

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin und
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Mechanismen der Neurodegeneration in murinen Modellen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der
Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Sandra Gültner
aus Meißen

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. F. Heppner
2. Prof. Dr. med. J. Tatzelt
3. Prof. Dr. med. M. Otto

Datum der Promotion:

18.11.2011

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	1
Abstract	1
Einleitung	2
Methodik	3
Ergebnisse	5
Diskussion	8
Literatur	11
Anteilerklärung	14
Ausgewählte Publikationen	15
Lebenslauf	37
Publikationsliste	38
Selbstständigkeitserklärung	39
Danksagung	40

Ausgewählte Publikationen

Publikation 1:

Gültner S, Laue M, Riemer C, Heise I, Baier M. Prion disease development in slow Wallerian degeneration (Wld(S)) mice. *Neurosci Lett*. 2009 Jun 5;456(2):93-8.

Publikation 2:

Mok SW, Thelen KM, Riemer C, Bamme T, Gültner S, Lütjohann D, Baier M. Simvastatin prolongs survival times in prion infections of the central nervous system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Sep 22;348(2):697-702.

Publikation 3:

Gültner S, Kuhlmann T, Hesse A, Weber JP, Riemer C, Baier M, Hutloff A. Reduced Treg frequency in LFA 1-deficient mice allows enhanced T effector differentiation and pathology in EAE. *Eur J Immunol*. 2010 Dec;40(12):3403-12.

ZUSAMMENFASSUNG

Titel: Mechanismen der Neurodegeneration in murinen Modellen

Autor: Sandra Gültner

Abstract

Erkrankungen des Zentralen Nervensystems (ZNS) - ob infektiöser Natur, wie zum Beispiel Prionerkrankungen, oder mit chronisch-entzündlichen Eigenschaften, wie bei Autoimmunerkrankungen - sind immer noch unheilbar. Die Aufklärung von Mechanismen, die zur Degeneration der Nervenzellen führen, ist daher von großem gesundheitspolitischem Interesse. In der vorliegenden Arbeit wurden Mechanismen der Neurodegeneration in drei verschiedenen Mausmodellen näher analysiert.

Im ersten Modell wurde untersucht, ob die Wallersche Degeneration zum Krankheitsverlauf in einem murinen Prionen-Infektionsmodell beiträgt. Transgene Mäuse, bei denen die Wallersche Degeneration verlangsamt abläuft (sog. Wld^S -Mäuse) wurden mit Scrapie infiziert und hinsichtlich des Krankheitsverlaufs, sowie der Neuropathologie untersucht.

Im zweiten Teilprojekt wurden Behandlungsversuche an Scrapie-infizierten Mäusen mit Simvastatin, einem HMG-CoA-Reduktasehemmer, durchgeführt. Simvastatin hat neben der Cholesterin-senkenden Wirkung auch immunmodulatorische und anti-inflammatorische Eigenschaften und zeigte bereits *in vitro* eine Inhibierung der Prion-Replikation in infizierten Zellkulturen. Es konnte nun auch *in vivo* gezeigt werden, dass Simvastatin das Überleben Scrapie-infizierter Mäuse verlängert.

Ein möglicher Mechanismus hierfür ist die Hemmung der Interaktion des Integrins LFA-1 mit seinem Liganden, ICAM-1. In einem Scrapie-Infektionsmodell zeigten LFA-1-defiziente Mäuse jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Überlebenszeiten. Um die Bedeutung von LFA-1 für andere neurodegenerative Erkrankungen zu untersuchen, wurde zusätzlich das Mausmodell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) verwendet. In diesem Modell konnten deutliche Unterschiede zwischen Wildtyp-(LFA-1^{+/+}) und LFA-1 Knock-out-(LFA-1^{-/-}) Mäusen gezeigt werden. Eine weitergehende immunologische Untersuchung zeigte, dass LFA-1 wichtig für die Generierung regulatorischer T-Zellen (Tregs) ist.

Einleitung

Für die Entwicklung von Therapiemöglichkeiten bei neurodegenerativen Erkrankungen ist die Aufklärung der zu Grunde liegenden Pathomechanismen entscheidend.

Prion-Erkrankungen, wie zum Beispiel die Creutzfeld-Jakob-Krankheit, die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) oder Scrapie, verursachen eine fortschreitende und schließlich tödliche Neurodegeneration. Ultrastrukturelle Untersuchungen an Prion-infiziertem Gewebe zeigten axonale Demyelinisierungen und Veränderungen, die teils der sogenannten Wallerschen Degeneration ähneln [1-3]. Ein Einfluss dieses Prozesses bei Erkrankungen des ZNS konnte bereits in verschiedenen Modellen, wie Zerebraler Ischämie [4], EAE [5] oder axonaler Dystrophie [6], bestätigt werden. Um einen möglichen Zusammenhang der Neurodegeneration bei Prion-Infektionen und der Wallerschen Degeneration zu untersuchen, sollten im Rahmen dieser Arbeit Hirnschnitte von „slow Wallerian degeneration“ (Wld^S)-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen immunhistochemisch und elektronenmikroskopisch untersucht werden.

