

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Die Rolle von Adhäsionsmolekülen auf Mikroglia-Zellen  
im Verlauf der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Johanna Görg  
aus Dernbach

Mainz, 2021

Tag der Promotion:

12. Juli 2022

*Für meine Familie*

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung &amp; Literaturdiskussion</b>	<b>1</b>
1.1	Multiple Sklerose	1
1.1.1	Epidemiologie & Symptomatik	1
1.1.2	Pathogenese	2
1.1.3	Therapieansätze	4
1.1.4	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis	5
1.2	Makrophagen & Mikroglia in MS & EAE	6
1.2.1	Die Rolle von Mikroglia in der MS und der EAE	6
1.2.2	Die Rolle von peripheren Makrophagen in der MS und der EAE	10
1.2.3	Unterscheidung der ZNS-infiltrierten Makrophagen von ZNS-residenten Mikroglia	12
1.3	Zelladhäsionsmoleküle in der MS	14
1.3.1	VCAM-1 & VLA-4	16
1.3.2	ICAM-1 & LFA-1	18
1.4	Ziel dieser Dissertation	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1	Material	21
2.1.1	Geräte	21
2.1.2	Labor- und Verbrauchsartikel	22
2.1.3	Chemikalien & Reagenzien	23
2.1.4	Kits	25
2.1.5	Puffer, Medien und Lösungen	25
2.1.6	Antikörper	26
2.1.7	qRT-PCR Primer	27
2.1.8	Mäuse	28
2.1.8.1	Wildtyp-Mäuse	28
2.1.8.2	Genetisch-modifizierte Mäuse	28
2.1.9	Software	28
2.2	Methoden	29
2.2.1	Manuelle Zellzählung	29
2.2.2	FACS Analyse und Sort	29
2.2.2.1	Oberflächenfärbung	30
2.2.2.2	Lebend-Tot-Differenzierung	31
2.2.3	Präparation der Mäuse	31
2.2.3.1	Extraktion des Milz-Gewebe	31
2.2.3.2	Extraktion des ZNS-Gewebe	31
2.2.4	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis	32
2.2.5	Zellselektion	33

2.2.5.1	Aufbereitung der Zellen des ZNS	33
2.2.5.2	Aufbereitung der Zellen der Milz	34
2.2.5.3	FACS Sort der Mikroglia & Makrophagen	34
2.2.6	RNA Isolation	35
2.2.7	cDNA Synthese	36
2.2.8	qRT-PCR	37
2.2.9	Statistische Auswertung	38
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
3.1	Etablierung eines Verfahrens zur Analyse von Zelladhäsionsmolekülen auf myeloiden Zellen	39
3.1.1	Symptomverlauf und FACS Analyse der myeloiden Zellen	39
3.2	Steigerung der LFA-1-Expression in erkrankten EAE Mäusen	42
3.2.1	Mikroglia zeigen eine gesteigerte LFA-1-Expression im hochsymptomatischen Stadium	42
3.2.2	LFA-1-Expression auf Mikroglia zeigt Expressionsmuster in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium	43
3.2.3	CAM-Expression auf Mikroglia und Makrophagen im Verlauf der EAE	46
3.2.3.1	CAM-Expression auf ZNS-infiltrierenden Makrophagen im Verlauf der EAE	46
3.2.3.2	Ausgeprägtere CAM-Expression auf eingewanderten Makrophagen im Vergleich zu Mikroglia im erkrankten ZNS	47
3.2.3.3	Adhäsionsmolekülexpression auf Makrophagen in der Milz zeigt keine Regulation im Verlauf der EAE	48
3.2.3.4	Stärkere Adhäsionsmolekülexpression auf Makrophagen in der Milz im Vergleich zu ZNS-infiltrierenden Makrophagen	50
3.3	Quantitative in vitro Analyse des RNA-Gehalts von Zytokin- und Chemokin-Genen in Mikroglia	53
3.3.1	Separation der myeloiden Zellen in Abhängigkeit vom Ausmaß der LFA-1-Expression	53
3.3.2	Das anti-inflammatorische Interleukin-4-Gen wird in LFA-1 <sup>high</sup> -Mikroglia verstärkt exprimiert	55
3.3.3	Steigerung der Expression von Arginase und iNOS korreliert mit Steigerung der LFA-1-Expression	57
3.4	Intensität der LFA-1-Expression auf Mikroglia korreliert mit der Symptomschwere	59
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>61</b>
4.1	Ausblick und Implikationen	75
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>78</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>97</b>
7.1	Erklärung	97

# Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BDNF	brain-derived neurotrophic factor, Wachstumsfaktor BDNF
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CAM	Cell Adhesion Molecules, Zelladhäsionsmoleküle
CCL-2	CC-Chemokinligand 2
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IL	Interleukin
INF $\gamma$	Interferon $\gamma$
iNOS	induzierbare NO-Synthase
KIS	Klinisch Isoliertes Syndrom
LFA-1	Lymphocyte/Leukocyte Function Associated Antigen 1
MCS	Mean Clinical Score, mittlerer Symptomwert
MFI	Mean Fluorescence Intensity, mittlere Fluoreszenzintensität
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
NO	Stickstoffmonoxid
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PI	Propidiumjodid
qRT-PCR	quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction, quantitative Echtzeit-PCR
RFU	relative fluorescence units, relative Fluoreszenzeinheiten
RM	Rückenmark
ROS	reactive oxygen species, Reaktive Sauerstoffspezies
RPS29	Ribosomal Protein S29
RT	Raumtemperatur
SEM	standard error of the mean, Standardfehler
TGF	Transforming Growth Factor
TNF $\alpha$	Tumornekrose-Faktor $\alpha$
v. Chr.	vor Christus
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VLA-4	very late antigen-4
vs	versus
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung & Literaturdiskussion

## 1.1 Multiple Sklerose

### 1.1.1 Epidemiologie & Symptomatik

Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste, nicht-traumatische Erkrankung junger Erwachsener, die zu Behinderung führt (Flachenecker et al., 2017, Filippi et al., 2018). Als häufigste entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) zeigt diese Krankheit eine steigende Inzidenz und betrifft weltweit etwa 2,3 Millionen Menschen, wobei in Deutschland ca. 250.000 Menschen erkrankt sind, mit steigender Tendenz (Petersen et al., 2014, Browne et al., 2014, Müller, 2018). Die klinische Präsentation der MS ist facettenreich, zu Beginn präsentiert sich die MS häufig als Klinisch-Isoliertes Syndrom (KIS) (Brownlee et al., 2017). In Abhängigkeit von Lokalisation und Größe der primären symptomatischen Läsion resultiert dies in spezifischen neurologischen Defiziten: Anfänglich treten dabei oft eine Neuritis nervi optici, Hirnstamm- oder spinale Syndrome auf. Jedoch kann theoretisch jede zentralnervöse Instanz betroffen sein und sich dadurch in zahlreichen diversen Symptomen äußern (Compston und Coles, 2008). Diese Heterogenität der Erstsymptomatik erschwert die Diagnosestellung der MS (Brownlee et al., 2017).

Die MS ist durch einen meist schubförmigen Verlauf gekennzeichnet. Dieser zeichnet sich durch eine akute Phase der Symptome von Stunden bis Tagen aus und geht nach einem plateauförmigen Verlauf schließlich in eine Rückbildungsphase über (Dobson und Giovannoni, 2019, Filippi et al., 2018). Die Symptomregression kann vollständig oder partiell verlaufen, wodurch sich eine Differenzierung der Formen der MS treffen lässt: In 80% der Fälle weist die Ersterkrankung einen klassischen schubförmigen Verlauf auf, auch als rezidivierend-remittierende MS (RRMS) bekannt, bei dem sich die Symptomatik im Intervall zwischen den Schüben größtenteils oder auch komplett zurückbildet (Lublin et al., 2014, Lublin und Reingold, 1996). Nur in etwa 5-15% zeigt die Erkrankung einen primär progressiven bzw. primär chronisch progredienten (PPMS) Verlauf, bei dem die Behinderung der Patienten kontinuierlich zunimmt (Flachenecker et al., 2017, Oh et al., 2018).

Während anfänglich häufig noch eine vollständige Remission erreicht werden kann, akkumuliert über die Zeit der Zelluntergang und die damit einhergehende Beeinträchtigung. So sind schließlich auch im Intervall zwischen den Schüben weiterhin neurologische Einschränkungen vorhanden, die langfristig zu gravierenden Behinderungen führen (Leray et al., 2010, Kobelt et al., 2017, Confavreux und Vukusic, 2006). 10-15 Jahre nach Erstdiagnose einer RRMS findet in etwa ein Drittel der Fälle ein Übergang in die sekundär chronisch progrediente Form der MS (SPMS) statt, bei der die progressive Biologie der Erkrankung überwiegt und sich dann klinisch in einer schubunabhängigen kontinuierlichen Verschlechterung manifestiert (Compston und Coles, 2008). Die Behinderung der MS Patienten hinterlässt gravierende Spuren im persönlichen, sozialen und beruflichen Umfeld, denn etwa ein Drittel der Betroffenen wird vorzeitig berentet und die Lebenserwartung von MS Patienten sinkt im Durchschnitt um 6-7 Jahre (Bronnum-Hansen et al., 2004, Marrie et al., 2015). Obwohl die genaue Krankheitsentstehung unklar verbleibt, besteht Konsens darüber, dass sowohl Genetik als auch Umwelt eine Rolle spielen: Zahlreiche Risikofaktoren der Erkrankung an MS konnten mittlerweile belegt werden, dazu zählen neben Rauchen, Adipositas und einem verminderten Vitamin-D-Spiegel auch das weibliche Geschlecht (Olsson et al., 2017, Palacios et al., 2011, Mokry et al., 2016, Orton et al., 2006). Zudem zeigt sich eine familiäre Veranlagung auf genetischer Ebene, da etwa ein Achtel der Erkrankten eine positive Familienanamnese für MS aufweist (Harirchian et al., 2018). In diesem Zusammenhang sind oft Genloci des Immunsystems von Anomalien betroffen, wodurch hervorgehoben wird, welcher immensen Stellenwert das Immunsystem in der Pathogenese der MS besitzt (Hollenbach und Oksenberg, 2015).

### **1.1.2 Pathogenese**

Typische Charakteristika der MS sind Inflammation, Neurodegeneration und Gliose, die eine Demyelinisierung und neuronale Schädigung hervorrufen (Filippi et al., 2018, Dobson und Giovannoni, 2019). Charakteristisch für die MS sind De- & Remyelinisierungsherde in der weißen und grauen Substanz (Lassmann et al., 2007). Der exakte Pathomechanismus verbleibt unaufgeklärt, doch gilt ein pathologisches Zusammenspiel von Zellen des adaptiven Immunsystems, Gliazellen, Endothelzellen und ZNS-ständigen Zellen als gesichert (Frohman et al., 2006, Compston und Coles, 2008). In aktuellen Krankheitsmodellen wird eine „schubförmige“ von einer „progressiven“ Biologie unterschieden, die prinzipiell

beide zu jedem Zeitpunkt der Erkrankung vorhanden sind, sich aber je nach akzentuierter Ausprägung unterschiedlich klinisch präsentieren.

Besonders initial in der Erkrankung ist eine Dysregulation der Schrankenfunktion der Blut-Hirn-Schranke (BHS) typisch, die eine fokale Migration von peripheren Immunzellen ins ZNS ermöglicht (Ortiz et al., 2014). Besonders relevant sind dabei in der Peripherie aktivierte, autoreaktive T-Zellen (Van Kaer et al., 2019). Unter dem Begriff „Molekulare Mimikry“ ist eine These zur Entstehung der Auto-Reaktivität der T-Zellen bekannt (Wekerle und Hohlfeld, 2003, Goverman, 2011, Reynolds et al., 2015). Neben CD8<sup>+</sup>-T-Zellen finden sich unter den infiltrierenden Immunzellen im erkrankten ZNS auch CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, wie etwa Th1- und Th17-Zellen, wobei sich in letzter Zeit besonders bezüglich Th17-Zellen spannende Entdeckungen zeigten (Hemmer et al., 2015, Van Kaer et al., 2019, Kebir et al., 2007). In den MS Läsionen finden sich zudem B-Zellen und aktivierte Zellen der angeborenen Immunität wie Makrophagen und Mikroglia, auf die in 1.2 näher eingegangen wird (Dendrou et al., 2015, Lassmann et al., 2007).

Im Rahmen der ausgelösten Kaskade der Inflammation kommt es schließlich zur Schädigung von Oligodendrozyten und zur Demyelinisierung von Neuronen (Trapp et al., 1998). In Endstadien kann dies in verminderter Axondichte durch Axonschädigung und letztlich in deren Verlust resultieren (Frohman et al., 2006).

MS Läsionen weisen eine gravierende Heterogenität je nach Form der MS und Stadium auf: Im akuten Schub sind die typischen aktiven Entzündungsläsionen gekennzeichnet durch eine hohe Immunzellanzahl, während man in chronischen Läsionen oft ein inaktives Zentrum umgeben von aktivierten myeloiden Zellen findet (Frischer et al., 2009, Prineas et al., 2001). Während in der Frühphase einer Läsion die adaptiv-vermittelte Inflammation und Demyelinisierung dominiert, ist in späteren Erkrankungsphasen vermehrt die Neurodegeneration relevant (Lassmann, 2013, Lucchinetti et al., 2000, Frischer et al., 2009). Sowohl in der chronischen als auch akuten Phase wird diesen degenerativen Vorgängen durch Remyelinisierungsprozesse mittels Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläufern entgegengewirkt (Vogelaar et al., 2018, Compston und Coles, 2008).

All diese pathologischen Vorgänge sind im MS-ZNS charakteristisch, jedoch in Abhängigkeit von der Verlaufsform unterschiedlich gewichtet (Tallantyre et al., 2009, Dobson und Giovannoni, 2019). Die Frage nach Faktoren, die diese Prozesse beeinflussen und auf die Balance zwischen Entzündung, De- & Remyelinisierung und Axonverlust einwirken, regt weitere Forschung an, um damit schlussendlich neue Therapieoptionen schaffen zu können.

### 1.1.3 Therapieansätze

Obwohl MS nicht heilbar ist, lässt sich die Erkrankung dank Fortschritten im Bereich der Forschung, neuer Diagnostik und spezifisch wirksamer Medikation immer besser behandeln und der Verlauf drastisch verbessern (Rae-Grant et al., 2018). Unter dem Therapieziel NEDA („No Evidence of Disease Activity“) wird das langfristige Behandlungsziel der Reduktion von klinischer Schubfrequenz und subklinisch im MRT messbarer Krankheitsaktivität durch gezielte Modulation des Immunsystems zusammengefasst. Grundsätzlich wird ein Eskalationsschema mit Wechsel auf die nächste Behandlungsstufe bei Nicht-Ansprechen verfolgt. Dadurch soll die MS-Progression bestmöglich hinausgezögert und eine Behinderung vermieden werden (Ziemssen et al., 2016, Giovannoni, 2018, Montalban et al., 2018).

Um im akuten Schub eine schnelle Rückbildung der Symptomatik zu erzielen wird auf eine Hochdosis-Glucocorticoid-Therapie zurückgegriffen, eskalierend sind Verfahren der Plasmapherese oder Immunadsorption möglich (Goodin, 2014, Faissner et al., 2016). In der symptomatischen Behandlung der neurologischen Beeinträchtigungen wird ein multimodales Konzept mit medikamentöser Linderung der Spastik, etwa durch Baclofen, in Kombination mit Physiotherapie, Logopädie und Psychotherapie angestrebt (Kesselring und Beer, 2005, Henze, 2004, Leitlinien der DGN, 2021). Zur spezifischen Verlaufs-modifizierenden Therapie, die in Immunvorgänge eingreift, zählen neben dem Adhäsionsmolekül-Antikörper Natalizumab etwa auch die Immunsuppressoren Fingolimod, ein Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-Modulator, der Einfluss auf die Lymphozyten-Migration nimmt oder der CD20-Antikörper Ocrelizumab, welcher B-Zellen blockiert und erstmals eine Option speziell zur Behandlung der PPMS darstellt (Filippini et al., 2013, Giovannoni, 2018, Greenfield und Hauser, 2018).

Die Therapiemöglichkeiten sind stark abhängig von der Verlaufsform der MS, so sind aktuell die Therapieoptionen bei progressiven Verlaufsformen begrenzt (Ocrelizumab bei PPMS oder Siponimod bei aktiver SPMS) (Wingerchuk und Weinshenker, 2016, Greenfield und Hauser, 2018). Selbst die derzeit verfügbare Medikation ist oft nicht zufriedenstellend und etwa bezüglich des Therapieziels der Verbesserung der Lebensqualität unzureichend erfolgreich (Berger, 2011, Hart und Bainbridge, 2016). Dies sind nur einige der Gründe, weshalb MS-Forschung betrieben wird, mit der Hoffnung neue Therapieansätze zu entdecken, die bei den verschiedenen Formen der MS gezielt und effektiv einsetzbar sind.

### 1.1.4 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis

Zur Erforschung der charakteristischen pathogenen Prozesse der MS können Untersuchungen in Tiermodellen durchgeführt werden, die ähnliche pathologische Vorgänge auslösen. Eines dieser Tiermodelle ist die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) (Gold et al., 2006, Denic et al., 2011). Die Auslösung der EAE wird durch Sensibilisierung des murinen Immunsystems gegen ZNS-Gewebe erreicht. Dies erfolgt entweder als aktive Immunisierung durch Auslösung einer T-Zell-Reaktion nach Antigeninjektion oder durch Übertragung von autoreaktiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im Rahmen einer passiven Immunisierung (Stromnes und Goverman, 2006a, Stromnes und Goverman, 2006b). Vergleichbar mit der Pathogenese der MS lässt sich auch im EAE-Modell eine Störung der Blut-Hirn-Schranke nachweisen, welche das Einwandern von peripheren Immunzellen ermöglicht (Ortiz et al., 2014, Dendrou et al., 2015). So wird durch die erzeugte T-Zell-Autoreaktivität im Tiermodell eine chronisch-entzündliche Erkrankung verursacht, welche Inflammationsherde mit Demyelinisierung und Axondegeneration vorweist, wie sie vergleichbar auch im ZNS von MS-Patienten aufzufinden ist (Constantinescu et al., 2011, Glatigny und Bettelli, 2018). Häufig werden C57BL/6 Mäuse verwendet, die durch eine subkutane Injektion des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein-Peptids 35-55 (MOG 33-55) immunisiert werden. So wird ein chronisch progressiver Verlauf, ähnlich wie in der MS induziert, mit fortschreitenden neurologischen Ausfällen (Mendel et al., 1995). Anhand dieses Modells lässt sich daher im Detail erforschen, wie sich neuroinflammatorische Bedingungen auf diverse Zellpopulationen auswirken und welchen Einfluss diese im Verlauf der Erkrankung nehmen.

## 1.2 Makrophagen & Mikroglia in MS & EAE

### 1.2.1 Die Rolle von Mikroglia in der MS und der EAE

In den letzten Jahren konzentrieren sich Forschungsbemühungen verstärkt auf die Rolle von ZNS-ständigen Mikroglia-Zellen in der MS. Mikroglia sind Teil des mononukleär-phagozytären Systems und mesenchymalen Ursprungs. Im Zuge der Embryonalentwicklung wandern erythromyeloide Vorgängerzellen aus dem Dottersack in das Neuralrohr ein, wo sie zu reifen Mikroglia differenzieren (Schulz et al., 2012, Kierdorf et al., 2013). Diese stellen schließlich die residenten Gewebemakrophagen des Immunsystems im ZNS dar (Heneka et al., 2014).

Mit etwa 10-20% der Gliazellen nehmen sie im Immunsystems des ZNS eine bedeutende Rolle ein, so etwa bezüglich der angeborenen Immunantwort im Entzündungsgeschehen (Ponomarev et al., 2005, Kettenmann et al., 2011, Streit, 2002). Mikroglia sind äußerst variabel in ihrer Morphologie und Funktion, wodurch sie sich den gegenwärtigen Bedingungen anpassen und je nach Aktivitätsstatus zahlreiche Funktionen ausführen können. Essentiell ist ihr Vermögen zur Phagozytose von Pathogenen oder Zelldetritus um somit Regenerationsvorgänge zu ermöglichen und die Homöostase zu sichern (Benarroch, 2013). Mit ihren verzweigten Fortsätzen treten Mikroglia fortwährend mit ihrer Umgebung in Kontakt und werden bei Störungen wie Zelldegeneration durch Inflammation oder Verletzung aktiviert (Gonzalez et al., 2014).

Mikroglia interagieren mit weiteren Immunzellen, z.B. Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen, über verschiedene Kommunikationswege, etwa durch Zytokin-Sekretion oder in ihrer Funktion als Antigen-präsentierende Zelle (APZ) (Domingues et al., 2016, Lampron et al., 2013, Benveniste, 1997, Jack et al., 2005). So können Mikroglia beispielsweise positiv auf die neuronale Proliferation durch Induktion der Synapsen-Neubildung einwirken (Block und Hong, 2007, Gemma und Bachstetter, 2013). Somit stellen Mikroglia einen bedeutenden Drehpunkt im Zusammenspiel der Zellen dar, um auf direktem oder indirektem Weg mit anderen Zellpopulationen zu interagieren und diese in ihrer Aktivität zu beeinflussen. Durch ihre zahlreichen Funktionen sichern sie im gesunden ZNS die Homöostase, schützen vor Pathogenen und ermöglichen Regeneration. In welchem Ausmaß Mikroglia Einfluss auf das ZNS nehmen, zeigt sich im Besonderen im erkrankten ZNS, wo Mikroglia einerseits in vielen Aspekten Pathologien unterstützen oder andererseits diesen entgegenwirken können.

In der Erforschung der Pathogenese der MS wird Mikroglia-Zellen eine immer größere Bedeutung zuteil (Jack et al., 2005, Gandhi et al., 2010, O'Loughlin et al., 2018). Dass das steigende Forschungsinteresse an Mikroglia durchaus begründet ist, wird schon dadurch verdeutlicht, dass die Entwicklung einer EAE durch Ablation von Mikroglia gehemmt werden kann: Im ZNS von Mäusen, denen Mikroglia fehlen oder deren Funktion auf genetischer Ebene blockiert wurde, zeigt sich eine weniger gravierende Demyelinisierung und eine geringere Krankheitsintensität (Heppner et al., 2005, Goldmann und Prinz, 2013).

Das Auffinden von phagozytierenden Mikroglia ist kennzeichnend für entzündliche Läsionen des ZNS, da sowohl in frühen als auch in fortgeschrittenen Stadien aktivierte Mikroglia in diesen Herden nachweisbar sind (Singh et al., 2013, Prineas et al., 2001). Bereits vor Auftreten erster Krankheitssymptome kann eine Aktivierung von Mikroglia festgestellt werden (Ponomarev et al., 2005). Zudem wird die Infiltration von adaptiven Immunzellen in das ZNS durch Mikroglia begünstigt (Ransohoff und Perry, 2009). In MS Läsionen interagieren Mikroglia mit diversen Zellpopulationen, darunter vermutlich auch mit eingewanderten T-Zellen (Woodroffe et al., 1986, Hemmer et al., 2015).

Ein positiver Einfluss der Modulation von Mikrogliafunktionen auf Verlauf und Schwere der Erkrankung konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden (O'Loughlin et al., 2018, Chu et al., 2018). So hemmt das Antibiotikum Minocyclin die Aktivierung von Mikroglia und bewirkt dadurch neben positiven Effekten unter experimentellen Bedingungen auch einen verminderten Übergang eines CIS in eine manifeste MS Diagnose (Chen et al., 2011). Dies unterstützt die Annahme, dass Mikroglia einen pro-inflammatorischen Effekt auf die Prozesse der EAE besitzen können. Aktuell befinden sich mehrere Vertreter der sogenannten Bruton's tyrosine kinase (BTK)-Inhibitoren in klinischen Phase 3-Studien. Durch BTK-Inhibition soll konzeptionell eine gleichzeitige Hemmung der B-Zell- und Mikroglia-Funktion erreicht werden, welches als vielversprechender Ansatzpunkt für mögliche Therapeutika angesehen wird (Dolgin, 2021).

Beispielsweise sind aktivierte Mikroglia fähig, reaktive Sauerstoffradikale (ROS), Stickstoffmonoxid (NO), sowie reaktive Stickstoffspezies zu produzieren (Gray et al., 2008, Haider et al., 2011, Smith et al., 1999). Dadurch können Mikroglia die in MS Läsionen verstärkt auftretende oxidative Schädigung fördern und zu deren Entstehung beitragen (Mayo et al., 2012, Haider et al., 2011, Heneka et al., 2014). Zudem können Mikroglia die Inflammation im Rahmen der MS verstärken, indem sie pro-inflammatorische Zytokine wie etwa Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TN-F $\alpha$ ) und

Interleukin-6 (IL-6) produzieren und sezernieren (Gao und Tsirka, 2011, Chu et al., 2018, Benarroch, 2013). Dadurch können sie unter anderem die T-Zell-Antwort im Entzündungsgeschehen unterhalten (Raivich und Banati, 2004).

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Mikroglia Effekte auf die Differenzierung von T-Zellen haben können und z.B. durch Anregen der Proliferation von Th1- und Th17-Zellen auf den Erkrankungsverlauf einwirken (Gao und Tsirka, 2011).

Die Aktivierung von Mikroglia und damit einhergehender Kapazität zur Antigen-Präsentation ist potenziell förderlich für das Fortschreiten der Erkrankung (Almolda et al., 2011, Benveniste, 1997). Unter welchen Bedingungen Mikroglia in vivo als APZ fungieren ist aktuell noch Gegenstand der Forschung, doch implizieren einige Studien, dass aktivierte Mikroglia im Rahmen der Inflammation dazu in der Lage wären (Brendecke und Prinz, 2015, Ford et al., 1995, Greter et al., 2015): Beispielsweise zeigt sich nicht nur eine verstärkte Expression von MHC-Molekülen, sondern auch der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 (B7-2), womit sie als APZ etwa mit autoreaktiven T-Zellen in Interaktion treten könnten (Gao und Tsirka, 2011, Almolda et al., 2010, Peferoen et al., 2015). So können die kostimulatorischen Strukturen B7-1 und B7-2 an CD28 auf T-Zellen binden und deren Proliferation und Differenzierung fördern, darüber hinaus aber auch die Zytokin-Ausschüttung anregen und damit indirekt wiederum andere Zellpopulationen beeinflussen (Sanders und De Keyser, 2007, Benveniste, 1997). Weitere APZ, wie Makrophagen, werden durch die Ausschüttung von Chemokinen, z.B. CC-Chemokinen, angezogen, fördern wiederum die Inflammation und verstärken die Entzündungskaskade immer weiter (Chu et al., 2018). Dies verdeutlicht, dass Mikroglia das Potential besitzen durch Kontaktaufnahme zu anderen Zellarten im ZNS in der T-Zell-Aktivierung und der pro-inflammatorischen Immunantwort involviert zu sein.

Im Gegensatz dazu besitzen Mikroglia auch anti-inflammatorischen Einfluss und ermöglichen durch die Beseitigung toten Zellmaterials Reparaturprozesse im ZNS (Luo und Chen, 2012, Gomes-Leal, 2012). Als Phagozyten entfernen sie Zelldetritus und abgestorbene Neurone, wodurch sie der Entzündung entgegenwirken und Reparaturprozesse anstoßen können. Somit können Mikroglia eine neuroprotektive Rolle im ZNS übernehmen (Neumann et al., 2009, Domingues et al., 2016, Polazzi und Monti, 2010). Im Zusammenspiel mit Oligodendrozyten ermöglichen Mikroglia Remyelinisierungsvorgänge, indem sie die Proliferation und Differenzierung von Vorläufer-Zellen anregen (Miron et al., 2013, Olah et al., 2012). Fehlt diese Funktion der Mikroglia, etwa durch

Ausschalten des Proteins CX3CR1, sinkt das Ausmaß an Remyelinisierung (Lampron et al., 2015). Auch über Strukturen der Antigen-Präsentation sollen Mikroglia zur Proliferation regulatorischer T-Zellen beitragen, wodurch indirekt autoreaktive Immunprozesse eingedämmt werden könnten (Ebner et al., 2013). Ebenso entzündungshemmend wirken Mikroglia durch Sekretion anti-inflammatorischer Mediatoren wie den Zytokinen TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor) oder auch IL-10, ohne welches die EAE-Ausbildung beschleunigt und eine spontane Regeneration verhindert wird (Mosser und Zhang, 2008, Li et al., 2006, Samoiloova et al., 1998). Durch Ausschüttung neurotropher Faktoren wie BDNF („brain-derived neurotrophic factor“) fördern Mikroglia Reparatur-Vorgänge (Kerschensteiner et al., 2003). All dies betont, wie essenziell aktivierte Mikroglia bezüglich Reparaturvorgängen und Symptomregression sind.

Umgekehrt nehmen in der Pathogenese der MS auch andere Zelltypen Einfluss auf Mikroglia und deren Aktivitätsstatus: Beispielsweise vermögen Th1-Zellen Mikroglia in eine pro-inflammatorische Richtung zu lenken, im Sinne einer gesteigerten Produktion von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und NO wohingegen nach Interaktion mit Th-2-Zellen vermehrt anti-inflammatorische Moleküle wie IL-4, BDNF oder Neurotrophin-3 exprimiert werden (Roy und Pahan, 2013, Roy et al., 2007). Diese Interaktionen können unter anderem von Adhäsionsmolekülen vermittelt werden, auf die in 1.3 näher eingegangen wird. Auf diese Weise stellen Mikroglia eine wichtige Schnittstelle in der Interaktion mit anderen Zelltypen dar, die in der Pathogenese der MS involviert sind.

Mittlerweile gilt als etabliert, dass Mikroglia nicht per se als pro- oder anti-inflammatorisch zu kategorisieren sind, sondern ihr Einfluss vielmehr von ihrem Aktivierungszustand abhängig ist (Benarroch, 2013, Walker und Lue, 2015, Jiang et al., 2014). Diese Aktivierung kann wie erläutert das Resultat zahlreicher Änderungen der Homöostase sein, z.B. Entzündungsprozessen im ZNS. Wodurch jedoch welche Art des Aktivitätszustandes von Mikroglia-Zellen ausgelöst wird, ist noch Gegenstand der Forschung. Neue Erkenntnisse besäßen das Potential, Möglichkeiten der Förderung der anti-inflammatorischen Eigenschaften von Mikroglia und damit der Förderung von Remyelinisierung und Regeneration, aufzuzeigen (Voss et al., 2012, Polazzi und Monti, 2010).

## **1.2.2 Die Rolle von peripheren Makrophagen in der MS und der EAE**

Makrophagen sind Teil des mononukleär-phagozytären Systems, die in ihrer Funktion und Morphologie in vielfacher Weise Mikroglia ähneln. Im gesunden ZNS sind Makrophagen aus der Peripherie durch die BHS und die Blut-Liquor-Schranke (BLS) des Plexus choroideus strikt vom ZNS abgetrennt und werden so an einer Passage ins Gehirn gehindert (Shechter et al., 2013, Dyrna et al., 2013). Durch diese Abschirmung wird eine separat kontrollierte Homöostase im ZNS ermöglicht. Als immunprivilegiertes Gewebe unterliegt das ZNS einer strengen Kontrolle der Immunprozesse, diese Funktion wird im gesunden ZNS hauptsächlich von Mikroglia als residenten Gewebsmakrophagen ausgeübt (Ousman und Kubes, 2012, Bogie et al., 2014, Luo et al., 2017). Unter regulären Bedingungen findet sich in ZNS-angrenzenden Geweben, z.B. den Meningen, eine geringe Anzahl an Makrophagen, die an der Kommunikation der Kompartimente untereinander beteiligt sind (Prinz und Priller, 2017, Brendecke und Prinz, 2015). Perivaskuläre Makrophagen können so kleinste Änderungen im Blut detektieren, während Makrophagen im Plexus choroideus die Liquorproduktion regulieren können (Goldmann et al., 2016). Makrophagen stellen in diesen in sich geschlossenen Systemen somit zwar einerseits einen Teil der Immunüberwachung dar, andererseits werden durch sie auch autoimmune Vorgänge ermöglicht (Mildner et al., 2009, Benveniste, 1997).

In Inflammationsvorgängen steigt die Anzahl peripherer Makrophagen im ZNS drastisch an, da bei Entzündung, Infektion oder Verletzung Makrophagen in Richtung dieser Trigger migrieren (Jiang et al., 2014). Dies wird durch eine Störung der BHS im Rahmen der Entzündung ermöglicht, wodurch periphere Makrophagen das erkrankte ZNS infiltrieren können (Obermeier et al., 2013). Schon vor Auftreten erster Krankheitssymptome migrieren Monozyten in das ZNS (King et al., 2009, Mildner et al., 2009). Zudem kann eine Korrelation zwischen der Schwere der Symptomatik und einem Anstieg der Makrophagen-Anzahl im ZNS in der akuten und chronischen Phase belegt werden (Howell et al., 2015, Jiang et al., 2014, Brendecke und Prinz, 2015). Sowohl in aktiven Demyelinisierungsherden der MS als auch der EAE, sind Makrophagen in beträchtlicher Zahl nachweisbar (Boven et al., 2006, Dendrou et al., 2015).

Wie essenziell diese Zellen der angeborenen Immunität in der Pathogenese neuroinflammatorischer Erkrankungen sind zeigen diverse Studien (Huitinga et al.,

1990, Mildner et al., 2009): So wird z.B. die Ausprägung einer EAE durch gezieltes Ausschalten von Makrophagen der Milz und Leber abgemildert (Huitinga et al., 1990). Ähnlich positiv auf den Verlauf wirkt sich in Studien die Blockade der Monozyten-Einwanderung ins ZNS aus (Fife et al., 2000, Ajami et al., 2011).

In der MS hat die Infiltration peripherer Makrophagen ins ZNS in vielfacher Weise schädliche Effekte, beispielsweise durch die Interaktion mit ZNS-fremden Zellen (Jiang et al., 2014, Benveniste, 1997, Gandhi et al., 2010): Studien geben Grund zur Annahme, dass Makrophagen an der Aufnahme und Verarbeitung von Myelin-Antigenen im ZNS beteiligt sind (Sosa et al., 2013). Sie können als APZ fungieren, auch für infiltrierte T-Zellen, wofür sie MHC II exprimieren (Kivisakk et al., 2009, Goldmann et al., 2016, Almolda et al., 2011).

Zudem besitzen Makrophagen die Kompetenz zur Produktion von ROS und Zytokinen, welche zur Inflammation und Gewebeschädigung beitragen (Mosser und Edwards, 2008, Raivich und Banati, 2004). Durch die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, sowie zytotoxischer Mediatoren sind Makrophagen fähig weitere an der MS beteiligte Immunzellen zu beeinflussen. So können sie z.B. die Th17-Zell-Differenzierung hemmen oder die Proliferation regulatorischer T-Zellen fördern (Jiang et al., 2014, Weber et al., 2007). T-Zellen wiederum können durch Sekretion des Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (GM-CSF) die Entwicklung von Makrophagen fördern (Croxford et al., 2015).

Abhängig vom Zytokin-Milieu lassen sich auch für Makrophagen distinkte pro- bzw. anti-inflammatorische Aktivitätsmuster beschreiben, die zu der Bezeichnung als M1- oder M2-Makrophagen führen (Kigerl et al., 2009). Die Einteilung in M1 und M2 gilt heutzutage angesichts des heterogenen und plastischen Phänotyps von myeloiden Zellen zwar als überholt, illustriert aber plastisch zwei funktionell-distinkte gegensätzliche Zustände und wird deshalb immer noch häufig verwendet. Sogenannte M1-Makrophagen entwickeln sich in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  und sezernieren wiederum selbst die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-23, TNF $\alpha$  und die induzierbare NO-Synthase (iNOS). Im Kontrast dazu zeigen Makrophagen durch den Einfluss von IL-4 und IL-10 im M2-Status eine anti-inflammatorische Tendenz, etwa durch verstärkte Arginase-1- und IL-10-Produktion (Mosser und Edwards, 2008, Jiang et al., 2014, Chu et al., 2018). Diese M2-phänotypischen Makrophagen sind an Reparaturprozessen im ZNS beteiligt und fördern so die Regeneration im Rahmen der MS (Bogie et al., 2014, Vogel et al., 2013, Kigerl et al., 2009, Miron und Franklin, 2014).

