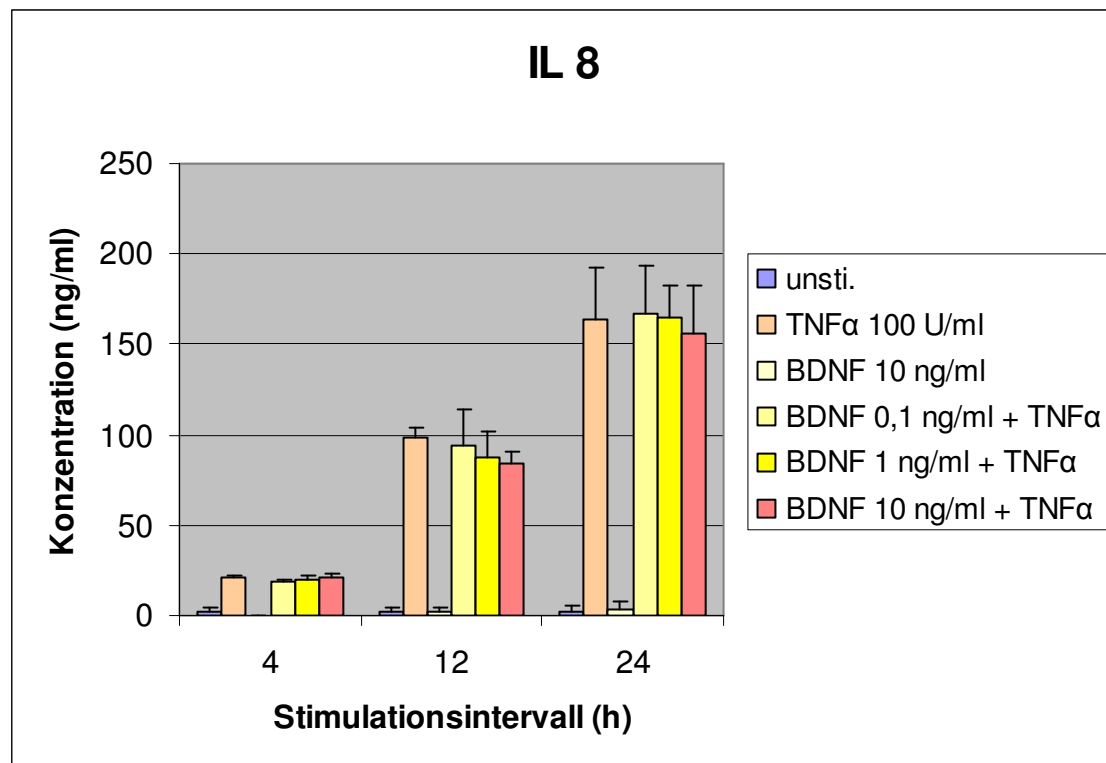


Abb. 18: IL8 aus dem Überstand humaner zerebraler Endothelzellen unter Inkubation mit BDNF; eine Säule stellt exemplarisch den Mittelwert \pm Standardabweichung aus einem Duplikatansatz dar, weitere Experimente erbrachten vergleichbare Resultate

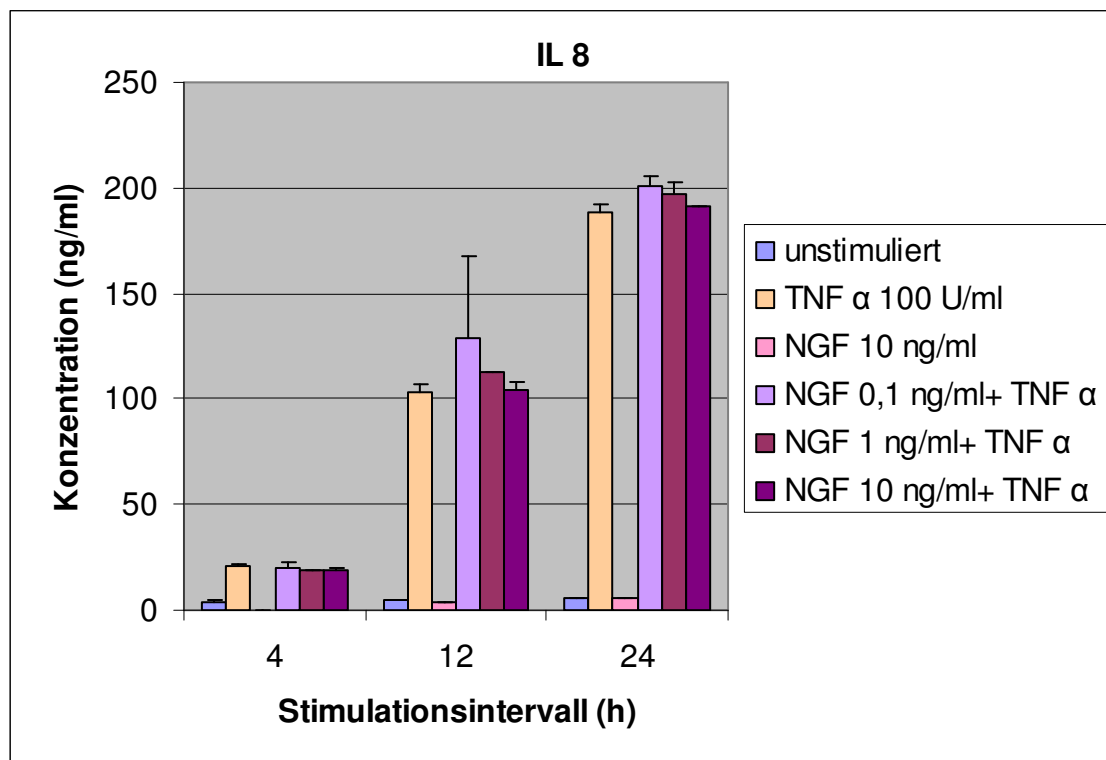


Abb. 19: IL8 aus dem Überstand humaner zerebraler Endothelzellen unter Inkubation mit NGF