Ein möglicher Therapieansatz für Prion-Erkrankungen wäre die Inhibierung der Prion-Replikation. *In vitro* zeigten HMG-CoA-Inhibitoren, sogenannte Statine, bereits vielversprechende Ergebnisse [7, 8]. Neben der Inhibierung der Cholesterol-Synthese haben Statine jedoch auch immunmodulatorische und anti-inflammatorische Eigenschaften [9-11]. Da Simvastatin bereits ein zugelassenes und breit eingesetztes Arzneimittel ist, könnten positive Ergebnisse aus Tiermodellen auch rasch klinischen Einsatz finden. Hierzu ist aber die Aufklärung der genauen Wirkmechanismen eine Grundvoraussetzung. Um einen Einfluss von Simvastatin auf den Verlauf einer Prion-Infektion zu untersuchen, sollten Scrapie-infizierte Mäuse damit behandelt und der Verlauf der Erkrankung mit unbehandelten Tieren verglichen werden.

Die EAE ist eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS), bei der infiltrierende Leukozyten eine chronische Demyelinisierung von Axonen auslösen. Das Integrin LFA-1 (CD11a/CD18) ist ein wichtiges Molekül für die Migration von Leukozyten [12]. Seine genaue Rolle bei der Pathogenese einer EAE konnte bisher aber noch nicht abschließend geklärt werden. Um hierzu einen Beitrag zu leisten, sollte der Krankheitsverlauf einer aktiv induzierten EAE in LFA-1 Knockout-Mäusen und Wildtyp-Kontrollen verglichen, sowie mögliche Ursachen für Unterschiede aufgezeigt werden.

Methodik

Tierversuche

Für die Induktion von Prion-Erkrankungen wurde ein Hirnhomogenat einer terminal kranken Maus, infiziert mit dem Prionstamm 139A, hergestellt. Dieses wurde in verschiedenen Verdünnungen den zu infizierenden Mäusen intrazerebral injiziert. Kontrolltiere wurden mock-infiziert mit dem Hirnhomogenat einer gesunden Maus. Die Tiere wurden anschließend zweimal wöchentlich auf Krankheitssymptome untersucht. Zur Induktion einer EAE wurden Mäuse subkutan mit dem Myelin-spezifischen Peptid MOG₃₅₋₅₅ in komplettem Freundschem Adjuvanz immunisiert. Ab Auftreten erster Lähmungserscheinungen wurden die Tiere täglich untersucht, und je nach Stärke der Symptome wurde ihnen ein Score zwischen 0 und 5 zugeordnet.

Immunhistochemie und Histologie

Zum Nachweis der Expression verschiedener Proteine wurden in Paraffin eingebettete Hirnschnitte (bei der EAE auch Rückenmarksschnitte) auf Objektträgern fixiert und mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt. Anschließend wurden die Färbungen mikroskopisch analysiert und an Hand eines semi-quantitativen Scoring-Systems ausgewertet. Zur Analyse der Demyelinisierung im ZNS von EAE-Mäusen wurde die Färbung von Gewebeschnitten mit Luxol Fast Blue / Periodsäure-Schiffs Reagenz durchgeführt. Die demyelinisierte Fläche wurde ausgemessen und der Anteil in Prozent der Weißen Substanz errechnet.

Paraffin-Embedded Tissue (PET) Blot

Zur Darstellung von fehlgefaltetem Prion-Protein (PrP^{Sc}) wurden Hirnschnitte auf eine PVDF-Membran aufgebracht und PrP^{Sc} mit dem Antikörper 6H4 angefärbt.

Western Blot

Zum quantitativen Nachweis der Proteinexpression bzw. -ablagerung wurde von entsprechenden Tieren ein Hirnhomogenat mittels Ultraschall hergestellt, im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern angefärbt.

Isolierung von Zellen aus dem Rückenmark

Um eine Einzelzell-Suspension aus Rückenmark herzustellen, wurden die Tiere mit PBS perfundiert und das Rückenmark entnommen. Die Organe wurden dann mittels Kollagenase und DNase verdaut und schonend mittels des gentleMACS (Miltenyi Biotec) dissoziiert.