Trotz dieses distinkten Einflusses und abgrenzbarer Funktion weisen M1- und M2-Makrophagen ähnliche Oberflächenmarker auf, wobei neben dieser Schwierigkeit in der Unterscheidung auch deren Abgrenzung zu anderen myeloiden Zellen wie etwa Mikroglia von Herausforderungen gekennzeichnet ist (Greter et al., 2015, Ford et al., 1995, Brendecke und Prinz, 2015).

### **1.2.3 Unterscheidung der ZNS-infiltrierten Makrophagen von ZNS-residenten Mikroglia**

Die Differenzierung von Mikroglia und Makrophagen ist nicht immer problemlos möglich, denn neben ähnlichen Funktionen besitzen beide Populationen häufig auch eine Vielzahl gleicher Oberflächenmarker (Greter et al., 2015, Biber et al., 2014, Haage et al., 2019). Dadurch, dass Mikroglia eine vielfältige Morphologie aufweisen können und dabei oftmals Makrophagen ähneln, wird zudem die phänotypische Abgrenzung voneinander erschwert (Greter et al., 2015). In MS Herden finden sich neben den ZNS-residenten Mikroglia auch verstärkt die morphologisch ähnlichen Makrophagen (Chu et al., 2018). Ähnliche Oberflächenmarker, Morphologie und Funktion verleiten dazu, sie als Teil einer gemeinsamen Gruppe zu klassifizieren, doch wurde versucht eine distinkte Abgrenzung dieser Zellpopulationen vorzunehmen (Ajami et al., 2011, Yamasaki et al., 2014). Beispielsweise ist eine Unterscheidung in ihrer Entwicklung möglich, da sie aus zwei völlig unterschiedlichen Vorläuferzellen entstehen, ein gleicher Ursprung wurde widerlegt (Streit et al., 1988, Ginhoux et al., 2010, Schulz et al., 2012, Kierdorf et al., 2013).

Auf genetischer Ebene wird für jede Zellart ein distinktes Muster der Expression von Genen der Phagozytose, Transkriptionsfaktoren und Chemokinen während der Erkrankung beschrieben (Butovsky et al., 2014, Yamasaki et al., 2014, Brendecke und Prinz, 2015). Im späteren Verlauf ähnelt das Expressionsmuster der ins ZNS infiltrierten Makrophagen wieder dem peripherer Monozyten, deren Anzahl im ZNS mit Entzündungsrückgang parallel abnimmt (Ajami et al., 2011, Yamasaki et al., 2014).

Die Problematik in der Unterscheidung wird zudem dadurch erschwert, dass beide Zellpopulation extrem dynamisch sind und im aktivierten Zustand dynamisch ihre Oberflächenstrukturen anpassen. Mit Erkrankungsbeginn und damit einhergehender Mikroglia-Aktivierung werden Moleküle hochreguliert, die in

Antigen-Präsentation und Stimulation anderer Zellpopulationen involviert sind, die sich jedoch neben Mikroglia auch auf Makrophagen wiederfinden (Juedes und Ruddle, 2001, Ponomarev et al., 2005, Kreutzberg, 1996). Ebenso weisen sowohl Mikroglia als auch Makrophagen der Peripherie den Oberflächenmarker CD11b (macrophage-1 antigen Mac-1) auf und exprimieren CX3CR1 (Greter et al., 2015, Raivich und Banati, 2004). Aus diesem Grund macht man sich in der Analyse molekulare Marker zunutze, die eine Abgrenzung der beiden Zellarten voneinander ermöglichen (Butovsky et al., 2014, Prinz und Priller, 2014): Mikroglia-spezifische Moleküle, die an dieser Stelle zu nennen wären, sind der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor oder Fcrls (FC-Rezeptor-like S), die sich nicht auf infiltrierten Makrophagen finden (Butovsky et al., 2014, Greter et al., 2015, Mildner et al., 2017). Ein weiterer klassischer Indikator zur Differenzierung stellt die Intensität der Expression von CD45 dar: Während dies auf Mikroglia typischerweise in geringer Intensität exprimiert wird, zeigt sich auf Makrophagen der Peripherie meist eine wesentlich intensivere Expression. Somit lassen sich Mikroglia näherungsweise durch ihre Oberflächenmarker CD11b<sup>+</sup> und CD45<sup>low</sup> Expression beschreiben. ZNS infiltrierende, aus hämatopoetischen Vorläuferzellen entwickelte, myeloide Zellen sind wie Mikroglia positiv für CD11b, in Abgrenzung zu Mikroglia jedoch eher CD45<sup>high</sup>-exprimierend (Ford et al., 1995, Peferoen et al., 2015, Greter et al., 2015). Im Folgenden wird diese näherungsweise, in der Literatur bereits etablierte, Unterscheidung von Mikroglia und Makrophagen verwendet, da sie für den Zweck unserer Untersuchungen, auch mit Rücksicht auf den methodischen Aufwand und Kosten, hinreichend ist (Greter et al., 2015, Peferoen et al., 2015). Trotz der Unterschiede dieser beiden Zellarten exprimieren sowohl Mikroglia als auch Makrophagen Adhäsionsmoleküle, die potenziell zu ihrer Funktion beitragen und im folgenden Kapitel näher beschrieben werden.

### 1.3 Zelladhäsionsmoleküle in der MS

Zelladhäsionsmoleküle (cell adhesion molecules, CAMs) sind Membranproteine, die eine bedeutende Rolle in der interzellulären Interaktion spielen (Raine und Cannella, 1992, Verma und Kelleher, 2017, Milner und Campbell, 2002). In der Pathogenese der MS ist das Zusammenspiel diverser Zellpopulation essenziell, welches unter anderem über Zelladhäsionsmoleküle vermittelt wird (Lee und Benveniste, 1999, Elovaara et al., 2000, Cotman et al., 1998). Insbesondere drei Subtypen der CAMs sind dabei relevant: Selektine, die Immunglobulin Superfamilie und Integrine (Springer, 1990, Raine und Cannella, 1992). Durch Interaktion mit Oberflächenmolekülen anderer Zellen oder mit der Extrazellulären Matrix („extracellular matrix“ ECM) leiten diese Moleküle Signale weiter und vermitteln so den Kontakt zwischen Immunzellen untereinander und darüber hinaus auch mit dem umgebenden Milieu (Jones, 1996, Hynes, 1992, Juliano und Haskill, 1993). Als Signalübermittler sind sie beispielsweise an Migrations-, Proliferations- und Differenzierungsvorgängen beteiligt (Jones und Grooms, 1997, Springer, 1990, Milner und Campbell, 2002). Erste Forschungsergebnisse bezogen sich vor allem auf CAMs auf Endothelzellen und Leukozyten, insbesondere in der neuronalen Entwicklung. Mittlerweile wurden zahlreiche Rollen der CAMs aufgedeckt, etwa in Hinblick auf Vorgänge in der Angiogenese oder Inflammation des erwachsenen ZNS (Cotman et al., 1998, Milner und Campbell, 2002, Springer, 1990, Togashi et al., 2009).

Im Rahmen der MS-Forschung liegt der Fokus bezüglich der Funktion von CAMs zum einen auf der Extravasation und Migration von Leukozyten über die BHS und zum anderen auf der Antigen-Präsentation. Von essenzieller Bedeutung sind CAMs in der Migration von peripheren Zellen über die BHS, indem LFA-1 (Lymphocyte/Leukocyte Function Associated Antigen 1) oder VLA-4 (Very Late Activation Antigen 4) auf Leukozyten mit ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) respektive VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) auf Endothelzellen interagiert und so den Übertritt ermöglicht (Madri et al., 1996, Prat et al., 2002, Shimizu et al., 1992, Springer, 1990). Sowohl die Interaktion von LFA-1/ICAM-1, als auch VLA-4/VCAM-1 ist an der Endotheladhäsion und Extravasation ins ZNS beteiligt (Laschinger und Engelhardt, 2000, Greenwood et al., 1995).

Des Weiteren wird die Antigenpräsentation von APZ durch die Expression von CAMs wie VCAM-1 und ICAM-1 als kostimulatorisches Molekül ermöglicht, wobei das Ausmaß der CAM-Expression mit der APZ-Funktion korreliert (Damle et al.,

1993, Van Seventer et al., 1990, Verma und Kelleher, 2017). Zellspezifisch exprimierte CAM nehmen als kostimulatorisches Signal im Rahmen der Antigen-Präsentation oder durch Affinitätssteigerung von Zell-Zell-Interaktionen schließlich auch Einfluss auf die Aktivierung anderer Zellpopulationen wie B- und T-Zellen (Lee und Benveniste, 1999, Poudrier und Owens, 1994, Ybarrondo et al., 1994).

CAMs werden unter inflammatorischen Bedingungen auf diversen Zellen, die eine Rolle in der Neuroinflammation spielen, exprimiert, darunter Lymphozyten, Endothelzellen, sowie Makrophagen und Mikroglia (Raine und Cannella, 1992, Cannella und Raine, 1995, Lassmann et al., 1991). Bezogen auf die Zell-Gesamtheit im ZNS werden LFA-1, ICAM-1, sowie VLA-4 in der MS vermehrt exprimiert (Bo et al., 1996, Cannella und Raine, 1995, Dopp et al., 1994).

Unter anderem mittels Zytokine wird durch diverse Immunzellen Einfluss auf das Ausmaß der CAM-Expression auf Mikroglia genommen (Lee und Benveniste, 1999, Brosnan et al., 1995). Im umgekehrten Fall wirkt sich die CAM-Expression auf Mikroglia auch auf andere Zellarten aus und vermittelt dort wiederum zahlreiche Prozesse (Jones, 1996, Cotman et al., 1998, Milner und Campbell, 2002): So sind CAMs auf Mikroglia u.a. an der Phagozytose degenerierender Neurone, bei Vorgängen der Demyelinisierung durch Oligodendrozyten oder an der Aktivierung von T-Zellen bei Autoimmunerkrankungen beteiligt (Peterson et al., 2002, Domingues et al., 2016, Raivich und Banati, 2004, Lee und Benveniste, 1999). Zudem ist zumindest für experimentell-herbeigeführte degenerative Vorgänge des ZNS eine über die Zeit regulierte Expression einiger CAMs (LFA-1, VLA-4, ICAM-1) auf Mikroglia nachweisbar, insbesondere auf phagozytierenden Mikroglia (Hailer et al., 1997, Milner und Campbell, 2002). Diese Ergebnisse von nicht-quantitativen, immunzytochemischen Untersuchungen in nicht-MS Proben werfen die Frage auf, inwiefern dies auf die neuroinflammatorischen Vorgänge der MS übertragbar wäre (Hailer et al., 1997, Hartlage-Rübsamen und Schliebs, 2001). Versuche zur Analyse der CAM-Expression auf verschiedenen Zellarten in MS Biopsien lassen vermuten, dass auch Mikroglia eine verstärkte Expression von CAMs in MS Läsionen zeigen, doch untersuchten vorausgegangene Studien wiederum nicht spezifisch die CAM-Expression für Mikroglia über den Verlauf der Erkrankung (Cannella und Raine, 1995).

Die immense Relevanz von CAMs in der Pathogenese der MS oder EAE wird in multiplen Antikörper-Studien nachgewiesen; Wie komplex die Funktionsweise und wie vielfach die Einflussaspekte bzw. -orte der CAMs sind, wird jedoch auch durch widersprüchliche Ergebnisse dieser Studien unterstrichen (Cannella et al., 1993,

Greenwood et al., 1995). Das Potential dieses Forschungsgebiets und von möglichen neuen Erkenntnissen lässt sich am Beispiel des blockierenden VLA-4-Antikörpers belegen, der nun als Natalizumab in der MS Therapie Verwendung findet und durch Blockade der Zelladhäsion an der BHS zu einer Besserung der neuroinflammatorischen Symptomatik führt (Kawamoto et al., 2012).

Zudem besteht in der MS Diagnostik die Hoffnung, dass CAMs ein potenzielles diagnostisches Kriterium darstellen könnten und ggf. Rückschluss auf die Krankheitsaktivität zu geben vermögen (Dore-Duffy et al., 1995, Hartung et al., 1995). Untersuchungen zu löslichen Formen der CAMs in Serum- oder Liquorproben bei gesunden Probanden und auch im Serum von MS Patienten wurden bereits vorgenommen (McDonnell et al., 1998, Rothlein et al., 1991, Kraus et al., 2002). Vergleichbare Studien zu zellgebundenen CAMs in der MS fehlen jedoch, insbesondere mit Fokus auf die CAM Expression auf Mikroglia.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Funktion und Bedeutung von Adhäsionsmolekülen auf Mikroglia zum aktuellen Standpunkt der Forschung noch nicht im Detail aufgeklärt ist (Raivich und Banati, 2004, Lee und Benveniste, 1999). Bisher publizierte Studien zum Thema Zelladhäsionsmoleküle konzentrieren sich meist auf andere Zellpopulationen des ZNS, in nicht-MS-Erkrankungen oder stützen sich auf die näherungsweise Analyse von ZNS-Biopsien, ohne quantitative Analyse der CAM-Expression (Cotman et al., 1998, Bagyinszky et al., 2017, Davignon et al., 1981, Springer, 1990, Cannella und Raine, 1995). Mikroglia und Makrophagen exprimieren eine Vielzahl an CAMs, darunter wie bereits beschrieben LFA-1 und VLA-4, sowie ICAM-1 und VCAM-1 (Cannella und Raine, 1995, Shin et al., 1995, Hailer et al., 1997, Lee und Benveniste, 1999, Akiyama und McGeer, 1990, Sobel et al., 1990, Dugger et al., 2009, Springer, 1990). Dabei sind die bereits genannten Interaktionspaare VCAM-1/VLA-4 und ICAM-1/LFA-1, für die bereits einige Relevanz in der Pathogenese der MS beschrieben werden konnte, von besonderem Interesse und werden im Weiteren detailliert dargestellt.

### **1.3.1 VCAM-1 & VLA-4**

Das „Vascular Cell Adhesion Molecule 1“ (VCAM-1) ist erst unter pathologischen Bedingungen in relevantem Ausmaß im ZNS nachweisbar (Springer, 1990, Raine und Cannella, 1992, Brosnan et al., 1995). Eine Immunsystem-Aktivierung geht dann mit einer gesteigerten VCAM-1-Expression im ZNS einher (Dopp et al., 1994, Bevilacqua, 1993). In MS Läsionen wird VCAM-1 auf Endothelzellen, sowie auf

aktivierten Makrophagen und Mikroglia exprimiert (Lee und Benveniste, 1999, Peterson et al., 2002, Hofmann et al., 2002). Für dieses CAM aus der Superfamilie der Immunglobuline zeigt sich vor allem in Läsionen der chronisch-aktiven Phase ein gesteigertes Expressionsmuster (Williams und Barclay, 1988, Cannella und Raine, 1995). So ist VCAM auf Endothelzellen in MS-Läsionen in der T-Zell-Extravasation involviert (Rice et al., 1990, Greenwood et al., 1995). Die Relevanz VCAM-1s in der MS Pathogenese wurde hauptsächlich hinsichtlich der Interaktion mit dessen Bindungspartner untersucht (Elices et al., 1990, Lee und Benveniste, 1999): Als Ligand für VCAM-1 dient das Integrin „Very Late Activation Antigen 4“ (VLA-4, CD49d/CD29,  $\alpha 4\beta 1$ -Integrin) (Elices et al., 1990, Springer, 1990). Im EAE-Verlauf zeigt sich im Subarachnoidalraum ein Anstieg an VLA-4-positiven Zellen, z.B. Lymphozyten, insbesondere zu Beginn der Neuroinflammation, wenn periphere Zellen das ZNS infiltrieren (Shin et al., 1995, Cannella und Raine, 1995). Zwar dient neben  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4) auch  $\alpha 4\beta 7$  als Ligand für VCAM-1, jedoch ist  $\alpha 4\beta 7$  funktionell im Darm anstelle des Gehirns relevant, was auf die  $\beta$ -Kette als relevante Struktur und damit die Bedeutung von VLA-4 als Bindungspartner hinweist (Engelhardt et al., 1998, Habtezion et al., 2016). Die essentielle Rolle dieses Interaktionspaars wird in Antikörper-Studien verdeutlicht: Durch Blockade der Infiltration von VLA-4-positiven Zellen, wie etwa T-Zellen, über die BHS wird die Ausprägung einer EAE drastisch gemindert (Yednock et al., 1992, Baron et al., 1993). Diese Entdeckung führte zur Entwicklung des aktuell noch immer verwendeten Therapeutikums Natalizumab, ein Antikörper, der an VLA-4 auf Leukozyten bindet und effektiv deren Einwanderung ins ZNS hemmt (Rice et al., 2005, Kent et al., 1995, Yednock et al., 1992, Polman et al., 2006).

Zusammen vermittelt das Interaktionspaar VLA-4/VCAM-1 im Rahmen der MS die Adhäsion von T-Zellen an Gefäßen der weißen Substanz (Laschinger und Engelhardt, 2000, Baron et al., 1993). Somit unterhält das Bindungspaar durch Rekrutierung und Extravasation von Entzündungszellen die Inflammation im erkrankten MS-ZNS (Brocke et al., 1999, Sheremata et al., 2005, Bevilacqua, 1993). Zudem nimmt VLA-4 auch Einfluss auf die Zellfortbewegung, beispielsweise durch Verlangsamung zirkulierender Zellen aufgrund einer Bindung an CAMs auf Endothelzellen (Chigaev und Sklar, 2012, Sheremata et al., 2005). In der Interaktion von APZ mit  $CD4^+$ -T-Zellen kann über VCAM-1 ein kostimulatorisches Signal vermittelt werden, was in Aktivierung und Proliferation von ruhenden T-Zellen resultiert (Damle und Aruffo, 1991, Damle et al., 1993). Über diese Adhäsionsmoleküle ist es Makrophagen und Mikroglia möglich u.a. mit

T-Zellen Kontakt aufzunehmen oder mit Oligodendrozyten in der Nähe von Demyelinisierungsherden zu interagieren (Hailer et al., 1996, Cannella und Raine, 1995, Damle et al., 1993, Peterson et al., 2002). Die Interaktion dieser Zellpopulationen stellt wie in 1.1.2 beschrieben eine wichtige Schnittstelle in der MS Pathogenese dar, sodass dieses Zelladhäsionspaar VCAM-1/VLA-4 bedeutsame Forschungserkenntnisse verspricht.

### **1.3.2 ICAM-1 & LFA-1**

Das „Intercellular Adhesion Molecule 1“ (ICAM-1, CD54) ist ein CAM aus der Superfamilie der Immunoglobuline (Van De Stolpe und Van Der Saag, 1996, Springer, 1990). Im gesunden ZNS wird ICAM-1 auf der Oberfläche von Endothelzellen konstitutiv exprimiert (Bo et al., 1996, Dopp et al., 1994). Unter pathologischen Bedingungen wird dieses CAM vermehrt auch auf weiteren Zellen exprimiert, wie z.B. Astrozyten und mononuklearen Zellen (Shrikant et al., 1995, Sobel et al., 1990, Brosnan et al., 1995). Bei MS Patienten findet sich ICAM-1 auf Immunzellen wie Mikroglia und Makrophagen besonders in der Nähe von MS Läsionen (Bo et al., 1996, Dopp et al., 1994, Hofmann et al., 2002). Auch in der EAE steigt die Anzahl der ICAM-1-exprimierenden Zellen, vor allem bezüglich Endothelzellen: Bereits vor Auftreten erster Symptome ist eine gesteigerte ICAM-1-Expression im ZNS nachweisbar (Dopp et al., 1994, Matsuda et al., 1994). In aktiven MS-Läsionen lässt sich ein Anstieg der ICAM-1-Intensität auf der Endothelzelloberfläche verglichen mit pathologischen, aber nicht-inflammatorischen ZNS-Proben und verglichen mit gesunden ZNS-Proben detektieren (Bo et al., 1996, Sobel et al., 1990). Dabei zeigt sich wiederum eine zeitliche und örtliche Korrelation des Ausmaßes der ICAM-1-Expression zu der Anzahl an infiltrierten Leukozyten (Lee und Benveniste, 1999, Dopp et al., 1994). Auf Endothelzellen ist ICAM-1 Einfluss in die Extravasation von Lymphozyten involviert, ein essenzieller Schritt in der MS Pathogenese (Bevilacqua, 1993, Springer, 1990, Makgoba et al., 1988). Zudem dient ICAM-1 als kostimulatorisches Signal für B- und T-Lymphozyten im Rahmen der Antigen-Präsentation, z.B. zur Aktivierung zytotoxischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (Damle et al., 1992, Poudrier und Owens, 1994, Ybarrondo et al., 1994). Insbesondere auf aktivierten Mikroglia wird ICAM-1 verstärkt exprimiert und vermittelt die Phagozytose von Zelldebris, sowie die Interaktion mit Lymphozyten (Werner et al., 1998, Hailer et al., 1997). Als Ligand für ICAM-1 dient unter anderem das „Lymphocyte/Leukocyte Function Associated Antigen 1“ (LFA-1, CD11a/CD18) (Springer, 1990). Dieses Heterodimer

des  $\beta 2$ -Subtyps der Integrine tritt unter inflammatorischen Bedingungen verstärkt auf infiltrierenden Zellen in Gefäßnähe auf (Binnerts und Van Kooyk, 1999, Bo et al., 1996, Cannella und Raine, 1995). In MS Herden ist dieses CAM, neben Leukozyten, auf Mikroglia am Läsionsrand zu finden, auf denen es konstitutiv exprimiert wird (Akiyama und McGeer, 1990, Bo et al., 1996).

Die Funktion von LFA-1 wurde hauptsächlich im Hinblick auf T-Zellen erforscht und kann deren Aktivierung und Differenzierung unterstützen (Verma und Kelleher, 2017, Shimizu, 2003, Van Seventer et al., 1990). In der MS ist LFA-1 an der Extravasation von Immunzellen beteiligt und essenziell für die T-Zell-Adhäsion am Endothel mit anschließender Migration (Laschinger und Engelhardt, 2000, Walling und Kim, 2018, Male et al., 1992). So wird LFA-1 unter anderem für die Infiltration der in der MS Pathogenese bedeutenden Th17-Zellen benötigt (Rothhammer et al., 2011). Zudem nimmt LFA-1 auch Einfluss auf die supprimierende Wirkung von regulatorischen T-Zellen: In LFA<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigt sich eine verminderte regulatorische T-Zell-Zahl, insbesondere im ZNS, was mit einer gravierenderen EAE mit verstärkter Demyelinisierung und einer größeren Anzahl an CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im ZNS einhergeht (Tran et al., 2009, Gultner et al., 2010). Dies verdeutlicht, dass LFA-1 potenziell auch günstigen Einfluss auf den Erkrankungsverlauf nehmen kann. Zudem kann LFA-1 auf zytotoxischen T-Zellen an ICAM-1 auf toxischen Zielzellen binden und so deren Elimination vermitteln (Ybarrondo et al., 1994, Davignon et al., 1981). Weiterhin ist LFA-1 möglicherweise durch die Beteiligung an der Weiterleitung extrazellulärer Signale ins Zellinnere in der Aktivierung von Mikroglia involviert (Lub et al., 1995, Hynes, 1992).

In Interaktion vermögen ICAM-1 und LFA-1 daher an vielfältigen Prozessen in der MS teilzunehmen. Dies lässt vermuten, dass durch Blockade dieser CAM eine drastische Abweichung des Krankheitsverlaufs erzielt werden kann, jedoch erreichen Antikörper-Studien diesbezüglich keinen klaren Konsens. Neben ihrem Einfluss auf die Migration von Immunzellen über die Blut-Hirn-Schranke besitzen CAMs, u.a. durch ihre Expression auf Mikroglia, darüber hinaus noch vielfache Einflussgebiete, wodurch sich die Auswirkungen dieser CAM kaum möglich auf einzelne Aktionen beschränken lassen.

## 1.4 Ziel dieser Dissertation

Die Interaktion von Mikroglia und Makrophagen mit multiplen anderen Zellarten, die an der Pathogenese der MS beteiligt sind, wird wie beschrieben unter anderem durch CAMs ermöglicht. Da dieser Kontakt andere Zellen potentiell beeinflusst, können sich Mikroglia ggf. positiv oder negativ auf den Krankheitsverlauf auswirken. Insbesondere die vier genannten Moleküle ICAM-1, LFA-1, VLA-4 und VCAM-1 werden in dieser Arbeit im Fokus stehen. Deren funktionelle Relevanz, insbesondere hinsichtlich ihrer Expression auf Mikroglia, konnte bezüglich der Prozesse der MS und EAE noch nicht im Detail geklärt werden. Diese Dissertation soll den Einfluss von Zelladhäsionsmolekülen auf Mikroglia zu vier verschiedenen Erkrankungszeitpunkten im Verlauf der EAE untersuchen, um der Frage nachzugehen, ob die schädigenden oder regenerativen Funktionen durch Interaktionen begünstigt werden, die über diese CAMs vermittelt werden. Aus diesem Grund ist in dieser Arbeit von Interesse, wie sich der Krankheitsverlauf auf die Expression von CAMs auswirkt und umgedreht.

Falls sich zeigt, dass einige der CAMs ein distinktes Expressionsmuster über den Verlauf der EAE aufweisen, so soll diese CAM-exprimierende Zellpopulation der Mikroglia bzw. Makrophagen im nächsten Schritt zur weiteren Analyse selektiert werden. Die Subpopulation, welche das Adhäsionsmolekül in hohem Ausmaß exprimiert, wird der gering-exprimierenden Population vergleichend gegenübergestellt. Zudem soll das Expressionsmuster dieser CAMs auf Mikroglia der Expression auf den infiltrierten Makrophagen gegenübergestellt werden, um zu untersuchen, inwiefern diese unterschiedlichen myeloiden Zellpopulationen zu den CAM-vermittelten günstigen oder schädigenden Effekten beitragen können. Mittels qRT-PCR erfolgt eine Analyse der unterschiedlichen Populationen bezüglich ihrer Genexpression von anti- bzw. pro-inflammatorischen Genen, insbesondere von intrazellulären Botenstoffen wie beispielsweise Zytokinen. Dadurch sollen Rückschlüsse darauf gezogen werden können, inwiefern sich diese distinkte Zellpopulation der CAM<sup>high</sup>-exprimierenden Mikroglia auf potenzielle Interaktionspartner im MS-ZNS auswirken kann. Die so gewonnen Erkenntnisse würden als Basis für fortführende Forschung hinsichtlich der Relevanz von CAMs in der Interaktion von Mikroglia mit diversen Zellarten des ZNS im Rahmen der MS dienen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Firma/Hersteller</b>
<b>Autoklav Heraeus</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
<b>Analog Vortex Mixer</b>	VWR International GmbH, Darmstadt (Deutschland)
<b>BD FACS Canto II</b>	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
<b>BD FACS Aria II</b>	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
<b>Zellzählkammer Neubauer</b>	Brand , Wertheim (Deutschland)
<b>Zellkultur Lichtmikroskop</b>	Hund, Wetzlar (Deutschland)
<b>Zentrifuge Heraeus Fresco 21</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
<b>Zentrifuge Multifuge Heraeus XIR</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
<b>CFX Connect™ Real Time Detection System</b>	Bio-Rad Laboratories, München (Deutschland)
<b>Eppendorf “Research Plus Adjustable-volume” Pipetten</b>	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf (Deutschland)
<b>Kühl- und Gefrierschränke</b>	Liebherr, Bulle (Schweiz)
<b>Gefrierschrank (Sanyo)</b>	EWALD Innovationstechnik GmbH, Rodenberg (Deutschland)
<b>Werkbank “Horizontal Laminar Flow Hood Heraguard”</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
<b>Pipetus®</b>	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt (Deutschland)
<b>Schüttelplattform</b>	Edmund Bühler GmbH, Hechingen

	(Deutschland)
<b>Operationsbesteck</b>	Fine Science Tools Inc., Heidelberg (Deutschland)
<b>Thermozykler</b>	Peqlab GmbH, Erlangen (Deutschland)
<b>Werkbank "Vertical Laminar Flow Hood SAFE 2020"</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
<b>Wasserbad Aqualine AL18</b>	Lauda GmbH & CO. KG, Lauda-Königshofen (Deutschland)

### 2.1.2 Labor- und Verbrauchsartikel

<b>Produkt</b>	<b>Firma/Hersteller</b>
<b>Zellkulturschale, Polystyrol, Ø 60 mm + 100 mm</b>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (Deutschland)
<b>Zellsieb, Nylonnetz, 100 µm</b>	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
<b>Falcon™ Zentrifugenröhrchen, Polypropylen, 15 mL + 50 mL</b>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (Deutschland)
<b>Eppendorf Gefäße 1,5 mL + 2 mL</b>	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf (Deutschland)
<b>Injektionsnadel 20G + 27G</b>	BD Microlance, Gateshead (UK)
<b>PCR Multiplate™, 96 Wells</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (Deutschland)
<b>Pipettenspitzen 10 µL, 200 µL, 1000 µL</b>	VWR International GmbH, Darmstadt (Deutschland)
<b>Filter Pipettenspitzen 10 µL, 100 µL, 200 µL und 1000 µL</b>	Starlab, Hamburg (Deutschland)
<b>Polystyrol Teströhrchen mit rundem Boden, 5 mL (FACS Röhrchen)</b>	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
<b>Skalpell</b>	B. Braun AG, Melsungen (Deutschland)
<b>Serologische Pipetten, Polystyrol, 5 mL + 10 mL + 25 mL</b>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (Deutschland)

<b>Spritze, 1 mL + 2 mL + 30 mL</b>	B. Braun AG, Melsungen (Deutschland)
-------------------------------------	--------------------------------------

### 2.1.3 Chemikalien & Reagenzien

<b>Material</b>	<b>Firma/Hersteller</b>
<b>Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl)</b>	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
<b>Albumin, bovin (BSA)</b>	Serva Electrophoresis, Heidelberg (Deutschland)
<b>Aqua bi. dest. steril</b>	B. Braun AG, Melsungen (Deutschland)
<b>Kollagenase</b>	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
<b>D-Glucose</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
<b>Dispase</b>	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
<b>DNase I</b>	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel
<b>dNTP Mix (je 10 mM)</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
<b>Dulbeccos PBS mit Ca<sup>2+</sup> &amp; Mg<sup>2+</sup></b>	Gentaur, Kampenhout (Belgium)
<b>Ethanol 100 % (v/v) (EtOH)</b>	AppliChem GmbH, Darmstadt (Deutschland)
<b>Ethanol 70 % (v/v) (EtOH)</b>	AppliChem GmbH, Darmstadt (Deutschland)
<b>Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
<b>EDTA Dinatrium Salz Dihydrat (Na<sub>2</sub>EDTA) Lösung (0,5 M)</b>	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
<b>Fetales Kälberserum, Hitzeinaktiviert (FBS)(FCS)</b>	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
<b>HEPES</b>	Life Technologies Corp., Grand Island (USA)
<b>IMDM</b>	Life Technologies Corp., Grand Island (USA)

<b>Isofluran</b>	Abbot, Wiesbaden (Deutschland)
<b>iQ™ SYBR® Green Supermix</b>	Bio-Rad Laboratories, München (Deutschland)
<b>KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2×)</b>	KAPA Biosystems, Wilmington (USA)
<b>Ketamin</b>	Hameln Pharma Plus GmbH, Hameln (Deutschland)
<b>L-Glutamin (200 mM)</b>	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
<b>Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>)</b>	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
<b>NaCl Lösung 0,9 %</b>	B. Braun AG, Melsungen (Deutschland)
<b>Percoll®</b>	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
<b>Propidium Iodid (PI)</b>	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
<b>Rompun 2 % Injektionslösung (Xylazin)</b>	Bayer Health Care, Leverkusen (Deutschland)
<b>RPMI 1640</b>	Life Technologies Corp., Grand Island (USA)
<b>Trypanblau</b>	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
<b>Penicillin / Streptomycin (P/S) (10,000 Einheiten Penicillin und 10 mg Streptomycin per mL)</b>	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
<b>7-Aminoactinomycin D “Viability Staining Solution”</b>	BioLegend, San Diego (USA)
<b>β-Mercaptoethanol</b>	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)

### 2.1.4 Kits

Kit	Company
<b>DNase I, rekombinant, RNase frei mit 10x Inkubationspuffer</b>	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel
<b>Hooke Kit™ MOG<sub>35-55</sub>/CFA Emulsion + PTX</b>	Hooke Laboratories, Inc. Lawrence (USA)
<b>RNeasy® Micro Kit</b>	Qiagen, Hilden (Deutschland)
<b>Superscript™ II Reverse Transkriptase + Superscript™ II First Strand Puffer + DTT</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
<b>Superscript™ III First Strand Synthesis System</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

### 2.1.5 Puffer, Medien und Lösungen

Puffer/Lösungen	Bestandteile
<b>Anästhetikum</b>	20 mL 50 mg/mL Ketamin 2,5 mL 2% Rompun in 77.5 mL 0.9 % NaCl Lösung
<b>FACS Puffer</b>	0,5 % BSA in PBS
<b>Lyse Puffer</b>	8,29 g/l NH <sub>4</sub> Cl 1 g/l KHCO <sub>3</sub> 37,2 mg/l NA <sub>2</sub> EDTA in dH <sub>2</sub> O
<b>MACS Puffer</b>	0,5 % BSA 0,5 M EDTA in PBS

Medium	Bestandteile
--------	--------------

<b>Mausmedium (MM)</b>	10 % FCS 1 % P/S 1 % L-Glutamin 0,1 % $\beta$ -Mercaptoethanol 1 % HEPES in RPMI
<b>Waschmedium (WM)</b>	5 % FCS 1 % P/S 1 % HEPES in RPMI

### 2.1.6 Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Klon</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Konzentration in mg/mL</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
<b><math>\alpha</math>CD11a/ CD18-PE (<math>\alpha</math>LFA-1)</b>	H155-78	rat- $\alpha$ -mouse monoclonal IgG1, $\kappa$	0,2	BioLegend, San Diego (USA)	1:200
<b><math>\alpha</math>CD16/ <math>\alpha</math>CD32 (FC-Block)</b>	2.4G2	rat- $\alpha$ -mouse monoclonal IgG2b, $\kappa$	0,5	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)	1:100
<b><math>\alpha</math>CD49d-FITC (<math>\alpha</math>VLA-4)</b>	R1-2	rat- $\alpha$ -mouse monoclonal IgG2b, $\kappa$	0,5	BioLegend, San Diego (USA)	1:400
<b><math>\alpha</math>CD106- PE/Cy7 (<math>\alpha</math>VCAM-1)</b>	429 (MVCAM.A)	rat- $\alpha$ -mouse monoclonal IgGa, $\kappa$	0,2	BioLegend, San Diego (USA)	1:500
<b><math>\alpha</math>CD54-Biotin (<math>\alpha</math>ICAM-1)</b>	3E2	hamster- $\alpha$ - mouse monoclonal IgG1, $\kappa$	0,5	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)	1:200

<b>αCD45.2- AF700</b>	104	mouse-α- mouse monoclonal IgG2a, κ	0,2	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	1:100
<b>αCD11b-APC</b>	M1/70.15	rat-α-mouse monoclonal IgG2b	0,4	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	1:400
<b>αBiotin- Horizon V450</b>		Streptavidin	0,5	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)	1:400

### 2.1.7 qRT-PCR Primer

<b>Gen</b>	<b>Sequenz des Vorwärtsprimer</b>	<b>Sequenz des Rückwärtsprimer</b>	<b>Konzen- tration</b>	<b>Tm [°C]</b>
<b>Murine CCL-2</b>	ATCGGAACCAAATGA GAT	TCAGATTTACGGG TCAAC	200 nM	58
<b>Murine Arginase-1</b>	AAGGTCTCTACATCA CAGAA	GAAGCAAGCCAA GGTTAA	200 nM	60
<b>Murine IL-4</b>	TCATCCTGCTCTTCT TTCTC	TCCTGTGACCTCG TTCAA	200 nM	57
<b>Murine TNF-α</b>	TCTTGTGTTTCTGAG TAG	GTCTGTATCCTTC TAACTTA	200 nM	56
<b>Murine iNOS</b>	TGTCCTATCTCCATT CTACTAC	TGACCTTTCGCAT TAGCA	200 nM	61
<b>Murine RPS29</b>	CAAATACGGGCTGA ACAT	GTCGCTTAGTCCA ACTTAA	200 nM	58

## 2.1.8 Mäuse

### 2.1.8.1 Wildtyp-Mäuse

Stamm	Labor
<b>C57BL/6 (B6)</b>	Janvier Labs, Laval (Frankreich)

### 2.1.8.2 Genetisch-modifizierte Mäuse

Stamm	besondere Eigenschaften	Referenz/Zuchtprogramm
<b>B6.CX3CR1.GFP</b>	grün markierte CX3CR1 <sup>+</sup> - Mikroglia-Zellen	(Jung et al., 2000)

## 2.1.9 Software

Software	Verwendung	Firma
<b>Bio-Rad CFX Manager</b>	Auswertung der qRT-PCR Daten	Bio-Rad Laboratories, München (Deutschland)
<b>FACSDiva</b>	FACS Analyse	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
<b>FlowJo</b>	FACS Analyse	Tree Star, Ashland (USA)
<b>GraphPad Prism 7</b>	Statistische Analyse	GraphPad Software, Inc., La Jolla (USA)
<b>Office 2007/2010</b>	Textentwurf, Berechnungen, Entwerfen von Grafiken	Microsoft Corp., Redmond (USA)

## 2.2 Methoden

Grundsätzlich wird vor jedem Gebrauch die Werkzeugbank sterilisiert oder mit 70% Ethanol desinfiziert. Der Abfall wurde für 20 min bei 121°C und einem Druck von 1 bar autoklaviert.