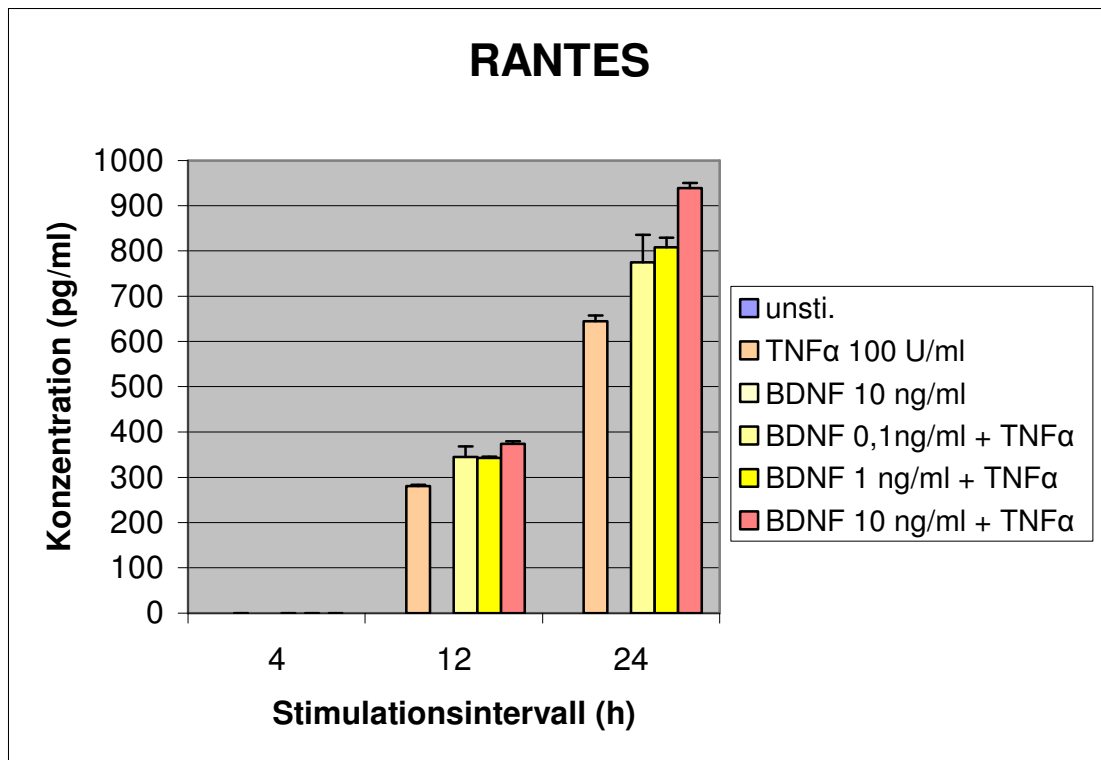


Abb. 20 RANTES aus dem Überstand humaner zerebraler Endothelzellen unter Inkubation mit BDNF

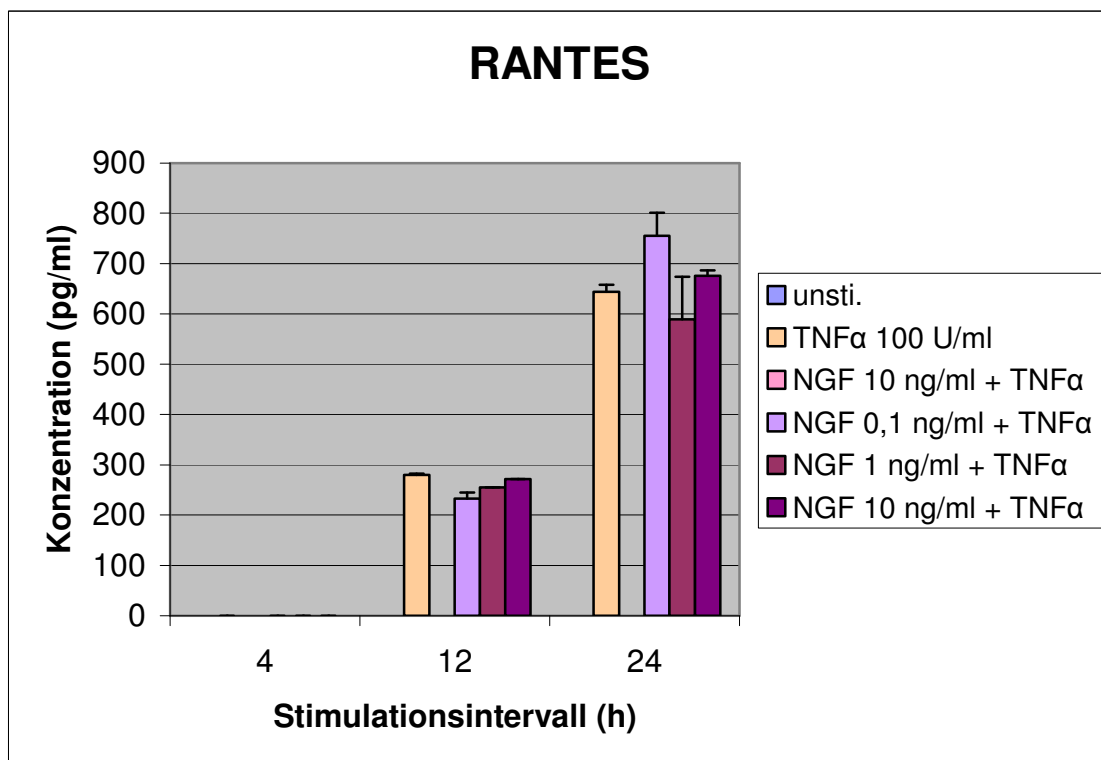


Abb. 21: RANTES aus dem Überstand humaner zerebraler Endothelzellen unter Inkubation mit NGF

