

Aus dem Institut für Zell- und Neurobiologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Invasion und Emigration von Leukozyten in das und aus dem
zentralen Nervensystem: Untersuchungen mit grün fluoreszierenden
Zellen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin
Berlin

von

Jana Goldmann

aus Eilenburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. I. Bechmann
2. Prof. Dr. med. F. Paulsen
3. Prof. Dr. D. N. Angelov MD PhD

Datum der Promotion: 15. Januar 2007

Meinem Großvater
Willi Werner Goldmann
(1926-2005)

Inhaltsverzeichnis

1. verwendete Abkürzungen	5
2. Abstract	6
3. Einleitung	7
4. Zielstellung	10
5. Methodik	11
6. Ergebnisse	14
7. Diskussion	16
8. Literaturverzeichnis	20
9. Eigenanteilserklärung	26
10. Danksagung	27
11. Lebenslauf	28
12. Selbständigkeitserklärung	29
13. Publikationen	30
1. Goldmann et. al	
2. Bechmann et. al	
3. Kwidzinski et. al	

verwendete Abkürzungen

BD	Becton, Dickinson und Company
CD4	cluster of differentiation
CFDA	6-Carboxylfluorescein Diacetat
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ECL	entorhinal cortex lesion; entorhinale Kortexläsion
FACS	Fluorescence activated cell sorting; Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung
GFP	green fluorescent protein; grün fluoreszierendes Protein
HE	Hematoxylin Eosin
hpi	hours post injection; Stunden nach Injektion
LK	Lymphknoten
MS	Multiple Sklerose
PB	phosphate buffer; Phosphatpuffer
PFA	Paraformaldehyd
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abstract

Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste neuroimmunologische Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) in Europa. Nach derzeitigem Kenntnisstand wird diese autoimmune Erkrankung durch unterschiedliche Mechanismen vermittelt. Zum einen kommt es zum Eindringen autoreaktiver CD4+ T-Helfer Zellen in das ZNS (Sospedra and Martin 2005) und damit zum Auslösen einer gegen Bestandteile der Markscheide gerichteten Immunreaktion. Zum anderen werden antigenpräsentierende Zellen, wie ortständige Mikroglia und aus dem Blut abstammende Makrophagen rekrutiert, die zur Induktion und Regulation der Intensität T-zellvermittelter Entzündung und Parenchymschäden in MS Läsionen beitragen (Raivich and Banati 2004).

In unserer Arbeitsgruppe wurde an der Frage gearbeitet, ob aus dem Blut stammende Leukozyten die Zonen axonaler Degeneration infiltrieren. Dafür nutzen wir das Modell der entorhinalen Kortexläsion (entorhinal cortex lesion; ECL), welches seit über 30 Jahren zur Untersuchung axonaler Sprossung und reaktiver Synaptogenese in Regionen axonaler Degeneration eingesetzt wird (Lynch et al. 1972, Ramirez 2001). Zum einen konnten wir zeigen, dass es in den Zonen axonaler Degeneration zur Einwanderung monozytärer, aus dem Blut stammender Zellen kommt, und zum anderen, dass dieser Befund bei knochenmarktransplantierten Tieren unabhängig von Transplantation und vorausgegangener Radiatio waren.

Nach Etablierung eines Protokolls zur histologischen Aufarbeitung ganzer Köpfe und Häuse unter Bewahrung des Signals von grün fluoreszierendem Protein (green fluorescent protein; GFP), konnten wir nachweisen, dass CD4+ T-Zellen, eine Subpopulation von Leukozyten, in der Lage sind, über präformierte, schon länger für lösliche Antigene postulierte Drainagewege (Cserr and Knopf 1992) das ZNS zu verlassen. Die Wanderung der T-Zellen konnte von uns entlang der Filae olfactoriae, durch die Lamina cribrosa bis unter die nasale Riechschleimhaut dargestellt werden. Von hier hatten die T-Zellen Zugang zu nasalen lymphatischen Abflusswegen und erreichten die zervikalen Lymphknoten (LK) in einem definierten zeitlichen Schema.