### 2.2.1 Manuelle Zellzählung

Die Zellzählung erfolgt manuell, indem die Zellen in einem definierten Volumen aufgenommen werden. Je nach erwarteter Zellzahl wird Trypanblau diesem Aliquot in einem Verhältnis von 1:5 oder 1:10 zugefügt. Durch Zufügen dieses Farbstoffes lässt sich eine lichtmikroskopische Unterscheidung zwischen lebenden Zellen, die sich hier farbfrei darstellen und toten, also blau gefärbten, Zellen treffen. Dieser Effekt wird dadurch erreicht, dass Trypanblau ausschließlich durch geschädigte Zellmembran toter Zellen gelangen kann und folglich diese Zellen im Gegensatz zu lebenden Zellen anfärbt (Strober, 2001). Nachdem die Flüssigkeit auf eine Neubauer Zählkammer aufgetragen wird, werden die Zellen unter dem Lichtmikroskop gezählt. Um einen annähernden Durchschnittswert ermitteln zu können, werden je vier Quadrate ausgezählt und daraus folgendermaßen ein Mittelwert der Zellzahl lebender Zellen gebildet:

Gesamtzahl lebender Zellen = gezählte Zellen pro Quadranten \*  $10^4$  (Zählkammerkoeffizient) \* Verdünnungsfaktor durch Trypanblau \* Volumen der Zellsuspension

### 2.2.2 FACS Analyse und Sort

Im „Fluorescence Activated Cell Sorting“ (FACS, im Deutschen auch als Durchflusszytometrie bezeichnet) lassen sich molekulare Eigenschaften von Zellen quantitativ bestimmen und analysieren. Mithilfe von Antikörpern können Zellpopulationen auf Einzelzellebene auf ihre Morphologie untersucht und Oberflächenstrukturen erkannt werden. In diesem Verfahren wird ein fokussierter Laserstrahl auf die mit Antikörpern gefärbte Einzelzellsuspension gerichtet und anschließend die Ablenkung des Laserstrahls detektiert (Hulett et al., 1973).

Streuung und Beugung des Lichtstrahles durch die Zellen erlauben Rückschlüsse auf morphologische Eigenschaften, wie etwa die Zellgröße und intrazelluläre Beschaffenheit. So wirkt sich das Volumen der Zelle etwa auf das Vorwärtsstreulicht („Forward Scatter“, FSC) aus, wobei ein größeres Zellvolumen

mit einem höheren FSC einhergeht. Im Unterschied dazu ist das Seitwärtsstreulicht („Sidewards Scatter“, SSC) von intrazellulären Gegebenheiten wie Zellkernmorphologie, Granularität und Vesikelgehalt abhängig.

Durch Zuhilfenahme Fluoreszenzfarbstoff-markierter Antikörper gegen bestimmte Zellstrukturen kann eine Markierung und Analyse der Zellen aufgrund dieser Oberflächeneigenschaften erfolgen. Dabei lässt sich eine Zellsuspension simultan mit verschiedenen Fluorochromen messen, da sich die Farbstoffe in ihren Emissionsspektren unterscheiden, die dann auf diversen Kanälen detektiert werden können.

Des Weiteren lässt sich die Zellsuspension im „FACS Sort“ je nach markierter Zieleigenschaft getrennt in diverse Populationen sortieren.

In den Experimenten dieser Arbeit wird das Gerät FACS Canto II verwendet, um die Oberflächenmerkmale per FACS zu analysieren, während das FACS Aria II Gerät im FACS Sort zur Trennung von Zellpopulationen genutzt wird.

Die Analyse der erhaltenen FACS Daten erfolgt mit der Software FlowJo.

### **2.2.2.1 Oberflächenfärbung**

Um die Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern zu färben wird der Zellprobe in zwei Waschschritten je 1ml FACS Puffer zugefügt und bei 550g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands werden je 100 µL vom Färbemix, der neben den Fluoreszenz-markierten Antikörper in entsprechender Verdünnung mit FACS Puffer auch FC-Blocker zur Optimierung der Bindungsspezifität enthält, auf das Zellpellet pipettiert. Nach Vermischung der Proben inkubieren diese nun im Dunkeln bei 4°C für 10 min. Zum Herauswaschen ungebundener AK erfolgt ein erneuter Waschschriff mit 1ml FACS Puffer durch Zentrifugieren bei 550g, 4°C für 5 min. Bei Verwendung eines Biotin-gekoppelten Antikörpers wird das Prozedere in zwei Schritte unterteilt: Im ersten Schritt wird dieser AK in entsprechender Verdünnung in FACS Puffer zusammen mit einem FC-Blocker zum Zellpellet hinzugefügt, wie beschrieben inkubiert und daraufhin gewaschen, bevor im zweiten Schritt dann ein zweiter Färbemix mit den restlichen Antikörpern (inklusive Streptavidin-Antikörper) hinzugegeben, erneut inkubiert und gewaschen wird. Die Zellsuspension wird anschließend in 200 µL FACS Puffer aufgenommen und in ein FACS Röhrchen übertragen.

### **2.2.2.2 Lebend-Tot-Differenzierung**

Um eine Unterscheidung der Zellen bezüglich ihrer Viabilität zu erlauben, wird sowohl PI, als auch 7-AAD eingesetzt.

7-AAD ist ein DNA-interkalierender Farbstoff, der in Zellen, die keine intakte Zellmembran besitzen, eindringen und im FACS analysiert werden kann. Da sich 7-AAD also ausschließlich in nicht-viablen Zellen einlagert, ist es ein Avitalfarbstoff. Beim Anfärben von toten Zellen mit 7-AAD werden 3  $\mu\text{L}$  pro 1 Mio. Zellen zusammen mit dem Färbemix aufgetragen und anschließend wird die Zellprobe inkubiert und gewaschen.

Auch PI (Propidiumjodid) kann intakte Zellmembranen nicht durchdringen und ist somit ein Marker für tote Zellen, indem es sich nach Diffusion in die Zelle mit der DNA interkaliert. Um das Eindringen von PI in gesunde Zellen zu minimieren und nur tote Zellen anzufärben, wird 1  $\mu\text{L}$  dieses Farbstoffs erst unmittelbar vor der Messung am FACS Gerät hinzugefügt.

### **2.2.3 Präparation der Mäuse**

Vorbereitend auf die Präparation der Versuchstiere werden die Operationsinstrumente mit 70% Ethanol desinfiziert. Durch eine tödliche intraperitoneale Injektion von 1ml eines Anästhetikums, zusammengesetzt aus steriler 0,9% NaCl Lösung mit Ketamin und Rompun, werden die Mäuse geopfert. Die Operation beginnt nach Erlöschen der Reflexzeichen der Maus mit Desinfektion, Fell- und Hautschnitt, sowie nachfolgender Ablösung der Abdominalhaut von der -höhle um die Milz präparieren zu können.

#### **2.2.3.1 Extraktion des Milz-Gewebe**

Nach Freilegung der Abdominalhöhle wird diese mit sterilen Operationsscheren eröffnet. Die Milz wird durch Pinzetten von ihren Nachbarorganen separiert, extrahiert und in ein Falcon mit 5ml Mausmedium überführt.

#### **2.2.3.2 Extraktion des ZNS-Gewebe**

Zum vollständigen Entbluten der Mäuse werden diese noch vor Sezieren des ZNS mit PBS perfundiert, um so die Anzahl an Blutzellen im ZNS zu minimieren. Bei diesem Verfahren erfolgt eine Durchtrennung des Diaphragmas und Entfernung des Sternums. Durch diese Eröffnung des Thorax und Freilegung des Herzens kann nun der rechte Herzvorhof mit einer Operationsschere eröffnet werden. Über

eine Kanüle im Apex des linken Ventrikels werden 20-30ml PBS in den Kreislauf der Maus injiziert. Nach erfolgreicher Perfusion werden ZNS und Rückenmark in ein Falcon mit 5 mL IMDM überführt.

## **2.2.4 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis**

Das Modell der EAE ist weithin etabliert und wird häufig eingesetzt, um in vivo Vorgänge ähnlich der MS zu untersuchen, wie etwa entzündliche Vorgänge, Axonverlust, Demyelinisierung und Gliose (Denic et al., 2011). Bei dem Verfahren der aktiven Induktion einer EAE werden den Versuchstieren Gewebeanteile oder Peptide des ZNS gespritzt, woraufhin die T-Zell-vermittelte Immunität gegen diese Antigene induziert wird (Giralt et al., 2018). Durch die Applikation von Pertussis Toxin wird zusätzlich die Blut-Hirn-Schranke angegriffen und ermöglicht es peripheren Immunzellen in das ZNS einzudringen.

Die Experimente mit Tieren dieser Arbeit werden in Übereinstimmung mit dem Deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Alle Tiere werden in Gruppen von 2-4 Mäusen in separat ventilierten Käfigen in pathogen-freiem Milieu gehalten, mit einem Tag-/Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden. Im Speziellen werden in den Versuchen dieser Arbeit Mäuse verwendet, die zwischen 9-13 Wochen alt waren und mindestens eine Woche Zeit nach Umsetzung hatten, um sich an die Tierstallbedingungen zu akklimatisieren.

Für die aktive EAE bei C57BL/6 Mäusen werden entweder subkutan 200 µL einer Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG)<sub>35-55</sub> Lösung in CFA („complete Freund's adjuvant“), welches das abgetötete Mycobakterium tuberculosis (H37RA Stamm) enthält und somit die Immunantwort der Tiere intensiviert, appliziert (Hooke Kit). Anschließend werden 100 ng Pertussis Toxin (PTX) in PBS intraperitoneal am ersten Tag der Immunisierung gespritzt und am darauffolgenden Tag erneut.

Alternativ erfolgt die aktive EAE Immunisierung durch subkutane Applikation einer Lösung aus 100-200 µg MOG plus 400-1000 µg H37Ra initiiert. Am Tag der Immunisierung, sowie zwei Tage darauf werden 400 ng PTX in PBS intraperitoneal appliziert.

Die immunisierten Mäuse werden täglich auf die Intensität der klinischen Symptome untersucht. Dabei wird je nach Ausprägung und Schwere der Symptomatik ein Symptomwert („Score“) nach dem folgenden Muster erhoben:

Symptomwert	klinische Symptome
0	keine Symptome einer EAE ersichtlich
0,5	Parese des Schwanzes
1	Plegie des Schwanzes
2	Parese der Hinterbeine
3	Plegie der Hinterbeine
3,5	Plegie der Hinterbeine und Parese der Vorderbeine
4	Plegie der Hinter- und Vorderbeine
5	moribund oder verstorben

## 2.2.5 Zellselektion

### 2.2.5.1 Aufbereitung der Zellen des ZNS

Die in 2.2.3.2 gewonnenen ZNS-Proben werden aus dem IMDM in eine Petrischale überführt und mithilfe eines Skalpells zerkleinert. Diese ZNS Fragmente werden zurück in den Falcon mit IMDM überführt. Anschließend werden jeder Probe 10 mg/mL Kollagenase/Dispase, 10 mg/mL Kollagenase, sowie 200 U/mL DNase hinzugefügt, um mögliche Zellkonglomerate zu zersetzen. Dieser Mix inkubiert für 30 min bei 37°C im Wasserbad und dabei alle 5 min mithilfe des Vortexschüttlers gemischt. Nach dieser enzymatischen Verdauung wird das Gewebe durch eine Nylonmembran (70-100 µm) gefiltert. Daraufhin erfolgt ein Waschschrift mit 45 mL IMDM. Die Zellsuspension wird nun bei 550 g und 4°C für 5 min zentrifugiert.

Zur Isolierung mononukleärer Zellen des ZNS vom Rest des Gewebes wird ein 30/70-Percoll-Gradient aufgebaut. Dazu werden je Probe 5 mL einer 70%-igen Percoll-Lösung (in PBS) in einem 15 mL Falcon vorbereitet. Ebenso werden 5 mL 30%-iges Percoll (in IMDM) zum Zellpellet hinzugegeben. Im Folgenden wird diese Zelllösung vorsichtig auf das vorbereitete 70%-ige Percoll geschichtet. Dieser Gradient wird bei Raumtemperatur für 30 min bei 750 g zentrifugiert, wobei beachtet wird, dass die Beschleunigung und Abbremsung auf 1 gestellt ist. Nach der Zentrifugation wird zunächst die Fettschicht, die sich am oberen Teil des Gradienten gesammelt hat, mit einer Pipette abgesaugt und verworfen. Die für diese Versuche erwünschten mononukleären Zellen werden in der Interphase

zwischen 30%-iger und 70%-iger Percoll-Lösung erwarten. Vorsichtig werden daher die Zellen aus diesem Grenzbereich des Gradienten entnommen und in 40 mL MACS Puffer übertragen. Anschließend erfolgt die Zentrifugation bei 550 g, 4°C für 5 min. Das Zellpellet wird in 1 mL MACS Puffer gelöst und anschließend per manueller Zellzählung die gewonnene Anzahl mononuklearer Zellen pro aufgearbeitetem ZNS bestimmt.

### **2.2.5.2 Aufbereitung der Zellen der Milz**

Wie in 2.2.3.1 erläutert, werden die Milz-Proben in 5 mL Mausmedium für das weitere Prozedere bereitgehalten. Die Milz mitsamt Flüssigkeit wird durch eine Nylonmembran (70-100 µm) gerieben und dadurch zerkleinert. Im Anschluss daran wird das Nyloonsieb in zwei Waschschrritten mit je 10 mL Waschmedium gewaschen und die erhaltene Zelllösung bei 550 g, 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes werden 10 mL Lysepuffer verwendet, um durch wiederholtes Resuspendieren der Zellprobe Erythrozyten zu lysieren. Durch Zugabe von 5 mL Waschmedium wird der Lysevorgang unterbrochen. Nach erneuter Zentrifugation bei 550 g, 4°C für 5 min wird das Zellpellet in 30 mL MACS Puffer aufgenommen. Auch hier erfolgt abschließend eine Bestimmung der Zellzahl per manueller Zellzählung.

### **2.2.5.3 FACS Sort der Mikroglia & Makrophagen**

Die gewonnenen Zellproben aus Milz und ZNS werden daraufhin mit der in 2.2.2.1 dargestellten Extrazellulärfärbung durch Fluoreszenz-markierte Antikörper angefärbt. Dazu werden je 100 µL Färbemix pro Zellpellet im 1,5 mL Eppendorf Gefäß zugegeben, um die jeweilige erwünschte Oberflächenstruktur zu markieren. In dieser Arbeit kommen konkret Fluoreszenz-markierte Antikörper gegen CD11b, CD45.2, LFA-1, VLA-4, ICAM-1, SA und VCAM-1 zum Einsatz. Des Weiteren wird ein Antikörper zur Blockade des FC-Anteils verwendet und 7-AAD um eine Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen zu ermöglichen. Die gefärbte und gewaschene Zellprobe wird in 250 µL FACS Puffer aufgenommen. Schließlich werden die Proben im FACS Aria II analysiert und anschließend in 150 µL vorgelegtem Mausmedium sortiert. Dabei werden die 7AAD<sup>-</sup>, CD11<sup>+</sup> und CD45<sup>low</sup> Zellen in Subpopulationen unterteilt, bei der eine Population eine starke LFA-1-Expression zeigt, wohingegen die andere Subgruppe LFA-1 nur wenig beziehungsweise gar nicht exprimiert. Die nun sortierten Zellen werden mit 1 mL

Mausmedium aufgefüllt und bei 550 g, 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wird das Zellpellet bei -80°C eingefroren.

### 2.2.6 RNA Isolation

Das RNeasy® Micro Kit wird den Herstellerangaben entsprechend zur Isolation der RNA aus den sortierten Zellen verwendet, da pro Probe weniger als  $5 \cdot 10^5$  Zellen gewonnen werden.

Dementsprechend wird nach sorgfältigem Säubern der Arbeitsfläche und verwendeten Materialien dem eingefrorenen Zellpellet 350 µL RLT Puffer, sowie 3,5 µL β-Mercaptoethanol zugefügt. Mithilfe einer 20 G Kanüle wird die Lösung mehrfach resuspendiert, um somit die Zellen zu lysieren und die Probe zu homogenisieren. Unter Verwendung aller Rückstände aus der verwendeten Kanüle werden 350 µL 70%-igen Ethanol hinzugegeben, um ebenfalls die Lyse zu fördern. Nach Vermischen der Lösung wird diese auf eine RNeasy MinElute Spin Säule auf einem 2 mL Sammelgefäß aufgetragen und bei 8000 g, Raumtemperatur für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und 350 µL RW1 Puffer auf die Säule zugegeben. Die Proben werden erneut zentrifugiert (8000 g, RT für 1 min) und der Durchfluss entsorgt. Danach werden 80 µL des Inkubationsmixes, bestehend aus 10 µL DNase I und 70 µL RDD Puffer, auf die Säulenmembran gegeben und bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert, um sicher zu stellen, dass ausreichend Zeit für die DNA-Verdauung gegeben ist. Anschließend werden 350 µL RW1 auf die Säule pipettiert und bei 8000 g, RT für 1 min zentrifugiert. Die nun auf ein neues Sammelgefäß platzierte RNeasy MinElute spin Säule wird mit 500 µL RPE Puffer aufgefüllt. Nach Zentrifugation (8000 g, RT, 1 min) wird der Durchfluss verworfen und 500 µL 80%-igen Ethanol beigefügt. Dieses Mal erfolgt die Zentrifugation für 2 min bei 8000 g, RT, bevor die Säule auf ein neues Sammelgefäß gesteckt wird. Anschließend wird bei offenem Deckel der Probenbehältnisse für 5 min bei voller Geschwindigkeit (21000 g), RT zentrifugiert, um die Säulenmembran zu trocknen. Die Säule wird nun auf ein neues 1,5 mL Eppendorf Gefäß transferiert und durch die Zugabe von 18 µL RNase-freiem Wasser, direkt auf die Membranmitte, wird die erhaltene RNA aus der Membran herausgelöst. Nach einer kurzen Inkubationsperiode von 3 min folgt eine letzte Zentrifugation bei voller Geschwindigkeit (21000 g), RT für 2 min. Die gewonnene RNA Lösung wird im anschließenden Schritt für die cDNA Synthese verwendet.

## 2.2.7 cDNA Synthese

In diesem Verfahren wird aus der erhaltenen RNA Lösung cDNA synthetisiert. Dazu wird das SuperScript® III First-Strand Synthesis System und die gesamte RNA Menge verwendet, da aufgrund einer geringen Zellzahl der Ursprungsprobe ein geringer RNA Gehalt zu erwarten war. Zu Beginn werden 5 µL Random Hexamer Primer (50 ng/µL) zu den 18 µL RNA Lösung hinzugefügt. Dies inkubiert bei 65°C für 5 min bevor die Proben auf Eis gestellt werden. In dieser Zeit wird ein Mastermix aus den folgenden Komponenten pro Probe erstellt:

Material	Volumen (µL)
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	10
<b>10x RT Puffer</b>	5
<b>0,1 M DTT</b>	5
<b>dNTP mix (je 10 mM)</b>	5
<b>RNaseOUT</b>	1
<b>Superscript III Reverse Transkriptase (250 Units)</b>	1

Die insgesamt 27 µL Mastermix werden auf die Probe aufgetragen und im Thermocycler nach folgendem Programm erhitzt:

Zyklus	Temperatur (°C)	Zeit
<b>1</b>	25	10 min
<b>2</b>	50	50 min
<b>3</b>	85	5 min
<b>4</b>	4	Lagerung

Nach Ablauf der Zyklen wird die cDNA abhängig von benötigtem Volumen für qRT-PCR mit 20-40 µL Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Die fertigen cDNA Proben werden dann bei -20°C eingelagert.

## 2.2.8 qRT-PCR

In der quantitativen „Real Time Polymerase Chain Reaction“ (qRT-PCR, Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion) wird die cDNA der Probe im CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System amplifiziert und analysiert. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer sind bereits bezüglich Amplifikationseffizienz und –spezifität getestet worden, sodass sich eine optimale Konzentration jedes Primers von 200 nM ergab. Daher wird pro Untersuchungsprobe ein Mix nach gleichem Schema aus den folgenden Komponenten vorbereitet:

Material	Volumen (µL)
<b>iQ SYBR® Green Supermix</b>	10
<b>„Forward“ Primer</b>	0,4
<b>„Reverse“ Primer</b>	0,4
<b>Nuklease-freies Wasser</b>	5,2

Die 16 µL dieses Mixes werden zu je 4 µL der Probe in eine 96-Well Platte hinzugegeben. Dabei wird jede cDNA Probe in 3 Wells aufgeteilt, um in dreifacher Ausführung analysiert zu werden. Anschließend wird die Platte versiegelt, mit einer Handschleuder zentrifugiert und in das CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System platziert. Dort laufen diese PCR-Schritte ab:

Zyklus	Vorgang	Temperatur ( °C)	Dauer
<b>1</b>	initiale Denaturierung	95	3 min
<b>2-41</b>	Denaturierung	95	10 s
	Hybridisierung („Annealing“) & Elongation	Primerabhängige T <sub>m</sub>	45 s
	Fluoreszenz-Quantifizierung		
<b>42</b>	Denaturierung	95	1 min
<b>43</b>	Abkühlung	55	1 min
<b>44</b>	Schmelzkurve	55-95	Anstieg: 0,5 °C / 10s

Mithilfe der Bio-Rad CFX Manager Software werden die Messergebnisse analysiert. Dabei werden Triplets ausgeschlossen, deren Standardabweichung über 0,5 betrug. Die Genexpression wurde auf RPS29 (Ribosomales Protein S29) normalisiert

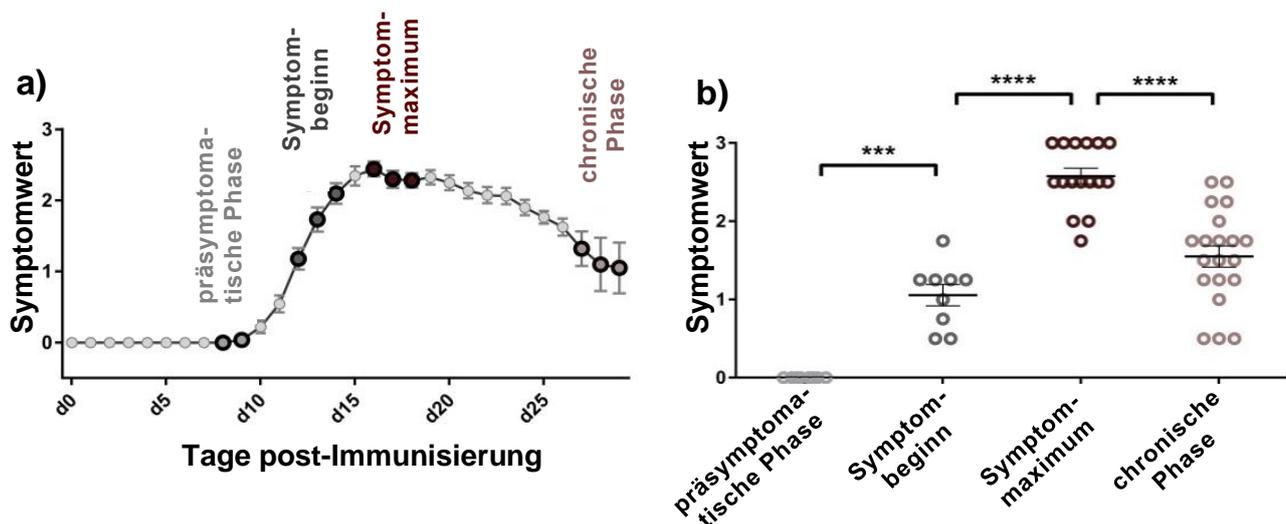
### **2.2.9 Statistische Auswertung**

Falls nicht anderweitig angegeben wird für die statistische Auswertung der Daten das Programm GraphPad Prism 7 verwendet. Zur Ermittlung der Signifikanz der mittleren Differenz zwischen diversen Gruppen findet entweder der t-Test oder die einfache ANOVA Verwendung, sowie Tukey's multiple Mehrfachvergleichstest. Das Signifikanzlevel dieser Tests liegt bei  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*), sowie  $p \leq 0,0001$  (\*\*\*\*). Falls nicht abweichend angegeben sind die Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung eines Verfahrens zur Analyse von Zelladhäsionsmolekülen auf myeloiden Zellen

##### 3.1.1 Symptomverlauf und FACS Analyse der myeloiden Zellen

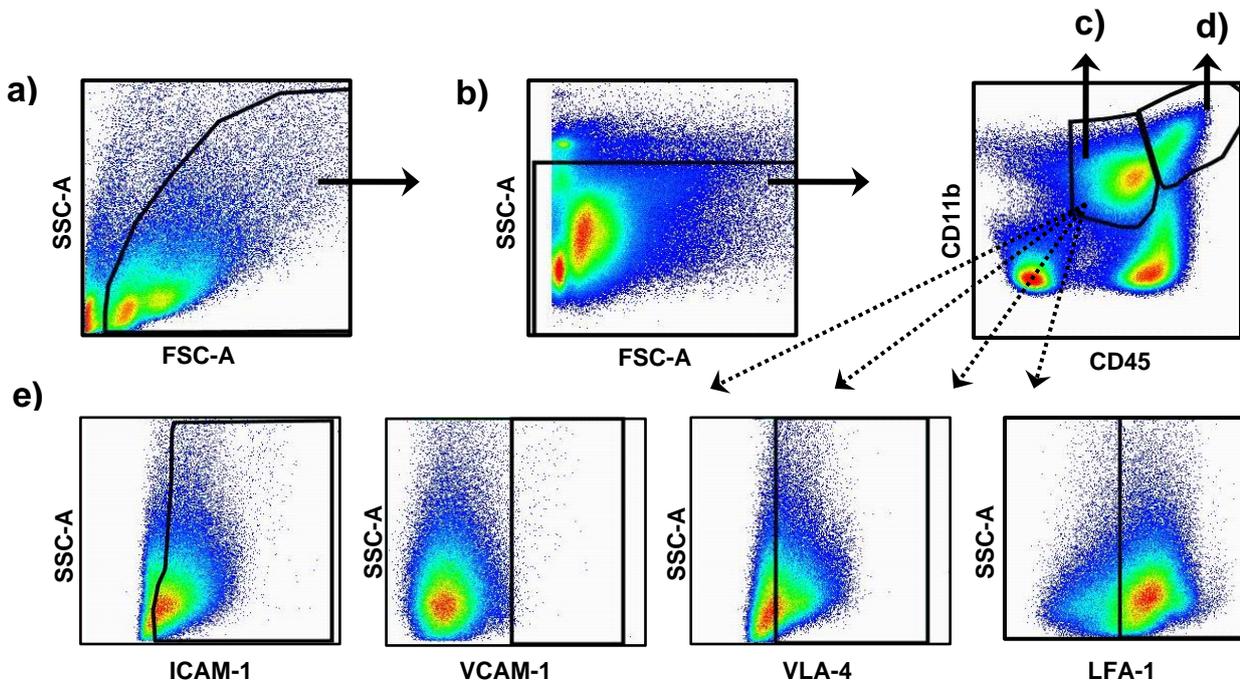


**Abbildung 1: Verlauf der EAE Erkrankung und klinischer Symptomatik zu den vier untersuchten Krankheitszeitpunkten**

- a) exemplarischer Verlauf eines EAE Durchlauf; dargestellt sind die Mittelwerte des Symptomwerts (Mean Clinical Score, MCS), sowie SEM aller verwendeten Versuchstiere. Farblich markiert sind die vier Zeitpunkte der Zellentnahme in diesem EAE Durchlauf.
- b) Ausprägung der klinischen Symptomatik der mit MOG<sub>35-55</sub> immunisierten Mäuse zu den vier Krankheitsstadien. Insgesamt wurden Daten aus fünf unabhängigen EAE Durchläufen erhoben, mit Probenentnahme jeweils in der präsymptomatischen Phase (Tag 8-9 post-Immunisierung, MCS 0), zu Symptombeginn (d12-14, MCS 1,06), Phase des Symptommaximums (d16-18, MCS 2,58) und chronischer Phase (d26-29, MCS 1,55)

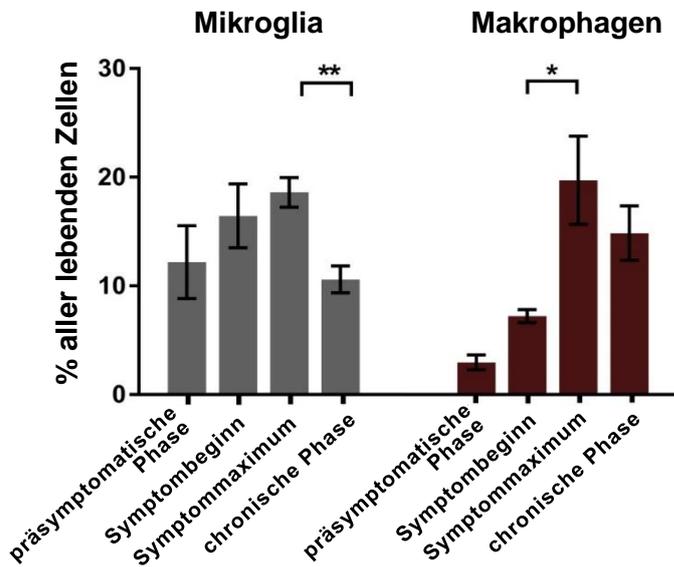
Um in dieser Dissertation detailliert untersuchen zu können, inwiefern die Expression von Adhäsionsmolekülen auf myeloiden Zellen des CNS im Verlauf der Erkrankung reguliert ist, wurden durchflusszytometrische ex-vivo Analysen der Zelladhäsionsmoleküle (CAMs), sowie PCR-Analysen der intrazellulären Genprodukte durchgeführt. Dazu wurden in insgesamt fünf unabhängigen EAE Durchläufen zu den vier verschiedenen Krankheitsstadien der präsymptomatischen Phase, Symptombeginn, Symptommaximum und chronischer Phase Zellen sowohl aus Gehirn und Rückenmark als auch der Milz gewonnen. Diese wurden mittels FACS Analyse auf die Expression von CAMs untersucht, von denen wie beschrieben bekannt ist, dass sie von myeloiden Zellen des ZNS exprimiert werden können (s. Kapitel 1.3). Wie in Abbildung 1 dargestellt, konnten

signifikante Unterschiede in der Krankheitssymptomatik zu den unterschiedlichen Zeitpunkten im Verlauf der EAE festgestellt werden. In der Analyse der myeloiden Zellpopulationen im ZNS hinsichtlich ihrer CAM-Expression wurden  $CD45^{low}CD11b^{+}$  und  $CD45^{high}CD11b^{+}$ -Zellen untersucht (s. Abb. 2). Anhand der CD45-Intensität lässt sich eine grobe Einteilung in ZNS-residente Mikroglia und ZNS-infiltrierende Makrophagen aus der Peripherie vornehmen (Greter et al., 2015, Peferoen et al., 2015). Demnach wird im Folgenden die als  $CD45^{low}CD11b^{+}$  beschriebene Population simplifiziert als Mikroglia bezeichnet.



### Abbildung 2: FACS Auswahl der Mikroglia und Makrophagen Population

Exemplarische Darstellung der FACS-Analyse der gewonnenen Zellen einer erkrankten C57BL/6 Maus. Unter Verwendung von Fluoreszenz-markierten Antikörpern erfolgte nach Doubletten-/Zellfragmenten-Ausschluss die Auswahl der dargestellten Zellpopulation, entsprechend der Vorwärts- und Seitwärtsstreulichteigenschaften von Leukozyten (a). Nach Exklusion von nicht-vitalen Zellen mithilfe der Lebend-Tot-Färbung durch PI oder 7-AAD (b) wurde die  $CD45^{low}CD11b^{+}$  Zellpopulation ausgewählt, von denen im Folgenden angenommen wird, dass diese Mikroglia-Zellen darstellen (c), sowie die  $CD45^{high}CD11b^{+}$  Zellpopulation als Makrophagen-Population (d), mit anschließender Darstellung der vier untersuchten Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1, VLA-4 und LFA-1 auf Mikroglia Zellen.



**Abbildung 3: Anteil der Mikroglia bzw. Makrophagen an allen ZNS Zellen**

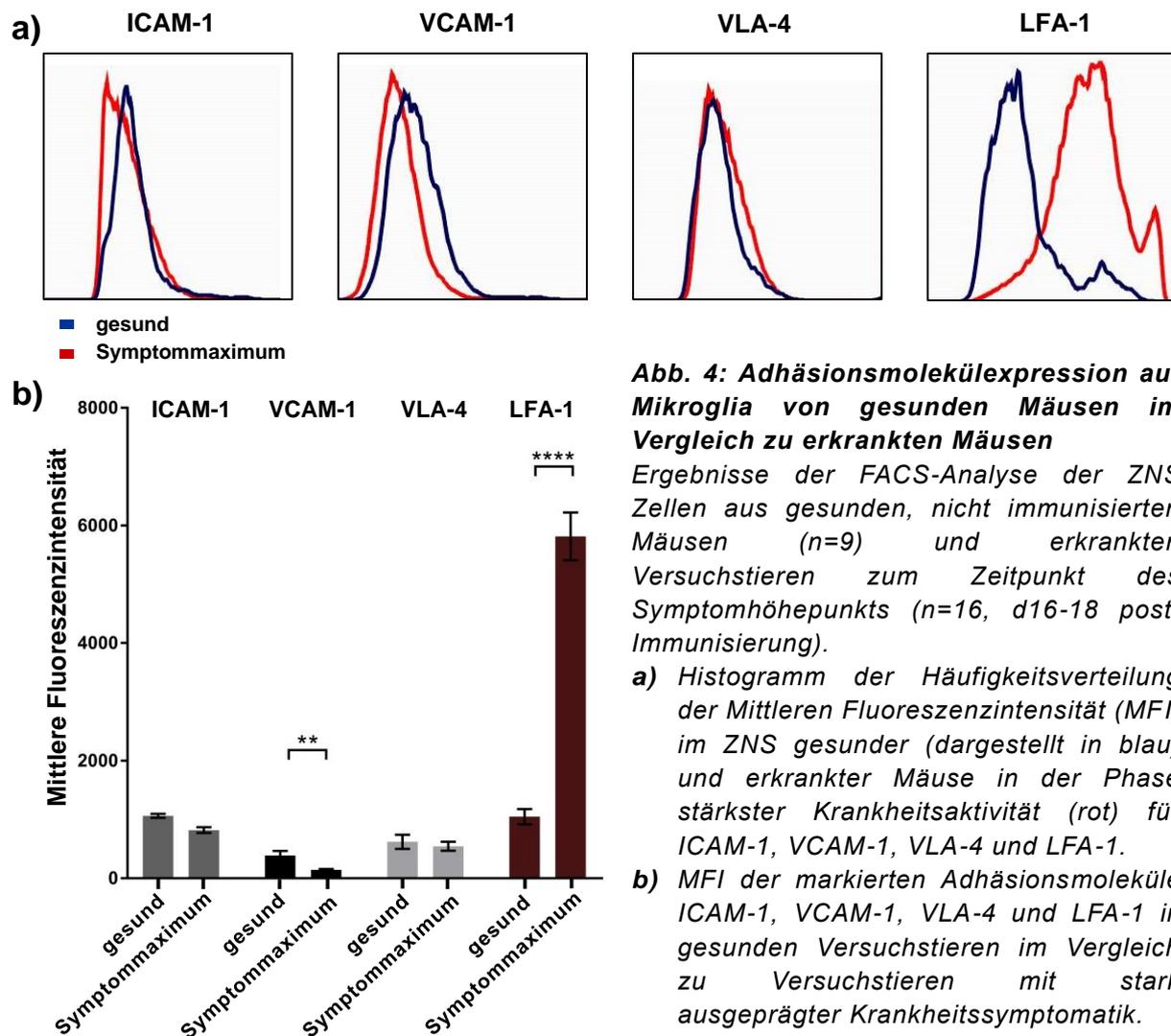
Prozentualer Anteil der Mikroglia- bzw. Makrophagen-Population an allen lebenden Zellen in der ZNS Probe nach Auswertung der FACS-Analyse zu den vier gemessenen Krankheitszeitpunkten im Verlauf der EAE.