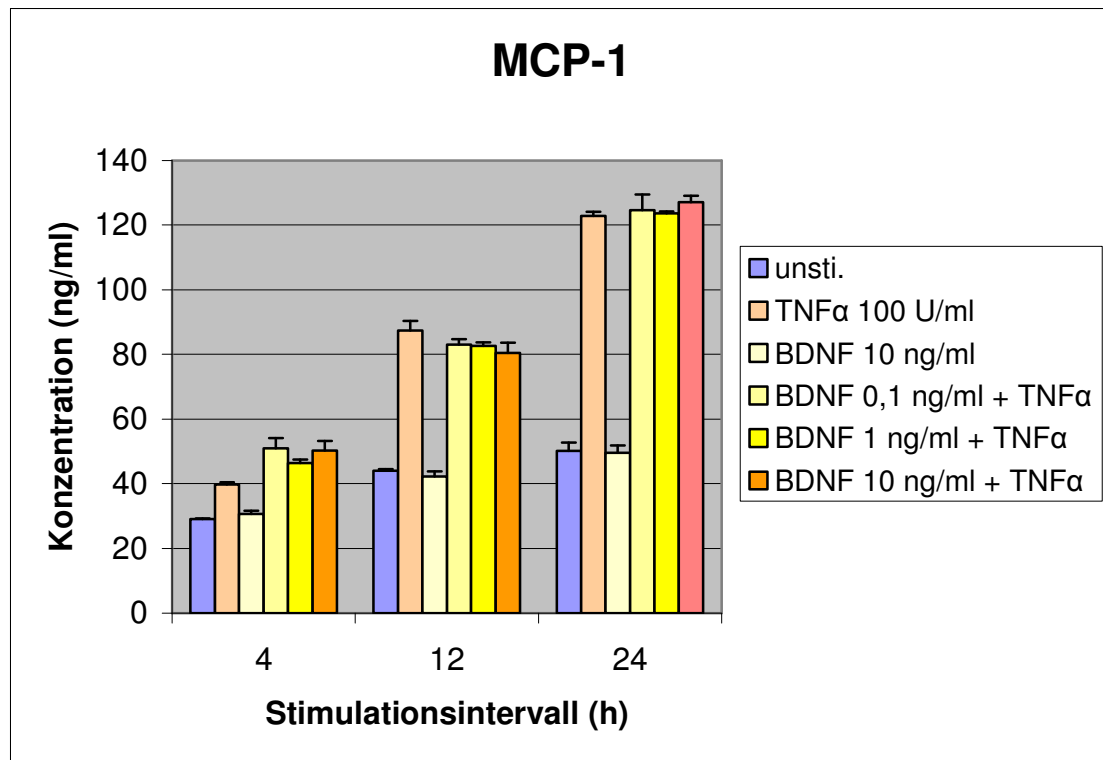


Abb. 22: MCP-1 aus dem Überstand humaner zerebraler Endothelzellen unter Inkubation mit BDNF

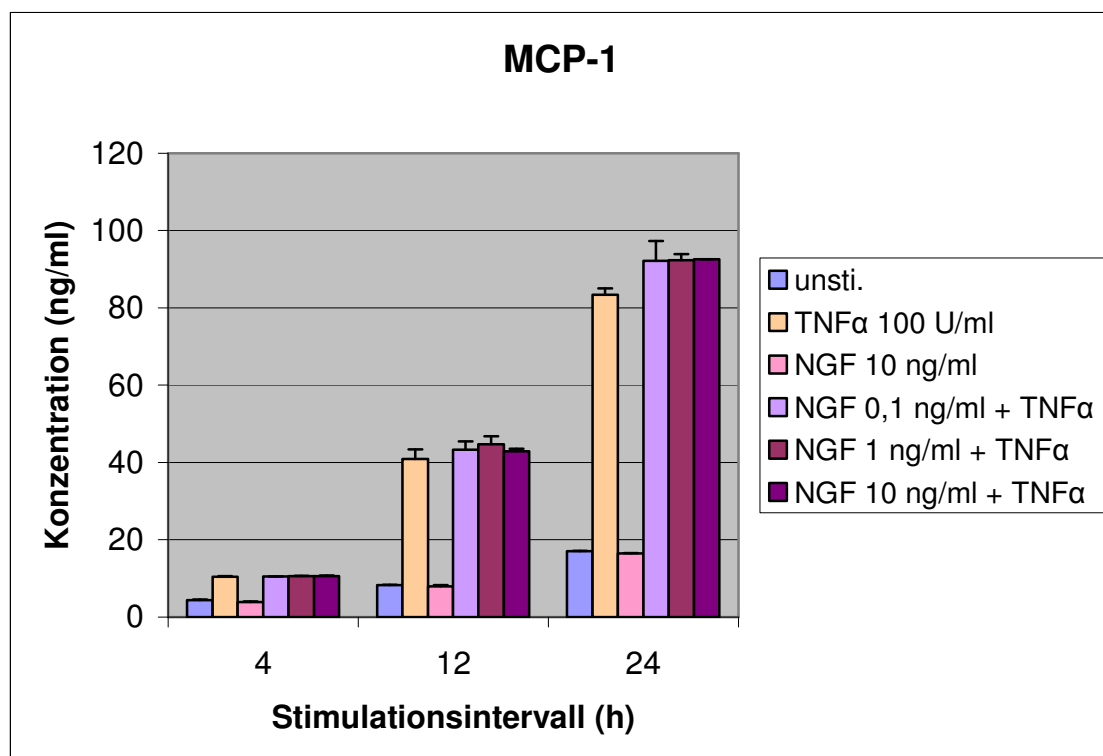


Abb. 23: MCP-1 aus dem Überstand humaner zerebraler Endothelzellen unter Inkubation mit NGF

4. Diskussion

In den oben beschriebenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass humane zerebrale Endothelzellen eine Reihe von Chemokinen synthetisieren können, deren Auftreten in verschiedenen neurologischen Erkrankungen beschrieben wurde. All diesen Erkrankungen oder entsprechenden Tiermodellen ist gemein, dass die Inflammation einen zentralen Bestandteil in den pathologischen Veränderungen darstellt. Dies betrifft die immunologisch bedingten autoaggressiven Erkrankungen wie die Multiple Sklerose und deren Tiermodell, die experimentell allergische Enzephalomyelitis, ebenso wie die zerebrale Ischämie, das Hirntrauma oder infektiöse ZNS-Erkrankungen wie die Virusenzephalitis oder die bakterielle Meningitis (Hesselgesser et al, 1999; Huang et al, 2000).

Wie in den im Rahmen dieser in vitro durchgeführten Experimenten gezeigt werden konnte, können zerebrale Endothelzellen ein bestimmtes Muster von Chemokinen unter inflammatorischen Bedingungen produzieren, wobei die inflammatorischen Regulatormoleküle $TNF\alpha$, $IL\ 1\beta$ und $IFN\ \gamma$ sowie weitere proinflammatorische Substanzen, wie der Bakterienbestandteil LPS, als Stimulus dienten. Der spezielle Phänotyp der zerebralen Endothelzelle, der zu einer funktionsfähigen Blut-Hirn-Schranke beiträgt, scheint in diesem Versuch trotz der in vitro Bedingungen unverändert geblieben zu sein. So konnte die Expression eines für zerebrale Endothelzellen charakteristischen Transportproteins, des Glukosetransporters GLUT-1, weiterhin mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden.

Es fand sich eine starke Expression von IP-10 mit einer bevorzugten Induktion durch $IFN\gamma$, so dass Endothelzellen, stimuliert durch proinflammatorische Zytokine als weiterer Produzent von IP-10 neben reaktiven Astrozyten fungieren könnten. IP-10 wurde auch bei tierexperimentellen Versuchen der Hirnischämieforschung und infektiöser ZNS Erkrankungen nachgewiesen, dort wird im eine Rolle bei der Entwicklung der entzündlichen Infiltrate zugeschrieben (Wang X et al, 1998; Liu et al, 2001).