Durchflusszytometrie

Zellen aus dem Rückenmark wurden mit verschiedenen Fluorophor-konjugierten monoklonalen Antikörpern, wie in Publikation 3 beschrieben, angefärbt.

Zur Untersuchung antigenspezifischer Zellen und der Zytokin-Produktion von Zellen wurden diese *in vitro* mit dem Antigen restimuliert, wobei die Sekretion von Proteinen mittels Zugabe von Brefeldin A zum Medium gehemmt wurde. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden intrazellulär pro- und anti-inflammatorische Zytokine mittels entsprechender Fluorophor-konjugierter Antikörper gefärbt. Antigen-spezifische Zellen wurden mittels der kürzlich beschriebenen Methode von Kirchhoff et al. [13] identifiziert. Diese beruht auf einer intrazellulären Färbung von CD40L nach *in vitro* Restimulation der Zellen mit dem Antigen.

Regulatorische T-Zellen wurden an Hand ihrer Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 identifiziert. Dazu wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und anschließend mittels des Alexa Fluor 647-konjugierten Antikörpers FJK-16s gefärbt.

Gemessen wurden die Multi-Farben-Analysen mit jeweils 9 Fluorophoren an einem LSR II Durchflusszytometer (BD Biosciences), die Analyse der Daten erfolgte mittels FlowJo (Treestar).

Depletion von regulatorischen T-Zellen

Zur Verringerung der Anzahl regulatorischer T-Zellen in Wildtyp-Mäusen wurde diesen acht Tage vor EAE-Induktion anti-CD25 Antikörper (Klon PC61) intraperitoneal injiziert.

Statistische Auswertung

Statistische Auswertungen erfolgten mittels Prism (GraphPad). Zur Berechnung der Signifikanz zwischen zwei Gruppen wurde der Student's t-Test angewandt, bei den EAE Scoring-Kurven der Kruskal Wallis-Test.

Ergebnisse

Krankheitsverlauf bei Scrapie-infizierten Wld^S- und Wildtyp-Mäusen

Nach Scrapie-Infektionen mit zwei verschiedenen Dosen entwickelten beide Maus-Gruppen jeweils gleichzeitig typische Symptome der Prion-Erkrankung, wie Bewegungsstörungen, Gewichtsverlust oder struppiges Fell. Ebenso war die Dauer der Erkrankung in Wld^S- und Wildtyp-Mäusen bei beiden infektiösen Dosen gleichlang.

Neuropathologie Scrapie-infizierter Wld^S- und Wildtyp-Mäuse

Auch pathologisch konnte zwischen den Mäusen kein Unterschied festgestellt werden. Die Ablagerung von fehlgefaltetem Prion-Protein, spongiforme Veränderungen des Hirngewebes, sowie die Aktivierung von Gliazellen waren gleichermaßen ausgeprägt; sowohl in der asymptomatischen Phase, als auch zum terminalen Zeitpunkt der Erkrankung. Elektronenmikroskopisch zeigten beiden Gruppen eine Anhäufung von Lysosomen in Nervenzellen und strukturelle Veränderungen von Axonen - zum Teil war kein Axoplasma mehr vorhanden oder es war vesikuliert, so dass nur noch Myelin übrig war.

Krankheitsverlauf Simvastatin-behandelter und unbehandelter Scrapie-infizierter Mäuse

Simvastatin-behandelte Mäuse überlebten durchschnittlich 16 (bei hoher infektiöser Dosis) bzw. 20 (bei niedriger infektiöser Dosis) Tage länger als unbehandelte Mäuse. Eine Cholesterin-reiche Nahrung hatte im Gegensatz dazu keine Auswirkung auf den Krankheitsverlauf. Beide Gruppen entwickelten zeitgleich die typischen Krankheitssymptome, bei den behandelten Tieren wurde das terminale Stadium allerdings erst später erreicht.

Neuropathologie Simvastatin-behandelter und unbehandelter Scrapie-infizierter Mäuse

Um zu untersuchen, was für das längere Überleben der behandelten Tiere verantwortlich ist, wurde die Ablagerung von PrP^{Sc}, sowie die Glia-Aktivierung in Hirnschnitten analysiert. In der Ablagerung von PrP^{Sc} konnten keine Unterschiede gefunden werden. Auch die Protein-Expression typischer Astrozyten- bzw. Mikroglia-Marker wie GFAP bzw. Mac-3 war unverändert. Allerdings konnte eine bereits beschriebene Inhibierung der Expression von MHC II bestätigt werden. Interessanterweise führte die Simvastatin-Behandlung zu einer erhöhten Expression des Glia-Aktivierungsmarkers Galectin-3,

einem multi-funktionellen Protein, was eine Rolle bei zellulärer Aktivierung, Adhäsion, Proliferation, Apoptose und Phagozytose spielt.