In den gewonnenen ZNS Proben waren zunächst etwas mehr als 10% aller lebenden Zellen Mikroglia-Zellen, während zum Zeitpunkt des Symptombeginns ein Makrophagen-Anteil von ca. 5% bestimmt wurde (s. Abb. 3). Im Verlauf der EAE stieg die relative Zellzahl dieser beiden Populationen im ZNS an, sodass mit steigender Symptomschwere auch ein Anstieg des prozentualen Anteils der myeloiden an allen lebenden Zellen zu verzeichnen war (s. dazu auch Abb. 1b). Wie Abbildung 3 zeigt, waren dabei signifikante Unterschiede der relativen Zellzahl im Vergleich der untersuchten Krankheitszeitpunkte untereinander nachweisbar. So stieg beispielsweise der Anteil der Makrophagen im Stadium des Symptommaximums im Vergleich zum Zeitpunkt des Symptombeginns signifikant an. Da Mikroglia bereits in präsymptomatischen Stadien im ZNS resident sind, war ein weniger drastischer Anstieg des Mikroglia-Anteils zu verzeichnen als für Makrophagen, obwohl beide Zellpopulationen zum Höhepunkt der Krankheitssymptomatik auf ähnlich hohe Level ansteigen (Brendecke und Prinz, 2015, Zrzavy et al., 2017). Dies resultiert daraus, dass Makrophagen in präsymptomatischen Stadien nur geringfügig im ZNS vorzufinden sind und ihre Anzahl folglich erst durch Infiltration des ZNS in fortgeschrittenen Stadien ansteigt. Somit durchlief der Anteil dieser Zellart im EAE-Verlauf eine größere Spannbreite als dies für Mikroglia der Fall war.

Demnach konnte in dieser Arbeit im ersten Schritt bestätigt werden, dass die relative Anzahl der myeloiden Zellen im Verlauf der EAE steigt und einen Trend durchläuft, der mit dem Fortschritt der Symptomschwere in Relation steht. Inwiefern sich diese myeloiden Zellen, die wie hier aufgezeigt, bei verstärkter Symptomatik auch verstärkt im ZNS auftreten, bezüglich ihres möglichen Einflusses auf die Krankheitsprozesse definieren lassen, wurde im Folgenden betrachtet.

## 3.2 Steigerung der LFA-1-Expression in erkrankten EAE Mäusen

### 3.2.1 Mikroglia zeigen eine gesteigerte LFA-1-Expression im hochsymptomatischen Stadium



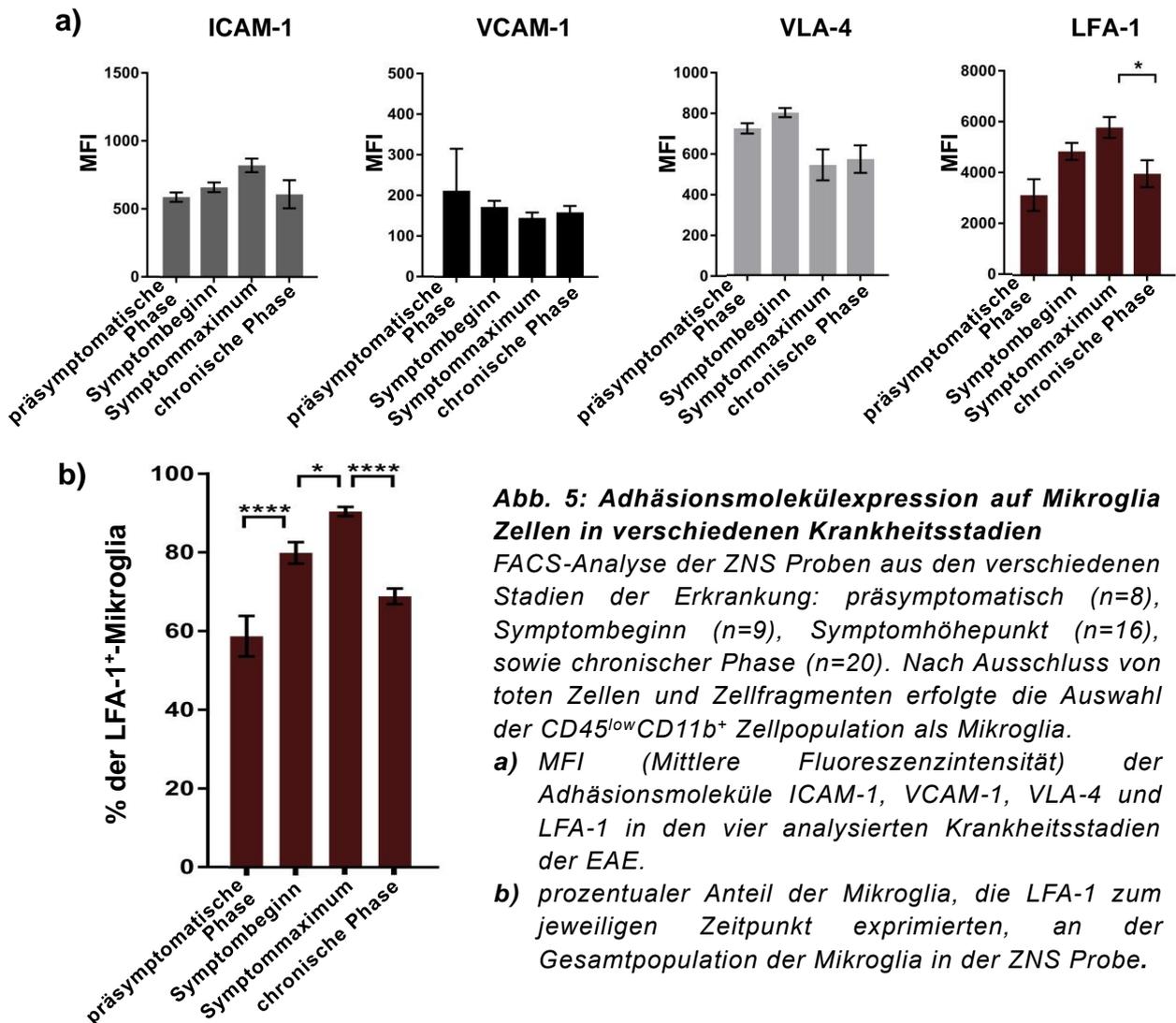
Um zu untersuchen, inwiefern myeloide Zellen im ZNS von stark symptomatischen Mäusen im Vergleich zu gesunden Versuchstieren einen differenzierten Phänotyp aufweisen, wurden diese Zellen hinsichtlich ihrer Zelladhäsionsmolekülexpression untersucht. Dabei wurde zunächst das Ausmaß der CAM-Expression auf Mikroglia analysiert, um Rückschlüsse auf ihren Aktivitätszustand und das Interaktionspotential ziehen zu können.

In der Auswertung der Mikroglia Population zeigte sich, dass VLA-4 und ICAM-1 nahezu unverändert im ZNS erkrankter Tiere exprimiert wurde, während sich bei VCAM-1 eine Abnahme der Expression in kranken Mäusen darstellte (Abb. 4). Im Gegensatz dazu war eine drastische Steigerung der LFA-1-Expression in erkrankten Mäusen besonders offensichtlich: Während LFA-1 im Vergleich zu den weiteren Adhäsionsmolekülen bereits auf Mikroglia gesunder Tiere intensiv exprimiert wurde, nahm dies im hochsymptomatischen Krankheitszustand nochmals gravierend zu. Die Intensität der LFA-1-Expression auf Mikroglia war im kranken ZNS im Mittel mehr als 5-mal so stark wie im gesunden ZNS und wies dabei immense Signifikanz auf.

Die Ergebnisse dieses Vergleichs von Mikroglia aus gesunden mit an EAE erkrankten ZNS Proben verdeutlichen, dass unter inflammatorischen Bedingungen, wie sie z.B. in der EAE vorherrschen, die Expression von LFA-1 auf der Oberfläche von Mikroglia signifikant ansteigt. Um detaillierten Einblick zu erhalten, inwieweit diese Expression der CAMs selbst innerhalb des EAE-Verlaufs in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium voneinander abweicht, wurden im nächsten Schritt die Erkrankungsphasen separat untersucht.

### **3.2.2 LFA-1-Expression auf Mikroglia zeigt Expressionsmuster in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium**

Bei Betrachtung der CAM-Expression von Mikroglia in unterschiedlichen Krankheitsstadien ließen sich einige signifikante Expressionsmuster der untersuchten Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1, VLA-4 und LFA-1 erkennen. Wie Abbildung 5 darstellt, stieg die ICAM-1-Expression auf Mikroglia mit Beginn vor dem ersten Symptomauftritt bis zum Höhepunkt der Symptomschwere stetig an. Mit Rückgang der Symptomatik in der chronischen Phase nahm wiederum auch die ICAM-1-Expression ab. Diese Ergebnisse indizieren, dass die Expression von ICAM-1 in Relation zum Fortschreiten der Krankheit und Symptomintensität steht. Ein derartiges Expressionsmuster ließ sich bei Untersuchung der Oberflächenexpression von VCAM-1 und VLA-4 auf Mikroglia in der EAE nicht finden. Diese beiden CAMs variierten zwar geringfügig in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium, jedoch zeichnete sich hier kein eindeutiger Trend ab.



**Abb. 5: Adhäsionsmolekülexpression auf Mikroglia Zellen in verschiedenen Krankheitsstadien**

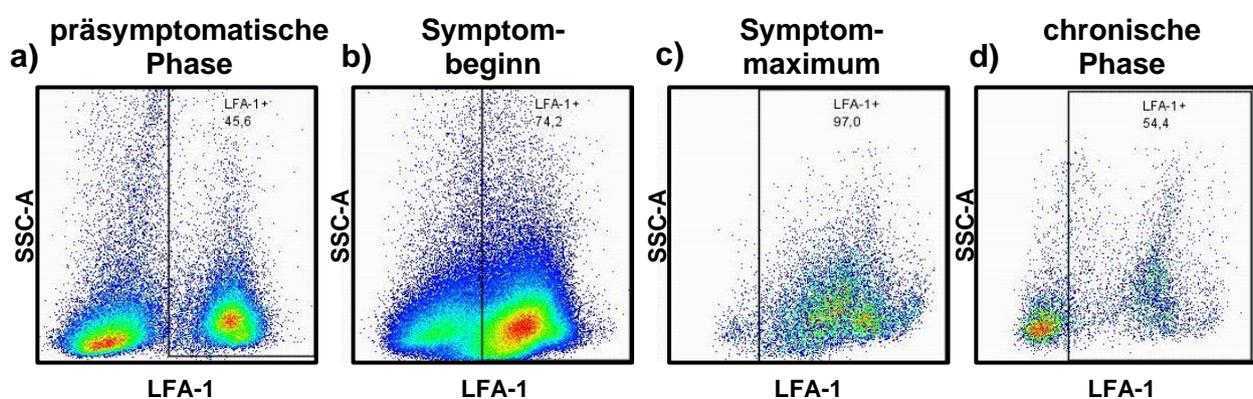
FACS-Analyse der ZNS Proben aus den verschiedenen Stadien der Erkrankung: präsymptomatisch ( $n=8$ ), Symptombeginn ( $n=9$ ), Symptommiximum ( $n=16$ ), sowie chronischer Phase ( $n=20$ ). Nach Ausschluss von toten Zellen und Zellfragmenten erfolgte die Auswahl der  $CD45^{low}CD11b^{+}$  Zellpopulation als Mikroglia.

a) MFI (Mittlere Fluoreszenzintensität) der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1, VLA-4 und LFA-1 in den vier analysierten Krankheitsstadien der EAE.

b) prozentualer Anteil der Mikroglia, die LFA-1 zum jeweiligen Zeitpunkt exprimierten, an der Gesamtpopulation der Mikroglia in der ZNS Probe.

Auch in diesem Analyseschritt trat wiederum vor allem LFA-1 hervor und hob sich von den übrigen CAMs ab. Hier war eine signifikante, kontinuierliche Steigerung der Expression mit Beginn im präsymptomatischen Stadium über das Auftreten erster Krankheitsanzeichen bis zum Symptommiximum messbar. Das Maximum der LFA-1-Expression zeichnete sich für Tiere mit maximalen EAE Symptomen ab. Dies lässt erkennen, dass LFA-1 in dieser gravierenden Entzündungsphase in stärkstem Ausmaß auf Mikroglia Zellen exprimiert wird. Dieses CAM weist dabei während des EAE-Verlaufes ein geregeltes Expressionsmuster in Abhängigkeit von der Krankheitssymptomatik auf. So zeichnete sich in Korrelation mit der Symptomregression in der chronischen Phase auch ein signifikanter Rückgang der LFA-1-Intensität auf Mikroglia ab ( $p=0,0261$ ). Dies illustriert, dass die Expression von LFA-1 auf Mikroglia über den Verlauf der EAE derart reguliert ist, dass die LFA-1-Expression in Relation zur Erkrankungsphase und somit der Symptomschwere steht.

Ebenso war in der Analyse des relativen Anteils der LFA-1-exprimierenden Mikroglia an allen Mikrogliazellen ein Muster der LFA-1-Expression über den Verlauf der EAE zu erkennen (s. Abb. 5b). Bereits vor Beginn der Krankheitssymptomatik exprimierte ein beträchtlicher Anteil der Mikroglia LFA-1 auf ihrer Oberfläche (58,6%). Im Verlauf der EAE traf dies auf einen stetig größer werdenden Anteil der Mikroglia zu. Wie Abbildung 6 illustriert, lässt sich mit Fortschreiten der Erkrankung eine noch deutlicher werdende LFA-1<sup>+</sup>-Mikroglia-Population abgrenzen. Dabei steht die relative Anzahl der LFA-1-exprimierenden Mikroglia in Relation zur Entwicklung der Symptomatik: So war zum Zeitpunkt des höchsten Symptomwerts eine signifikante Steigerung mit einem relativen Anteil von 90,3% LFA-1<sup>+</sup>-Mikroglia messbar. Korrelierend mit der rückläufigen Symptomschwere in der chronischen Phase wurde zudem von einem signifikant geringeren Anteil der Mikroglia Zellen LFA-1 exprimiert ( $p < 0,0001$ ). Im direkten Vergleich der Krankheitsstadien untereinander wies der relative Anteil der LFA-1<sup>+</sup>-Mikroglia konsistent eine ausgeprägte Differenz mit deutlicher Signifikanz auf. Diese eindrücklichen Ergebnisse unterstützen wiederum die These, dass LFA-1 als Adhäsionsmolekül auf Mikroglia fungiert, welches in Phasen höchster Krankheitsaktivität und damit einhergehender Neuroinflammation verstärkt exprimiert wird. Nachdem dieser Trend für Mikroglia im ZNS gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob dies kennzeichnend für Mikroglia ist und sie sich diesbezüglich von anderen myeloiden Zellen abgrenzen. Zu diesem Zweck wurde das CAM-Profil weiterer myeloider Zellen im ZNS in der EAE analysiert.

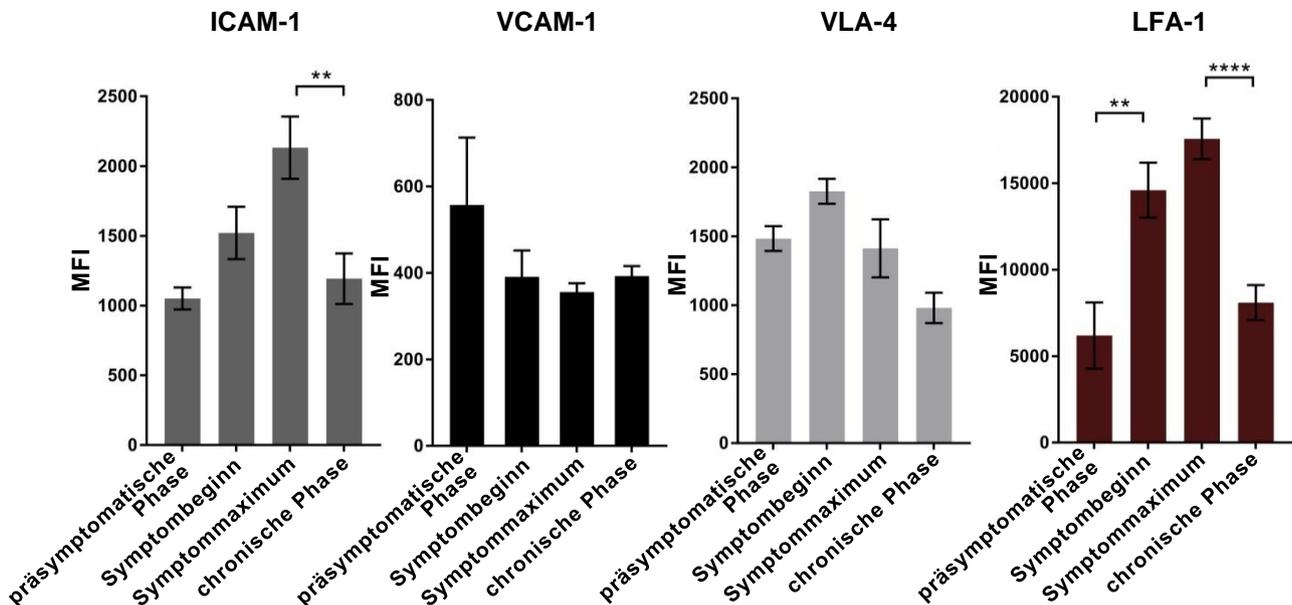


**Abbildung 6: LFA-1-Expression auf Mikroglia Zellen im Verlauf der EAE**

Exemplarische Darstellung der FACS Analyse der Mikroglia Zellen einer C57BL/6 Maus in den verschiedenen Krankheitsstadien der EAE, nach Analyse wie in Abb. 2. Dargestellt ist der LFA-1 Dotplot von LFA-1 auf Mikroglia vor Beginn der klinischen Symptomatik (a) zum Zeitpunkt des Auftretens erster Symptome (b), in der Phase mit der höchsten Krankheitsaktivität (c) und in der chronischen Phase (d).

### 3.2.3 CAM-Expression auf Mikroglia und Makrophagen im Verlauf der EAE

#### 3.2.3.1 CAM-Expression auf ZNS-infiltrierenden Makrophagen im Verlauf der EAE



**Abbildung 7: Adhäsionsmolekülexpression auf eingewanderten Makrophagen im ZNS im Verlauf der EAE**

Ergebnisse der FACS Analyse der vier untersuchten CAMs auf Makrophagen in der ZNS Probe im Verlauf der EAE. Jeweils dargestellt sind die Mittelwerte des MFI, sowie SEM aus der präsymptomatischen Phase (n=8), bei Symptombeginn (n=9), Symptommaximum (n=16) und der chronischen Phase (n=20): MFI von ICAM-1, VCAM-1, VLA-4 und LFA-1 zu den vier analysierten Krankheitsstadien der EAE.

Nachdem insbesondere für LFA-1 auf Mikroglia ein spezifisches Expressionsmuster im Verlauf der EAE gezeigt werden konnte, war im ersten Schritt von Interesse, wie sich andere myeloide Zellen im ZNS bezüglich ihrer CAM-Expression verhalten. Im zweiten Schritt wurde zudem untersucht, inwiefern sich die Expression auf diesen myeloiden Zellen von Mikroglia abgrenzen lassen. Aus diesem Grund wurde zunächst betrachtet, wie sich die CAM-Expression auf ZNS-infiltrierenden Makrophagen verhält.

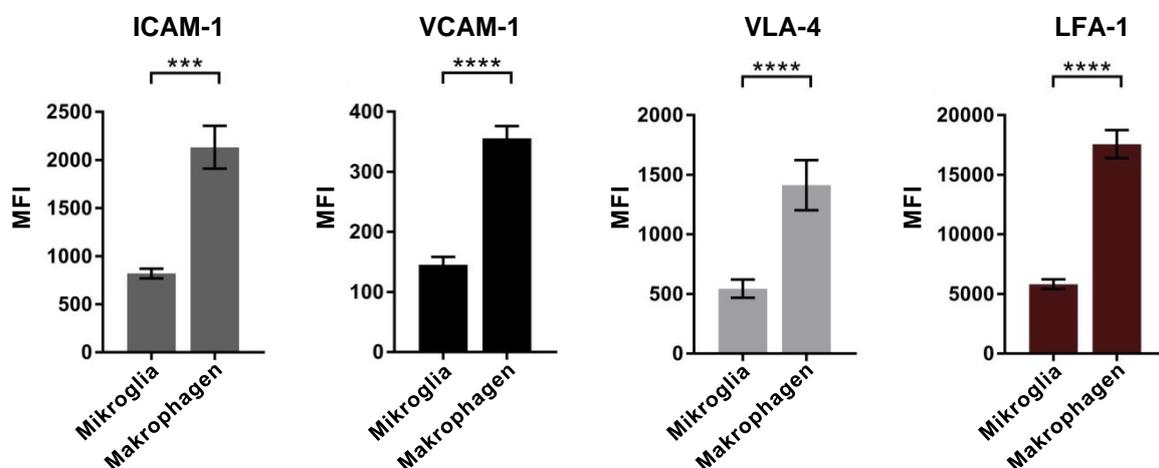
Mit Fortschreiten der Erkrankung infiltrieren Makrophagen das ZNS über die gestörte BHS, sodass schließlich auch eine größere Makrophagen-Population im ZNS aufzufinden ist. In dieser Population der ZNS-infiltrierenden Makrophagen war weder die Expression von VLA-4 noch VCAM-1 im Verlauf der Erkrankung reguliert, sie folgte keinem erkennbaren Muster (s. Abb. 7). ICAM-1 war im Verlauf

der EAE simultan mit Anstieg an Krankheitssymptomen intensiver messbar und wurde im Übergang in die chronische Phase geringer exprimiert.

Besonders interessant stellte sich die Expression von LFA-1 auf ZNS-infiltrierenden Makrophagen dar und bot dabei einige Übereinstimmungen zu der LFA-1-Expression auf Mikroglia (vgl. Abb. 5). So war zu erkennen, dass auch bei eingewanderten Makrophagen ein Trend zur gesteigerten LFA-1-Expression mit Fortschreiten der Erkrankung zu sehen ist: Mit Zunahme der Symptomschwere bis zum Symptommöhepunkt ließ sich eine signifikante Intensivierung der Oberflächenexpression von LFA-1 auf ZNS-infiltrierenden Makrophagen finden. In der darauffolgenden chronischen Phase wurde LFA-1, dem symptomatischen Verlauf entsprechend, immens rückläufig auf Makrophagen im ZNS exprimiert.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich somit festhalten, dass insbesondere LFA-1 nicht nur auf Mikroglia, sondern auch auf Makrophagen, die in der EAE das ZNS infiltrieren, ein Expressionsmuster zeigen, welches in Beziehung zur Ausprägung der Symptomatik steht. Dies wirft die Frage auf, inwiefern diese Expression mit der Adhäsionsmolekülexpression auf Mikroglia Zellen übereinstimmt oder sich davon abgrenzen lässt.

### 3.2.3.2 Ausgeprägtere CAM-Expression auf eingewanderten Makrophagen im Vergleich zu Mikroglia im erkrankten ZNS

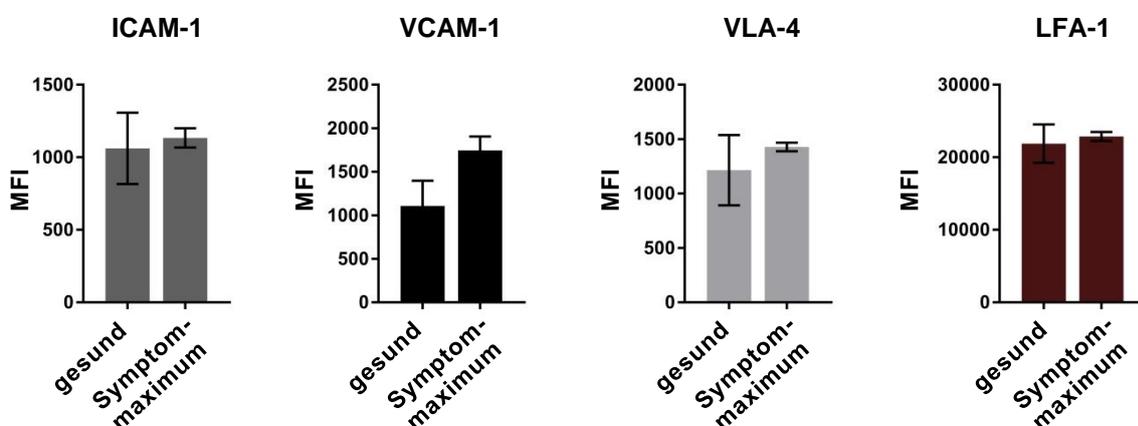


**Abbildung 8: Vergleich der CAM-Expression auf Mikroglia vs. Makrophagen im ZNS erkrankter Mäuse**

Ergebnisse der FACS Analyse der ZNS Zellen aus Versuchstieren (n=16) zum Zeitpunkt des symptomatischen Höhepunkts der Erkrankung. Analysiert wurden Mikroglia beziehungsweise Makrophagen in der ZNS Probe. Dargestellt ist die MFI der Adhäsionsmoleküle auf Mikroglia Zellen im Vergleich zu ZNS-infiltrierenden Makrophagen.

Im direkten Vergleich zwischen Makrophagen, die das ZNS infiltriert haben, und Mikroglia wurde bezüglich der Expression von ICAM-1, VCAM-1, VLA-4 und LFA-1 im hochehrkrankten ZNS ein eindeutiges Bild sichtbar: Diese CAMs wurden von Makrophagen wesentlich stärker exprimiert als von Mikroglia. Abbildung 8 stellt deutlich dar, dass für jedes der vier untersuchten Moleküle eine signifikant höhere Expression auf Makrophagen zum Höhepunkt der Erkrankungssymptomatik auftrat. Auch hier zeigte sich der höchste relative Unterschied für das Adhäsionsmolekül LFA-1, welches bei Gegenüberstellung der Intensität auf Makrophagen verglichen mit der LFA-1-Expression auf Mikroglia signifikante Differenzen aufwies ( $p < 0,0001$ ). Dass Adhäsionsmoleküle auf Makrophagen in verstärkter Intensität exprimiert werden als auf Mikroglia, führte zur Annahme, dass sich diese eingewanderten Makrophagen in einem aktiveren Zustand befinden und die Expression von CAMs auf diesen Immunzellen im erkrankten ZNS enorm gesteigert ist (Bo et al., 1996, Hailer et al., 1996, Cannella und Raine, 1995). Vor diesem Hintergrund wurde im Folgenden weitergehend untersucht, ob sich diese Gruppe der ZNS-infiltrierenden Makrophagen in besonderer Weise auszeichnet.

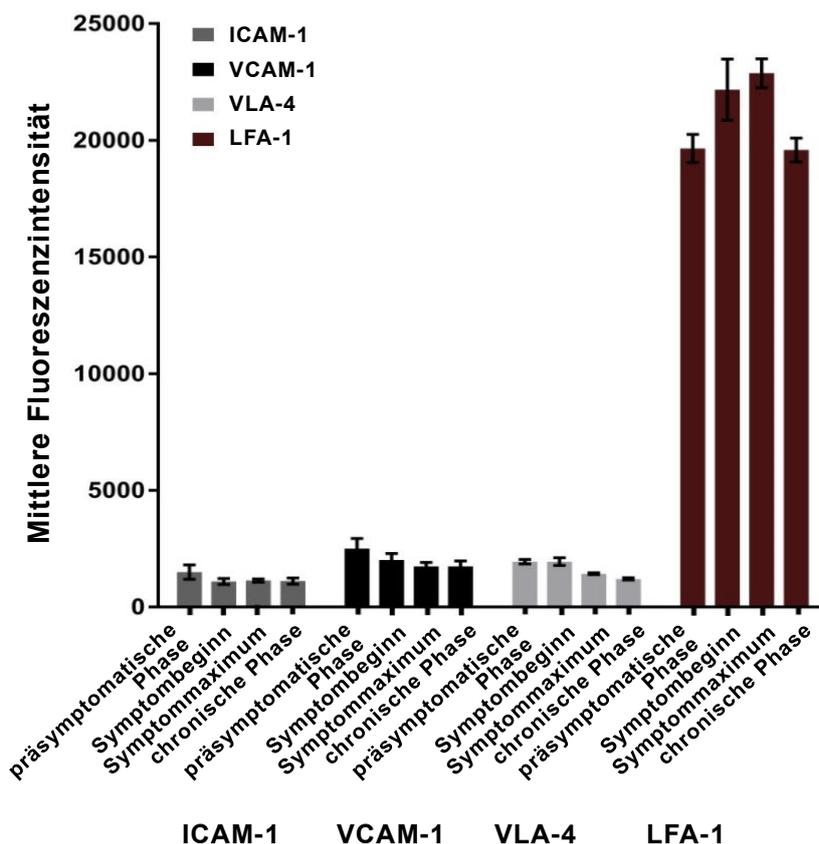
### 3.2.3.3 Adhäsionsmolekülexpression auf Makrophagen in der Milz zeigt keine Regulation im Verlauf der EAE



**Abbildung 9: Adhäsionsmolekülexpression auf Makrophagen in der Milz gesunder vs. erkrankter Mäuse**

FACS-Analyse der Makrophagen Population aus Milzproben von gesunden ( $n=6$ ) und an EAE-erkrankten ( $n=11$ ) C57BL/6-Mäusen. Dargestellt ist die MFI der markierten Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1, VLA-4 und LFA-1 in gesunden vs. erkrankten Versuchstieren.

Ob sich die Makrophagen-Population im ZNS durch eine gesteigerte CAM-Expression auszeichnet und darüber definieren lässt oder ob eine allgemeine Verstärkung der CAM-Expression myeloider Zellen vorliegt, könnte Hinweise darauf liefern, inwiefern diese Population in der Pathogenese der MS involviert sein könnte. Um einen Vergleich zwischen dem CAM-Expressionsmuster von ZNS-infiltrierenden Makrophagen und Makrophagen der Milz herstellen zu können, wurde zunächst die Population in der Milz als solche untersucht (s. Abb. 9). Zwecks besserer Komparabilität mit der ZNS-infiltrierenden Makrophagen-Population, wurden auch in der Milz die CD45<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen analysiert. Es zeigte sich, dass Makrophagen in der Milz hinsichtlich aller vier CAMs nur eine geringfügige Tendenz zum Anstieg der Expression in erkrankten Mäusen aufweisen: Während dies im Fall von ICAM-1 und LFA-1 minimal war, fiel die Zunahme der VLA-4- und VCAM-1-Intensität auf Makrophagen der Milz in erkrankten Mäusen etwas deutlicher aus, blieb jedoch auch hier unterhalb des Signifikanzniveaus. Dies zeigt, dass selbst bei maximaler Krankheitsaktivität von Makrophagen der Milz nur unerheblich vermehrt CAMs exprimiert wurden. Die Ergebnisse lassen somit vermuten, dass das Immunsystem in Rahmen der Erkrankung systemisch nicht nennenswert aktiviert wird. Ob sich jedoch bei detaillierterer Betrachtung peripherer Makrophagen über den EAE-Verlauf eine umschriebene Regulation feststellen lässt, sollte im Folgenden untersucht werden.



**Abbildung 10:**  
**CAM-Expression auf Makrophagen in der Milz in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium**

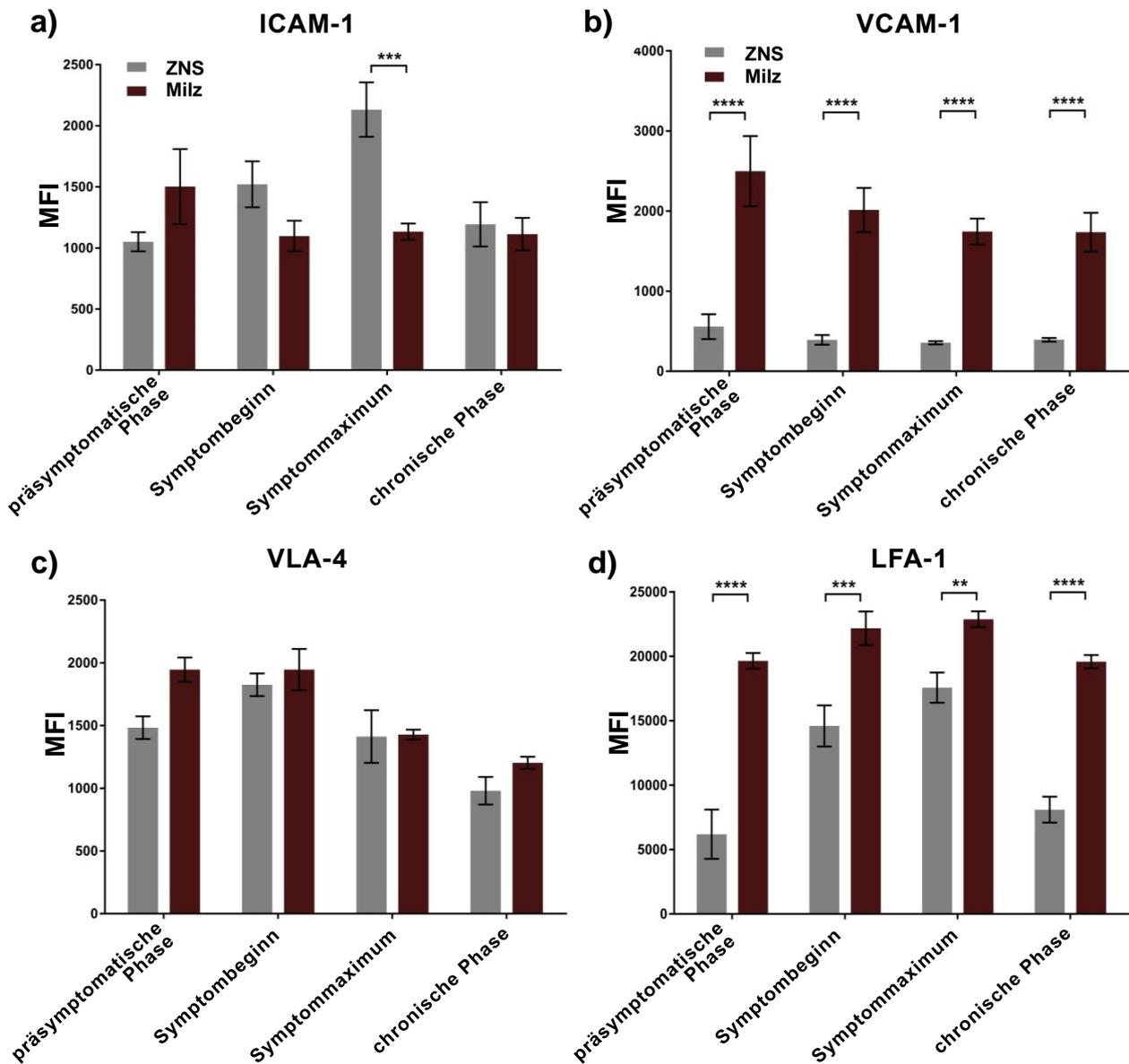
FACS Analyse der Milzproben aus C57BL/6-Mäusen in verschiedenen Stadien der Erkrankung: präsymptomatisch (n=8), Symptombeginn (n=9), Symptommaximum (n=11), sowie chronischer Phase (n=15). MFI der markierten Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1, VLA-4 und LFA-1 in den vier analysierten Krankheitsstadien der EAE.