Ein weiteres Chemokin, das von den zerebralen Endothelzellen produziert wurde, war MCP-1, dessen Auftreten in verschiedenen entzündlichen ZNS-Erkrankungen schon beschrieben wurde. So scheint seine Expression in posttraumatischem Nervengewebe zum Einwandern von Entzündungszellen in das traumatisierte Gewebe zu führen und für die darauf folgende Sekundärschädigung mitverantwortlich zu sein (Glabinski et al, 1996b). Eine Erhöhung der MCP-1 Spiegel im Liquor ließ sich auch bei Patienten mit infektiösen Meningitiden nachweisen und es ließ sich eine Korrelation mit der Anzahl der eingewanderten mononukleären Zellen herstellen (Sprenger et al, 1996). MCP-1 ist zudem bedeutsam für das Einwandern von Makrophagen in das ZNS bei der experimentell-autoimmunen Enzephalomyelitis. Diese nehmen dann Effektorfunktionen im entzündlichen Infiltrat wahr, die schließlich zum Auftreten von Krankheitssymptomen führen. Interessanterweise scheinen die autoaggressiven T-Lymphozyten nicht selbst MCP-1 zu produzieren, sondern dies über die Ausschüttung von inflammatorischen Mediatoren wie TNF α und IFN γ in anderen Zelltypen zu induzieren (Huang et al, 2001; Kawakami et al., 2004), so dass als Produzenten dieses Schlüsselchemokins nach den hier vorliegenden Ergebnissen auch zerebrale Endothelzellen in Betracht kommen.

MCP-1 wurde mit der Polarisierung der Immunantwort in eine sogenannte Th2 Antwort in Verbindung gebracht (Gu et al, 2000). Zerebrale Endothelzellen produzieren in vitro ohne inflammatorischen Stimulus spontan MCP-1, so dass dies einer Th1 mediierten Entzündungsreaktion entgegen wirken und damit eine immunregulatorische Rolle spielen könnte. Die Basalsekretion könnte zudem für das Einwandern von Leukozyten ohne Vorliegen von pathologischen Veränderungen bei der Immunüberwachung des ZNS von Bedeutung sein.

RANTES ist ein weiteres CC-Chemokin, das in zerebralen Endothelzellen unter Einwirkung von TNF α und LPS exprimiert wird. Nachgewiesen wurde seine Synthese im Rahmen von autoimmunologischen Erkrankungen schon in perivaskulären Lymphozyten (Hvas et al, 1997). Eine Expression dieses Chemokins liegt auch in infektiösen ZNS-Erkrankungen wie der HIV-Enzephalopathie oder in tierexperimentellen Enzephalitis-Modellen vor (Sasseville et al, 1996; Asensio et al, 1999), so dass auch in diesen pathologischen Zuständen vorstellbar ist, dass zerebrale Endothelzellen neben anderen Zelltypen als Produzenten von RANTES auftreten könnten.

Ein Zeichen dafür, dass die Chemokinexpression in zerebralen Endothelzellen einer Regulation unterliegt und nicht unspezifisch erfolgt, ist die fehlende Expression des CC-Chemokins MIP-1 α , dessen Bedeutung für die Entwicklung der EAE nachgewiesen werden konnte (Karpus et al, 1995).

Im Gegensatz zu MIP-1 α war jedoch eine starke Expression von IL-8, einem der wichtigsten chemoattraktiven Stoffe für neutrophile Granulozyten nachweisbar. Der stärkste Stimulus war LPS, ein bakterieller Zellwandbestandteil. Passend dazu finden sich im Liquor von an bakterieller Meningitis erkrankter Patienten hohe IL-8- Spiegel (Spanaus et al, 1997).

In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass zerebrale Endothelzellen, trotz des besonderen Phänotyps als Teil der Blut-Hirn-Schranke, in der Lage sind, eine Reihe von proinflammatorischen Chemokinen zu produzieren. Die Produktion der verschiedenen Chemokine unterliegt einer Regulation, da sie mit einer unterschiedlichen Kinetik und unter Einwirkung eines vergleichbarem Stimulus in unterschiedlicher Stärke erfolgt. Bei der Untersuchung der mRNA Expression der analysierten Chemokine zeigten sich keine Unterschiede zu den Ergebnissen im ELISA. Eine posttranskriptionelle Regulation scheint damit in vitro bei den untersuchten Chemokinen unter diesen Bedingungen nicht vorzuliegen.

Bestätigt werden die hier erhobenen Ergebnisse durch eine Reihe in letzter Zeit entstandener Untersuchungen (Zhang et al, 1999; Shukaliak et al, 2000; Prat et al, 2002).

Die umfassendsten Untersuchungen zu den in dieser Arbeit analysierten Chemokinen liegen bisher für das Tiermodell der Autoimmunerkrankung Multiple Sklerose, die experimentell autoimmune Enzephalomyelitis, vor (Zhang et al, 2000). So konnte in frühen Untersuchungen im EAE-Modell durch immunhistochemische Untersuchungen eine MCP-1 und IP 10 Produktion im entzündeten Nervengewebe der erkrankten Tiere nachgewiesen werden. Als Produzenten dieser Chemokine fungierten reaktive Astrozyten (Ransohoff et al, 1993). Nachfolgende Untersuchungen konnten zu den oben genannten Chemokinen die Synthese von MIP1 α und RANTES während der Erkrankungsphase nachweisen (Glabinski et al, 1997). In funktionellen Studien

mit blockierenden Antikörpern oder Knockout-Tieren für die entsprechenden Chemokine oder Ihre jeweiligen Rezeptoren konnte die Relevanz der Expression bestimmter Chemokine für die Krankheitsentstehung bestätigt werden (Karpus et al, 1995; Fife et al, 2000). In Analogie zu den tierexperimentellen Ergebnissen konnte in daran anschließenden Studien an Biopsiematerial von an Multiple Sklerose erkrankten Patienten die Synthese von RANTES, MCP-1 und IP-10 gezeigt werden (Hvas et al 1997, Van der Voorn et al, 1999; Simpson et al, 2000b)., Zudem exprimieren die in das ZNS eingewanderten Leukozyten bevorzugt die entsprechenden Chemokinrezeptoren CCR-1, CCR-5 und CXCR3 (Simpson J et al, 2000a). Entsprechende Ergebnisse zeigten sich in Liquoruntersuchungen mit einer Erhöhung der Chemokine IP-10 und RANTES (Soerensen TL et al, 1999; Franciotta et al, 2001). Als Produzenten der Chemokine wurden in diesen Studien vor allem in das ZNS eingewanderte Lymphozyten und reaktive Astrozyten beschrieben. In wenigen Studien konnten Chemokine jedoch auch in Endothelzellen immunhistochemisch lokalisiert werden. (McManus et al., 1998; Simpson et al., 1998).

In der Folge wurde in dieser Arbeit untersucht, ob es unter Einwirkung verschiedener Substanzgruppen, für die immunmodulierende Eigenschaften beschrieben sind, zu einer veränderten Expression der oben beschriebenen Chemokine kommt.

