

Aus dem Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen

Abteilung Hirnforschung

Direktor: Professor Dr. R. Meyermann

Blut-Hirn-Schranken assoziierte Immunüberwachung  
des menschlichen Gehirns.

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Christian Karl Löffler

aus

Freiburg im Breisgau

2009

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. R. Meyermann

2. Berichterstatter:

Professor Dr. T. Skutella

*Für meinen Großvater.*

## VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

AP	Area postrema
APC	Antigen präsentierende Zelle
BBB	aus dem Englischen: <i>blood brain barrier</i> = Blut-Hirn-Schranke
BDNF	Brain derived neurotrophic factor = dem Hirn entstammender, neurotropher Faktor
CVO	Zirkumventrikuläre Organe
CD	Cluster of differentiation
DN T-Zellen	Doppelt negative T-Zellen
EAE	Experimentelle Autoimmunenenzephalitis
GLUT	Glukose Transporter
HIV	Human immune deficiency virus
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1 (Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1)
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Major histocompatibility complex
MO	Medulla oblongata (= vMO + dMO; ohne Area postrema)
dMO	dorsale Medulla oblongata
vMO	ventrale Medulla oblongata
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
TGF- $\beta$	Transforming growth factor-beta (transformierender Wachstumsfaktor beta)
TJ	Tight junction
TZR	T-Zell-Rezeptor
VC	Visueller Kortex (Sehrinde)
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1 (Gefäßzelladhäsionsmolekül-1)
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO-1	Zonula occludens Protein-1

**INHALTSVERZEICHNIS**

	Seite
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Vorbemerkung.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2 Das Immunsystem.....</b>	<b>6</b>
1.2.1 Grundzüge des Immunsystems.....	6
1.2.2 Herkunft der Lymphozyten.....	8
1.2.3 Morphologie der Lymphozyten.....	8
1.2.4 Mechanismen der leukozytären Extravasation: Homing.....	9
1.2.5 Lymphozytäre Wege in das ZNS.....	12
1.2.6 Das Konzept der Immunüberwachung.....	14
<b>1.3 Die Blut-Hirn-Schranke.....</b>	<b>17</b>
1.3.1 Die Anfänge.....	17
1.3.2 Schranke oder Schleuse?.....	18
1.3.3 Anatomisch-morphologisches Korrelat der BBB.....	20
1.3.4 Molekulare Zusammensetzung der BBB.....	21
1.3.5 Unterschiedliche Ausprägungsmuster der BBB im Gehirn.....	21
1.3.6 Modulierende Einflüsse auf die BBB.....	23
1.3.7 Zusammenfassung: BBB.....	26
<b>1.4 Zirkumventrikuläre Organe.....</b>	<b>28</b>
1.4.1 Anatomische Besonderheiten.....	28
1.4.2 Funktion der CVO.....	29
1.4.3 Die Area postrema im Besonderen.....	31
1.4.4 Zusammenfassung: CVO.....	32
<b>1.5 Ziele der Arbeit und Fragestellung.....</b>	<b>33</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>34</b>
<b>2.1 Patientendaten.....</b>	<b>34</b>
2.1.1 Definition des Normalhirns und Ausschluss pathologischer Zustände.....	34
2.1.2 Klinische Daten.....	36
<b>2.2 Untersuchte Hirnregionen.....</b>	<b>37</b>

<b>2.3 Herstellung histologischer Präparate.....</b>	<b>38</b>
<b>2.4 Immunhistochemie.....</b>	<b>39</b>
2.4.1 Verwendete Antikörper.....	39
2.4.1.1 Antikörper gegen CD3.....	39
2.4.1.2 Antikörper gegen CD4.....	39
2.4.1.3 Antikörper gegen CD8.....	39
2.4.1.4 Antikörper gegen CD20.....	40
2.4.1.5 Antikörper gegen CD137 (4-1BB).....	40
2.4.1.6 Antikörper gegen MHC-II (HLA-DR; -DP; -DQ).....	41
2.4.1.7 Antikörper gegen Granzym B.....	41
2.4.1.8 Antikörper gegen Laminin.....	41
2.4.2 Begründung der Antikörperauswahl.....	42
2.4.3 Protokoll der Immunhistochemie.....	43
2.4.4 Immunhistochemische Doppelfärbung.....	44
<b>2.5 Färbungen aus dem Routinelabor.....</b>	<b>45</b>
2.5.1 Hämatoxylin/Eosin (H.E.)-Färbung.....	45
2.5.2 Klüver-Barrera (kombinierte Luxol Fast Blue- und Nissl-Färbung).....	45
2.5.3 Retikulin-Versilberung nach Novotny.....	45
2.5.4 Elastica van Gieson-Färbung (EvG).....	46
<b>2.6 Lichtmikroskopische Auszählung und Auswertung.....</b>	<b>47</b>
<b>2.7 Statistische Methoden.....</b>	<b>48</b>
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1 Ausschluss pathologischer Zustände.....</b>	<b>49</b>
<b>3.2 Vorbemerkungen zur Ergebnisdarstellung.....</b>	<b>50</b>
<b>3.3 Lymphozytäre Verteilung in den einzelnen Regionen separat betrachtet.....</b>	<b>51</b>
3.3.1 Visueller Kortex.....	51
3.3.2 Area postrema.....	52
3.3.3 Medulla oblongata.....	52
<b>3.4 Vergleich der einzelnen Regionen im Hinblick auf die exprimierten Marker.....</b>	<b>54</b>