Im nächsten Schritt wurde nun das Muster der CAM-Expression von Makrophagen in der Milz im Detail über den Verlauf der Erkrankung betrachtet. Wie Abbildung 10 darstellt, ergab die Untersuchung der betrachteten Makrophagen-Population der Milzproben, dass sowohl ICAM-1 und VCAM-1 als auch VLA-4 jeweils auf einem ähnlich niedrigen Level exprimiert wurden. In Abgrenzung dazu ließ sich für LFA-1 zumindest im Ansatz erkennen, dass sich die Intensität der LFA-1-Expression dem klinischen Verlauf der EAE entsprechend entwickelt. Jedoch ist auch für die Expression von LFA-1 allenfalls ein Trend zu beschreiben, ohne statistische Signifikanz. Folglich zeigen periphere Makrophagen im Gegensatz zu myeloiden Zellen im ZNS keine Regulation von ICAM-1, VCAM-1, VLA-4 oder LFA-1.

Im Weiteren sollte diese Makrophagen Population aus der Milz den ZNS-infiltrierenden Makrophagen gegenübergestellt werden, um herauszufinden, was diese beiden myeloiden Zellpopulationen potentiell auszeichnet und um sie voneinander abzugrenzen.

#### **3.2.3.4 Stärkere Adhäsionsmolekülexpression auf Makrophagen in der Milz im Vergleich zu ZNS-infiltrierenden Makrophagen**

In vorangegangenen Analysen wurden Makrophagen aus der Milz und aus dem ZNS bereits separat untersucht, um die ZNS-Populationen im Folgenden bezüglich ihrer Expression von CAMs charakterisieren zu können (s. auch 3.2.1). Die dort gewonnenen Ergebnisse führten nun zu der Frage, ob sich diese Makrophagen Population, der es gelingt, das ZNS zu infiltrieren, bezüglich ihrer CAM-Expression gegenüber anderen Makrophagen Populationen auszeichnet. Dies könnte gegebenenfalls Hinweise darauf geben, ob die verstärkte Expression von CAMs die Migration ins ZNS ermöglicht oder ob die Expression im ZNS angeregt wird. Dadurch ließen sich gegebenenfalls wiederum Rückschlüsse ziehen, welche CAMs unter entzündlichen ZNS-Bedingungen der Interaktion von myeloiden Zellen mit anderen Zellen dienen.



**Abbildung 11: Adhäsionsmolekülexpression im Verlauf der EAE auf Makrophagen in der Milz im Vergleich zu Makrophagen, die das ZNS erkrankter Mäuse infiltrierten**

Analyse der Milz-Proben, sowie ZNS-Proben aus Versuchstieren zu verschiedenen Stadien der Erkrankung: prä-symptomatische Phase (Milz und ZNS je n=8), Zeitpunkt des Symptombeginns (Milz und ZNS je n=9), Symptommaximum (Milz n=11, ZNS n=16), sowie chronischer Phase (Milz n=15, ZNS n=20). Hier gezeigt ist die MFI von ICAM-1 (a), VCAM-1 (b), VLA-4 (c) und LFA-1 (d) auf Makrophagen im Verlauf der EAE.

Abbildung 11 zeigt, dass bei Betrachtung des Vergleichs zwischen Makrophagen aus der Milz mit infiltrierenden Makrophagen im ZNS für ICAM-1 eine intensivere Expression auf ZNS-infiltrierenden Makrophagen auftrat, was vor allem zum Zeitpunkt der stärksten Krankheitssymptomatik deutlich wurde ( $p=0,008$ ). VCAM-1 wurde konstant und unabhängig vom Stadium der EAE signifikant stärker auf der Population in der Milz exprimiert ( $p<0,0001$ ). Derart drastische Unterschiede ließen sich bei VLA-4 nicht wiederfinden: Im gesamten Krankheitsverlauf korrespondierte die Oberflächenexpression von VLA-4 auf Makrophagen der Milz

in Ausmaß und Tendenz des Verlaufs mit der Expression auf ZNS-infiltrierenden Makrophagen.

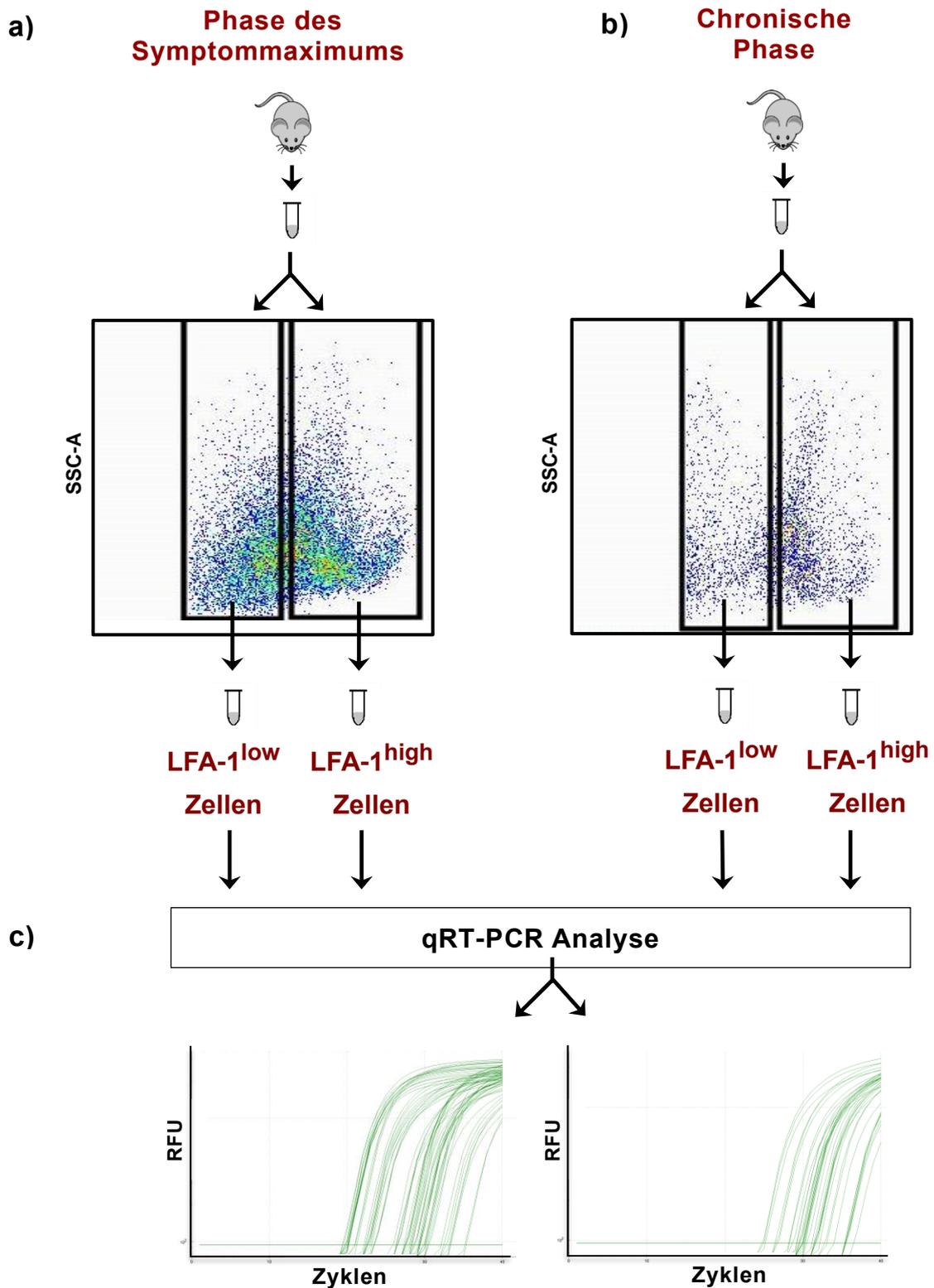
Da für LFA-1 in vorherigen Untersuchungen bereits vielversprechende Ergebnisse erhoben werden konnten, war die Expression dieses Integrins auf myeloiden Zellen von besonderem Interesse. LFA-1 wurde sowohl auf Makrophagen der Milz als auch im ZNS in enormer Intensität exprimiert und wies darüber hinaus im Verlauf der Erkrankung eine eindruckliche Korrelation zur Symptomatik auf (s. 3.2.3.1). Hier ging aus dem direkten Vergleich hervor, dass dieses CAM auf Makrophagen der Milz signifikant stärker exprimiert wurde als auf ZNS-infiltrierenden Makrophagen. Dieser Kontrast war in den ersten Tagen nach Immunisierung am deutlichsten ( $p < 0,0001$ ). Da die Intensität der LFA-1-Expression auf ZNS-Makrophagen im weiteren Verlauf der Erkrankung überproportional stark anstieg, während sie auf Makrophagen der Milz nur leicht zunahm, war die Differenz zwischen diesen beiden Populationen zum symptomstärksten Zeitpunkt geringer als noch bei Erkrankungsbeginn. Im chronischen Stadium wurde die Diskrepanz hinsichtlich des Ausmaßes der LFA-1-Expression wiederum markanter, da die LFA-1-Expression auf Makrophagen im ZNS noch stärker sank als in der Milz. Daher blieb LFA-1 auf Makrophagen in der Milz verglichen mit Makrophagen im ZNS deutlich erhöht ( $p < 0,0001$ ).

Diese Ergebnisse lassen annehmen, dass die Expression der Adhäsionsmoleküle nicht nur spezifisch für das jeweilige Molekül, sondern auch hinsichtlich der diversen Immunzellarten spezifisch reguliert wird. Darüber hinaus muss selbst für dieselbe Zellart zwischen der Lokalisation in unterschiedlichen Organen differenziert werden. Wie diese Analyse verdeutlicht, lässt sich die Makrophagen-Population im ZNS hinsichtlich ihrer CAM-Expression klar gegenüber Makrophagen in der Peripherie abgrenzen. Da MS eine Erkrankung des ZNS ist, lag nicht zuletzt deshalb der Fokus im folgenden Schritt auf der Adhäsionsmolekülexpression auf Immunzellen, die im ZNS lokalisiert sind. Nach der bereits beschriebenen detaillierten Analyse der CAM-Expression sollte nun anschließend die Population der stark LFA-1-exprimierenden Mikroglia, LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia genauer bezüglich ihres intrazellulären Profils untersucht werden.

### **3.3 Quantitative in vitro Analyse des RNA-Gehalts von Zytokin- und Chemokin-Genen in Mikroglia**

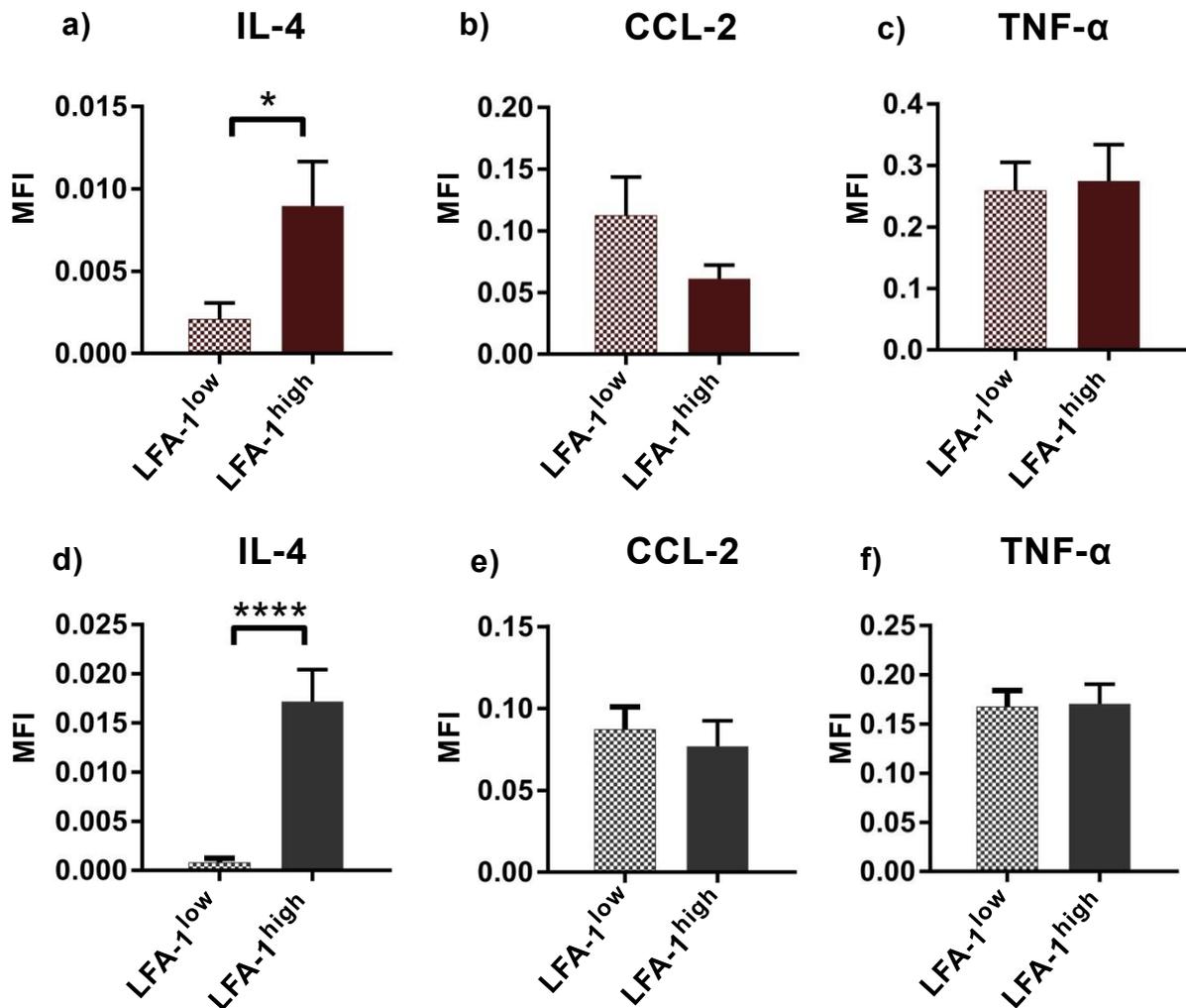
#### **3.3.1 Separation der myeloiden Zellen in Abhängigkeit vom Ausmaß der LFA-1-Expression**

Als Resultat lässt sich zunächst festhalten, dass insbesondere LFA-1 ein spezifisches Expressionsmuster über den EAE-Verlauf beschreibt, dessen Intensität in Relation zum Symptomverlauf steht. Dies ließ sich nicht nur für die LFA-1-Expression auf Makrophagen in Milz und ZNS, sondern auch auf Mikroglia nachweisen. Zudem stellte sich diese Regulierung der LFA-1-Intensität entsprechend der Symptomatik vielfach als signifikant dar. Zusammengenommen wurde dadurch die Frage aufgeworfen, inwiefern insbesondere das CAM LFA-1 in der Pathogenese der EAE und MS involviert ist. Um das Verständnis über den Einfluss von LFA-1 zu erweitern und einen möglichen Zusammenhang mit funktionellen Auswirkungen dieser myeloiden Zellen in pathologischen Prozessen zu betrachten, wurden Mikroglia-Zellen erkrankter Tiere detaillierter untersucht. Da dieses Adhäsionsmolekül besonders in der Phase der höchsten Krankheitsaktivität in extremem Ausmaß exprimiert wurde und im weiteren Verlauf zur chronischen Phase wieder vermindert zur Darstellung kam, wurde eine Separation der Proben aus diesen Krankheitsstadien in Abhängigkeit des Ausmaßes der LFA-1-Expression vorgenommen. Folglich wurde der Subtyp der LFA-1<sup>low</sup>-Mikroglia in Abgrenzung zur Population mit hoher LFA-1-Expression, im Weiteren als LFA-1<sup>high</sup> bezeichnet, selektiert (dargestellt in Abb. 12). Um Aufschluss über intrazelluläre Vorgänge im Vergleich dieser beiden Populationen zu erhalten, erfolgte eine qRT-PCR („quantitative real-time Polymerase Chain Reaction“, quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion). So sollten Kenntnisse erlangt werden, inwiefern das Ausmaß der Expression von LFA-1 mit einem differenzierten intrazellulären Status korreliert. Dadurch sollten Rückschlüsse gezogen werden, inwieweit diese LFA-1<sup>+</sup>-Mikroglia-Zellen die pathologischen Prozesse in der EAE entweder in eine positive oder destruktive Richtung zu lenken vermögen und in welcher Weise dies in den untersuchten Symptomphasen voneinander abweicht.



**Abbildung 12: Vorgehen bei der FACS Sortierung der ZNS-Proben mit Separation in zwei Populationen in Abhängigkeit von der Intensität der LFA-1-Expression**  
 Separation der ZNS Proben in der Phase des Symptommaximums (a) und chronischen Phase (b) der EAE mit anschließender qRT-PCR der beiden gewonnenen Populationen (c), dabei werden die relativen Fluoreszenzeinheiten („Relative fluorescence units“, RFU) gegen die Anzahl der durchlaufenen Zyklen dargestellt.

### 3.3.2 Das anti-inflammatorische Interleukin-4-Gen wird in LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia verstärkt exprimiert



**Abbildung 13:** Zytokin-/Chemokin-RNA Level in LFA-1<sup>low</sup>- vs. LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia-Zellen der Phase der höchsten Krankheitsaktivität (a-c), sowie der chronischen Phase der EAE (d-f)

**a-c)** qRT-PCR Analyse der Mikroglia aus ZNS Proben von Mäusen in der Phase mit den stärksten Symptomwerten im Erkrankungsverlauf

**d-f)** qRT-PCR Analyse der Mikroglia in der chronischen Phase der EAE

Die aufbereiteten und Antikörper-markierten Mikroglia wurden per FACS-Sortierung in die Populationen LFA-1<sup>low</sup> und LFA-1<sup>high</sup> aufgetrennt. Falls die Zellzahl für eine Analyse nicht ausreichend war, wurden zwei Proben zusammengefasst, wobei in der Phase des Symptommaximums n=10 und chronisch n=12 Populationen gewonnen wurden (s. Abb.12). Anschließend erfolgte die cDNA Gewinnung und qRT-PCR. In der Auswertung wurden die Expressionslevel von IL-4 (a), CCL-2 (b) und TNF-α (c) in Relation zu RPS29 normalisiert.

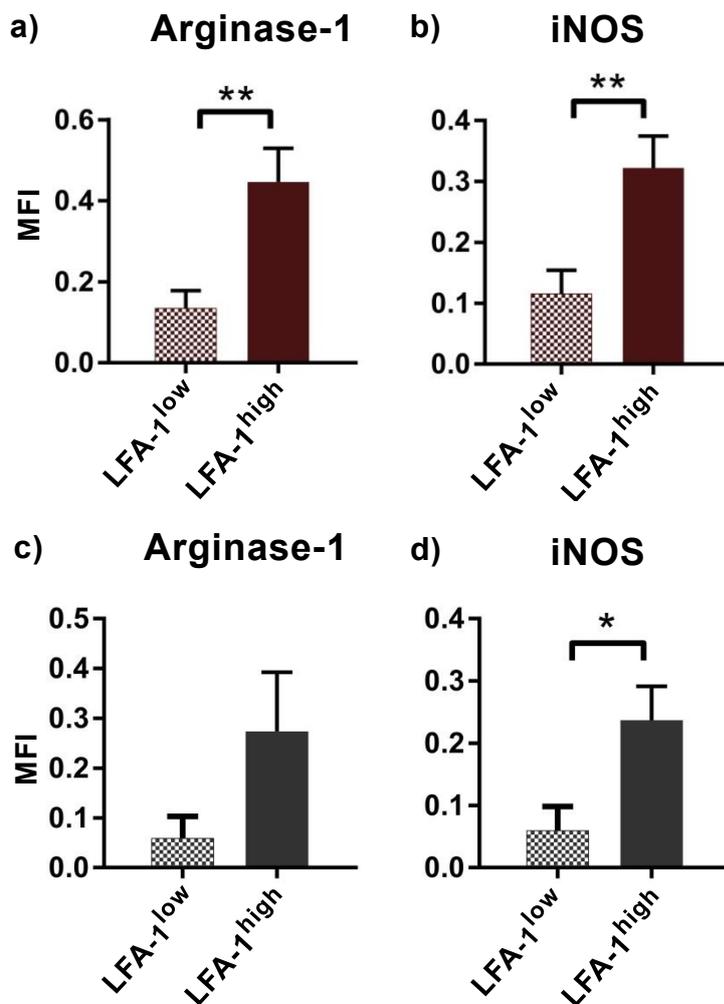
Im Folgenden wurde die abgrenzbare Population der LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia weiterführend klassifiziert, um zu untersuchen, ob speziell die Expression dieses CAMs in der Pathogenese der EAE eine Rolle spielt und welche Auswirkungen eine erhöhte LFA-1-Expression auf myeloiden Zellen des ZNS haben könnte. Dazu wurden in diesem Schritt die Genprodukte des anti-inflammatorisch wirkenden

Zytokins Interleukin-4 (IL-4) und der tendenziell pro-inflammatorischen Moleküle CCL-2 (CC-Chemokinligand 2) und TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ) analysiert und im Anschluss Gene von Enzymen untersucht, die eine funktionelle Rolle im Entzündungsgeschehen der EAE spielen (Xu et al., 2003, De Groot et al., 1997, Hill et al., 2004).

Wie Abbildung 13 demonstriert, hob sich insbesondere das anti-inflammatorische Zytokin IL-4 ab, welches in der Krankheitsphase mit der stärksten Symptomschwere in der LFA-1<sup>high</sup>-Population der Mikroglia signifikant erhöht nachweisbar war. Dementsprechend trat in Abhängigkeit von der Intensität der LFA-1-Expression ein deutlich signifikanter Unterschied der IL-4 Produktion in LFA-1<sup>high</sup>- verglichen mit LFA-1<sup>low</sup>-Mikroglia auf. Dieser Unterschied zwischen den beiden Mikroglia Populationen wurde im chronischen Erkrankungsstadium noch deutlicher, hier war in Übereinstimmung mit der verstärkten LFA-1-Expression auf Mikroglia ebenso deren IL-4-Produktion auf etwa das Zwanzigfache signifikant gesteigert. Somit stieg die Differenz im RNA-Gehalt zwischen den Mikroglia Populationen, welche LFA-1 unterschiedlich stark exprimieren, im Erkrankungsverlauf zur chronischen Phase an. Die hier gewonnenen Erkenntnisse zeigen auf, dass Mikroglia bei intensiver LFA-1-Expression auch verstärkt das anti-inflammatorische IL-4 produzieren. Dies gibt Grund zur Annahme, dass mithilfe dieses Zytokins das Potenzial von LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia gefördert wird, einen anti-inflammatorischen Einfluss im ZNS auszuüben.

Im Gegensatz dazu zeigten die beiden entzündungsfördernden Moleküle CCL-2 und TNF- $\alpha$  keine derartigen Ausprägungen. Für TNF- $\alpha$  war weder in der aktiven, hochsymptomatischen Erkrankungsphase, noch in der chronischen Phase ein Unterschied im intrazellulären Gehalt dieses Genprodukts im Zusammenhang mit der LFA-1-Intensität nachweisbar. Auch bezüglich CCL-2 war allenfalls ein dezenter Trend der verminderten Produktion in LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia in der Phase des Symptommaximums erkennbar. Tendenziell verhielt sich die CCL-2-Expression entgegengesetzt zur LFA-1-Expression, sodass LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia weniger CCL-2 produzierten, dies verblieb jedoch unterhalb des Signifikanzlevels. Diese Ergebnisse führen zusammenfassend zu der Annahme, dass im ZNS insbesondere durch Mikroglia, die intensiv das Adhäsionsmolekül LFA-1 exprimieren, mittels einer verstärkten IL-4-Produktion eine anti-inflammatorische Rolle eingenommen werden kann. Somit konnten hier erste Hinweise auf den Einfluss von LFA-1-exprimierenden Mikroglia auf das Entzündungsgeschehen gesammelt werden.

### 3.3.3 Steigerung der Expression von Arginase und iNOS korreliert mit Steigerung der LFA-1-Expression



**Abbildung 14: RNA Level von Enzymen in LFA-1<sup>low</sup>- vs. LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia-Zellen der symptomstärksten sowie der chronischen Phase der EAE**

**a und b) qRT-PCR Ergebnisse der Mikroglia Zellen aus ZNS Proben von Mäusen in der Phase mit der höchsten Krankheitsaktivität**

**c und d) qRT-PCR Analyse der Mikroglia in der chronischen Phase der EAE**

Bei der Analyse wurde wie bei Abb. 13 beschrieben vorgegangen, wobei in der Phase der höchsten Krankheitsaktivität  $n=10$  und in der chronischen Phase  $n=12$  analysiert wurden. In der Auswertung der qRT-PCR wurden die Expressionslevel von Arginase-1 (a+c) und iNOS (b+d) in Relation zu RPS29 normalisiert.

Mikroglia, die LFA-1 in stärkerem Ausmaß exprimieren, befinden sich, wie in 3.3.2 für Chemokine bzw. Zytokine gezeigt werden konnte, in einem Zustand der veränderten intrazellulären Aktivität. Inwiefern die modifizierte Expression von LFA-1 darüber hinaus auch mit einer Änderung des intrazellulären Enzym-Milieus einhergeht, sollte durch folgende Versuche näher betrachtet werden. Dadurch sollten weitere Erkenntnisse gesammelt werden, ob Mikroglia auf diesem Weg einen funktionellen Einfluss auf andere Zellen nehmen können. Zu diesem Zweck wurden LFA-1<sup>low</sup>- und LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia hinsichtlich der enzymatischen Genprodukte Arginase-1 und iNOS (induzierbare NO-Synthase) analysiert, um Hinweise auf den funktionellen Status dieser Mikroglia zu sammeln.

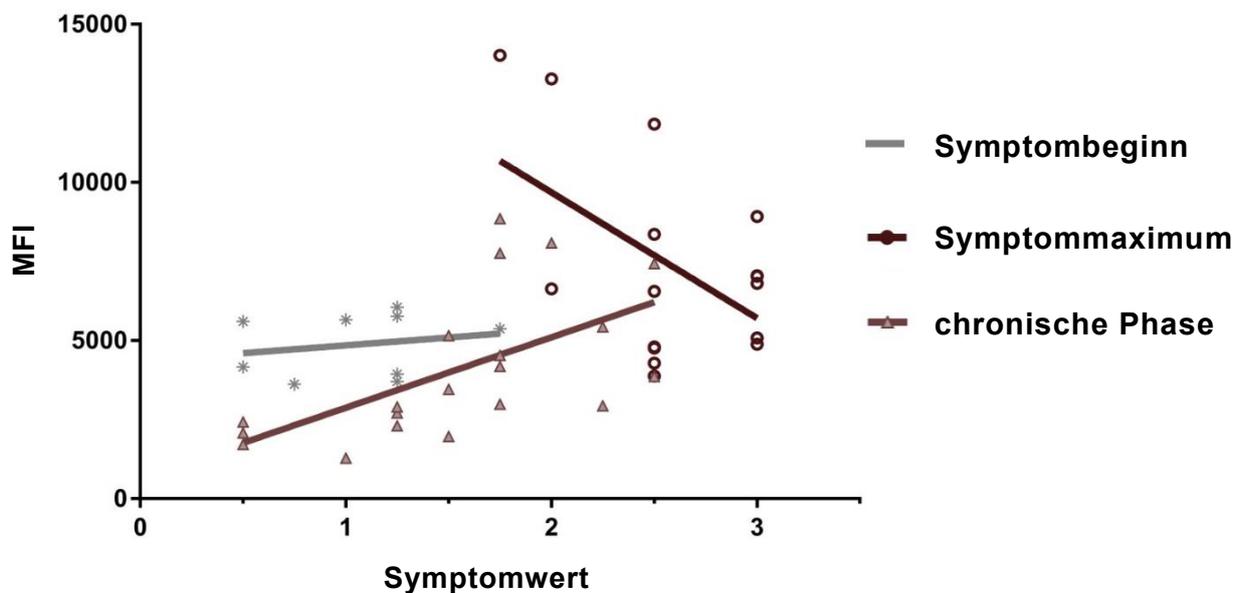
Abbildung 14 stellt dar, dass nicht nur der intrazelluläre RNA-Gehalt des Enzyms Arginase-1, sondern auch der iNOS eine klare Beziehung zur LFA-1-Expression auf der Zelloberfläche zeigte. So ließ sich für Arginase-1 und iNOS zum Zeitpunkt

der stärksten Krankheitssymptomatik im Vergleich der LFA-1<sup>low</sup> Mikroglia mit LFA-1<sup>high</sup> Mikroglia eine ausgeprägte Differenz in deren Enzymproduktion feststellen. Die Differenz war in dieser Erkrankungsphase deutlich signifikant, wobei eine hohe LFA-1-Expression mit einer ca. dreifachen RNA-Konzentration der Enzyme einherging und umgekehrt. In der chronischen Erkrankungsphase wies die Population der Mikroglia mit hoher LFA-1-Intensität ebenso einen gesteigerten intrazellulären Gehalt der hier untersuchten enzymatischen Genprodukte auf. Folglich stehen sowohl die Arginase-1 als auch iNOS in einer positiven Relation zur LFA-1-Expression.

Nach dieser Untersuchung lässt sich daher festhalten, dass Mikroglia, die das untersuchte CAM LFA-1 in stärkerer Intensität exprimieren, auch intrazelluläre Differenzen aufweisen: Während sich dies bereits für das anti-inflammatorische Zytokin IL-4 abzeichnete, waren bezüglich Arginase-1 und iNOS die Konzentrationsunterschiede in Abhängigkeit von der LFA-1-Expression noch deutlicher ausgeprägt, sodass diese funktionellen Enzyme in LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia um ein Vielfaches erhöht waren. Demzufolge belegen diese signifikanten Differenzen im RNA-Gehalt eine starke Relation zwischen der LFA-1-Expression und der intrazellulären Enzymproduktion. Dabei könnten LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia auch durch ihre erhöhte Enzymproduktion in den pathologischen Vorgängen des ZNS eine bedeutende Rolle einnehmen. Möglicherweise besäßen Mikroglia dadurch das Potential, den Erkrankungsverlauf zu beeinflussen. Dieser Aspekt des Zusammenhangs von LFA-1 mit der Ausprägung der Krankheitssymptomatik wurde in den nachfolgenden Ausführungen konkret analysiert.

### 3.4 Intensität der LFA-1-Expression auf Mikroglia korreliert mit der Symptomschwere

Im Folgenden wurde abschließend der Frage nachgegangen, ob die Expression von LFA-1 auf Mikroglia Auswirkungen auf die Symptomatik der Erkrankung und deren Schwere hat. Dafür wurde innerhalb der untersuchten Krankheitsstadien analysiert, inwiefern eine Korrelation zwischen Intensität der LFA-1-Expression und Symptomausprägung besteht. So sollten Hinweise darüber gesammelt werden, ob Mikroglia im Rahmen der Neuroinflammation über dieses CAM mit anderen Zellen interagieren und über dadurch die Erkrankung und deren Verlauf beeinflussen könnten.



**Abbildung 15: LFA-1-Expression auf Mikroglia Zellen in Abhängigkeit von der klinischen Symptomausprägung zu verschiedenen Krankheitsstadien**

Intensität der LFA-1-Expression auf Mikroglia aus den FACS Analysen der ZNS Proben, die zu den drei Erkrankungsphasen des ersten Symptomauftritts (a), des Symptommaximums (b) und des chronischen Symptomstadiums (c) entnommen wurden. Dargestellt sind die Symptomwerte der einzelnen ZNS Proben, nach Zeitpunkten aufgetrennt. Als Regressionswerte ergaben sich für a)  $R^2=0,3478$ , b)  $R^2=0,2591$ , c)  $R^2=0,04177$ .

Für die Phase des Symptombeginns fand sich zwar eine Korrelation zwischen der Intensität der LFA-1-Expression auf Mikroglia und der Symptomschwere, jedoch ging eine Steigerung der Symptomatik nur mit einem sehr geringen Anstieg der LFA-1-Intensität einher und umgekehrt. Im Gegensatz dazu war im weiteren Krankheitsverlauf der EAE, zum Zeitpunkt des Symptommaximums, eine signifikante Korrelation erkennbar. Dort war der Symptom-Schweregrad und die LFA-1-Expression auf Mikroglia-Zellen negativ korreliert ( $p=0,044$ ). Somit ging

eine verminderte LFA-1-Expression auf Mikroglia mit einer deutlich ausgeprägteren Symptomatik und funktionellen Beeinträchtigung der Versuchstiere einher. Diese Korrelation war in der chronischen Phase der Erkrankung aufgehoben, hier ließ sich im weiteren Verlauf der EAE kein eindeutiger Rückschluss von der LFA-1-Intensität auf die Schwere der Symptomatik ziehen.: Im Gegensatz zur Phase des Symptommaximums nahm im chronischen Stadium bei hoher LFA-1-Expression der Mikroglia die Symptomschwere tendenziell zu, war jedoch nicht signifikant messbar.

Folglich unterstützen diese Ergebnisse die These, dass LFA-1 auf Mikroglia Einfluss auf den Erkrankungsverlauf und die Schwere der Symptomatik nimmt. Im hochsymptomatischen Stadium steht eine erhöhte LFA-1-Expression auf Mikroglia in Relation zu einer abgeschwächten Krankheitsausprägung. Dementsprechend liegt die Annahme nahe, dass die Intensität des LFA-1 auf Mikroglia von immenser Relevanz im Verlauf der neuroinflammatorischen Erkrankung ist. Welche Rolle Mikroglia und ihre Expression von Zelladhäsionsmolekülen in der Interaktion mit anderen Zellen im Rahmen der MS einnehmen, lässt sich auf Basis der in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse diskutieren.

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde verdeutlicht, wie wichtig das Adhäsionsmolekül LFA-1 auf Mikroglia ist. Dies steht einerseits in Übereinstimmung mit früheren Studien, die gezeigt haben, dass zahlreiche Zelladhäsionsmoleküle von myeloiden Zellen wie Mikroglia exprimiert werden können (Lee und Benveniste, 1999, Raivich und Banati, 2004). Als relevante Vertreter dieser umfangreichen Gruppe von Membranproteinen wurde in dieser Dissertation der Fokus auf die Integrine LFA-1 und VLA-4, sowie aus der Immunglobulin-Superfamilie ICAM-1 und VCAM-1 gelegt. In Interaktion untereinander vermitteln die Bindungspartner LFA-1/ICAM-1, sowie VLA-4/VCAM-1 eine Vielzahl von Funktionen, darunter beispielweise die endotheliale T-Zell-Adhäsion und -Extravasation sowie die Kostimulation im Rahmen der Antigenpräsentation (Lee und Benveniste, 1999, Springer, 1990, Verma und Kelleher, 2017, Damle et al., 1993). Andererseits ist zum aktuellen Stand der Forschung wenig hinsichtlich der Rolle von CAMs auf Mikroglia im Rahmen der MS bekannt, erst recht nicht, in welcher Art sich diese unter neuroinflammatorischen Bedingungen verhält. Diese Dissertation konnte diese Forschungslücke näher beleuchten und Erkenntnisse über die Rolle von Zelladhäsionsmolekülen, insbesondere LFA-1 auf Mikroglia im Verlauf der EAE sammeln.

Im ersten Schritt konnte diese Promotionsarbeit eindrücklich zeigen, dass das Verlaufsmuster der Expression von CAMs im gesunden ZNS von der Expression während der Neuroinflammation abzugrenzen ist. Die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VLA-4 und VCAM-1 auf Mikroglia wiesen in dieser Gegenüberstellung keine deutliche Differenz auf oder wurden nur gering exprimiert. LFA-1 sticht hier deutlich hervor: Dieses CAM wird unter den vorherrschenden Inflamationsbedingungen wesentlich intensiver auf Mikroglia exprimiert. Erstmals konnte hier für Mikroglia in-vivo dargestellt werden, dass im Krankheitsfall eine signifikante Steigerung der Intensität dieses Zelladhäsionsmoleküls LFA-1 im Vergleich zum gesunden Organismus vorliegt.

Eine derartige phänotypische Veränderung dieser myeloiden Zellpopulation im Verlauf der Erkrankung lässt die Überlegung zu, dass damit einhergehend auch die Funktion dieser Zellen einer Änderung unterliegt. Bei einer, wie hier vorliegenden, Steigerung der LFA-1-Expression im kranken ZNS liegt die Vermutung nahe, dass darüber auch ein Anstieg der Interaktionen von Mikroglia mit anderen Zellen resultiert. Mikroglia hätten somit im Stadium der höchsten

Krankheitssymptomatik ein gesteigertes Potential über CAMs als Signalübermittler Einfluss auf weitere Zellen zu nehmen. Erste Ergebnisse dieser Arbeit weisen somit auf eine bedeutsame Rolle von LFA-1 auf Mikroglia in der EAE hin. Im Weiteren konnte deshalb mit Fokus auf dieses Zelladhäsionsmolekül systematisch dessen Expression im EAE-Verlauf untersucht werden, um der Frage nachzugehen, wie myeloide Zellen über diese CAMs Einfluss nehmen können.