Neutrophine sind eine Gruppe von Polypeptiden, die eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung von Neuronen spielen (Lewin et al, 1996). Vor kurzem wurde zudem beschrieben, dass sie einen immunmodulierenden Effekt besitzen. So konnte für den bekanntesten Vertreter, NGF, gezeigt werden, dass er die Induzierbarkeit von MHC II- Molekülen auf der Mikroglia supprimiert (Neumann et al, 1998). Weitere Studien zeigten einen antiinflammatorischen Effekt in verschiedenen Tiermodellen der EAE. Wobei in einer Untersuchung durch eine intrazerebrale NGF-Applikation ein verändertes, verstärkt antiinflammatorisches, Zytokinmuster, in einer zweiten Studie eine verminderte Makrophagenmigration in das zentrale Nervensystem für die antiinflammatorische Wirkung verantwortlich gemacht werden konnte (Villoslada et al, 2000; Flügel et al, 2001).

BDNF ist ein weiterer Vertreter aus der Gruppe der Neutrophine für den Interaktionen zwischen Immunzellen und dem Nervensystem vermutet werden. In Biopsie-Material von an Multiple Sklerose Erkrankten ließ sich in den perivaskulär gelegenen Infiltraten eine Expression von BDNF in den Entzündungszellen nachweisen, die geschädigte Neurone vor dem Zelltod bewahren, darüber hinaus jedoch Einfluss auf andere Zelltypen haben könnte (Kerschensteiner et al, 1999; Stadelmann et al, 2002). Vorstellbar wäre, dass eine Niederregulation proinflammatorisch wirkender Substanzen wie der Chemokine erfolgen könnte und die BDNF-Expression der Leukozyten als negativer Feedback-Mechanismus zur Beendigung der Entzündungsreaktion dient. Zudem wäre denkbar, dass Neurone konstitutiv über die Expression von Neutrophinen und deren Wirkung auf benachbarte Zellen wie den Endothelzellen zu einem antiinflammatorischen Umfeld im zentralen Nervensystem beitragen.

In den durchgeführten Untersuchungen gab es jedoch keinen Hinweis darauf, dass Neutrophine eine Veränderung der Expressionsrate bestimmter Chemokine in zerebralen Endothelzellen bewirken können. Es ergab sich bei Koinkubation der proinflammatorischen Substanzen mit NGF bzw. BDNF keine Veränderung des Expressionsmusters sowie der -rate der untersuchten Chemokine. In der Zwischenzeit erfolgte in unserer Gruppe der Nachweis, dass humane zerebrale Endothelzellen in vitro keinen der entsprechenden BDNF-Rezeptoren exprimieren, so dass eine direkter Effekt von BDNF auf zerebrale Endothelzellen unter diesen Bedingungen nicht zu erwarten ist (Ruprecht et al., 2002).

Eine weitere Gruppe an Substanzen, deren Effekt auf die Chemokinexpression von zerebralen Endothelzellen interessant erscheint, sind weibliche Steroidhormone. So haben Östrogene und Gestagene eine antiatherogene Wirkung, die bei der inzwischen vorherrschenden Entzündungshypothese der Atherosklerose ihre Ursache in der Beeinflussung von Schlüsselkomponenten der Entzündung wie der Expression von Chemokinen haben könnte (Lusis, 2000). Zudem ist der Bias beim Auftreten von bestimmten Autoimmunerkrankungen, auch der Multiplen Sklerose, zugunsten des weiblichen Geschlechts und die Suppression bzw. Exazerbation der Krankheitsaktivität in Phasen veränderter Hormonspiegel, wie in der Schwangerschaft oder nach der Entbindung, ein Hinweis für einen

modulierenden Einfluss der weiblichen Steroidhormone auf die entzündliche Aktivität der Erkrankung (Birk et al, 1990). Erklärt wird dies zum Beispiel über eine Verschiebung einer zellvermittelten TH1 zu einer humoralen TH2-Immunreaktion. Unterstützung erhielt diese Hypothese durch tierexperimentelle Ergebnisse, bei denen es durch Verabreichung von Estradiol zu einer Suppression der Krankheitsaktivität der experimentell-autoimmunen Enzephalomyelitis gekommen war (Polanczyk et al., 2003). Zudem wurde beobachtet, dass dieser Effekt auf einer Veränderung des Genexpressionsmusters von immunologischen Regulatormolekülen im ZNS dieser Tiere beruht (Matejuk et al., 2002). Neben der direkten Wirkung der Sexualhormone auf lymphatische Zellen, wäre die Einwirkung auf Endothelzellen und die Suppression von inflammatorischen Schlüsselmolekülen wie den Chemokinen möglich. Vereinbar damit wäre die oben angeführte antiatherogene Wirkung der weiblichen Steroidhormone.

Der biologische Effekt von Steroidhormonen wird vermittelt über zytoplasmatische oder nukleäre Rezeptoren, die nach Binden des Liganden in den Zellkern wandern und dort an spezifische DNA-Sequenzen binden und eine Veränderung der Expressionsrate bestimmter Gene hervorrufen. Bei den Östrogenen erfolgen diese genomischen Effekte über zwei Rezeptorsubtypen ER- α und ER- β (Nilsson et al., 2001). Die Expression dieser Rezeptoren wurde in zerebralen Rattenendothelzellen nachgewiesen (Stirone et al., 2003; Dan et al., 2003). In den bisherigen Untersuchungen in der EAE werden die protektiven Effekte über den Rezeptorsubtyp ER α hervorgerufen (Polanczyk et al, 2003.). In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnte kein Hinweis für eine Suppression der Chemokinexpression durch weibliche Steroidhormone gefunden werden. Sollten humane zerebrale Endothelzellen wie zerebrale Rattenendothelzellen die entsprechenden Rezeptoren exprimieren, könnte es sein, dass die Gensequenzen der untersuchten Chemokine nicht der Regulation von weiblichen Steroidhormonen unterliegen oder, dass die Inkubationszeiten zu kurz waren, um die transkriptionellen Effekte zu beobachten.

Eine weitere Substanz, deren immunmodulatorische und antiinflammatorische Eigenschaften hinsichtlich eine Veränderung der Expression von inflammatorischen Chemokine untersucht wurde, ist der nicht-selektive Phosphodiesteraseinhibitor Pentoxifyllin. Für diese Substanz sind in einigen

inflammatorischen Erkrankungen beim Menschen sowie in Tiermodellen immunmodulierende Eigenschaften beschrieben (Nataf et al, 1993). Bei Präinkubation der zerebralen Endothelzellen mit verschiedenen Konzentrationen von Pentoxifyllin konnte keine Veränderung hinsichtlich der Chemokinexpression beobachtet werden, obwohl die bekannte Wirkung des cAMP- Anstiegs nachweisbar war (Bindewald et al., unveröffentlichte Ergebnisse).