3.4.1 CD8.....	54
3.4.2 CD3.....	57
3.4.3 MHC-II.....	58
3.4.4 CD20.....	59
3.4.5 CD4 und Granzym B.....	59
3.4.6 CD137.....	60
<b>3.5 Vergleich der einzelnen Regionen im Hinblick auf die kompartimentale Verteilung.....</b>	<b>61</b>
3.5.1 Parenchymale Lymphozyten.....	61
3.5.2 Perivaskuläre Lymphozyten.....	61
<b>3.6 Evaluation potentieller Einflussgrößen auf die Immunüberwachung des ZNS.....</b>	<b>62</b>
3.6.1 Sepsis.....	62
3.6.2 Geschlecht.....	63
3.6.3 Alter.....	63
<b>3.7 Ergebnisse der Doppelfärbung und Gefäßdarstellung.....</b>	<b>65</b>
3.7.1 CD3/CD8-Doppelfärbung.....	65
3.7.2 Laminin-Färbung zur Gefäßdarstellung.....	66
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>67</b>
<b>4.1 Blut-Hirn-Schranken-assoziierte Immunüberwachung des ZNS.....</b>	<b>67</b>
4.1.1 Gibt es eine Assoziation zwischen BBB und der Immunüberwachung in Kortex und Hirnstamm?.....	67
4.1.2 Betrachtung der Hirnstammareale.....	68
4.1.3 Assoziation mit dem Alter.....	71
<b>4.2 Typ der immunüberwachenden Lymphozyten.....</b>	<b>72</b>
4.2.1 Wer überwacht das menschliche Gehirn?.....	72
4.2.2 Immunzellen vom Typ CD3 <sup>(+)</sup> /CD8 <sup>+</sup> /Granzym B <sup>-</sup> .....	74
4.2.3 Immunzellen vom Typ CD3 <sup>-</sup> /CD8 <sup>+</sup> /Granzym B <sup>-</sup> .....	77
4.2.4 Immunzellen vom Typ CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>-</sup> /CD8 <sup>-</sup> .....	78

---

<b>4.3 Warum Immunüberwachung?.....</b>	<b>80</b>
4.3.1 Ist Immunüberwachung gleichbedeutend mit Immunsuppression auf neuronaler Ebene?.....	80
4.3.2 Einfluss der Präsenz von Immunzellen auf Neurone.....	82
4.3.3 Immunüberwachung – ein Zufallsphänomen?.....	84
<b>4.4 Schlussfolgerungen.....</b>	<b>86</b>
<b>4.5 Ausblick.....</b>	<b>88</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>89</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>91</b>
<b>7. ANHANG.....</b>	<b>102</b>
<b>7.1 Tabellen.....</b>	<b>102</b>
<b>7.2 Danksagungen.....</b>	<b>110</b>
<b>7.3 Lebenslauf.....</b>	<b>111</b>



## **1. EINLEITUNG**

### **1.1 VORBEMERKUNG**

Das Immunsystem und das zentrale Nervensystem (ZNS) besitzen als einzige Systeme des menschlichen Organismus die Fähigkeit zur Gedächtnisbildung. Bis vor fünfzehn Jahren sah man noch eine mehr oder weniger strikte anatomische wie physiologische Trennung beider Systeme (Barker und Billingham, 1977; Cuzner et al., 1988). Der Begriff des Immunprivilegs wurde bereits 1948 von Peter B. Medawar eingeführt (Medawar, 1948). In den vergangenen zwei Jahrzehnten vollzog sich ein Paradigmenwechsel, der das Konzept der strengen immunologischen Isolation des gesunden zentralen Nervensystems ablöste.