Verlauf der EAE in LFA-1 Knockout-Mäusen und Wildtyp-Kontrollen

LFA-1-defiziente Mäuse entwickelten eine deutlich stärkere EAE als die Wildtyp-Kontrollen mit einer höheren Krankheits-Inzidenz sowie höheren klinischen Scores.

Neuropathologie nach EAE-Induktion

Die Pathologie einer EAE wird hauptsächlich von infiltrierenden Leukozyten verursacht, die im ZNS eine chronische Entzündung auslösen, was zur Demyelinisierung und somit Schädigung von Axonen führt. Um hier den Einfluss von LFA-1 genauer zu untersuchen, wurden Gewebeschnitte immunhistochemisch untersucht. Am Höhepunkt der Erkrankung waren signifikant mehr infiltrierende Mac-3 positive Zellen im Rückenmark von LFA-1^{-/-} Mäusen zu finden. Damit einhergehend war ebenfalls der Grad der Demyelinisierung deutlich höher. Auch im Gehirn EAE-erkrankter LFA-1 Knockout-Mäuse waren mehr infiltrierende Leukozyten zu finden.

Untersuchung der entzündlichen Infiltrate im Rückenmark nach EAE-Induktion

Um die zelluläre Zusammensetzung der entzündlichen Infiltrate im Rückenmark genauer zu untersuchen, wurde eine Einzelzell-Suspension der Organe hergestellt, mit spezifischen, Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Zunächst war bereits die Anzahl an Gesamt-Leukozyten, die aus dem Rückenmark von LFA-1^{-/-} Mäusen isoliert wurde, deutlich höher als bei den Wildtyp-Kontrollen. Die Leukozyten-Population bestand zum Großteil aus Mikroglia und CD4-positiven T-Zellen. Des Weiteren waren B-Zellen, wenige CD8+ T-Zellen, NK-Zellen, NK T-Zellen, $\gamma\delta$ T-Zellen, konventionelle und plasmazytoide Dendritische Zellen zu finden. Der Anteil von CD4+ T-Zellen war im Rückenmark LFA-1-defizienter Tiere im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen deutlich erhöht.

Da Autoantigen-spezifische CD4+ T-Zellen die Hauptauslöser der EAE sind [14], wurden diese näher untersucht. Dazu wurden die aus dem Rückenmark isolierten Zellen *in vitro* mit dem Antigen (MOG₃₅₋₅₅) restimuliert und anschließend zur Detektion antigen-spezifischer T-Zellen intrazellulär mit einem anti-CD40L Antikörper gefärbt. So konnte festgestellt werden, dass bis zu 50% der infiltrierenden CD4+ T-Zellen autoreaktiv waren und der Anteil der MOG-spezifischen CD4+ T-Zellen in LFA-1^{-/-} Mäusen etwa doppelt so hoch war wie in den Kontrolltieren. Unter Berücksichtigung der

bereits deutlich erhöhten absoluten Zellzahl, war die Anzahl an infiltrierenden autoreaktiven CD4⁺ Zellen in LFA-1 Knockout-Mäusen circa fünffach höher als in den Wildtyp-Tieren.

Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine verstärkte Rekrutierung von autoreaktiven T-Zellen ins Rückenmark. Dagegen allerdings spricht, dass der Anteil autoreaktiver T-Zellen nicht nur am Ort der Entzündung, sondern auch in den sekundärlymphatischen Organen von LFA-1-defizienten Tieren erhöht ist. LFA-1 scheint daher an der Generierung und nicht der Verteilung autoreaktiver T-Zellen beteiligt zu sein.

Zytokin-Produktion der infiltrierenden Lymphozyten im Rückenmark

Unter den CD4⁺ T-Zellen sind in der EAE vor allem IL-17-produzierende (Th17) Zellen verantwortlich für die Pathogenese [14]. Daher wurde die Produktion pro-inflammatorischer (IL-17, IFN- γ , IL-4) und anti-inflammatorischer (IL-10) Zytokine analysiert. Dazu wurden die Zellen *in vitro* mit MOG-Peptid restimuliert, intrazellulär mit fluorophorgekoppelten Antikörpern gegen verschiedene Zytokine und CD40L gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die MOG-spezifischen T-Zellen gehörten in beiden Gruppen zu Th1-, Th17- und Th1/Th17-Subklassen. Das Zytokin-Profil war jedoch in beiden experimentellen Gruppen absolut vergleichbar, ebenso die Menge an produzierten Zytokinen pro Zelle. Allerdings resultiert aus der erhöhten Gesamtzellzahl in LFA-1 Knockout-Mäusen eine erhöhte Anzahl an Zytokin-produzierenden CD4⁺ T-Zellen.