Humane zerebrale Endothelzellen spielen als Teil der Blut-Hirn-Schranke eine aktive Rolle in der Entwicklung und der Regulation von entzündlichen Prozessen im zentralen Nervensystem. So zeigt sich in diesen Experimenten die Fähigkeit zur Synthese einer Reihe von Chemokinen aus der CC-Chemokin-Familie, denen eine große Bedeutung bei der Entstehung von entzündlichen, insbesondere chronisch-entzündlichen Prozessen, und bei der Regulation der Immunüberwachung durch Lymphozyten zukommt. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um abzuschätzen welche Rolle die zerebralen Endothelzellen als Produzenten dieser Schlüsselmoleküle im Verhältnis zu weiteren ortsständigen Zellen wie den Astrozyten oder der Mikroglia haben (McManus et al., 2000; Oh et al., 1999).

5. Zusammenfassung

Humane zerebrale Endothelzellen sind in vitro in der Lage nach Stimulation mit IL1 β , IFN γ , TNF α oder LPS ein bestimmtes Muster an proinflammatorischen Chemokinen zu produzieren. Es konnte die Expression von IL 8, MCP-1, IP-10 und RANTES beobachtet werden. Dabei handelt es sich um Chemokine, deren Schlüsselrolle für die Pathogenese einer Reihe von inflammatorischen neurologischen Erkrankungen bekannt ist. Zerebrale Endothelzellen kommen somit neben einer Reihe von anderen Zelltypen wie Astrozyten, Mikroglia oder ins ZNS invadierten Leukozyten für die Chemokinsynthese bei diesen Erkrankungen in Frage.

Es war eine selektive Expression der Chemokine zu beobachten, so unterschieden sie sich in ihren stärksten Stimulus oder der Geschwindigkeit mit der sie nach Stimulationsbeginn synthetisiert wurden. Ein Chemokin, MIP 1 α , wurde unter den getesteten Bedingungen nicht exprimiert.

Unter Einwirkung einer Reihe von Substanzen (weibliche Steroidhormone, Pentoxifyllin, Neurotrophine), deren antiinflammatorische Eigenschaften bekannt sind oder für die solche angenommen werden, konnte keine signifikante Veränderung des Chemokinexpressionsmusters beobachtet werden.

6. Literaturverzeichnis

Abbott NJ (2002) Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J. Anat.* 200, 629-638

Andjelkovic AV, Spencer DD, Pachter JS (1999) Visualization of chemokine binding sites on human brain microvessels. *J Cell Biol.* 145, 403-412

Asensio VC, Kincaid C, Campbell IL (1999) Chemokines and the inflammatory response to viral infection in the central nervous system with a focus on lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Neurovirol.* 5, 65-75

Baggiolini M, Dewald B, Moser B (1997) Human chemokines: An update. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 675-705

Balashov KE, Rottmann JB, Weiner HL, Hancock WW (1999) CCR5 and CXCR3 T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1 α and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 6873-6878

Bartholdi D, Schwab ME (1997) Expression of proinflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse : an in situ hybridization study. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1422-1438

Beuckmann CT, Galla HJ (1998) Tissue culture of brain endothelial cells-induction of blood-brain barrier properties by brain factors. In: *An introduction to the blood-brain barrier: Methodology, biology and pathology*(ed. Pardrige WM), pp. 79-85. Cambridge, 1998

Birk K, Ford C, Meltzer S (1990) The clinical course of multiple sclerosis during pregnancy and the puerperium. *Arch. Neurol.* 47, 738

Conant K, Garzino-Demo A, Nath A, McArthur JC, Halliday W, Power C, Gallo RC, Major EO (1998) Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in HIV-1 Tat-stimulated astrocytes and elevation in AIDS dementia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 3117-3121

Dan P, Cheung J, Scriven D, Moore E (2003) Epitope-dependent localization of estrogen receptor α , but not $-\beta$, in en face arterial endothelium. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol 284, H1295-H1306

Fife BT, Huffnagle GB, Kuziel WA, Karpus WJ (2000) CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Exp. Med. 192, 899-905

Franciotta D, Martino G, Zardini E, Furlan R, Bergamaschi R, Andreoni L, Cosi V (2001) Serum and CSF levels of MCP-1 and IP-10 in multiple sclerosis patients with acute and stable disease and undergoing immunomodulatory therapies. J. Neuroimmun. 115, 192-198

Garlanda C, Dejana E (1997) Heterogeneity of endothelial cells. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 17, 1193-1199

Ghirnikar R, Lee Y, He T, Eng L (1996) Chemokine expression in rat stab wound brain injury. J. Neurosci. Res. 46, 727-733

Glabinski AR, Tani M, Tuohy VK, Tuthill RJ, Ransohoff RM (1996 a) Central nervous system chemokine mRNA accumulation follows leukocyte entry at the onset of murine acute experimental autoimmune encephalomyelitis. Brain Behav. Immun. 9, 315-330

Glabinski AR, Tani M, Balasingam V, Yong VW, Ransohoff RM (1996b) Chemokine monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) is expressed by astrocytes after mechanical injury to the brain. *J. Immunol.* 156, 4363-4368

Glabinski AR, Ransohoff RM (1999) Sentries at the gate: chemokines and the blood-brain barrier. *J. Neuro Virol.* 5, 623-634

Godiska R, Chantry D, Dietsch G, Gray P (1995) Chemokine expression in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 58, 167-176

Gourmala NG, Buttini M, Limonta S, Sauter A, Boddeke HW (1997) Differential and time-dependent expression of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA by astrocytes and macrophages in rat brain: effects of ischemia and peripheral lipopolysaccharide administration. *J. Neuroimmunol.* 74, 35-44

Gu L, Tseng S, Horner RM, Tam C, Loda M, Rollins BJ (2000) Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* 404, 407-411

Harling-Berg CJ, Park JT, Knopf PM (1999) Role of cervical lymphatics in the Th2-type hierarchy of CNS immune regulation. *J. Neuroimmunol.* 101, 111-127

Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP (2001) New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nature rev neuroscience* 3, 291-301

Hesselgesser J, Horuk R (1999) Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. *J. Neuro Virol.* 5, 13-26

Huang DR, Wang J, Kivisakk P, Rollins BJ, Ransohoff RM (2001) Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune

response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 193, 713-725

Hvas J, McLean C, Justesen J et al (1997) Perivascular T cells express the proinflammatory chemokine RANTES mRNA in multiple sclerosis lesions. *Scand. J. Immunol.* 46, 195-203

Janzer RC, Raff MC (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325, 253-257

Joo F (1996) Endothelial cells of the brain and other organ systems: some similarities and differences. *Progress in Neurobiology* 48, 255-273