Für das Integrin LFA-1, welches unter anderem auf Mikroglia zu finden ist, wurde bisher beobachtet, dass es hinsichtlich der Gesamtheit der ZNS-Zellen unter neuroinflammatorischen Bedingungen vermehrt exprimiert wird (Raine und Cannella, 1992, Cannella und Raine, 1995). In dieser Arbeit wurde nun erstmals quantitativ aufgedeckt, dass dies speziell für Mikroglia der Fall ist. In Abgrenzung zu dieser Arbeit wurden bereits publizierte Ergebnisse bisher entweder anhand immunhistochemischer, nicht-quantifizierender Analysen gewonnen oder beziehen sich nicht differenziert auf Mikroglia oder aber nicht auf entzündliche Erkrankungen des ZNS wie die EAE oder MS oder (Bo et al., 1996, Cannella und Raine, 1995, Hartlage-Rübsamen und Schliebs, 2001, Matsuda et al., 1994, Gultner et al., 2010).

Insbesondere für T-Zellen ist in der Literatur bereits ausgiebig belegt, dass LFA-1 eine essenzielle Rolle im MS Geschehen einnimmt und dabei in diverse Prozesse, wie beispielsweise die T-Zell-Adhäsion und -Extravasation, involviert ist (Laschinger und Engelhardt, 2000, Walling und Kim, 2018). Da sich dort zeigte, dass ein Eingriff in die Funktion von Zelladhäsionsmolekülen einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen kann, bestand Grund zur Annahme, dass auch die Modulation von Adhäsionsmolekülen auf Mikroglia vielversprechend ist. An diesem spannenden Ansatzpunkt wurde weiter geforscht, um nicht nur den Zusammenhang zwischen der CAM-Expression auf myeloiden Zellen und der neuroinflammatorischen Erkrankung an sich, sondern auch detaillierter über den gesamten Verlauf der EAE besser verstehen zu können. Die vorliegende Promotionsarbeit geht demnach über die zum aktuellen Zeitpunkt vorliegenden Studien hinaus, in dem Sinne, dass hier erstmalig der Fokus auch auf der Entwicklung der CAM-Expression speziell auf Mikroglia und zudem über den Verlauf der EAE analysiert wurde. Folglich stellt diese Dissertation die erste quantitative in-vivo Analyse der Zelladhäsionsmoleküle zu verschiedenen Krankheitszeitpunkten dar, welche speziell die CAM-Expression auf Mikroglia untersucht.

Im Vergleich der einzelnen Krankheitsstadien der EAE untereinander zeigt sich bezüglich der Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und VLA-4 für Mikroglia keine signifikante Entwicklung. Dies stellt dar, dass diese CAMs unabhängig von der Phase der Erkrankung exprimiert werden, was darauf hindeutet, dass deren Expression auf Mikroglia von der Krankheitssymptomatik unabhängig ist und das Ausmaß der Expression dieser CAMs nicht von der Symptomintensität abhängig ist.

Für LFA-1 auf Mikroglia konnte in dieser Dissertation ein deutlich erkennbarer und signifikanter Zusammenhang zwischen der Intensität der LFA-1-Expression und dem Verlauf der EAE belegt werden: Mikroglia exprimieren mit Fortschreiten der Erkrankung und damit einhergehender Symptomatik vermehrt das CAM LFA-1, bis zu einem Maximalwert zum Zeitpunkt der höchsten Krankheitssymptomatik. Im weiteren Verlauf wird in der chronischen Phase LFA-1 auf Mikroglia etwas weniger stark exprimiert. Dies entspricht einem simultanen Rückgang der EAE Symptome. Somit stellt LFA-1 ein interessantes Zielmolekül in der Forschung dar, insofern, dass es flexibel auf die Entwicklung der Neuroinflammation reagiert und die Intensität der Expression in Beziehung zur Krankheitssymptomatik steht.

Darüber hinaus lässt sich die LFA-1-Expression im Hinblick darauf betrachten, inwiefern sich die relative Anzahl der CAM-exprimierenden Mikroglia im Verlauf verändert. Dabei ist diese Population der LFA-1-exprimierenden Mikroglia klar von der Mikroglia-Population abgrenzen, welche LFA-1 nur in geringem Ausmaß exprimieren. Diese Betrachtungsweise unterstützt die bereits dargestellten Erkenntnisse dieser Promotionsarbeit, da auch hier eine deutliche Tendenz in Relation zum Verlauf der Symptomatik zu erkennen war. Hier konnte explizit aufgezeigt werden, dass die Phase der Erkrankung in Relation zum Anteil der Mikroglia, welche LFA-1 exprimieren, steht. Angesichts dieser Ergebnisse liegt die Schlussfolgerung nahe, dass diese myeloiden Zellen im Verlauf der EAE vermehrt dazu angeregt werden LFA-1 zu exprimieren. In der Konsequenz können diese LFA-exprimierenden Mikroglia darüber zunehmend mit weiteren Akteuren im EAE Geschehen interagieren.

Somit konnte in dieser Promotionsarbeit für LFA-1 im Verlauf der Erkrankung ein differenziertes Verlaufsmuster der CAM-Expression auf Mikroglia nachgewiesen werden, in dem Sinne, dass sich die Intensität der LFA-1-Expression kongruent zum Ausmaß der Krankheitssymptomatik entwickelt. Somit lässt sich festhalten, dass Adhäsionsmoleküle in der Neuroinflammation dahingehend reguliert sind, dass sie in Phasen intensiver Symptomschwere stärker ausgeprägt exprimiert

werden. Hier wurde durch in-vivo Analyse selektiv für Mikroglia in der EAE die These untermauert, dass LFA-1 im erkrankten ZNS eine bedeutende Rolle spielt und möglicherweise verstärkt die Interaktion von Mikroglia mit anderen Zellen des ZNS vermittelt.

Welche Bedeutung einer LFA-1-vermittelten Einflussnahme durch Mikroglia auf andere Zellen beizumessen ist, bleibt nicht zuletzt deshalb ungeklärt, weil frühere, nicht-Mikroglia-spezifische Untersuchungen zu LFA-1 und dessen Auswirkungen auf den Erkrankungsverlauf viel diskutiert und kontrovers umstritten sind. Bis heute herrscht Uneinigkeit über die Frage, ob Antikörper-Blockade dieses Adhäsionsmoleküls einen positiven oder aggravierenden Einfluss nimmt. In einigen Untersuchungen wirkt sich die Blockade von LFA-1 negativ auf den Krankheitsverlauf aus, verschlimmerte die Erkrankung beziehungsweise tötete die Versuchstiere im schlimmsten Fall sogar (Welsh et al., 1993, Cannella et al., 1993). Im Gegensatz dazu resultieren weitere LFA-1-Antikörperstudien in verspäteter oder komplett inhibierter Auslösung der EAE mit teils verminderter Krankheitsschwere und deuten auf einen protektiven Effekt von LFA-1 zusammen mit dessen Interaktionspartner ICAM-1 hin (Gordon et al., 1995, Kawai et al., 1996, Willenborg et al., 1996).

Mit dem Ziel diese Kontroverse der diskrepanten Antikörperstudien aufzuklären, wurden weiterführende Studien an Knockout-Tieren durchgeführt. Die Vermutung, dass die Interaktion von LFA-1 mit ICAM-1 einen pro-inflammatorischen Einfluss besitzt, wurde durch Versuche an ICAM-1<sup>-/-</sup>-Mäusen unterstützt. Dort wurde die Ausbildung einer EAE drastisch reduziert und folglich gezeigt, dass die Expression des Bindungspartners von LFA-1, ICAM-1, auf Immunzellen notwendig ist, um eine EAE auszubilden (Bullard et al., 2007). Diese These des pro-inflammatorischen Einflusses von LFA-1 wird teils auch durch die Untersuchung an LFA<sup>-/-</sup>-Mäusen bekräftigt: Dort fand sich in einigen Studien eine geringere Induktion der EAE und eine verminderte Krankheitsschwere in LFA<sup>-/-</sup>-Mäusen, was als Auswirkung einer verminderten Th17-Reifung diskutiert wird (Wang et al., 2007). Konträr dazu resultieren Untersuchungen an Knockout-LFA<sup>-/-</sup>-Mäusen, denen ZNS-reaktive T-Zellen injiziert wurden, in einer Exazerbation der EAE mit letalen Ereignissen (Dugger et al., 2009). Dies lässt wiederum vermuten, dass diesem CAM unter gewissen Bedingungen auch eine anti-inflammatorische Rolle zukommen kann. Zum aktuellen Stand der Forschung ist diese Debatte letztlich noch ungeklärt und es besteht noch kein Konsens über die Rolle von LFA-1 bzw. dessen Blockade in der EAE und MS.

Zusammenfassend stellen die bis hierhin gewonnenen Ergebnisse eine vielversprechende Forschungserkenntnis dar, welche zweifellos die Relevanz des Zelladhäsionsmoleküls LFA-1 im Verlauf der EAE aufzeigt.

Hinweise zur Klärung der Frage, inwiefern sich Mikroglia durch diese adaptierte CAM-Expression auszeichnen und auf welche Weise sich diese Expressionsmuster auf den verschiedenen Populationen myeloider Zellen voneinander unterscheiden, konnten durch die Gegenüberstellung myeloider Zellarten im neuroinflammatorischen ZNS erlangt werden. Die Ergebnisse lassen darauf rückschließen, welche Population mithilfe CAM-vermittelter Prozesse Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen und somit die Symptomatik entweder verbessern oder verschlimmern könnte.

Für eine aussagekräftige Untersuchung ist deshalb zunächst einmal eine möglichst klare Abgrenzung von Mikroglia und Makrophagen nötig. Da zahlreiche Studien keine klare Unterscheidung zwischen Makrophagen und Mikroglia treffen, sind vermutlich einige Forschungsergebnisse von Mikroglia auf die Funktion von Makrophagen übertragbar (Greter et al., 2015). In dieser Arbeit wurde eine Annäherung an die Unterscheidung dieser beiden Zellarten anhand ihrer Expression des Oberflächenmoleküls CD45 vorgenommen, eine Methode, die zwar etabliert, jedoch ebenfalls nur eingeschränkt zwischen Mikroglia und Makrophagen unterscheiden lässt (Ford et al., 1995, Ponomarev et al., 2005). Die Distinktion könnte in zukünftigen Studien durch Verwendung eines zusätzlichen molekularen Markers verbessert werden. Diesbezüglich wären etwa TMEM119 und P2RY12 zu nennen, welche in der Literatur oftmals als verlässliches Merkmal zur Differenzierung beschrieben werden (Zrzavy et al., 2017, Butovsky et al., 2014, Hickman et al., 2013).

In der Literatur wird des Weiteren die Theorie postuliert, dass in Abhängigkeit vom Krankheitszeitpunkt der Einfluss einer myeloiden Zellart überwiegt: In frühen Stadien der MS sollen demnach hauptsächlich die einwandernden Makrophagen als Effektorzellen der Demyelinisierung zur ZNS Schädigung beitragen, indem sie unter anderem als APZ fungieren und weitere, pro-inflammatorische Zellarten aktivieren. Im Kontrast dazu würden im weiteren Verlauf die ZNS residenten Mikroglia eine Phagozytosefunktion übernehmen und somit Remyelinisierungsvorgänge durch die Beseitigung von Zelltrümmern ermöglichen (Yamasaki et al., 2014, Goldmann und Prinz, 2013, Brendecke und Prinz, 2015). In dieser Arbeit wurden vorerst Makrophagen und Mikroglia aus dem ZNS von an EAE erkrankten Mäusen systematisch einander gegenübergestellt und schließlich

mit peripheren Makrophagen aus der Milz verglichen. Dabei zeigte sich als erste Erkenntnis, dass Makrophagen, die das ZNS infiltriert hatten, deutlich stärker alle der vier untersuchten Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1, VLA-4 und LFA-1 exprimieren als dies für Mikroglia der Fall war. Jedoch ist die Expression der untersuchten Zelladhäsionsmoleküle VCAM-1, VLA-4 und LFA-1 auf ZNS-infiltrierten Makrophagen erheblich geringer als auf Makrophagen der Milz. Dabei unterscheidet sich die CAM-Expression in der Peripherie und im ZNS derart stark voneinander, dass davon auszugehen ist, dass die Expression spezifisch und individuell für jedes Organsystem reguliert wird. Aus diesen Ergebnissen lässt sich daher ableiten, dass sich selbst für ein und dieselbe Zellart zum selben Krankheitszeitpunkt ein differentielles Expressionsverhalten in Abhängigkeit von der Zelllokalisierung zeigt. Eine mögliche Erklärung dafür wäre ein Einfluss von externen Faktoren auf die Makrophagen, welche im ZNS und in der Milz aufgrund grundsätzlich völlig unterschiedlichen Umfelds stark voneinander abweichen (Gosselin et al., 2014, Bogie et al., 2014, Chu et al., 2018). Da die Expression von CAMs beispielsweise auch vom Zytokin-Milieu beeinflusst wird, lässt sich annehmen, dass dies einer der Faktoren ist, die zu den Unterschieden in der CAM-Intensität auf verschiedenen Makrophagen-Populationen beitragen (Lee und Benveniste, 1999, Brosnan et al., 1995, Cannella und Raine, 1995).

Weiterhin wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Expression von LFA-1 auf Makrophagen, welche das ZNS infiltrieren, im Verlauf der EAE ein ähnliches Muster beschrieb, wie sich dies für Mikroglia darstellte. Demgegenüber konnte jedoch für Makrophagen aus der Milz in dieser Form kein derart deutlich erkennbares Expressionsmuster nachgewiesen werden. In der Peripherie wurde auf myeloiden Zellen die Expression von Zelladhäsionsmolekülen in der hochsymptomatischen Krankheitsphase verglichen mit gesunden Proben der Milz nur unerheblich gesteigert.

Darüber hinaus wurden die untersuchten CAMs auf peripheren Makrophagen selbst bei detaillierter Betrachtung im Verlauf der EAE in keinerlei offenkundiger Abhängigkeit vom Symptomstadium exprimiert. Hinsichtlich LFA-1 verdeutlichen die Ergebnisse demnach, dass für Makrophagen der Milz nicht davon auszugehen ist, dass die LFA-1-Expression in Beziehung zum Symptomverlauf stünde. Folglich war im Gegensatz zu myeloiden Zellen im ZNS auf Makrophagen in der Peripherie keine signifikante Regulation von LFA-1 über den Verlauf der Erkrankung zu erkennen.

Die sich daraus ergebende Schlussfolgerung ist, dass sich diese charakteristische Entwicklung der CAM-Expression im Verlauf der EAE exklusiv auf das ZNS beschränkt. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass sich die CAM-Expression im weiteren bzw. die LFA-1-Expression im engeren Sinne ausschließlich auf myeloiden Zellen im ZNS der Symptomentwicklung entsprechend verhält. Ein Anstieg der LFA-1-Intensität auf ZNS-infiltrierten Makrophagen in Relation zur steigenden Krankheitssymptomatik indiziert eine Anregung der Expression dieses Zelladhäsionsmoleküls unter steigenden entzündlichen Bedingungen des ZNS. Auf Basis dessen lässt sich diskutieren, ob dies dazu dient, die Interaktion von myeloiden Zellen mit anderen Zellen zu ermöglichen und eine gesteigerte LFA-1-Expression in einer gesteigerten Interaktion von myeloiden Zellen mit anderen Akteuren der Neuroinflammation resultiert.

Die hier gewonnen Ergebnisse führen zu der Erkenntnis, dass LFA-1 einen derart differenzierten und starken Anstieg unter Inflammationsbedingungen selektiv auf myeloiden Zellen des ZNS durchläuft. Es muss an dieser Stelle offenbleiben, aus welchem Grund solch eine Veränderung der LFA-1-Expression ausschließlich im ZNS vorzufinden ist. Eine mögliche Erklärung dafür wäre beispielsweise die unterschiedlichen Bindungspartner im Vergleich zwischen ZNS und Peripherie. Die spezifische Änderung der LFA-1-Expression, welche derart nur im ZNS vorzufinden ist, lässt sich möglicherweise auf das dort vorherrschende, einzigartige Milieu und insbesondere die ZNS-spezifischen Interaktionspartner zurückführen. Da der Bindungspartner ICAM-1 im ZNS unter anderem von Endothelzellen, Mikroglia und Makrophagen exprimiert wird, liegt die Vermutung nahe, dass durch die Regulation der LFA-1-Expression eine Interaktion mit diesen Zelltypen begünstigt wird. Darüber könnten Prozesse wie die Phagozytose von Zelltrümmern durch Mikroglia oder auch die Aktivierung von Lymphozyten vorangetrieben werden (Werner et al., 1998, Hailer et al., 1997, Sobel et al., 1990, Walling und Kim, 2018).

Diese Arbeit zeigt, dass in der Peripherie die LFA-1-vermittelte Interaktion weniger Veränderung in Abhängigkeit von dem Ausmaß der Inflammation erfährt, als dies für Mikroglia und Makrophagen im ZNS der Fall ist. Im Weiteren wurde nun die noch offene Frage näher beleuchtet, welche Art von Einfluss Mikroglia über LFA-1 als Signalvermittler an andere Zellen nehmen können. Zur Klärung der Frage, inwiefern ein CAM-vermitteltes gesteigertes Interaktionspotential der Mikroglia mit einem pro- oder einem anti-inflammatorischen Genprofil korreliert, wurden

Mikroglia in Abhängigkeit vom Ausmaß ihrer LFA-1-Expression in zwei Populationen selektiert. So konnten für LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia im Vergleich zu LFA-1<sup>low</sup>-Mikroglia anhand qRT-PCR-Untersuchungen der RNA-Gehalt des eher pro-inflammatorisch wirkenden CCL-2- und TNF- $\alpha$ -Gens, sowie im Kontrast dazu des anti-inflammatorisch wirkenden IL-4-Gens beurteilt werden. Indem diese Analyse nicht nur zum Zeitpunkt der stärksten Krankheitssymptomatik, sondern darüber hinaus auch in der chronischen Phase der Erkrankung erfolgte, konnte Bezug zum Krankheitsstadium und damit einhergehender Symptomschwere genommen werden.

Wie diese Arbeit eindeutig offenlegt, sind Mikroglia-Populationen in ihrer Genexpression bestimmter pro- und anti-inflammatorischer Gene anhand der Intensität ihrer CAM-Expression voneinander zu differenzieren. So konnten im Rahmen dieser Arbeit für das Zytokin IL-4 deutliche Unterschiede im Ausmaß des intrazellulären RNA-Gehalts zwischen den untersuchten Mikroglia-Populationen gezeigt werden. Dabei war zu erkennen, dass Mikroglia, die eine intensive LFA-1-Expression aufweisen, im Stadium des Symptommaximums verstärkt das anti-inflammatorische Zytokin IL-4 produzieren. Erstmals konnte hier nachgewiesen werden, dass in dieser Phase der höchsten Krankheitsaktivität eine hohe LFA-1-Expression auf Mikroglia mit einer gesteigerten IL-4-Produktion einhergeht.

Für das Zytokin IL-4 wird in der Literatur beschrieben, dass dessen Produktion durch myeloide Zellen anti-inflammatorische Effekte vermittelt (Chu et al., 2018, Brendecke und Prinz, 2015). So ist IL-4 beispielsweise an der Regeneration des ZNS beteiligt, indem es myeloide Zellen zum Phagozytieren anregt (Vogelaar et al., 2018, Smith, 2001, Ponomarev et al., 2007). Zudem wurde für dieses Zytokin gezeigt, dass sich eine hohe Produktion im ZNS positiv auf den Verlauf der EAE auswirkt. In Übereinstimmung dazu bewirkt ein Defizit an IL-4 eine drastische Verschlimmerung der EAE (Jiang et al., 2014, Ponomarev et al., 2007, Falcone et al., 1998). Des Weiteren ist im Hinblick auf die Funktion von Mikroglia in der MS relevant, dass Mikroglia durch IL-4 dazu stimuliert werden die Oligodendrogenese anzuregen (Butovsky et al., 2006). Dies lässt sich als weiteren anti-inflammatorischen und regenerativen Effekt ansehen, der durch IL-4 und folglich von LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia verstärkt vermittelt werden kann.

Darüber hinaus hat das unter anderem durch LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia ausgeschüttete Zytokin IL-4, wie Studien zeigen, auch einen rückwirkenden Einfluss auf die Mikroglia Population (Merson et al., 2010, Chu et al., 2018). In Zusammenschau mit den Beobachtungen dieser Arbeit, dass LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia vermehrt IL-4

produzieren, wird so die Überlegung aufgeworfen, dass dies als selbstverstärkender Feedback-Mechanismus wirken könnte. Dadurch bestände die Möglichkeit, dass durch Zytokinausschüttung der LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia wiederum die IL-4-Produktion in weiteren myeloiden Zellen angeregt wird.

All diese Eigenschaften von IL-4 führen dazu, dass dieses Zytokin in der Erforschung der Pathogenese neuroinflammatorischer Erkrankungen eine bedeutende Rolle spielt. Folglich stellt eine signifikant veränderte IL-4-Produktion, wie hier für LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia aufgezeigt, eine Erkenntnis von großer Relevanz dar und bietet einen interessanten Ansatz für weiterführende Forschung.

Auf Basis der in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse lässt sich festhalten, dass Mikroglia, welche durch die vermehrte LFA-1-Expression ein gesteigertes Bindungspotential aufweisen, durch ihre IL-4-Produktionen die Fähigkeit besitzen vermehrt Einfluss auf ihre Interaktionspartner zu nehmen. Somit nehmen LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia zunächst im Stadium der stärksten Krankheitssymptomatik durch die gesteigerte IL-4-Produktion anti-inflammatorischen Einfluss und könnten auf diese Weise einen milderen Verlauf der Erkrankung begünstigen.

Diese These wird durch die Ergebnisse der Analyse von Mikrogliazellen der chronischen Erkrankungsphase untermauert. Mit Rückgang der Krankheitssymptome in diesem chronischen Stadium lässt sich hier eine deutliche Differenz in der IL-4-Produktion im Vergleich der zwei Mikroglia-Populationen nachweisen. Dabei ist der intrazelluläre RNA-Gehalt von IL-4 für Mikroglia, welche LFA-1 in höherem Ausmaß exprimieren, wesentlich stärker ausgeprägt. Folglich liegt die Annahme nahe, dass LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia, welche ein damit einhergehendes gesteigertes LFA-1-vermitteltes Interaktionspotential besitzen, auch in dieser chronischen Phase aufgrund der erhöhten IL-4-Produktion für die Abnahme der Krankheitsintensität im EAE-Verlauf von Bedeutung sein könnten.

Im Gegensatz dazu lässt sich für die pro-inflammatorisch wirkenden Botenstoffe CCL-2 und TNF- $\alpha$  weder in der hochsymptomatischen noch in der chronischen Krankheitsphase ein Unterschied zwischen LFA-1<sup>low</sup>- mit LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia hinsichtlich dessen RNA-Gehalt erkennen. Daher ist nicht davon auszugehen, dass die Produktion von CCL-2 oder TNF- $\alpha$  in Korrelation zur LFA-1-Expression auf myeloiden Zellen in der EAE steht. Die Vermutung liegt nahe, dass eine intensivere LFA-1-Expression auf Mikroglia nicht mit einem CCL-2 oder TNF- $\alpha$ -vermittelten pro-inflammatorischen Einfluss dieser Zellpopulation einhergeht. Dies trägt wiederum zu der bereits dargelegten Schlussfolgerung bei, dass eine

gesteigerte LFA-1-Expression auf Mikrogliazellen in Relation zu einem eher anti-inflammatorischen Phänotyp dieser myeloiden Zellen steht.

Darüberhinausgehend konnte diese Dissertation darlegen, dass sich auch die enzymatische Aktivität der Mikroglia-Populationen in Abhängigkeit von der LFA-1-Expression verändert. Neben der Arginase-1- wurde auch die iNOS-mRNA-Expression analysiert. Beide Enzyme können von Mikroglia produziert werden und sind in die Prozesse der MS involviert (Chu et al., 2018, Biber et al., 2014, Goldmann und Prinz, 2013). Diese beiden Enzyme agieren in der Neuroinflammation als kompetitive Gegenspieler, da beiden Enzymen L-Arginin als Substrat dient (Munder et al., 1998). Neuere Untersuchungen haben die These aufgeworfen, dass in Abhängigkeit von der Erkrankungsphase eines der Enzyme vermehrt durch myeloide Zellen produziert wird. Dabei wird postuliert, dass im Verlauf der EAE eine gesteigerte iNOS-Produktion in der Phase des Symptombeginns in eine Zunahme der Arginase-1-Produktion in der hochsymptomatischen und chronischen Phase stattfindet (Wasser et al., 2016, Giles et al., 2017, Jiang et al., 2014). Da diese beiden Enzyme unterschiedliche Rollen im Inflammationsgeschehen einnehmen, würde das Ausmaß der Enzymproduktion durch myeloide Zellen die Art des Einflusses dieser Population maßgeblich bestimmen.

Die Produktion des Enzyms Arginase-1 wird als Indikator für myeloide Zellen angesehen, welche eine anti-inflammatorische Rolle einnehmen (Ahn et al., 2012, Gordon und Martinez, 2010). Myeloide Zellen, die dieses Enzym exprimieren, können einen positiven Einfluss auf Entzündungsvorgänge nehmen, unter anderem indem sie Reparaturprozesse begünstigen (Pesce et al., 2009). In der Literatur finden sich zudem Studien über pathologische Vorgänge im ZNS, die eine Korrelation von Arginase-1-Expression und milderem Krankheitsverlauf belegen (Fenn et al., 2014, Miró-Mur et al., 2016). Für die akute Erkrankungsphase der EAE ist zudem bereits beschrieben, dass in diesem Stadium Arginase-1 verstärkt exprimiert wird (Xu et al., 2003, Ahn et al., 2012).

Die Expression dieses Enzyms ist jedoch auch immer in Zusammenschau mit dem vorherrschenden Zytokin-Milieu zu beurteilen, da beispielsweise IL-4 die Arginase-1-Expression induziert (Munder et al., 1998, Mills et al., 2000). Somit lässt sich die in dieser Arbeit dargestellte erhöhte IL-4-Produktion der LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia als ein möglicher Auslöser für eine hohe Arginase-1-Produktion diskutieren.

Demgegenüber wird iNOS oftmals als Marker für myeloide Zellen angewandt, welche in ihrer Funktion pro-inflammatorisch wirken (Munder et al., 1998, Chu et al., 2018). Diese Annahme basiert auf Studien, in denen durch Inhibition der iNOS

eine verkürzte Krankheitsdauer erzielt werden konnte (Shin et al., 2000, Hooper et al., 1997). Zudem lassen sich in aktiven MS Herden vermehrt myeloide Zellen nachweisen, die iNOS produzieren (De Groot et al., 1997, Hill et al., 2004). Dieses Enzym kann auf vielfältige Art und Weise die destruktiven Vorgänge in der MS und EAE fördern, etwa durch die Produktion von Stickstoffmonoxid, welches zytotoxische Eigenschaften besitzt (Smith et al., 1999, Jack et al., 2005).

Durch die verschiedenen Wirkungsweisen dieser beiden Enzyme auf die Prozesse der MS können myeloide Zellen durch deren Produktion potenziell völlig unterschiedlichen Einfluss nehmen. Welche Rolle Mikroglia in der Neuroinflammation einnehmen ist dementsprechend abhängig von der Balance zwischen dem tendenziell anti-inflammatorischen Enzym Arginase-1 und der iNOS, welche auf einen pro-inflammatorischen Phänotyp hindeutet.

Somit stellen die in dieser Dissertation gewonnenen Erkenntnisse, dass sowohl Arginase-1 als auch iNOS in LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia simultan verstärkt exprimiert werden, einen vielversprechenden Ansatzpunkt für weiterführende Forschung dar. Da sich eine Steigerung der Enzymproduktion auf die funktionelle Aktivität der Zellen auswirkt, wird durch die Beobachtungen dieser Dissertation suggeriert, dass bei verstärkter LFA-1-Expression über eine gesteigerte Arginase-1- und iNOS-Aktivität das MS Geschehen beeinflussen werden könnte. Auf Basis dessen lässt sich diskutieren, ob die selektierte LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia Population nochmal in Subtypen zu unterteilen wäre. Möglich wäre einerseits, dass LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia aus einer Entität von Mikroglia-Zellen bestehen, die sowohl die Enzyme Arginase-1 als auch iNOS simultan exprimieren. Andererseits könnte auch der Fall vorliegen, dass sich diese LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia wiederum in zwei Subpopulationen, je nach verstärkt exprimiertem Enzym, untergliedern lassen. Dies kann aus den bisher gewonnenen Ergebnissen noch nicht abgeleitet werden und bedarf weiterer experimenteller Untersuchungen. Jedoch legen die Ergebnisse dieser Arbeit dar, dass die LFA-1-Expression in einer positiven Relation zur enzymatischen Aktivität der Mikroglia-Zellen steht. Dadurch könnten LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia auf diesem Wege in den pathologischen Vorgängen des ZNS eine bedeutende Rolle einnehmen und somit den Erkrankungsverlauf beeinflussen.

Wie diese Arbeit jedoch auch aufzeigt, schließt eine anti-entzündliche Wirkung der Mikroglia, die man aufgrund der hohen Arginase-1-Produktion annehmen würde, nicht im gleichen Zuge einen destruktiven Einfluss von Mikroglia aus. Die Überlegung, dass eine gesteigerte LFA-1-Expression entweder auf die Arginase-1 oder iNOS-Produktion schließen lässt, konnte hier folglich nicht belegt werden,

stattdessen zeigen sich beide Enzyme erhöht. Dass beide Moleküle in LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia simultan verstärkt exprimiert werden, ist eine spannende Erkenntnis, die in dieser Dissertation gewonnen werden konnte. Folglich lässt sich eine verstärkte LFA-1-Expression nicht als eindeutigen Indikator für einen ausschließlich pro- oder anti-inflammatorischen Phänotyp dieser Zelle verwenden. Stattdessen ist womöglich das Gleichgewicht zwischen beiden Enzymen ausschlaggebend für die Art des Einflusses der Mikroglia, in dem Sinne, dass eine Änderung der Balance von Arginase-1 und iNOS die anti- oder pro-inflammatorische Funktionsweise der myeloiden Zellen vermittelt.

Diese Ergebnisse werfen jedoch die Frage auf, welche Funktion eine Steigerung sowohl der pro- als auch der anti-inflammatorischen Aktivität der LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia im Detail hat. Aufschlussreich könnte in dieser Hinsicht die tiefergehende Analyse der Möglichkeit einer Untergliederung der LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia-Population anhand des Enzyms, welches vermehrt exprimiert wird, sein. Zum aktuellen Zeitpunkt bleibt noch ungeklärt, aus welchem Grund diese Enzymsteigerung in Verbindung mit der gesteigerten LFA-1-Expression auf myeloiden Zellen ausgelöst wird. Dadurch wird umso mehr verdeutlicht, dass die Pathogenese der MS und die Funktion von Zelladhäsionsmolekülen auf Mikroglia in diesen Prozessen äußerst komplex ist und nach wie vor großes Forschungs- und Aufklärungspotential bietet.

Bisher konnte durch die weiterführenden Untersuchungen dieser Dissertation dargestellt werden, dass die oberflächliche CAM-Expression auch mit intrazellulären Anpassungen der Mikroglia einghergeht. Dabei zeigt sich, dass Oberflächenstrukturen wie LFA-1, die der Interaktion mit anderen Zellen dienen, in Relation zu einem veränderten genetischen Profil stehen. Eine potentielle Ursache dafür wäre, dass Mikroglia im Rahmen der MS bzw. deren Tiermodell EAE einer Änderung ihres Interaktionsverhalten unterliegen, welches sich in einer Steigerung der IL-4-, iNOS- und Arginase-1-Produktion in Mikroglia, die LFA-1 vermehrt exprimieren, äußert. In Betracht käme auch die umgekehrte Variante, dass Mikroglia, welche unter diesen Bedingungen interagieren, folglich zu einem aktiveren Phänotyp polarisiert werden, der vermehrt das Adhäsionsmolekül LFA-1 exprimiert. Unter dieser Annahme würde eine gesteigerte Enzymproduktion in einer Zunahme der LFA-1-Intensität auf Mikroglia-Zellen resultieren.

Bei Betrachtung des Zusammenhangs zwischen LFA-1-Expression und Symptomschwere ist in der Phase der höchsten Symptomausprägung eine umgekehrte Korrelation von Intensität der LFA-1-Expression auf Mikrogliazellen

und Krankheitsschwere auffällig. Zu diesem Zeitpunkt zeigt sich mit deutlicher Signifikanz, dass bezüglich Mikroglia-Zellen eine hohe LFA-1-Intensität mit einer geringen Krankheitssymptomatik einhergeht. Diese eindeutige Korrelation lässt sich in dieser Art und diesem Ausmaß nur in der Phase der stärksten Krankheitsschwere finden und unterstreicht erneut die Relevanz der CAM-Expression auf Mikroglia. Die Steigerung der LFA-1-Expression und die damit einhergehenden Veränderungen des intrazellulären RNA-Profiles können folglich die Intensität der Krankheitssymptomatik beeinflussen.

Eine Theorie zur Erklärung dieser Korrelation wären die intrazellulären Anpassungen, denen Mikroglia, welche LFA-1 in stärkerem Ausmaß exprimieren, unterliegen. So kann die in dieser Promotionsarbeit gezeigte Steigerung des anti-inflammatorischen IL-4 in LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia plausibel als eine mögliche Ursache für den Trend der rückläufigen Symptomwerte bei hoher LFA-1-Expression angesehen werden. Dies verdeutlicht, dass insbesondere in den Phasen verstärkter LFA-1-Intensität ein anti-inflammatorischer Einfluss dieser myeloiden Zellen auf das umgebende Milieu auftreten kann. Aus diesen Gründen lassen die Ergebnisse dieser Arbeit folgende Schlussfolgerung zu: Mikroglia im weiteren und LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia im engeren Sinne können in hochsymptomatischen Phasen durch das gesteigerte Potential der LFA-1-vermittelten Zell-Zell-Interaktion und simultan gesteigerter Produktion entzündungshemmender Mediatoren einen positiven Einfluss auf das Entzündungsgeschehen nehmen. Dadurch kommt ihnen eine bedeutende Relevanz im MS Geschehen zu.

Ein erster Erklärungsansatz, weshalb in der chronischen Phase diese umgekehrte Korrelation aufgehoben ist, wäre die in diesem Stadium verminderte Expression von LFA-1 auf Mikroglia bzw. die geringere Anzahl der LFA-1-exprimierenden Mikroglia-Zellen. Auf dieser Basis lässt sich diskutieren, ob dadurch auch die Interaktion von Mikroglia mit anderen Zellen in diesem Stadium wiederum rückläufig ist. Somit bestände zu diesem Zeitpunkt eine verminderte LFA-1-vermittelter Einflussnahme durch Mikroglia auf andere Zellen. Mit dieser Überlegung könnte auch begründet werden, weshalb im späteren Verlauf der Erkrankung trotz gesteigerter IL-4-Produktion der LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia keine Beziehung zwischen Symptomwert und LFA-1-Expression zu erkennen ist: Bei insgesamt verminderter LFA-1-Expression fällt womöglich selbst eine Steigerung des IL-4 kaum ins Gewicht und wirkt sich daher in dieser Phase weniger stark auf die Intensität der Krankheitssymptomatik aus.