Untersuchung regulatorischer T-Zellen

Regulatorische T-Zellen spielen eine bedeutende Rolle in der Unterdrückung chronischer Entzündungen, da sie die Expansion und Funktion autoreaktiver Effektor-T-Zellen kontrollieren. Um diese Zellen im Rückenmark EAE-erkrankter LFA-1^{-/-} Mäuse und Wildtyp-Kontrollen zu untersuchen, wurde die Expression von FoxP3 durchflusszytometrisch analysiert. Die absolute Anzahl dieser Zellen war in beiden Gruppen gleich, unter Beachtung der erhöhten Anzahl autoreaktiver T-Zellen in LFA-1 Knockout-Mäusen war das Verhältnis von regulatorischen T-Zellen zu Effektor-T-Zellen in dieser Gruppe allerdings deutlich verringert.

In weitergehenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die verringerte Zahl regulatorischer T-Zellen in LFA-1^{-/-} Mäusen bereits auf einen Defekt ihrer Generierung im Thymus zurückzuführen war, da auch dort weniger Tregs gefunden wurden.

Depletion regulatorischer T-Zellen

Um zu untersuchen, ob die verringerte Anzahl regulatorischer T-Zellen allein den stärkeren Verlauf der EAE in LFA-1 Knockout-Mäusen erklären kann, wurden regulatorische T-Zellen in Wildtyp-Mäusen „suboptimal“ depletiert, so dass in beiden Gruppen der Anteil dieser Zellen annähernd gleich war. Wildtyp-Mäuse, Treg-depletierte Wildtyp-Mäuse und LFA-1^{-/-} Mäuse wurden mit MOG-Peptid immunisiert und der Krankheitsverlauf beobachtet. Treg-depletierte Wildtyp-Mäuse und LFA-1 Knockout-Tiere erreichten absolut vergleichbare EAE-Scores. Treg-depletierte Wildtyp-Mäuse zeigten sogar eine schnellere Ausbildung der Lähmungserscheinungen.

Diskussion

Die Pathomechanismen von Prion-Erkrankungen sind bisher noch nicht hinreichend aufgeklärt. Neben dem Verlust von Neuronen wurden axonale Veränderungen *in vivo* und *in vitro* beschrieben [1, 15-17], wobei noch unklar ist, ob diese Veränderungen ein primärer Effekt der Prion-Toxizität sind oder ein sekundärer Effekt auf Grund neuronaler Funktionsstörung. Außerdem ist unklar, ob die axonalen Veränderungen zum Fortschreiten der Erkrankung beitragen oder lediglich Anzeichen für den neurodegenerativen Prozess sind. Um hierzu mehr Klarheit zu gewinnen, wurde im ersten Teilprojekt dieser Arbeit die Neurodegeneration in Wld^S- und Wildtyp-Mäusen nach einer Prion-Infektion genauer untersucht, um herauszufinden, ob die Wallersche Degeneration einen Einfluss auf das Fortschreiten der Erkrankung hat. Die Wld^S-Mutation hatte weder einen Einfluss auf das Überleben der Tiere noch auf typische Merkmale von Prion-Erkrankungen, wie Ablagerung von fehlgefaltetem Prion-Protein oder Glia-Aktivierung. Ultrastrukturell konnten verschiedene pathologische Veränderungen der Axone und des neuronalen Somas festgestellt werden, die allerdings gleichermaßen in beiden Versuchstier-Gruppen auftraten. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die Wallersche Degeneration einen signifikanten Einfluss auf das Fortschreiten der Erkrankung in diesem Prion-Modell hat. Diese Befunde stehen im Kontrast zu anderen neuronalen Krankheitsmodellen, wo Experimente mit Wld^S-Mäusen eine eindeutige Beteiligung dieses Prozesses am Krankheitsverlauf zeigten [4-6].

Im zweiten Teilprojekt der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von Simvastatin, einem HMG-CoA-Reduktasehemmer, auf Prion-Erkrankungen untersucht werden. Dazu