Karpus WJ, Kennedy KJ (1997) MIP-1alpha and MCP-1 differentially regulate acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis as well as Th1/Th2 lymphocyte differentiation. *J Leukoc Biol* 62, 681-687

Kawakami N, Lassmann S, Li Z, Odorani F, Ritter T, Ziemssen T, Klinkert W, Ellwart J, Bradl M, Krivacic K, Lassmann H, Ransohoff R, Volk HD, Wekerle H, Linington C, Flügel A (2004) The activation status of neuroantigen-specific T cells in the target organ determines the clinical outcome of autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 199, 185-197

Kossmann T, Stahel PF, Lenzlinger PM, Redl H, Dubs RW, Trentz O, Schlag G, Morganti-Kossmann MC (1997) Interleukin-8 released into the cerebrospinal fluid after brain injury is associated with blood-brain barrier dysfunction and nerve growth factor production. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17, 280-289

Krishnan L, Guilbert LJ, Russell AS, Wegmann TG, Mosmann TR, Belosevic m (1996) Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN- γ responses and increased production of T helper 2 cytokines. *J. Immunol.* 156, 644

Laudana C, Kim JY, Constantin G, Butcher E (2002) Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol. Rev.* 186, 37-46

Leibowitz S, Hughes RA (1983) *Immunology of the nervous system*. Edward Arnold, London

Liu MT, Keirstead HS, Lane TE (2001) Neutralization of the chemokine CXCL10 reduces inflammatory cell invasion and demyelination and improves neurological function in a viral model of multiple sclerosis. *J. Immunol.* 167, 4091-4097

Lusis AJ (2000) Atherosclerosis. *Nature* 407, 233-241

Luster AD (1998) Chemokines-Chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl.J. Med.* 338, 436-445

Mahalingam S., Friedland JS, Heise MT, Rulli NE, Meanger J, Lidbury BA (2003) Chemokines and viruses: friends or foes?. *Trends in Microbiology* 11, 383-391

Mantovani A, Bussolino F, Martino I (1997) Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol. Today* 18, 231-240

Martino G, Adorini L, Rieckmann P, Hillert J, Kallmann B, Comi G, Filippi M (2002) Inflammation in multiple sclerosis: the good, the bad, and the complex. *Lancet neurology* 1, 499-509

Matsumoto T, Ikeda K, Mukaida N, Harada A, Matsumoto Y, Yamashita J, Matsushima K (1997) Prevention of cerebral edema and infarct in cerebral reperfusion injury by an antibody to interleukin-8. *Lab. invest.* 77, 119-125

McIntyre TM, Prescott SM, Weyrich AS, Zimmerman GA (2003) Cell-cell interactions: leukocytes-endothelial interactions. *Curr. Opin. in Hematol.* 10, 150-158

McManus C, Berman J, Brett F, Staunton H, Farrell M, Brosnan C (1998) MCP-1, MCP-2 and MCP-3 expression in multiple sclerosis lesions: an immunohistochemical and in situ hybridisation study. *J. Neuroimmunol.* 86, 20-29

McManus C, Brosnan C, Berman J (2000) Cytokine induction of MIP-1 alpha and MIP-1 beta in human fetal microglia. *J. Immunol.* 160, 1449-1455

Miller DW (1999) Immunobiology of the blood-brain barrier. *J. of NeuroVirology* 5, 570-578

Matejuk A, Dwyer J, Zamora A, Vandenbark AA, Offner H (2002) Evaluation of the effects of 17 β -estradiol (17 β -E2) on gene expression in experimental autoimmune encephalomyelitis using DNA microarray. *Endocrinology* 143, 313-319

Mendelsohn M, Karas R (1999) The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N. Engl. J. Med.* 340, 1801-1811

Murdoch C, Finn A (2000) Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 95, 3032-3043

Nataf S., Louboutin JP, Chabannes D, Feve JR, Muller JY (1993) Pentoxifylline inhibits experimental allergic encephalomyelitis. *Acta Neurol. Scand.* 88, 97-99

Neumann H, Cavalie A, Jenne DE, Wekerle H (1995) Induction of MHC class I genes in neurons. *Science* 269, 549-552

Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G et al. (2001) Mechanisms of estrogen action . *Physiol. Rev.* 81, 1535-1565

Oh J, Schwiebert L, Benveniste E (1999) Cytokine regulation of CC and CXC chemokine expression by human astrocytes. *J. Neurovirol.* 5, 82-94

Pardrige WM (1999). Blood-brain barrier biology and methodology. *J. Neurovirology* 5, 556-569

Piccio L, Rossi B, Scarpini E et al (2002) Molecular mechanisms involved in lymphocyte recruitment in inflamed brain microvessels: critical roles for P-selectin glycoprotein ligand-1 and heterotrimeric G-linked receptors. *J. Immunol.* 168, 1940-1949

Polanczyk M, Zamora A, Subramanian S, Matejuk A, Hess D, Blankenhorn E, Teuscher C, Vandenbark A, Offner H (2003) The protective effect of 17 β -estradiol on experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated through estrogen receptor- α . *Am. J. of Pathology* 163, 1599-1605

Prat A, Biernacki K, Lavoie JF, Poirier J, Duquette P, Antel JP (2002) Migration of multiple sclerosis lymphocytes through brain endothelium. *Arch. Neurol.* 59, 391-397

Ransohoff RM, Hamilton TA, Tani M, Stoler MH et al (1993) Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB J.* 7, 592-600

Ranshoff RM, Kivisakk P, Kidd G (2003) Three or more routes for leukocyte migration into central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 569-581

Risau W, Wolburg H (1990) Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* 13, 174-178

Risau W. (1995) Differentiation of endothelium. *FASEB J.* 9, 926-933

Rollins BJ (1997) Chemokines. *Blood* 90, 909-928

Romson J, Hook B, Kunkel S, Abrams G, Schork M, Lucchesi B (1983) Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation* 67, 1016-1023

Sallusto F, Lening D, Mackay CR, Lanzavecchia A (1998) Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J. Exp. Med.* 187, 875-883

Sanders V, Pittmann C, White M, Wang G, Wiley C, Achim C (1998) Chemokines and receptors in HIV encephalitis. *AIDS* 12, 1021-1026

Sasseville VG, Smith MM, Mackay CR, Pauley DR, Mansfield KG, Ringler DJ, Lackner AA (1996) Chemokine expression in simian immunodeficiency virus-induced AIDS encephalitis. *Am. J. Pathol.* 149, 1459-1467

Saukkonen K, Sande S, Cioffe C, Wolpe S, Sherry B, Cerami A, Tuomanen E (1990) The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis. *J. Exp. Med.* 171, 439-448