Da unter neuroinflammatorischen Bedingungen laut Studienlage Mikroglia über LFA-1 mit zahlreichen ICAM-exprimierenden Zellen interagieren, darunter auch T-Zellen. Daher ist zu vermuten, dass Mikroglia mithilfe von LFA-1 unter pathologischen Bedingungen verstärkt Einfluss auf die Funktion weiterer Zellpopulationen nehmen können. Folglich besäßen Mikroglia so mithilfe dieses CAMs gegebenenfalls auch das Potential die T-Zell-Funktion zu beeinflussen und dadurch beispielsweise die inflammatorischen Prozesse in der MS zu fördern (Bullard et al., 2007, Lee und Benveniste, 1999). Da Mikroglia zudem auch mit Oligodendrozyten interagieren, wäre es von großem Interesse, zu erforschen, ob diese CAMs darin involviert sind und die Expression von LFA-1 gegebenenfalls einen Einfluss auf Remyelinisierungsvorgänge hätte (Domingues et al., 2016). Grundsätzlich lässt sich für multiple Kommunikationsvorgänge mit einer Vielzahl an Zellarten spekulieren, welche Rolle LFA-1 auf Mikroglia für diese Interaktionen spielt. Einige der aufgeworfenen Fragen konnten im Rahmen dieser Dissertation noch nicht eindeutig geklärt werden und verbleiben somit noch offen.

## 4.1 Ausblick und Implikationen

Weiterführende Experimente wären vonnöten, um die gewonnenen Erkenntnisse über die Expression von CAMs auf myeloiden Zellen im Zusammenhang mit der Pathogenese der MS besser einordnen zu können. In dieser Arbeit wurde bereits der Grundstein für tiefergehende Untersuchungen gelegt. So wäre die Rolle dieser Adhäsionsmoleküle, insbesondere auch LFA-1, in der Interaktion der myeloiden Zellen mit anderen Zellen des ZNS ein Ansatzpunkt für nachfolgende Analysen.

Eine konkrete Fragestellung wäre dabei etwa die Frage nach den Interaktionspartnern der Mikrogliazellen. So wäre es vielversprechend zu untersuchen, welche Art von Interaktionen die hier analysierten CAMs vermitteln. Auf diesem Wege ließen sich Hinweise sammeln, welche CAM-vermittelten Prozesse durch Mikroglia in der EAE bzw. MS gefördert werden. Dadurch könnte im Detail betrachtet werden ob Mikroglia über LFA-1 eher pro- oder anti-inflammatorische Auswirkungen haben, etwa indem sie zur Demyelinisierung beitragen oder dieser entgegenwirken. In weiterführender Forschung könnte gezielt untersucht werden, welche Zellen durch Mikroglia so beeinflusst werden. Denn wie bereits beschrieben, könnten je nach Interaktionspartner völlig unterschiedliche Effekte mittels LFA-1 vermittelt werden.

Im Hinblick auf die verschiedenen Krankheitsphasen wäre es aufschlussreich zu sehen, ob sich die Affinität der Mikroglia zu den Interaktionspartnern und die Interaktionsfrequenz zwischen den Stadien unterscheiden. Unter Umständen wären dadurch Rückschlüsse möglich, wie sich auch in Abhängigkeit der verschiedenen Phasen der Erkrankung die Art und Weise der Interaktion und des Einflusses von Mikroglia auf andere Zellen unterscheidet.

Denkbar wäre zudem die Untersuchung, ob das Ausmaß der LFA-1-Expression eine Korrelation zur Häufigkeit der Interaktion von Mikroglia mit anderen Zellen aufweist. Dies würde ein weiteres Puzzleteil zu der grundlegenden Frage beitragen, inwiefern die Expression von LFA-1 mit dem Potential zur Beeinflussung des Krankheitsverlaufs zusammenhängt. Durch künftige Versuche könnten die Zusammenhänge zwischen der Expression von CAMs bzw. LFA-1 und der darüber vermittelten Interaktion von Mikroglia mit anderen Zellen weiter identifiziert werden.

Diesbezüglich sollte nicht unerwähnt bleiben, dass zudem eine Analyse der exakten Lokalisation der LFA-1<sup>high</sup>- und LFA-1<sup>low</sup>-Mikroglia im ZNS noch aussteht. Dies wäre durchaus von Interesse, um weitere Hinweise zu sammeln, an welchen Prozessen LFA-1 auf Mikroglia im neuroinflammatorischen ZNS involviert ist.

Schließlich laufen im MS ZNS oftmals diverse Vorgänge simultan, jedoch in verschiedenen Regionen, ab, in denen Mikroglia teils einen positiven, teils aber auch einen negativen Einfluss ausüben (Brendecke und Prinz, 2015, Gao und Tsirka, 2011, Chu et al., 2018). Eine detaillierte Betrachtung, ob die Population der LFA-1<sup>low</sup>- oder LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia vermehrt in MS-Läsionen oder abseits dieser vorzufinden sind, könnte diesbezüglich einen tieferen Einblick geben. Mittels histochemischer Verfahren könnte die Fragestellung nach der Lokalisation LFA-1-exprimierender myeloider Zellen zusätzlich zu den Erkenntnissen aus dieser Arbeit aufgearbeitet werden, dies hätte jedoch den Rahmen dieser Dissertation gesprengt.

Des Weiteren bleibt offen, was als Auslöser für die gesteigerte LFA-1-Expression auf Mikroglia im Verlauf der EAE fungiert. Dabei wäre im Hinblick auf mögliche Faktoren, die diese gesteigerte CAM-Expression induzieren, eine Analyse der Mikroglia und deren Umgebung noch vor der gesteigerten LFA-1-Expression von Interesse. Dabei könnte untersucht werden, ob dieser LFA-1-Anstieg als Reaktion auf eine direkte Interaktion mit anderen Zellen anzusehen ist oder durch ein verändertes Zytokin- und Chemokin-Milieu ausgelöst wird. Es lässt sich zudem diskutieren, ob ein möglicher Auslöser dafür das gesteigerte Potential zur Interaktion mit anderen Zellen wäre und diese LFA-1<sup>high</sup>-Zellen aufgrund dieser Interaktion selektiert und stimuliert werden. Denkbar wäre jedoch auch dass dies ein Resultat der Milieuveränderung in der Inflammation ist, bei der eine generelle Stimulierung aller Mikroglia Zellen vorliegt und somit eine unspezifische Steigerung der LFA-1-Expression ausgelöst würde.

Im Hinblick auf zukünftige Forschung an Adhäsionsmolekülen auf Mikroglia und ihrer Rolle in der EAE wäre Verbesserungspotential bei der Auswahl des Probenmaterials gegeben. So sollte neben Konstanz der verwendeten Untersuchungsmaterialien auch die Mäuse-Art, sowie die angewandten Systeme zur Induktion der EAE nicht variiert werden. Die Umgebung und das Milieu der Mäuse unterlag in diesen Versuchen der vorschriftsgemäßen konstanten Überwachung und Regulierung, sodass diese Variablen einen möglichst geringen Einfluss auf das Studienergebnis besaßen.

Ein einschränkender, jedoch nicht zu verbessernder Faktor der Versuche ist der individuelle Zeitpunkt des Symptomauftretens und der -intensität, sodass eine simultane Analyse der Mäuse erschwert wird. Naturgemäß ist es nicht möglich, über Kenntnisse zu verfügen, wie sich die Krankheitssymptomatik in Zukunft entwickeln wird, um so den Zeitpunkt des Symptommöhepunkts zu erkennen und

eine Analyse unter völlig gleichwertigen Bedingungen vorzunehmen. Da diese Problematik mit den aktuellen Methoden nicht zu beheben ist, wurde in dieser Arbeit wie beschrieben eine bestmögliche Vorgehensweise etabliert.

Des Weiteren wurde die Interpretation der vorliegenden Ergebnisse dadurch erschwert, dass die Neuroinflammation und die CAM-Expression vielschichtige und multifaktorielle Prozesse sind. Zahlreiche nicht beeinflussbare Faktoren, wie etwa Zytokine, aber auch andere Zellen, nehmen auf direktem Weg Einfluss auf die Entwicklung und den Verlauf der EAE. Ebenso wird die Expression von CAMs, wie beispielsweise LFA-1, nicht nur durch zahlreiche erforschte, sondern auch durch noch unbekannte Faktoren beeinflusst.

Dies mindert den Erkenntnisgewinn dieser Arbeit jedoch nicht. Vielmehr besitzen jegliche neugewonnenen Einblicke der MS Forschung das Potential, das Wissen über die LFA-1-Expression auf Mikroglia weiter zu steigern. Aus diesem Grund wurde mit dieser Promotionsarbeit ein Beitrag zu dem vielversprechenden Thema der Zelladhäsionsmoleküle auf myeloiden Zellen im MS Geschehen geleistet, welcher auch in Zukunft von bedeutender Relevanz und in Zusammenschau mit künftigen Forschungserkenntnissen kontinuierlich neu einzuordnen sein wird.

## 5 Zusammenfassung

Mikroglia tragen als ZNS-residente myeloide Zellen eine bedeutende Rolle in den Prozessen neuroinflammatorischer Erkrankungen wie der MS und deren Tiermodell EAE. Dass Mikroglia ihre zahlreichen Funktionen unter anderem in Interaktion mit weiteren Zellen des ZNS ausüben, wurde umfassend erforscht und in der Literatur beschrieben (Hemmer et al., 2015, Lee und Benveniste, 1999). Grundsätzlich besitzen Mikroglia das Potential, einerseits positiven, andererseits auch schädlichen Einfluss auf andere Zellen auszuüben (Raivich und Banati, 2004, Chu et al., 2018). Jedoch sind die genauen Zusammenhänge dieser Interaktionen von Mikroglia mit anderen Zellarten und dessen Auswirkungen zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht im Detail aufgeklärt. Zelladhäsionsmoleküle stellen dabei eine bedeutsame Möglichkeit dar, um diese Interaktionen zu vermitteln (Lee und Benveniste, 1999). Trotz der unverkennbaren Relevanz von Zelladhäsionsmolekülen in der Pathogenese der MS und darüber hinaus als möglicher therapeutischer Ansatz ist bislang wenig zu ihrer spezifischen Rolle auf myeloiden Zellen des ZNS, den Mikroglia, bekannt.

Fasst man die Ergebnisse dieser Dissertation zusammen, so wurden neuartige und fundierte Anhaltspunkte für die essentielle Rolle der LFA-1-exprimierenden Mikroglia in der Neuroinflammation dargelegt. Erstmals konnte in dieser Promotionsarbeit anhand einer quantitativen in-vivo Analyse der Zelladhäsionsmoleküle in den unterschiedlichen Krankheitsstadien die Entwicklung der CAM-Expression auf Mikroglia aufgezeigt werden. Dabei ließ sich zunächst insbesondere für LFA-1 eine deutlich gesteigerte Expression auf Mikroglia in an EAE erkrankten Mäusen belegen. Bei Betrachtung des Verlaufs der Neuroinflammation konnte für LFA-1 gezeigt werden, dass dieses CAM auf Mikroglia in einem eindrücklichen Muster exprimiert wird, welches in Relation zur Krankheitsphase steht. Dabei zeigte die Intensität der LFA-1-Expression einen deutlichen Zusammenhang zur Entwicklung der Krankheitssymptomatik: So wird LFA-1 auf Mikroglia am intensivsten zum Zeitpunkt der höchsten Krankheitsintensität exprimiert. Dass diese Entwicklung der CAM-Expression über den EAE Verlauf organspezifisch ist und sich nur im ZNS zeigt, wurde in dieser Arbeit mittels Untersuchungen an myeloiden Zellen der Milz und des ZNS nachgewiesen. Da MS und EAE entzündliche Erkrankungen des ZNS sind, lag somit der Fokus im weiteren Verlauf auf der CAM-Expression auf myeloiden Zellen des ZNS, insbesondere im Hinblick auf die LFA-1-Expression.

Erste Erkenntnisse zur Beantwortung der Frage, inwiefern LFA-1 auf Mikroglia in den pathologischen Prozessen der Neuroinflammation involviert sind, konnten durch Untersuchungen der intrazellulären Charakteristika dieser Zellpopulation, welche LFA-1 in einem hohen Ausmaß exprimieren, gewonnen werden. Anhand von in-vitro Analysen des RNA-Gehalts von pro- und anti-inflammatorischen Zytokin- bzw. Chemokin-Genen in Mikroglia konnte unter anderem gezeigt werden, dass in LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia ein höherer Gehalt des anti-inflammatorischen IL-4 vorliegt. Somit belegt diese Arbeit, dass eine verstärkte LFA-1-Expression auf Mikroglia mit veränderten intrazellulären Prozessen einhergeht. Darüber hinaus zeigte sich in dieser Arbeit eine Korrelation zwischen LFA-1-Intensität und RNA-Gehalt der Enzyme Arginase-1 und iNOS, da in LFA-1<sup>high</sup>-Mikroglia eine höhere RNA-Konzentration dieser beiden Enzyme festgestellt werden konnte.

Anschließend wurde der Frage nachgegangen, inwiefern Mikroglia in verschiedenen Krankheitsphasen mithilfe dieses CAMs schädigenden oder regenerativen Einfluss ausüben und durch die Interaktion mit anderen Zellarten Auswirkungen auf die Neuroinflammation haben. Diesbezüglich konnte in dieser Arbeit ein Zusammenhang zwischen der Expression des CAMs LFA-1 und der Symptomschwere belegt werden. Insbesondere für die Phase höchster Krankheitsintensität besteht eine signifikante Korrelation von LFA-1-Intensität auf Mikroglia und Intensität der Krankheitssymptomatik. Dies lässt die Annahme zu, dass durch LFA-1-vermittelte Interaktion von Mikroglia mit anderen Zellen die Vorgänge im ZNS beeinflusst werden.

Diese Dissertation unterstreicht somit die Signifikanz der Rolle von LFA-1 auf Mikroglia in der Neuroinflammation. Durch diese Promotionsarbeit konnten neue Erkenntnisse bezüglich der Relation von Zelladhäsionsmolekül-Expression, besonders LFA-1, und der Rolle von Mikroglia in neuroinflammatorischen Erkrankungen erlangt werden. Abschließend lässt sich festhalten, dass die Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie LFA-1 auf Mikroglia, ein spannendes und in weiten Teilen noch unerforschtes Gebiet der MS Forschung darstellt. Hier bietet sich ein vielversprechender Angriffspunkt für weiterführende Forschung, welche einen bedeutenden Anteil zur erfolgreichen Behandlung neuroinflammatorischer Erkrankungen beitragen könnte.

## 6 Literaturverzeichnis

- AHN, M., YANG, W., KIM, H., JIN, J.-K., MOON, C. & SHIN, T. 2012. Immunohistochemical study of arginase-1 in the spinal cords of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. 1453, 77-86.
- AJAMI, B., BENNETT, J. L., KRIEGER, C., MCNAGNY, K. M. & ROSSI, F. M. 2011. Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci*, 14, 1142-9.
- AKIYAMA, H. & MCGEER, P. L. 1990. Brain microglia constitutively express beta-2 integrins. *Journal of neuroimmunology*, 30, 81-93.
- ALMOLDA, B., GONZALEZ, B. & CASTELLANO, B. 2010. Activated microglial cells acquire an immature dendritic cell phenotype and may terminate the immune response in an acute model of EAE. *J Neuroimmunol*, 223, 39-54.
- ALMOLDA, B., GONZALEZ, B. & CASTELLANO, B. 2011. Antigen presentation in EAE: role of microglia, macrophages and dendritic cells. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 16, 1157-71.
- BAGYINSZKY, E., GIAU, V. V., SHIM, K., SUK, K., AN, S. S. A. & KIM, S. 2017. Role of inflammatory molecules in the Alzheimer's disease progression and diagnosis. *J Neurol Sci*, 376, 242-254.
- BARON, J. L., MADRI, J. A., RUDDLE, N. H., HASHIM, G. & JANEWAY, C. A., JR. 1993. Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *The Journal of experimental medicine*, 177, 57-68.
- BENARROCH, E. E. 2013. Microglia: Multiple roles in surveillance, circuit shaping, and response to injury. *Neurology*, 81, 1079-88.
- BENVENISTE, E. N. 1997. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med (Berl)*, 75, 165-73.
- BERGER, J. R. 2011. Functional improvement and symptom management in multiple sclerosis: clinical efficacy of current therapies. *Am J Manag Care*, 17 Suppl 5 Improving, S146-53.
- BEVILACQUA, M. P. 1993. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annual review of immunology*, 11, 767-804.
- BIBER, K., OWENS, T. & BODDEKE, E. 2014. What is microglia neurotoxicity (Not)? *Glia*, 62, 841-54.
- BINNERTS, M. E. & VAN KOOYK, Y. 1999. How LFA-1 binds to different ligands. 20, 240-245.
- BLOCK, M. L. & HONG, J. S. 2007. Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. *Biochem Soc Trans*, 35, 1127-32.
- BO, L., PETERSON, J. W., MORK, S., HOFFMAN, P. A., GALLATIN, W. M., RANSOHOFF, R. M. & TRAPP, B. D. 1996. Distribution of immunoglobulin superfamily members ICAM-1, -2, -3, and the beta 2 integrin LFA-1 in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol*, 55, 1060-72.
- BOGIE, J. F., STINISSEN, P. & HENDRIKS, J. J. 2014. Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol*, 128, 191-213.
- BOVEN, L. A., VAN MEURS, M., VAN ZWAM, M., WIERENGA-WOLF, A., HINTZEN, R. Q., BOOT, R. G., AERTS, J. M., AMOR, S.,

- NIEUWENHUIS, E. E. & LAMAN, J. D. 2006. Myelin-laden macrophages are anti-inflammatory, consistent with foam cells in multiple sclerosis. *Brain*, 129, 517-26.
- BRENDECKE, S. M. & PRINZ, M. 2015. Do not judge a cell by its cover--diversity of CNS resident, adjoining and infiltrating myeloid cells in inflammation. *Semin Immunopathol*, 37, 591-605.
- BROCKE, S., PIERCY, C., STEINMAN, L., WEISSMAN, I. L. & VEROMAA, T. 1999. Antibodies to CD44 and integrin  $\alpha_4$ , but not L-selectin, prevent central nervous system inflammation and experimental encephalomyelitis by blocking secondary leukocyte recruitment. 96, 6896-6901.
- BRONNUM-HANSEN, H., KOCH-HENRIKSEN, N. & STENAGER, E. 2004. Trends in survival and cause of death in Danish patients with multiple sclerosis. *Brain*, 127, 844-50.
- BROSNAN, C. F., CANNELLA, B., BATTISTINI, L. & RAINE, C. S. 1995. Cytokine localization in multiple sclerosis lesions: correlation with adhesion molecule expression and reactive nitrogen species. *Neurology*, 45, S16-21.
- BROWNE, P., CHANDRARATNA, D., ANGOOD, C., TREMLETT, H., BAKER, C., TAYLOR, B. V. & THOMPSON, A. J. 2014. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology*, 83, 1022-4.
- BROWNLEE, W. J., HARDY, T. A., FAZEKAS, F. & MILLER, D. H. 2017. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet*, 389, 1336-1346.
- BULLARD, D. C., HU, X., SCHOEB, T. R., COLLINS, R. G., BEAUDET, A. L. & BARNUM, S. R. 2007. Intercellular adhesion molecule-1 expression is required on multiple cell types for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178, 851-857.
- BUTOVSKY, O., JEDRYCHOWSKI, M. P., MOORE, C. S., CIALIC, R., LANSER, A. J., GABRIELY, G., KOEGLSPERGER, T., DAKE, B., WU, P. M., DOYKAN, C. E., FANEK, Z., LIU, L., CHEN, Z., ROTHSTEIN, J. D., RANSOHOFF, R. M., GYGI, S. P., ANTEL, J. P. & WEINER, H. L. 2014. Identification of a unique TGF-beta-dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci*, 17, 131-43.
- BUTOVSKY, O., ZIV, Y., SCHWARTZ, A., LANDA, G., TALPALAR, A. E., PLUCHINO, S., MARTINO, G. & SCHWARTZ, M. 2006. Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci*, 31, 149-60.
- CANNELLA, B., CROSS, A. H. & RAINE, C. S. 1993. Anti-adhesion molecule therapy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 46, 43-55.
- CANNELLA, B. & RAINE, C. S. 1995. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*, 37, 424-35.
- CHEN, X., MA, X., JIANG, Y., PI, R., LIU, Y. & MA, L. 2011. The prospects of minocycline in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 235, 1-8.
- CHIGAEV, A. & SKLAR, L. A. 2012. Aspects of VLA-4 and LFA-1 regulation that may contribute to rolling and firm adhesion. *Front Immunol*, 3, 242.
- CHU, F., SHI, M., ZHENG, C., SHEN, D., ZHU, J., ZHENG, X. & CUI, L. 2018. The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 318, 1-7.

- COMPSTON, A. & COLES, A. 2008. Multiple sclerosis. *Lancet*, 372, 1502-17.
- CONFAVREUX, C. & VUKUSIC, S. 2006. Accumulation of irreversible disability in multiple sclerosis: from epidemiology to treatment. *Clin Neurol Neurosurg*, 108, 327-32.
- CONSTANTINESCU, C. S., FAROOQI, N., O'BRIEN, K. & GRAN, B. 2011. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*, 164, 1079-106.
- COTMAN, C. W., HAILER, N. P., PFISTER, K. K., SOLTESZ, I. & SCHACHNER, M. 1998. Cell adhesion molecules in neural plasticity and pathology: similar mechanisms, distinct organizations? *Progress in neurobiology*, 55, 659-669.
- CROXFORD, A. L., SPATH, S. & BECHER, B. 2015. GM-CSF in Neuroinflammation: Licensing Myeloid Cells for Tissue Damage. *Trends Immunol*, 36, 651-662.
- DAMLE, N. K. & ARUFFO, A. 1991. Vascular cell adhesion molecule 1 induces T-cell antigen receptor-dependent activation of CD4+T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 6403-6407.
- DAMLE, N. K., KLUSSMAN, K., LEYTZE, G., ARUFFO, A., LINSLEY, P. S. & LEDBETTER, J. A. 1993. Costimulation with integrin ligands intercellular adhesion molecule-1 or vascular cell adhesion molecule-1 augments activation-induced death of antigen-specific CD4+ T lymphocytes. *J Immunol*, 151, 2368-79.
- DAMLE, N. K., KLUSSMAN, K., LINSLEY, P. S. & ARUFFO, A. 1992. Differential costimulatory effects of adhesion molecules B7, ICAM-1, LFA-3, and VCAM-1 on resting and antigen-primed CD4+ T lymphocytes. *J Immunol*, 148, 1985-92.
- DAVIGNON, D., MARTZ, E., REYNOLDS, T., KÜRZINGER, K. & SPRINGER, T. A. 1981. Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1): a surface antigen distinct from Lyt-2,3 that participates in T lymphocyte-mediated killing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 4535-4539.
- DE GROOT, C. J. A., RUULS, S. R., M. THEEUWES, J. W., DIJKSTRA, C. D. & DER VALK, P. V. 1997. Immunocytochemical Characterization of the Expression of Inducible and Constitutive Isoforms of Nitric Oxide Synthase in Demyelinating Multiple Sclerosis Lesions. 56, 10-20.
- DENDROU, C. A., FUGGER, L. & FRIESE, M. A. 2015. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*, 15, 545-58.
- DENIC, A., JOHNSON, A. J., BIEBER, A. J., WARRINGTON, A. E., RODRIGUEZ, M. & PIRKO, I. 2011. The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology*, 18, 21-9.
- DOBSON, R. & GIOVANNONI, G. 2019. Multiple sclerosis - a review. *Eur J Neurol*, 26, 27-40.
- DOLGIN, E. 2021. BTK blockers make headway in multiple sclerosis. *Nat Biotechnol*, 39, 3-5.
- DOMINGUES, H. S., PORTUGAL, C. C., SOCODATO, R. & RELVAS, J. B. 2016. Oligodendrocyte, Astrocyte, and Microglia Crosstalk in Myelin Development, Damage, and Repair. *Front Cell Dev Biol*, 4, 71.
- DOPP, J. M., BRENNEMAN, S. M. & OLSCHOWKA, J. A. 1994. Expression of ICAM-1, VCAM-1, L-selectin, and leukosialin in the mouse central nervous system during the induction and remission stages of experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 54, 129-44.

- DORE-DUFFY, P., NEWMAN, W., BALABANOV, R., LISAK, R. P., MAINOLFI, E., ROTHLEIN, R. & PETERSON, M. 1995. Circulating, soluble adhesion proteins in cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis: correlation with clinical activity. *Annals of neurology*, 37, 55-62.
- DUGGER, K. J., ZINN, K. R., WEAVER, C., BULLARD, D. C. & BARNUM, S. R. 2009. Effector and suppressor roles for LFA-1 during the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 206, 22-7.
- DYRNA, F., HANSKE, S., KRUEGER, M. & BECHMANN, I. 2013. The blood-brain barrier. *J Neuroimmune Pharmacol*, 8, 763-73.
- EBNER, F., BRANDT, C., THIELE, P., RICHTER, D., SCHLIESSER, U., SIFFRIN, V., SCHUELER, J., STUBBE, T., ELLINGHAUS, A., MEISEL, C., SAWITZKI, B. & NITSCH, R. 2013. Microglial activation milieu controls regulatory T cell responses. *J Immunol*, 191, 5594-602.
- ELICES, M. J., OSBORN, L., TAKADA, Y., CROUSE, C., LUHOWSKYJ, S., HEMLER, M. E. & LOBB, R. R. 1990. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/Fibronectin binding site. 60, 577-584.
- ELOVAARA, I., UKKONEN, M., LEPPÄKYNNÄS, M., LEHTIMÄKI, T., LUOMALA, M., PELTOLA, J. & DASTIDAR, P. 2000. Adhesion molecules in multiple sclerosis: relation to subtypes of disease and methylprednisolone therapy. *Archives of neurology*, 57, 546-551.
- ENGELHARDT, B., LASCHINGER, M., SCHULZ, M., SAMULOWITZ, U., VESTWEBER, D. & HOCH, G. 1998. The development of experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse requires alpha4-integrin but not alpha4beta7-integrin. *J Clin Invest*, 102, 2096-105.
- FAISSNER, S., NIKOLAYCZIK, J., CHAN, A., HELLWIG, K., GOLD, R., YOON, M. S. & HAGHIKIA, A. 2016. Plasmapheresis and immunoadsorption in patients with steroid refractory multiple sclerosis relapses. *J Neurol*, 263, 1092-8.
- FALCONE, M., RAJAN, A. J., BLOOM, B. R. & BROSNAN, C. F. 1998. A critical role for IL-4 in regulating disease severity in experimental allergic encephalomyelitis as demonstrated in IL-4-deficient C57BL/6 mice and BALB/c mice. *J Immunol*, 160, 4822-30.
- FENN, A. M., HALL, J. C. E., GENSEL, J. C., POPOVICH, P. G. & GODBOUT, J. P. 2014. IL-4 Signaling Drives a Unique Arginase<sup>+</sup>/IL-1 $\beta$ <sup>+</sup> Microglia Phenotype and Recruits Macrophages to the Inflammatory CNS: Consequences of Age-Related Deficits in IL-4R $\alpha$  after Traumatic Spinal Cord Injury. *The Journal of Neuroscience*, 34, 8904-8917.
- FIFE, B. T., HUFFNAGLE, G. B., KUZIEL, W. A. & KARPUS, W. J. 2000. Cc Chemokine Receptor 2 Is Critical for Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. 192, 899-906.
- FILIPPI, M., BAR-OR, A., PIEHL, F., PREZIOSA, P., SOLARI, A., VUKUSIC, S. & ROCCA, M. A. 2018. Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*, 4, 43.
- FILIPPINI, G., DEL GIOVANE, C., VACCHI, L., D'AMICO, R., DI PIETRANTONJ, C., BEECHER, D. & SALANTI, G. 2013. Immunomodulators and immunosuppressants for multiple sclerosis: a network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev*, CD008933.
- FLACHENECKER, P., KOBELT, G., BERG, J., CAPSA, D., GANNEDAHL, M. & EUROPEAN MULTIPLE SCLEROSIS, P. 2017. New insights into the

- burden and costs of multiple sclerosis in Europe: Results for Germany. *Mult Scler*, 23, 78-90.
- FORD, A. L., GOODSALL, A. L., HICKEY, W. F. & SEDGWICK, J. D. 1995. Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4+ T cells compared. *J Immunol*, 154, 4309-21.
- FRISCHER, J. M., BRAMOW, S., DAL-BIANCO, A., LUCCHINETTI, C. F., RAUSCHKA, H., SCHMIDBAUER, M., LAURSEN, H., SORENSEN, P. S. & LASSMANN, H. 2009. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*, 132, 1175-89.
- FROHMAN, E. M., RACKE, M. K. & RAINE, C. S. 2006. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med*, 354, 942-55.
- GANDHI, R., LARONI, A. & WEINER, H. L. 2010. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 221, 7-14.
- GAO, Z. & TSIRKA, S. E. 2011. Animal Models of MS Reveal Multiple Roles of Microglia in Disease Pathogenesis. *Neurol Res Int*, 2011, 383087.
- GEMMA, C. & BACHSTETTER, A. D. 2013. The role of microglia in adult hippocampal neurogenesis. *Front Cell Neurosci*, 7, 229.
- GILES, D. A., WASHNOCK-SCHMID, J. M., DUNCKER, P. C., DAHLAWI, S., PONATH, G., PITT, D. & SEGAL, B. M. 2017. Myeloid cell plasticity in the evolution of central nervous system autoimmunity. *Annals of Neurology*.
- GINHOUX, F., GRETER, M., LEOBOEUF, M., NANDI, S., SEE, P., GOKHAN, S., MEHLER, M. F., CONWAY, S. J., NG, L. G., STANLEY, E. R., SAMOKHVALOV, I. M. & MERAD, M. 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 330, 841-5.
- GIOVANNONI, G. 2018. Disease-modifying treatments for early and advanced multiple sclerosis: a new treatment paradigm. *Curr Opin Neurol*, 31, 233-243.
- GIRALT, M., MOLINERO, A. & HIDALGO, J. 2018. Active Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) with MOG35–55 in the Mouse. In: WOODHOO, A. (ed.) *Myelin: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York.
- GLATIGNY, S. & BETTELLI, E. 2018. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS). *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8.
- GOLD, R., LININGTON, C. & LASSMANN, H. 2006. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*, 129, 1953-71.
- GOLDMANN, T. & PRINZ, M. 2013. Role of microglia in CNS autoimmunity. *Clin Dev Immunol*, 2013, 208093.
- GOLDMANN, T., WIEGHOFER, P., JORDAO, M. J., PRUTEK, F., HAGEMEYER, N., FRENZEL, K., AMANN, L., STASZEWSKI, O., KIERDORF, K., KRUEGER, M., LOCATELLI, G., HOCHGERNER, H., ZEISER, R., EPELMAN, S., GEISSMANN, F., PRILLER, J., ROSSI, F. M., BECHMANN, I., KERSCHENSTEINER, M., LINNARSSON, S., JUNG, S. & PRINZ, M. 2016. Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nat Immunol*, 17, 797-805.

- GOMES-LEAL, W. 2012. Microglial physiopathology: how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? *Brain Behav*, 2, 345-56.
- GONZALEZ, H., ELGUETA, D., MONTOYA, A. & PACHECO, R. 2014. Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *J Neuroimmunol*, 274, 1-13.
- GOODIN, D. S. 2014. Glucocorticoid treatment of multiple sclerosis. *Handb Clin Neurol*, 122, 455-64.
- GORDON, E. J., MYERS, K. J., DOUGHERTY, J. P., ROSEN, H. & RON, Y. 1995. Both anti-CD11a (LFA-1) and anti-CD11b (MAC-1) therapy delay the onset and diminish the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 62, 153-60.
- GORDON, S. & MARTINEZ, F. O. 2010. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity*, 32, 593-604.
- GOSSELIN, D., LINK, V. M., ROMANOSKI, C. E., FONSECA, G. J., EICHENFIELD, D. Z., SPANN, N. J., STENDER, J. D., CHUN, H. B., GARNER, H., GEISSMANN, F. & GLASS, C. K. 2014. Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell*, 159, 1327-40.
- GOVERMAN, J. M. 2011. Immune tolerance in multiple sclerosis. *Immunol Rev*, 241, 228-40.
- GRAY, E., THOMAS, T. L., BETMOUNI, S., SCOLDING, N. & LOVE, S. 2008. Elevated myeloperoxidase activity in white matter in multiple sclerosis. *Neurosci Lett*, 444, 195-8.
- GREENFIELD, A. L. & HAUSER, S. L. 2018. B-cell Therapy for Multiple Sclerosis: Entering an era. *Ann Neurol*, 83, 13-26.
- GREENWOOD, J., WANG, Y. & CALDER, V. L. 1995. Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1. *off. Immunology*, 86, 408-15.
- GRETER, M., LELIOS, I. & CROXFORD, A. L. 2015. Microglia Versus Myeloid Cell Nomenclature during Brain Inflammation. *Front Immunol*, 6, 249.
- GULTNER, S., KUHLMANN, T., HESSE, A., WEBER, J. P., RIEMER, C., BAIER, M. & HUTLOFF, A. 2010. Reduced Treg frequency in LFA-1-deficient mice allows enhanced T effector differentiation and pathology in EAE. *Eur J Immunol*, 40, 3403-12.
- HAAGE, V., SEMTNER, M., VIDAL, R. O., HERNANDEZ, D. P., PONG, W. W., CHEN, Z., HAMBARDZUMYAN, D., MAGRINI, V., LY, A., WALKER, J., MARDIS, E., MERTINS, P., SAUER, S., KETTENMANN, H. & GUTMANN, D. H. 2019. Comprehensive gene expression meta-analysis identifies signature genes that distinguish microglia from peripheral monocytes/macrophages in health and glioma. *Acta Neuropathol Commun*, 7, 20.
- HABTEZION, A., NGUYEN, L. P., HADEIBA, H. & BUTCHER, E. C. 2016. Leukocyte Trafficking to the Small Intestine and Colon. *Gastroenterology*, 150, 340-54.
- HAIDER, L., FISCHER, M. T., FRISCHER, J. M., BAUER, J., HOFTBERGER, R., BOTOND, G., ESTERBAUER, H., BINDER, C. J., WITZTUM, J. L. & LASSMANN, H. 2011. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain*, 134, 1914-24.
- HAILER, N. P., BECHMANN, I., HEIZMANN, S. & NITSCH, R. 1997. Adhesion molecule expression on phagocytic microglial cells following anterograde degeneration of perforant path axons. *Hippocampus*, 7, 341-349.