wurden Prion-infizierte Mäuse mit dem Medikament Zocor (Merck & Co) behandelt, und das Überleben, sowie typische Krankheitszeichen mit unbehandelten Mäusen verglichen. Eine Simvastatin-Behandlung verlängerte signifikant das Überleben der Tiere. *In vitro* zeigten Statine bereits eine Inhibierung der Ablagerung von fehlgefaltetem Prion-Protein, was auch in Verbindung mit einer Cholesterin-Senkung in den Zellen steht. *In vivo* ist die Situation allerdings etwas komplexer. Unsere Messung des Gehalts von Cholesterin und dessen Metabolite im Hirn zeigte, dass selbst bei Behandlung mit einer hohen Dosis an Simvastatin, diese kaum verändert wurden. Ebenso konnte keine Verringerung der Ablagerung von fehlgefaltetem Prion-Protein festgestellt werden. Daher ist es unwahrscheinlich, dass der positive Einfluss von Simvastatin auf das Überleben der Tiere auf eine Senkung des Cholesterin-Spiegels zurückzuführen ist. Vielmehr wurde bereits ein breites Spektrum an immunmodulatorischen und anti-inflammatorischen Eigenschaften von Statinen beschrieben [9-11]. Da die Neuro-Inflammation, auf Grund chronisch aktivierter Mikro- und Astroglia, ein wichtiger Teil der Pathomechanismen im Prion-infizierten Hirn ist, wäre dies ein möglicher therapeutischer Angriffspunkt.

Um zu untersuchen, ob das verlängerte Überleben auf die bereits beschriebene Inhibierung der Interaktion von LFA-1 mit ICAM-1 durch Statine [9] zurückzuführen ist, wurden LFA-1 Knockout-Mäuse und Wildtyp-Mäuse mit Prionen infiziert; es konnte hier aber keine eindeutige Verbesserung des Krankheitsverlaufs festgestellt werden.

Um den Einfluss von LFA-1 bei einer neurodegenerativen Erkrankung, an der hauptsächlich periphere Lymphozyten beteiligt sind, zu untersuchen, wurden LFA-1 Knockout-Mäuse in einem EAE-Modell mit Wildtyp-Tieren verglichen. Die LFA-1^{-/-} Tiere entwickelten signifikant stärkere Symptome als Wildtyp-Mäuse, was durch einen Defekt in der Generierung regulatorischer T-Zellen erklärt werden konnte. Auf Grund der reduzierten Unterdrückung einer Immunantwort durch Tregs, konnten sich Effektor-T-Zellen vermehrt entwickeln und ins ZNS einwandern. Interessanterweise hatte in unserem Modell das Fehlen von LFA-1 keinen direkten Einfluss auf die Funktion von Effektor-T-Zellen, wie die Zytokin-Produktion auf Einzelzell-Ebene zeigt. Bisher wurde LFA-1 allerdings als Verstärker der T-Zell-Aktivierung beschrieben [18, 19] bzw. entstanden konträre Ergebnisse in EAE-Modellen [20, 21]. Offensichtlich dominiert in unserem EAE-Modell der Effekt von LFA-1 auf die Entwicklung von Tregs und bestimmt so die biologische Auswirkung.

Der Einfluss von Tregs auf die Pathologie einer EAE wurde bereits mehrfach beschrieben, so führte die Depletion von CD25-positiven Zellen zu einer Verstärkung der Symptome bzw. adoptiver Transfer von Tregs schützte Tiere vor der Ausbildung einer EAE (zusammengefasst in [22]). Kürzlich wurde *in vitro* gezeigt, dass LFA-1 an der Interaktion von Dendritischen Zellen und Tregs beteiligt ist, da LFA-1^{-/-} Tregs nicht mehr in der Lage waren, die Reifung von ko-kultivierten Dendritischen Zellen zu inhibieren. Es konnte gezeigt werden, dass bereits in Milz und Thymus von nicht immunisierten Mäusen weniger Tregs vorhanden sind. ICAM-1, ein Ligand von LFA-1 wird von Stromazellen im Thymus exprimiert [23], daher erhöht LFA-1 möglicherweise den Kontakt zwischen Thymozyten und Stromazellen, was zu einem verstärkten T-Zell-Rezeptor Signal führt. Bei erhöhtem T-Zell-Rezeptor Signal wird die Ausbildung von natürlich vorkommenden Tregs im Thymus bevorzugt [24], was den Einfluss von LFA-1 auf die Generierung dieser Tregs erklären könnte.

Das Ergebnis des Treg-Depletions-Experiments bestätigte, dass die verringerte Anzahl an Tregs in LFA-1 Knockout-Mäusen allein ausreicht, den stärkeren Verlauf der EAE zu erklären.