Seebach J, Bartholdi D, Frei K, Spanaus KS, Ferrero E, Widmer U, Isenmann S, Strieter RM, Schwab M, Pfister H, Fontana A (1995) Experimental Listeria meningoencephalitis. Macrophage inflammatory protein-1 alpha and -2 are produced intrathecally and mediate chemotactic activity in cerebrospinal fluid of infected mice. *J. Immunol.* 155, 4367-4375

Shukaliak JA, Dorovini-Zis K (2000) Expression of the beta-chemokines RANTES and MIP-1 beta by human brain microvessel endothelial cells in primary culture. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 59, 339-352

Simpson J, Rezaie P, Newcombe J, Cuzner ML, Male D, Woodroffe MN (2000a) Expression of the beta-chemokine receptors CCR2, CCR3 and CCR5 in multiple sclerosis central nervous system tissue. *J. Neuroimmunol.* 108, 192-200

Silverstein RL (1999) *The Vascular Endothelium in : Inflammation : Basic Principles and Clinical Correlates* (Ed.: JI Gallin, R Snyderman), 207-225, Philadelphia, 1999

Simpson J, Newcombe J, Cuzner ML, Woodroffe MN (2000b) Expression of the interferon-gamma-inducible chemokines IP-10 and Mig and their receptor, CXCR 3, in multiple sclerosis lesions. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 26, 133-142

Sorensen TL, Tani M, Jensen J et al. (1999) Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J. Clin. Invest.* 103, 807-815

Sorensen TL, Trebst C, Kivisäkk P, Klaege KL, Majmudar A, Ravid R, Lassmann H et al.(2002) Multiple sclerosis: a study of CXCL10 and CXCR3 co-localization in the inflamed central nervous system. *J. Neuroimmunol.* 127, 59-68

Spanaus KS, Nadal D, Pfister HW, Seebach J, Widmer U, Frei K, Gloor S, Fontana A (1997) C-X-C and C-C chemokines are expressed in the cerebrospinal fluid in bacterial meningitis and mediate chemotactic activity on peripheral blood-derived polymorphonuclear and mononuclear cells in vitro. *J. Immunol.* 158, 1956-1964

Sprenger H, Rosler A, Tonn P, Braune JH, Huffmann G, Gemsa D (1996) Chemokines in the cerebrospinal fluid of patients with meningitis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 80, 155-161

Springer TA (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell* 76, 301-314

Stirone C, Duckles S, Krause D (2003) Multiple forms of estrogen receptor- α in cerebral blood vessels: regulation by estrogen. *Am. J. Endocrinol. Metab.* 284, E184-E192

Tanaka Y, Adams DH, Hubscher S, Hirano H, Siebenlist U, Shaw S (1993) T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature* 361, 79-82

Tipold A, Moore P, Zurbriggen A, Burgener I, Barben G, Vandeveld M (1999) Early T cell response in the central nervous system in canine distemper virus infection. *Acta Neuropathol* 97, 45-56

Van der Voorn P, Tekstra J, Beelen RH, Tensen CP, Van der Valk P, de Groot CJ (1999) Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Am. J. Pathol.* 154, 45-51

Vajkoczy P, Laschinger M, Engelhardt B (2001) α 4-integrin-VCAM-1 binding mediates G protein-independent capture of encephalitogenic T cell blasts to CNS white matter microvessels. *J. Clin. Investigation* 108, 557-565

Wang X, Yue TL, Barone FC, Feuerstein GZ (1995) Monocyte chemoattractant protein-1 messenger RNA expression in rat ischemic cortex. *Stroke* 26, 661-666

Wang X et al (1998) J. Neurochem. 71, 1194-1204

Zhang GX, Baker CM, Kolson DL, Rostami AM (2000) Chemokines and chemokine receptors in the pathogenesis of multiple sclerosis. Multiple Sclerosis 6, 3-13

Zhang W, Smith C, Shapiro A, Monette R, Hutchison J, Stanimirovic D (1999) Increased expression of bioactive chemokines in human cerebromicrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to stimulated ischemia in vitro. J. Neuroimmun. 101, 148-160

Zlotnik A, Yoshie O (2000) Chemokines: A new classification system and their role in immunity. Immunity 12, 121-127

Danksagung

Dem Direktor der Neurologischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg: Herrn Professor Dr. med. Klaus V. Toyka möchte ich recht herzlich für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten und seine Bereitschaft zur Erstellung des zweiten Gutachtens danken.

Mein spezieller Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Peter Rieckmann, der mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat. Neben der Bereitstellung notwendiger Materialien, Geräte und der Überlassung des Themas möchte ich vor allem für seine Unterstützung und sein Interesse an dieser Arbeit, ebenso auch für die mir entgegengebrachte Geduld bedanken.

Besonders herzlich möchte ich Frau Dr. Vera Hummel, Herrn Dr. Niels Kruse und Herrn Dr. Boris Kallmann für die hervorragende Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit danken.

Ebenso danke ich für die ständige Ansprechbarkeit und die vielen geduldigen Erklärungen.

Frau Silke Losert möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die gute Arbeitsatmosphäre danken.

Susanne Crohn danke ich für ihre Unterstützung und unendliche Geduld.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Oliver Klein
Pinnasberg 29, 20359 Hamburg
Geboren am 25. Februar 1971 in Gräfelfing/München
Familienstand ledig

Schulischer Werdegang / Studium

1977 – 1981	Grundschule in Friedberg/Bayern
1981 – 1990	Wernher-von-Braun-Gymnasium in Friedberg/Bayern
1990 – 1991	Zivildienst im Pflegebereich Stadtkrankenhaus Friedberg / Bayern
1991 – 1993	Studium der mittelalterlichen/neueren Geschichte Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt/Main
1993	Beginn des Medizinstudiums Julius-Maximilians-Universität Würzburg
1995	Ärztliche Vorprüfung in Würzburg
1996	1. Teil des Ärztlichen Staatsexamens
März 1999	2. Teil des Ärztlichen Staatsexamens
April - August 1999	PJ an der Medizinischen Klinik Universität Würzburg
August - Dezember 1999	PJ an der Neurologischen Klinik Universität Würzburg
Dezember 1999 - März 2000	PJ an der Chirurgischen Klinik Universität Würzburg
Mai 2000	3. Teil des Ärztlichen Staatsexamens

Beruflicher Werdegang

Juli 2000 – Dezember 2001	Arzt im Praktikum an der Abteilung für Immunologie und der klinischen Abteilung des Bernhard-Nocht- Instituts für Tropenmedizin, Hamburg
Februar 2002 – August 2002	Ärztlicher Mitarbeiter an der III. Medizinischen Klinik der Universität Mainz
seit August 2002	Ärztlicher Mitarbeiter an der II. Medizinischen Klinik, Abteilung für Hämatologie und Onkologie, des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf



Oliver Klein