- HAILER, N. P., JARHULT, J. D. & NITSCH, R. 1996. Resting microglial cells in vitro: analysis of morphology and adhesion molecule expression in organotypic hippocampal slice cultures. *Glia*, 18, 319-331.
- HARIRCHIAN, M. H., FATEHI, F., SARRAF, P., HONARVAR, N. M. & BITARAFAN, S. 2018. Worldwide prevalence of familial multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord*, 20, 43-47.
- HART, F. M. & BAINBRIDGE, J. 2016. Current and emerging treatment of multiple sclerosis. *Am J Manag Care*, 22, s159-70.
- HARTLAGE-RÜBSAMEN, M. & SCHLIEBS, R. 2001. Sequential upregulation of cell adhesion molecules in degenerating rat basal forebrain cholinergic neurons and in phagocytotic microglial cells. 897, 20-26.
- HARTUNG, H. P., REINERS, K., ARCHELOS, J. J., MICHELS, M., SEELDRAYERS, P., HEIDENREICH, F., PFLUGHAUPT, K. W. & TOYKA, K. V. 1995. Circulating adhesion molecules and tumor necrosis factor receptor in multiple sclerosis: correlation with magnetic resonance imaging. *Annals of neurology*, 38, 186-193.
- HEMMER, B., KERSCHENSTEINER, M. & KORN, T. 2015. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 14, 406-19.
- HENEKA, M. T., KUMMER, M. P. & LATZ, E. 2014. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol*, 14, 463-77.
- HENZE, T. 2004. [Symptomatic therapy of multiple sclerosis]. *Nervenarzt*, 75 Suppl 1, 2-39.
- HEPPNER, F. L., GRETER, M., MARINO, D., FALSIG, J., RAIVICH, G., HOVELMEYER, N., WAISMAN, A., RULICKE, T., PRINZ, M., PRILLER, J., BECHER, B. & AGUZZI, A. 2005. Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat Med*, 11, 146-52.
- HICKMAN, S. E., KINGERY, N. D., OHSUMI, T. K., BOROWSKY, M. L., WANG, L. C., MEANS, T. K. & EL KHOURY, J. 2013. The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat Neurosci*, 16, 1896-905.
- HILL, K. E., ZOLLINGER, L. V., WATT, H. E., CARLSON, N. G. & ROSE, J. W. 2004. Inducible nitric oxide synthase in chronic active multiple sclerosis plaques: distribution, cellular expression and association with myelin damage. *J Neuroimmunol*, 151, 171-9.
- HOFMANN, N., LACHNIT, N., STREPPPEL, M., WITTER, B., NEISS, W. F., GUNTINAS-LICHIUS, O. & ANGELOV, D. N. 2002. Increased expression of ICAM-1, VCAM-1, MCP-1, and MIP-1 alpha by spinal perivascular macrophages during experimental allergic encephalomyelitis in rats. *BMC immunology*, 3, 11-11.
- HOLLENBACH, J. A. & OKSENBERG, J. R. 2015. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *J Autoimmun*, 64, 13-25.
- HOOPER, D. C., BAGASRA, O., MARINI, J. C., ZBOREK, A., OHNISHI, S. T., KEAN, R., CHAMPION, J. M., SARKER, A. B., BOBROSKI, L., FARBER, J. L., AKAIKE, T., MAEDA, H. & KOPROWSKI, H. 1997. Prevention of experimental allergic encephalomyelitis by targeting nitric oxide and peroxynitrite: implications for the treatment of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 2528-33.
- HOWELL, O. W., SCHULZ-TRIEGLAFF, E. K., CARASSITI, D., GENTLEMAN, S. M., NICHOLAS, R., RONCAROLI, F. & REYNOLDS, R. 2015. Extensive grey matter pathology in the cerebellum in multiple sclerosis is

- linked to inflammation in the subarachnoid space. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 41, 798-813.
- HUITINGA, I., VAN ROOIJEN, N., DE GROOT, C. J., UITDEHAAG, B. M. & DIJKSTRA, C. D. 1990. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats after elimination of macrophages. *J Exp Med*, 172, 1025-33.
- HULETT, H. R., BONNER, W. A., SWEET, R. G. & HERZENBERG, L. A. 1973. Development and application of a rapid cell sorter. *Clin Chem*, 19, 813-6.
- HYNES, R. O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69, 11-25.
- JACK, C., RUFFINI, F., BAR-OR, A. & ANTEL, J. P. 2005. Microglia and multiple sclerosis. *J Neurosci Res*, 81, 363-73.
- JIANG, Z., JIANG, J. X. & ZHANG, G. X. 2014. Macrophages: a double-edged sword in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Lett*, 160, 17-22.
- JONES, L. S. 1996. Integrins: possible functions in the adult CNS. *Trends in neurosciences*, 19, 68-72.
- JONES, L. S. & GROOMS, S. Y. 1997. Normal and aberrant functions of integrins in the adult central nervous system. 31, 587-595.
- JUEDES, A. E. & RUDDLE, N. H. 2001. Resident and infiltrating central nervous system APCs regulate the emergence and resolution of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 166, 5168-75.
- JULIANO, R. L. & HASKILL, S. 1993. Signal transduction from the extracellular matrix. *The Journal of Cell Biology*, 120, 577-585.
- JUNG, S., ALIBERTI, J., GRAEMMEL, P., SUNSHINE, M. J., KREUTZBERG, G. W., SHER, A. & LITTMAN, D. R. 2000. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol*, 20, 4106-14.
- KAWAI, K., KOBAYASHI, Y., SHIRATORI, M., SOBUE, G., TAMATANI, T., MIYASAKA, M. & YOSHIKAI, Y. 1996. Intrathecal administration of antibodies against LFA-1 and against ICAM-1 suppresses experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Cell Immunol*, 171, 262-8.
- KAWAMOTO, E., NAKAHASHI, S., OKAMOTO, T., IMAI, H. & SHIMAOKA, M. 2012. Anti-integrin therapy for multiple sclerosis. *Autoimmune Dis*, 2012, 357101.
- KEBIR, H., KREYMBORG, K., IFERGAN, I., DODELET-DEVILLERS, A., CAYROL, R., BERNARD, M., GIULIANI, F., ARBOUR, N., BECHER, B. & PRAT, A. 2007. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*, 13, 1173-5.
- KENT, S. J., KARLIK, S. J., CANNON, C., HINES, D. K., YEDNOCK, T. A., FRITZ, L. C. & HORNER, H. C. 1995. A monoclonal antibody to alpha 4 integrin suppresses and reverses active experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 58, 1-10.
- KERSCHENSTEINER, M., STADELMANN, C., DECHANT, G., WEKERLE, H. & HOHLFELD, R. 2003. Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: implications for neurological diseases. *Ann Neurol*, 53, 292-304.
- KESSELRING, J. & BEER, S. 2005. Symptomatic therapy and neurorehabilitation in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 4, 643-52.
- KETTENMANN, H., HANISCH, U. K., NODA, M. & VERKHRATSKY, A. 2011. Physiology of microglia. *Physiol Rev*, 91, 461-553.

- KIERDORF, K., ERNY, D., GOLDMANN, T., SANDER, V., SCHULZ, C., PERDIGUERO, E. G., WIEGHOFER, P., HEINRICH, A., RIEMKE, P., HOLSCHER, C., MULLER, D. N., LUCKOW, B., BROCKER, T., DEBOWSKI, K., FRITZ, G., OPDENAKKER, G., DIEFENBACH, A., BIBER, K., HEIKENWALDER, M., GEISSMANN, F., ROSENBAUER, F. & PRINZ, M. 2013. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci*, 16, 273-80.
- KIGERL, K. A., GENSEL, J. C., ANKENY, D. P., ALEXANDER, J. K., DONNELLY, D. J. & POPOVICH, P. G. 2009. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci*, 29, 13435-44.
- KING, I. L., DICKENDESHER, T. L. & SEGAL, B. M. 2009. Circulating Ly-6C+ myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood*, 113, 3190-7.
- KIVISAKK, P., IMITOLA, J., RASMUSSEN, S., ELYAMAN, W., ZHU, B., RANSOHOFF, R. M. & KHOURY, S. J. 2009. Localizing central nervous system immune surveillance: meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol*, 65, 457-69.
- KOBELT, G., THOMPSON, A., BERG, J., GANNEDAHL, M., ERIKSSON, J., GROUP, M. S. & EUROPEAN MULTIPLE SCLEROSIS, P. 2017. New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe. *Mult Scler*, 23, 1123-1136.
- KRAUS, J., ENGELHARDT, B., CHATZIMANOLIS, N., BAUER, R., TOFIGHI, J., KUEHNE, B. S., LASKE, C., STOLZ, E., FRIELINGHAUS, P., SCHAEFER, C., BLAES, F., TRAUPE, H., KAPS, M. & OSCHMANN, P. 2002. Cell surface bound and soluble adhesion molecules in CSF and blood in multiple sclerosis: correlation with MRI-measures of subclinical disease severity and activity. 122, 175-185.
- KREUTZBERG, G. W. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 19, 312-8.
- LAMPRON, A., LAROCHELLE, A., LAFLAMME, N., PREFONTAINE, P., PLANTE, M. M., SANCHEZ, M. G., YONG, V. W., STYS, P. K., TREMBLAY, M. E. & RIVEST, S. 2015. Inefficient clearance of myelin debris by microglia impairs remyelinating processes. *J Exp Med*, 212, 481-95.
- LAMPRON, A., PIMENTEL-COELHO, P. M. & RIVEST, S. 2013. Migration of bone marrow-derived cells into the central nervous system in models of neurodegeneration. *J Comp Neurol*, 521, 3863-76.
- LASCHINGER, M. & ENGELHARDT, B. 2000. Interaction of alpha4-integrin with VCAM-1 is involved in adhesion of encephalitogenic T cell blasts to brain endothelium but not in their transendothelial migration in vitro. *Journal of neuroimmunology*, 102, 32-43.
- LASSMANN, H. 2013. Pathology and disease mechanisms in different stages of multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, 333, 1-4.
- LASSMANN, H., BRUCK, W. & LUCCHINETTI, C. F. 2007. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol*, 17, 210-8.
- LASSMANN, H., RÖSSLER, K., ZIMPRICH, F. & VASS, K. 1991. Expression of adhesion molecules and histocompatibility antigens at the blood-brain barrier. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 1, 115-123.

- LEE, S. J. & BENVENISTE, E. N. 1999. Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system. *J Neuroimmunol*, 98, 77-88.
- LEITLINIEN DER DGN, H., B. ET AL. 2021. Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen und MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen, S2k-Leitlinie [Online]. [www.dgn.org/leitlinien](http://www.dgn.org/leitlinien). [Zugriff am 29.11.2021].
- LERAY, E., YAOUANQ, J., LE PAGE, E., COUSTANS, M., LAPLAUD, D., OGER, J. & EDAN, G. 2010. Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis. *Brain*, 133, 1900-13.
- LI, M. O., WAN, Y. Y., SANJABI, S., ROBERTSON, A. K. & FLAVELL, R. A. 2006. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 24, 99-146.
- LUB, M., VAN KOOYK, Y. & FIGDOR, C. G. 1995. Ins and outs of LFA-1. *Immunology Today*, 16, 479-483.
- LUBLIN, F. D. & REINGOLD, S. C. 1996. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*, 46, 907-11.
- LUBLIN, F. D., REINGOLD, S. C., COHEN, J. A., CUTTER, G. R., SORENSEN, P. S., THOMPSON, A. J., WOLINSKY, J. S., BALCER, L. J., BANWELL, B., BARKHOF, F., BEBO, B., JR., CALABRESI, P. A., CLANET, M., COMI, G., FOX, R. J., FREEDMAN, M. S., GOODMAN, A. D., INGLESE, M., KAPPOS, L., KIESEIER, B. C., LINCOLN, J. A., LUBETZKI, C., MILLER, A. E., MONTALBAN, X., O'CONNOR, P. W., PETKAU, J., POZZILLI, C., RUDICK, R. A., SORMANI, M. P., STUVE, O., WAUBANT, E. & POLMAN, C. H. 2014. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*, 83, 278-86.
- LUCCHINETTI, C., BRUCK, W., PARISI, J., SCHEITHAUER, B., RODRIGUEZ, M. & LASSMANN, H. 2000. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol*, 47, 707-17.
- LUO, C., JIAN, C., LIAO, Y., HUANG, Q., WU, Y., LIU, X., ZOU, D. & WU, Y. 2017. The role of microglia in multiple sclerosis. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 13, 1661-1667.
- LUO, X. G. & CHEN, S. D. 2012. The changing phenotype of microglia from homeostasis to disease. *Transl Neurodegener*, 1, 9.
- MADRI, J. A., GRAESSER, D. & HAAS, T. 1996. The roles of adhesion molecules and proteinases in lymphocyte transendothelial migration. *Biochem Cell Biol*, 74, 749-57.
- MAKGOBA, M. W., SANDERS, M. E., GINTHER LUCE, G. E., DUSTIN, M. L., SPRINGER, T. A., CLARK, E. A., MANNONI, P. & SHAW, S. 1988. ICAM-1 a ligand for LFA-1-dependent adhesion of B, T and myeloid cells. *Nature*, 331, 86-88.
- MALE, D., PRYCE, G., LINKE, A. & RAHMAN, J. 1992. Lymphocyte migration into the CNS modelled in vitro. *J Neuroimmunol*, 40, 167-71.
- MARRIE, R. A., ELLIOTT, L., MARRIOTT, J., COSSOY, M., BLANCHARD, J., LEUNG, S. & YU, N. 2015. Effect of comorbidity on mortality in multiple sclerosis. *Neurology*, 85, 240-7.
- MATSUDA, M., TSUKADA, N., KOH, C.-S., IWAHASHI, T., SHIMADA, K. & YANAGISAWA, N. 1994. Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1

- and Lymphocyte Function-Associated Antigen-1 in the Spinal Cord of Rats During Acute Experimental Allergic Encephalomyelitis. 19, 15-22.
- MAYO, L., QUINTANA, F. J. & WEINER, H. L. 2012. The innate immune system in demyelinating disease. *Immunol Rev*, 248, 170-87.
- MCDONNELL, G. V., MCMILLAN, S. A., DOUGLAS, J. P., DROOGAN, A. G. & HAWKINS, S. A. 1998. Raised CSF levels of soluble adhesion molecules across the clinical spectrum of multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, 85, 186-192.
- MENDEL, I., KERLERO DE ROSBO, N. & BEN-NUN, A. 1995. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol*, 25, 1951-9.
- MERSON, T. D., BINDER, M. D. & KILPATRICK, T. J. 2010. Role of cytokines as mediators and regulators of microglial activity in inflammatory demyelination of the CNS. *Neuromolecular Med*, 12, 99-132.
- MILDNER, A., HUANG, H., RADKE, J., STENZEL, W. & PRILLER, J. 2017. P2Y12 receptor is expressed on human microglia under physiological conditions throughout development and is sensitive to neuroinflammatory diseases. *Glia*, 65, 375-387.
- MILDNER, A., MACK, M., SCHMIDT, H., BRUCK, W., DJUKIC, M., ZABEL, M. D., HILLE, A., PRILLER, J. & PRINZ, M. 2009. CCR2+Ly-6Chi monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system. *Brain*, 132, 2487-500.
- MILLS, C. D., KINCAID, K., ALT, J. M., HEILMAN, M. J. & HILL, A. M. 2000. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, 164, 6166-6173.
- MILNER, R. & CAMPBELL, I. L. 2002. The integrin family of cell adhesion molecules has multiple functions within the CNS. *J Neurosci Res*, 69, 286-91.
- MIRÓ-MUR, F., PÉREZ-DE-PUIG, I., FERRER-FERRER, M., URRÁ, X., JUSTICIA, C., CHAMORRO, A. & PLANAS, A. M. 2016. Immature monocytes recruited to the ischemic mouse brain differentiate into macrophages with features of alternative activation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 53, 18-33.
- MIRON, V. E., BOYD, A., ZHAO, J. W., YUEN, T. J., RUCKH, J. M., SHADRACH, J. L., VAN WIJNGAARDEN, P., WAGERS, A. J., WILLIAMS, A., FRANKLIN, R. J. M. & FFRENCH-CONSTANT, C. 2013. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci*, 16, 1211-1218.
- MIRON, V. E. & FRANKLIN, R. J. 2014. Macrophages and CNS remyelination. *J Neurochem*, 130, 165-71.
- MOKRY, L. E., ROSS, S., TIMPSON, N. J., SAWCER, S., DAVEY SMITH, G. & RICHARDS, J. B. 2016. Obesity and Multiple Sclerosis: A Mendelian Randomization Study. *PLoS Med*, 13, e1002053.
- MONTALBAN, X., GOLD, R., THOMPSON, A. J., OTERO-ROMERO, S., AMATO, M. P., CHANDRARATNA, D., CLANET, M., COMI, G., DERFUSS, T., FAZEKAS, F., HARTUNG, H. P., HAVRDOVA, E., HEMMER, B., KAPPOS, L., LIBLAU, R., LUBETZKI, C., MARCUS, E., MILLER, D. H., OLSSON, T., PILLING, S., SELMAJ, K., SIVA, A., SORENSEN, P. S., SORMANI, M. P., THALHEIM, C., WIENDL, H. &

- ZIPP, F. 2018.ECTRIMS/EAN guideline on the pharmacological treatment of people with multiple sclerosis. *Eur J Neurol*, 25, 215-237.
- MOSSER, D. M. & EDWARDS, J. P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, 8, 958-69.
- MOSSER, D. M. & ZHANG, X. 2008. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev*, 226, 205-18.
- MÜLLER, T. 2018. Zahl der MS-Kranken hat sich in Deutschland verdoppelt [Online]. *Ärztezeitung.de: Ärztezeitung*. [www.aerztezeitung.de/Medizin/Warum-es-heute-so-viele-MS-Kranke-gibt-225639.html](http://www.aerztezeitung.de/Medizin/Warum-es-heute-so-viele-MS-Kranke-gibt-225639.html) [Zugriff am 29.11.2021].
- MUNDER, M., EICHMANN, K. & MODOLELL, M. 1998. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol*, 160, 5347-54.
- NEUMANN, H., KOTTER, M. R. & FRANKLIN, R. J. 2009. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain*, 132, 288-95.
- O'LOUGHLIN, E., MADORE, C., LASSMANN, H. & BUTOVSKY, O. 2018. Microglial Phenotypes and Functions in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8.
- OBERMEIER, B., DANEMAN, R. & RANSOHOFF, R. M. 2013. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med*, 19, 1584-96.
- OH, J., VIDAL-JORDANA, A. & MONTALBAN, X. 2018. Multiple sclerosis: clinical aspects. *Curr Opin Neurol*, 31, 752-759.
- OLAH, M., AMOR, S., BROUWER, N., VINET, J., EGGEN, B., BIBER, K. & BODDEKE, H. W. 2012. Identification of a microglia phenotype supportive of remyelination. *Glia*, 60, 306-21.
- OLSSON, T., BARCELLOS, L. F. & ALFREDSSON, L. 2017. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*, 13, 25-36.
- ORTIZ, G. G., PACHECO-MOISES, F. P., MACIAS-ISLAS, M. A., FLORES-ALVARADO, L. J., MIRELES-RAMIREZ, M. A., GONZALEZ-RENOVATO, E. D., HERNANDEZ-NAVARRO, V. E., SANCHEZ-LOPEZ, A. L. & ALATORRE-JIMENEZ, M. A. 2014. Role of the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *Arch Med Res*, 45, 687-97.
- ORTON, S. M., HERRERA, B. M., YEE, I. M., VALDAR, W., RAMAGOPALAN, S. V., SADOVNICK, A. D., EBERS, G. C. & CANADIAN COLLABORATIVE STUDY, G. 2006. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol*, 5, 932-6.
- OUSMAN, S. S. & KUBES, P. 2012. Immune surveillance in the central nervous system. *Nat Neurosci*, 15, 1096-101.
- PALACIOS, N., ALONSO, A., BRONNUM-HANSEN, H. & ASCHERIO, A. 2011. Smoking and increased risk of multiple sclerosis: parallel trends in the sex ratio reinforce the evidence. *Ann Epidemiol*, 21, 536-42.
- PEFEROEN, L. A., VOGEL, D. Y., UMMENTHUM, K., BREUR, M., HEIJNEN, P. D., GERRITSEN, W. H., PEFEROEN-BAERT, R. M., VAN DER VALK, P., DIJKSTRA, C. D. & AMOR, S. 2015. Activation status of human microglia is dependent on lesion formation stage and remyelination in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 74, 48-63.
- PESCE, J. T., RAMALINGAM, T. R., MENTINK-KANE, M. M., WILSON, M. S., EL KASMI, K. C., SMITH, A. M., THOMPSON, R. W., CHEEVER, A. W.,

- MURRAY, P. J. & WYNN, T. A. 2009. Arginase-1–Expressing Macrophages Suppress Th2 Cytokine–Driven Inflammation and Fibrosis. *PLoS Pathogens*, 5, e1000371.
- PETERSEN, G., WITTMANN, R., ARNDT, V. & GOPFFARTH, D. 2014. [Epidemiology of multiple sclerosis in Germany: regional differences and drug prescription in the claims data of the statutory health insurance]. *Nervenarzt*, 85, 990-8.
- PETERSON, J. W., BO, L., MORK, S., CHANG, A., RANSOHOFF, R. M. & TRAPP, B. D. 2002. VCAM-1-positive microglia target oligodendrocytes at the border of multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61, 539-46.
- POLAZZI, E. & MONTI, B. 2010. Microglia and neuroprotection: from in vitro studies to therapeutic applications. *Prog Neurobiol*, 92, 293-315.
- POLMAN, C. H., O'CONNOR, P. W., HAVRDOVA, E., HUTCHINSON, M., KAPPOS, L., MILLER, D. H., PHILLIPS, J. T., LUBLIN, F. D., GIOVANNONI, G., WAJGT, A., TOAL, M., LYNN, F., PANZARA, M. A., SANDROCK, A. W. & INVESTIGATORS, A. 2006. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 354, 899-910.
- PONOMAREV, E. D., MARESZ, K., TAN, Y. & DITTEL, B. N. 2007. CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. *J Neurosci*, 27, 10714-21.
- PONOMAREV, E. D., SHRIVER, L. P., MARESZ, K. & DITTEL, B. N. 2005. Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *J Neurosci Res*, 81, 374-89.
- POUDRIER, J. & OWENS, T. 1994. CD54/intercellular adhesion molecule 1 and major histocompatibility complex II signaling induces B cells to express interleukin 2 receptors and complements help provided through CD40 ligation. *J Exp Med*, 179, 1417-27.
- PRAT, A., BIERNACKI, K., LAVOIE, J. F., POIRIER, J., DUQUETTE, P. & ANTEL, J. P. 2002. Migration of multiple sclerosis lymphocytes through brain endothelium. *Arch Neurol*, 59, 391-7.
- PRINEAS, J. W., KWON, E. E., CHO, E. S., SHARER, L. R., BARNETT, M. H., OLESZAK, E. L., HOFFMAN, B. & MORGAN, B. P. 2001. Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 50, 646-57.
- PRINZ, M. & PRILLER, J. 2014. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci*, 15, 300-12.
- PRINZ, M. & PRILLER, J. 2017. The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease. *Nat Neurosci*, 20, 136-144.
- RAE-GRANT, A., DAY, G. S., MARRIE, R. A., RABINSTEIN, A., CREE, B. A. C., GRONSETH, G. S., HABOUBI, M., HALPER, J., HOSEY, J. P., JONES, D. E., LISAK, R., PELLETIER, D., POTREBIC, S., SITCOV, C., SOMMERS, R., STACHOWIAK, J., GETCHIUS, T. S. D., MERILLAT, S. A. & PRINGSHEIM, T. 2018. Comprehensive systematic review summary: Disease-modifying therapies for adults with multiple sclerosis: Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 90, 789-800.

- RAINE, C. S. & CANNELLA, B. 1992. Adhesion molecules and central nervous system inflammation. *Seminars in Neuroscience*, 4, 201-211.
- RAIVICH, G. & BANATI, R. 2004. Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. *Brain Res Brain Res Rev*, 46, 261-81.
- RANSOHOFF, R. M. & PERRY, V. H. 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol*, 27, 119-45.
- REYNOLDS, C. J., SIM, M. J., QUIGLEY, K. J., ALTMANN, D. M. & BOYTON, R. J. 2015. Autoantigen cross-reactive environmental antigen can trigger multiple sclerosis-like disease. *J Neuroinflammation*, 12, 91.
- RICE, G. E., MUNRO, J. M. & BEVILACQUA, M. P. 1990. Inducible cell adhesion molecule 110 (ICAM-110) is an endothelial receptor for lymphocytes. A CD11/CD18-independent adhesion mechanism. *The Journal of experimental medicine*, 171, 1369-1374.
- RICE, G. P., HARTUNG, H. P. & CALABRESI, P. A. 2005. Anti-alpha4 integrin therapy for multiple sclerosis: mechanisms and rationale. *Neurology*, 64, 1336-42.
- ROTHHAMMER, V., HEINK, S., PETERMANN, F., SRIVASTAVA, R., CLAUSSEN, M. C., HEMMER, B. & KORN, T. 2011. Th17 lymphocytes traffic to the central nervous system independently of  $\alpha$ 4 integrin expression during EAE. *The Journal of Experimental Medicine*, 208, 2465-2476.
- ROTHLEIN, R., MAINOLFI, E. A., CZAJKOWSKI, M. & MARLIN, S. D. 1991. A form of circulating ICAM-1 in human serum. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 147, 3788-3793.
- ROY, A., LIU, X. & PAHAN, K. 2007. Myelin basic protein-primed T cells induce neurotrophins in glial cells via  $\alpha$ v $\beta$ 3 [corrected] integrin. *J Biol Chem*, 282, 32222-32.
- ROY, A. & PAHAN, K. 2013. Myelin Basic Protein-primed T Helper 2 Cells Suppress Microglial Activation via  $\alpha$ v $\beta$ 3 Integrin: Implications for Multiple Sclerosis. *J Clin Cell Immunol*, 7, 158.
- SAMOILOVA, E. B., HORTON, J. L. & CHEN, Y. 1998. Acceleration of experimental autoimmune encephalomyelitis in interleukin-10-deficient mice: roles of interleukin-10 in disease progression and recovery. *Cell Immunol*, 188, 118-24.
- SANDERS, P. & DE KEYSER, J. 2007. Janus faces of microglia in multiple sclerosis. *Brain Res Rev*, 54, 274-85.
- SCHULZ, C., GOMEZ PERDIGUERO, E., CHORRO, L., SZABO-ROGERS, H., CAGNARD, N., KIERDORF, K., PRINZ, M., WU, B., JACOBSEN, S. E., POLLARD, J. W., FRAMPTON, J., LIU, K. J. & GEISSMANN, F. 2012. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science*, 336, 86-90.
- SHECHTER, R., LONDON, A. & SCHWARTZ, M. 2013. Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. *Nat Rev Immunol*, 13, 206-18.
- SHEREMATA, W. A., MINAGAR, A., ALEXANDER, J. S. & VOLLMER, T. 2005. The role of alpha-4 integrin in the aetiology of multiple sclerosis: current knowledge and therapeutic implications. *CNS Drugs*, 19, 909-22.
- SHIMIZU, Y. 2003. LFA-1: more than just T cell Velcro. *Nat Immunol*, 4, 1052-4.
- SHIMIZU, Y., NEWMAN, W., TANAKA, Y. & SHAW, S. 1992. Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol Today*, 13, 106-12.

- SHIN, T., KIM, S., MOON, C., WIE, M. & KIM, H. 2000. Aminoguanidine-Induced Amelioration of Autoimmune Encephalomyelitis is Mediated by Reduced Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in the Spinal Cord. *Immunological Investigations*, 29, 233-241.
- SHIN, T., KOJIMA, T., TANUMA, N., ISHIHARA, Y. & MATSUMOTO, Y. 1995. The subarachnoid space as a site for precursor T cell proliferation and effector T cell selection in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 56, 171-8.
- SHRIKANT, P., WEBER, E., JILLING, T. & BENVENISTE, E. N. 1995. Intercellular adhesion molecule-1 gene expression by glial cells. Differential mechanisms of inhibition by IL-10 and IL-6. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 155, 1489-1501.
- SINGH, S., METZ, I., AMOR, S., VAN DER VALK, P., STADELMANN, C. & BRUCK, W. 2013. Microglial nodules in early multiple sclerosis white matter are associated with degenerating axons. *Acta Neuropathol*, 125, 595-608.
- SMITH, K. J., KAPOOR, R. & FELTS, P. A. 1999. Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species. *Brain Pathol*, 9, 69-92.
- SMITH, M. E. 2001. Phagocytic properties of microglia in vitro: implications for a role in multiple sclerosis and EAE. *Microsc Res Tech*, 54, 81-94.
- SOBEL, R. A., MITCHELL, M. E. & FONDREN, G. 1990. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cellular immune reactions in the human central nervous system. *The American journal of pathology*, 136, 1309-1316.
- SOSA, R. A., MURPHEY, C., JI, N., CARDONA, A. E. & FORSTHUBER, T. G. 2013. The kinetics of myelin antigen uptake by myeloid cells in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 191, 5848-57.
- SPRINGER, T. A. 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 346, 425-434.
- STREIT, W. J. 2002. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia*, 40, 133-9.
- STREIT, W. J., GRAEBER, M. B. & KREUTZBERG, G. W. 1988. Functional plasticity of microglia: a review. *Glia*, 1, 301-7.
- STROBER, W. 2001. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*, Appendix 3, Appendix 3B.
- STROMNES, I. M. & GOVERMAN, J. M. 2006a. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc*, 1, 1810-9.
- STROMNES, I. M. & GOVERMAN, J. M. 2006b. Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc*, 1, 1952-60.
- TALLANTYRE, E. C., BO, L., AL-RAWASHDEH, O., OWENS, T., POLMAN, C. H., LOWE, J. & EVANGELOU, N. 2009. Greater loss of axons in primary progressive multiple sclerosis plaques compared to secondary progressive disease. *Brain*, 132, 1190-9.
- TOGASHI, H., SAKISAKA, T. & TAKAI, Y. 2009. Cell adhesion molecules in the central nervous system. *Cell Adh Migr*, 3, 29-35.
- TRAN, D. Q., GLASS, D. D., UZEL, G., DARNELL, D. A., SPALDING, C., HOLLAND, S. M. & SHEVACH, E. M. 2009. Analysis of adhesion molecules, target cells, and role of IL-2 in human FOXP3+ regulatory T cell suppressor function. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182, 2929-2938.

- TRAPP, B. D., PETERSON, J., RANSOHOFF, R. M., RUDICK, R., MORK, S. & BO, L. 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 338, 278-85.
- VAN DE STOLPE, A. & VAN DER SAAG, P. T. 1996. Intercellular adhesion molecule-1. 74, 13-33.
- VAN KAER, L., POSTOAK, J. L., WANG, C., YANG, G. & WU, L. 2019. Innate, innate-like and adaptive lymphocytes in the pathogenesis of MS and EAE. *Cell Mol Immunol*, 16, 531-539.
- VAN SEVENTER, G. A., SHIMIZU, Y., HORGAN, K. J. & SHAW, S. 1990. The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 144, 4579-4586.
- VERMA, N. K. & KELLEHER, D. 2017. Not Just an Adhesion Molecule: LFA-1 Contact Tunes the T Lymphocyte Program. *J Immunol*, 199, 1213-1221.
- VOGEL, D. Y., VEREYKEN, E. J., GLIM, J. E., HEIJNEN, P. D., MOETON, M., VAN DER VALK, P., AMOR, S., TEUNISSEN, C. E., VAN HORSSEN, J. & DIJKSTRA, C. D. 2013. Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. *J Neuroinflammation*, 10, 35.
- VOGELAAR, C. F., MANDAL, S., LERCH, S., BIRKNER, K., BIRKENSTOCK, J., BÜHLER, U., SCHNATZ, A., RAINE, C. S., BITTNER, S., VOGT, J., KIPNIS, J., NITSCH, R. & ZIPP, F. 2018. Fast direct neuronal signaling via the IL-4 receptor as therapeutic target in neuroinflammation. *Science Translational Medicine*, 10, eaao2304.
- VOSS, E. V., SKULJEC, J., GUDI, V., SKRIPULETZ, T., PUL, R., TREBST, C. & STANGEL, M. 2012. Characterisation of microglia during de- and remyelination: can they create a repair promoting environment? *Neurobiol Dis*, 45, 519-28.
- WALKER, D. G. & LUE, L. F. 2015. Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. *Alzheimers Res Ther*, 7, 56.
- WALLING, B. L. & KIM, M. 2018. LFA-1 in T Cell Migration and Differentiation. *Front Immunol*, 9, 952.
- WANG, Y., KAI, H., CHANG, F., SHIBATA, K., TAHARA-HANAOKA, S., HONDA, S.-I., SHIBUYA, A. & SHIBUYA, K. 2007. A critical role of LFA-1 in the development of Th17 cells and induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. 353, 857-862.
- WASSER, B., PRAMANIK, G., HESS, M., KLEIN, M., LUESSI, F., DORNMAIR, K., BOPP, T., ZIPP, F. & WITSCH, E. 2016. Increase of Alternatively Activated Antigen Presenting Cells in Active Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. 11, 721-732.
- WEBER, M. S., PROD'HOMME, T., YOUSSEF, S., DUNN, S. E., RUNDLE, C. D., LEE, L., PATARROYO, J. C., STUVE, O., SOBEL, R. A., STEINMAN, L. & ZAMVIL, S. S. 2007. Type II monocytes modulate T cell-mediated central nervous system autoimmune disease. *Nat Med*, 13, 935-43.
- WEKERLE, H. & HOHLFELD, R. 2003. Molecular mimicry in multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 349, 185-6.
- WELSH, C. T., ROSE, J. W., HILL, K. E. & TOWNSEND, J. J. 1993. Augmentation of adoptively transferred experimental allergic encephalomyelitis by administration of a monoclonal antibody specific for LFA-1 alpha. *J Neuroimmunol*, 43, 161-7.

- WERNER, A., KLOSS, C. U., WALTER, J., KREUTZBERG, G. W. & RAIVICH, G. 1998. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the mouse facial motor nucleus after axonal injury and during regeneration. *Journal of neurocytology*, 27, 219-232.
- WILLENBORG, D. O., STAYKOVA, M. A. & MIYASAKA, M. 1996. Short term treatment with soluble neuroantigen and anti-CD11a (LFA-1) protects rats against autoimmune encephalomyelitis: treatment abrogates autoimmune disease but not autoimmunity. *J Immunol*, 157, 1973-80.
- WILLIAMS, A. F. & BARCLAY, A. N. 1988. The Immunoglobulin Superfamily—Domains for Cell Surface Recognition. 6, 381-405.
- WINGERCHUK, D. M. & WEINSHENKER, B. G. 2016. Disease modifying therapies for relapsing multiple sclerosis. *BMJ*, 354, i3518.
- WOODROOFE, M. N., BELLAMY, A. S., FELDMANN, M., DAVISON, A. N. & CUZNER, M. L. 1986. Immunocytochemical characterisation of the immune reaction in the central nervous system in multiple sclerosis. Possible role for microglia in lesion growth. *J Neurol Sci*, 74, 135-52.
- XU, L., HILLIARD, B., CARMODY, R. J., TSABARY, G., SHIN, H., CHRISTIANSON, D. W. & CHEN, Y. H. 2003. Arginase and autoimmune inflammation in the central nervous system. *Immunology*, 110, 141-8.
- YAMASAKI, R., LU, H., BUTOVSKY, O., OHNO, N., RIETSCH, A. M., CIALIC, R., WU, P. M., DOYKAN, C. E., LIN, J., COTLEUR, A. C., KIDD, G., ZORLU, M. M., SUN, N., HU, W., LIU, L., LEE, J. C., TAYLOR, S. E., UEHLEIN, L., DIXON, D., GU, J., FLORUTA, C. M., ZHU, M., CHARO, I. F., WEINER, H. L. & RANSOHOFF, R. M. 2014. Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med*, 211, 1533-49.
- YBARRONDO, B., O'ROURKE, A. M., BRIAN, A. A. & MESCHER, M. F. 1994. Contribution of lymphocyte function-associated-1/intercellular adhesion molecule-1 binding to the adhesion/signaling cascade of cytotoxic T lymphocyte activation. *The Journal of experimental medicine*, 179, 359-363.
- YEDNOCK, T. A., CANNON, C., FRITZ, L. C., SANCHEZ-MADRID, F., STEINMAN, L. & KARIN, N. 1992. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature*, 356, 63-6.
- ZIEMSEN, T., DERFUSS, T., DE STEFANO, N., GIOVANNONI, G., PALAVRA, F., TOMIC, D., VOLLMER, T. & SCHIPPLING, S. 2016. Optimizing treatment success in multiple sclerosis. *J Neurol*, 263, 1053-65.
- ZRZAVY, T., HAMETNER, S., WIMMER, I., BUTOVSKY, O., WEINER, H. L. & LASSMANN, H. 2017. Loss of 'homeostatic' microglia and patterns of their activation in active multiple sclerosis. *Brain*, 140, 1900-1913.

## 7 Anhang

### 7.1 Erklärung

Ich, Johanna Görg, erkläre hiermit, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt wurde. Alle von mir benutzten Veröffentlichungen, ungedruckten Materialien, sonstige Hilfsmittel sowie Textstellen, die ich wörtlich oder inhaltlich aus gedruckten oder ungedruckten Arbeiten übernommen habe, habe ich als solche gekennzeichnet und mit den erforderlichen bibliographischen Angaben nachgewiesen. Unterstützungsleistungen, die ich von anderen Personen erhalten habe, wurden in der Dissertationsschrift als solche benannt.

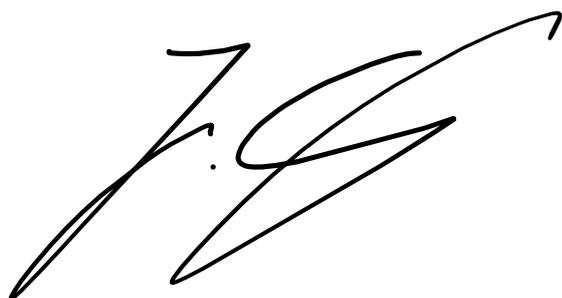
Die Dissertation wurde bei keiner anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich vorgelegt, weder im In- noch im Ausland.

Überdies bin ich nicht im Besitz eines anderen Doktorgrades oder habe einen erworbenen Doktorgrad aberkannt bekommen.

Ich habe bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet.

Mir ist bekannt, dass die Zulassung zur Promotion zu versagen ist, wenn die Unterlagen unvollständig oder die Angaben unrichtig sind. Ich bin darüber informiert, dass ich zur Führung des Dokortitels erst mit Aushändigung der Promotionsurkunde berechtigt bin.

Mainz, den 29.11.2021

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, overlapping letters that appear to be 'JG'.

Johanna Görg