Literatur

- 1 Liberski PP, Bratosiewicz-Wasik J, Gajdusek DC, Brown P. Ultrastructural studies of experimental scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease in hamsters. I. Alterations of myelinated axons. *Acta Neurobiol. Exp.* 62 (2002) 121–129.
- 2 Liberski PP, Mori S. The Echigo-1: a panencephalopathic strain of Creutzfeldt-Jakob disease: a passage to hamsters and ultrastructural studies. *Folia Neuropathol.* 35 (1997) 250–254.
- 3 Liberski PP, Yanagihara R, Wells GA, Gibbs Jr. CJ, Gajdusek DC. Ultrastructural pathology of axons and myelin in experimental scrapie in hamsters and bovine spongiform encephalopathy in cattle and a comparison with the panencephalopathic type of Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Comp. Pathol.* 106 (1992) 383–398.
- 4 Gillingwater TH, Haley JE, Ribchester RR, Horsburgh K. Neuroprotection after transient global cerebral ischemia in Wld(s) mutant mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 24 (2004) 62–66.
- 5 Kaneko S, Wang J, Kaneko M, et al. Protecting axonal degeneration by increasing nicotinamide adenine dinucleotide levels in experimental autoimmune encephalomyelitis models. *J. Neurosci.* 26 (2006) 9794–9804.
- 6 Mi W, Beirowski B, Gillingwater TH, et al. The slow Wallerian degeneration gene, WldS, inhibits axonal spheroid pathology in gracile axonal dystrophy mice. *Brain* 128 (2005) 405–416.
- 7 Bate C, Salmona M, Diomedea L, Williams A. Squalenstatin cures prion-infected neurons and protects against prion neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 14983–14990.
- 8 Taraboulos A, Scott M, Semenov A, Avrahami D, Laszlo L, Prusiner SB. Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J. Cell Biol.* 129 (1995) 121–132.
- 9 Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, et al. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat. Med.* 7 (2001) 687–692.
- 10 Weitz-Schmidt G. Statins as anti-inflammatory agents. *Trends Pharmacol. Sci.* 23 (2002) 482–486.

- 11 Youssef S, Stuve O, Patarroyo JC, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature* 420 (2002) 78–84.
- 12 Engelhardt B. Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J. Neural Transm.* 2006. 113: 477–485.
- 13 Kirchhoff D, Frentsch M, Leclerk P, et al. Identification and isolation of murine antigen-reactive T cells according to CD154 expression. *Eur. J. Immunol.* 2007. 37: 2370–2377.
- 14 Korn T, Anderson AC, Bettelli E, Oukka M. The dynamics of effector T cells and Foxp3+ regulatory T cells in the promotion and regulation of autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 2007. 191: 51–60.
- 15 Guiryo DC, Shankar SK, Gibbs Jr. CJ, Messenheimer JA, Das S, Gajdusek DC. Neuronal degeneration and neurofilament accumulation in the trigeminal ganglia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.* 25 (1989) 102–106.
- 16 Jeffrey M, Fraser JR, Halliday WG, Fowler N, Goodsir CM, Brown DA. Early unsuspected neuron and axon terminal loss in scrapie-infected mice revealed by morphometry and immunocytochemistry. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 21 (1995) 41-49.
- 17 Novitskaya V, Makarava N, Sylvester I, Bronstein IB, Baskakov IV. Amyloid fibrils of mammalian prion protein induce axonal degeneration in NTERA2-derived terminally differentiated neurons. *J. Neurochem.* 102 (2007) 398–407.
- 18 Bachmann MF, McKall-Faienza K, Schmits R, et al. Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity* 1997. 7: 549–557.
- 19 Wang Y, Shibuya K, Yamashita Y, et al. LFA-1 decreases the antigen dose for T cell activation in vivo. *Int. Immunol.* 2008. 20: 1119–1127.
- 20 Wang Y, Kai H, Chang F, et al. A critical role of LFA-1 in the development of Th17 cells and induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. 353: 857–862.

- 21 Dugger KJ, Zinn KR, Weaver C, Bullard DC, Barnum SR. Effector and suppressor roles for LFA-1 during the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 2009. 206: 22–27.
- 22 Bynoe MS, Bonorino P, Viret C. Control of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD41 suppressor T cells: peripheral versus in situ immunoregulation. *J. Neuroimmunol.* 2007. 191: 61–69.
- 23 Lepesant H, Reggio H, Pierres M, Naquet P. Mouse thymic epithelial cell lines interact with and select a CD3^{low}CD41CD81 thymocyte subset through an LFA-1-dependent adhesion–de-adhesion mechanism. *Int. Immunol.* 1990. 2: 1021–1032.
- 24 Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono, M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008. 133: 775–787.

Anteilserklärung

Sandra Gültner hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1:

Gültner S, Laue M, Riemer C, Heise I, Baier M.

Prion disease development in slow Wallerian degeneration (Wld(S)) mice.

Neurosci Lett. 2009 Jun 5;456(2):93-8. Impact Factor: 1,925

80 Prozent

Beitrag im Einzelnen: PET Blot, Western Blot, Immunhistochemie, Auswertung.