Erklärung über den Anteil an den Publikationen

Die Promovendin Jana Goldmann hatte folgenden Anteil an den eingereichten Publikationen:

Publikation 1: *T cells traffic from brain to cervical lymph nodes via the cribroid plate and the nasal mucosa.*

80 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Die Promovendin führte alle experimentellen Arbeiten selbständig durch, hierzu gehörten die Durchführung von Läsionen und Ventrikelinjektionen, die Gewinnung und Verarbeitung von Hirn, Lymphknoten und Milz, die Anwendung verschiedener Färbungsmethoden, die anschließende Fluoreszenz- und Lichtmikroskopie. Die FACS Analyse erfolgte unter Anleitung. Die Publikation wurde von der Promovendin selbständig geschrieben und von Prof. Bechmann kritisch korrigiert und gemeinsam überarbeitet.

Publikation 2: *Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia.*

20 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Die Promovendin führte die Arbeiten mit dem CFDA Marker aus (Figure 7 der Publikation). Hierzu erfolgten intrasplenale Injektionen, die Durchführung entorhinaler Kortexläsion, die Gewinnung von Hirnen, sowie deren anschließende histologische Aufarbeitung und Mikroskopie.

Publikation 3: *Self-tolerance in the immune privileged CNS: lessons from the entorhinal cortex lesion model.*

15 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Die Promovendin führte entorhinale Kortexläsionen sowie histologische und mikroskopische Aufarbeitungen aus. Sie half bei der Verfassung des Textes.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre nicht möglich gewesen, ohne die außergewöhnlich gute und intensive Zusammenarbeit mit Herrn Professor Dr. med. Ingo Bechmann, der mich seit dem Beginn meiner wissenschaftlichen Arbeit hervorragend unterstützt hat. Allen voran gilt ihm mein herzlichster Dank.

Des weiteren danke ich unserer gesamten Arbeitsgruppe für das angenehme Arbeitsklima. Insbesondere Jacqueline Mahlo für ihre unendliche Mühe mir geduldig die Geheimnisse der Immunzytochemie zu erklären, Erik Kwidzinski für den unvergesslichen Augenblick, als er mir zum ersten Mal "meine" GFP Zellen im Lymphknoten zeigte und Adam Kovac für seine anschaulichen Erklärungen tierexperimenteller Techniken. Ich danke Daniel Richter, Sabine Winkler, Leman Mutlu und Christine Brandt.

Danke Herrn Prof. Dr. med. Robert Nitsch für den ersten inspirierenden wissenschaftlichen Kontakt im Rahmen des Seminars Anatomie mit klinischen Bezügen und die Bereitstellung seiner Labore für meine experimentellen Arbeiten.

Finanzielle Unterstützung erfuhr ich von der Studienstiftung des Deutschen Volkes und der Charité Universitätsmedizin Berlin im Rahmen eines studentischen Forschungs- sowie eines Promotionsstipendiums.

Bedanken möchte ich mich in dieser Stelle auch bei meinen Freundinnen Kerstin Dähn, Astrid Petzoldt und Silvia Unterdörfel, die stets ein offenes Ohr für meine Probleme hatten und im rechten Moment für Abwechslung sorgten.

Robert Glumm danke ich für die liebevolle Unterstützung, intensiven Diskussionen und die Erduldung meiner Launen.

Für ihre Anteilnahme, Geduld und die viele großen und kleinen Hilfeleistungen danke ich meinen Eltern und meinem verstorbenen Großvater, dem diese Arbeit gewidmet ist.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Selbständigkeitserklärung

„Ich, Goldmann, Jana, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:
Invasion und Emigration von Leukozyten in das und aus dem zentralen Nervensystem:
Untersuchungen mit grün fluoreszierenden Zellen
selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne
die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten
dargestellt habe.“

18. Oktober 2006

Jana Goldmann

Publikationen:

1.

Goldmann J, Kwidzinski E, Brandt C, Mahlo J, Richter D, Bechmann I. T cells traffic from brain to cervical lymph nodes via the cribroid plate and the nasal mucosa. *J Leukocyte Biology* 2006; 80(4):797-801

2.

Bechmann I, Goldmann J, Kovac AD, Kwidzinski E, Simbürger E, Naftolin F, Dirnagl U, Nitsch R, Priller J. Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia. *FASEB J* 2005;19(6):647-649

3.

Kwidzinski E, Mutlu L, Kovac AD, Bunse J, Goldmann J, Aktas O, Zipp F, Kamradt T, Nitsch R, Bechmann I. Self-Tolerance in the immune privileged CNS: lessons from the entorhinal cortex lesion model. *J Neural Transm* 2003;(65):29-49