Publikation 2:

Mok SW, Thelen KM, Riemer C, Bamme T, Gültner S, Lütjohann D, Baier M.

Simvastatin prolongs survival times in prion infections of the central nervous system.

Biochem Biophys Res Commun. 2006 Sep 22;348(2):697-702. Impact Factor: 2,855

20 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Immunhistochemie.

Publikation 3:

Gültner S, Kuhlmann T, Hesse A, Weber JP, Riemer C, Baier M, Hutloff A.

Reduced Treg frequency in LFA-1-deficient mice allows enhanced T effector differentiation and pathology in EAE.

Eur J Immunol. 2010 Dec;40(12):3403-12. Impact Factor: 5,179

80 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Immunisierung und Scoring der Tiere, Organentnahme und Präparation, *in vitro*-Experimente, Durchflusszytometrie, Auswertung.

Sandra Gültner

Prof. Dr. Frank Heppner

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

- Mok SW, Thelen KM, Riemer C, Bamme T, Gültner S, Lütjohann D, Baier M.
Simvastatin prolongs survival times in prion infections of the central nervous system.
Biochem Biophys Res Commun. 2006 Sep 22;348(2):697-702.
- Mok SW, Riemer C, Madela K, Hsu DK, Liu FT, Gültner S, Heise I, Baier M.
Role of galectin-3 in prion infections of the CNS. Biochem Biophys Res Commun.
2007 Aug 3;359(3):672-8.
- Riemer C, Burwinkel M, Schwarz A, Gültner S, Mok SW, Heise I, Holtkamp N, Baier M.
Evaluation of drugs for treatment of prion infections of the central nervous system.
J Gen Virol. 2008 Feb;89(Pt 2):594-7.
- Baier M, Apelt J, Riemer C, Gültner S, Schwarz A, Bamme T, Burwinkel M, Schliebs R.
Prion infection of mice transgenic for human APPSwe: increased accumulation of
cortical formic acid extractable Abeta(1-42) and rapid scrapie disease development.
Int J Dev Neurosci. 2008 Nov;26(7):821-4.
- Riemer C, Schultz J, Burwinkel M, Schwarz A, Mok SW, Gültner S, Bamme T, Norley S,
van Landeghem F, Lu B, Gerard C, Baier M.
Accelerated prion replication in, but prolonged survival times of, prion-infected CXCR3^{-/-}
mice. J Virol. 2008 Dec;82(24):12464-71.
- Gültner S, Laue M, Riemer C, Heise I, Baier M.
Prion disease development in slow Wallerian degeneration (Wld(S)) mice.
Neurosci Lett. 2009 Jun 5;456(2):93-8.
- Riemer C, Gültner S, Heise I, Holtkamp N, Baier M.
Neuroinflammation in prion diseases: concepts and targets for therapeutic intervention.
CNS Neurol Disord Drug Targets. 2009 Nov;8(5):329-41. Review.
- Gültner S, Kuhlmann T, Hesse A, Weber JP, Riemer C, Baier M, Hutloff A.
Reduced Treg frequency in LFA-1-deficient mice allows enhanced T effector
differentiation and pathology in EAE. Eur J Immunol. 2010 Dec;40(12):3403-12. doi:
10.1002/eji.201040576.

Selbstständigkeitserklärung

Ich, Sandra Gültner, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Mechanismen der Neurodegeneration in murinen Modellen“ 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.

18.07.2011

Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich möchte mich bei der gesamten Arbeitsgruppe *Neurodegenerative Erkrankungen* des Robert Koch-Instituts für die schöne Zeit im Labor herzlichst bedanken.

Dr. Michael Baier danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die mir zur Verfügung gestellten Mittel, sowie die hervorragende Betreuung der Arbeit.

Ebenfalls für die gute Betreuung, sowie die Unterstützung mit Rat und Tat danke ich Dr. Constanze Riemer.

Theresa Bamme, Simon Mok, Ines Heise, Ute Kraft, Florian Neff, Martin Bringmann und Mari Wildhagen danke ich für die tolle Zusammenarbeit, die hilfreichen Gespräche und Diskussionen, sowie die schöne Zeit außerhalb des Labors.

Ein herzlicher Dank für die allzeit tolle Unterstützung im Labor gilt Frau Lichy, Karin Krohn und Elke Westhäuser.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, ohne die all dies nicht möglich gewesen wäre. Sie haben mich stets unterstützt und haben die lange Schaffenszeit geduldig auf einen gebührenden Abschluss gespart.

Zudem danke ich Andreas von ganzem Herzen – ohne seine tatkräftige Unterstützung hätten meine Eltern noch länger warten müssen.