Die routinemäßige lymphozytäre Immunüberwachung des gesunden menschlichen Gehirns stellt einen markanten Berührungspunkt zwischen Immun- und zentralem Nervensystem dar. Die vorliegende Arbeit möchte einen Beitrag zur näheren Charakterisierung dieses Phänomens beim Menschen leisten.

Hierzu bedarf es zunächst eines näheren Verständnisses beider Systeme. Aus diesem Grund sollen im Folgenden Teile des Immunsystems und des ZNS in einem für die Fragestellung relevanten Rahmen vorgestellt werden.

## 1.2 DAS IMMUNSYSTEM

### 1.2.1 Grundzüge des Immunsystems

Alle Komponenten des Immunsystems lassen sich in einer Matrix aus zellulären und humoralen, sowie spezifischen und unspezifischen Anteilen einordnen (siehe Tabelle 1). Dabei sind die Leistungen des spezifischen, adaptiven Arms des Immunsystems im Laufe des Lebens durch Antigenkontakt erworben und erlernt, während die unspezifische Abwehr von Geburt an in vollem Umfang einsatzbereit ist.

Sowohl B- als auch T-Lymphozyten gehören zur spezifischen zellulären Immunantwort des Organismus.

*Tab. 1: Die Komponenten des Immunsystems*

	<b>zellulär</b>	<b>humoral</b>
<b>spezifisch</b>	B- und T-Lymphozyten	Antikörper
<b>unspezifisch</b>	Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen	Säure-Milieu der Haut und des Magens, Lysozym, Komplement-System, u.v.a.

CD4-positive T-Zellen, die T-Helferzellen, werden aktiviert, indem sie das für sie spezifische Antigen von einer Antigen präsentierenden Zelle (APC), z.B. von einem gewebständigen Makrophagen, ablesen. Nur durch Ko-Präsentation des Antigens mit MHC-II (beim Menschen: HLA-Moleküle) durch die APC ist die T-Helferzelle in der Lage, das Antigen wahrzunehmen. Durch diese Interaktion kann nur der T-Zell-Klon aktiviert werden, dessen T-Zellrezeptor (TZR) als molekulare Passform das Antigen binden kann. Ist dies der Fall, ist es die Aufgabe der Helferzellen, zum einen durch die Ausschüttung von Zytokinen andere T-Zellen, zum anderen durch unmittelbare Zell-Zell-Interaktion, sogenannte T-B-Kooperation, den entsprechenden Klon der B-Lymphozyten zu aktivieren (MacLennan, 1994). Die T-Helferzell-Reaktion ist *der* entscheidende Schritt zur Mobilisation der vollen spezifischen Immunantwort des Organismus. Wie dramatisch eine Störung an dieser Stelle sein kann, zeigt die HIV-

Infektion, bei der die Anzahl intakter, virusfreier CD4-positiver Zellen im Laufe der Erkrankung drastisch abfällt (Groux et al., 1992). Die Folge ist eine progrediente Insuffizienz der adaptiven Immunkompetenz.

CD8-positive T-Zellen, zytotoxische T-Zellen (möglicherweise auch Suppressorzellen), interagieren mit körpereigenen Zellen mittels des MHC-I-Moleküls. Ist eine körpereigene Zelle beispielsweise mit viralen Proteinen oder Nukleinsäuren infiziert, kann sie Teile dieser via MHC-I an ihrer Oberfläche präsentieren. Der präsentierte Komplex wird vom T-Zell-Rezeptor (TZR) in Kooperation mit dem CD8-Oberflächenmolekül erkannt, wodurch zytotoxische T-Zellen das Signal erhalten, die betroffene Zelle mithilfe lytischer Enzyme wie Perforine und zahlreicher Serin-Esterasen (z.B. Granzym A und B) zu zerstören (Bratke et al, 2005).

An dieser Stelle muss von natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) abgegrenzt werden: Auch NK-Zellen besitzen Rezeptoren, um mit Zielzellen zu interagieren. Hier gibt es NK-Zell-aktivierende Rezeptoren und solche, die deren destruktiv lytische Aktivität hemmen, die sogenannten CD94:NKG2-Rezeptoren (*natural killer cell group 2*). Letztere interagieren ebenfalls mit MHC-I-Molekülen, jedoch – anders als bei zytotoxischen T-Zellen – *unabhängig* vom über MHC-I präsentierten Antigen. Erfolgt eine zahlenmäßig ausreichende Bindung über CD94:NKG2-Rezeptoren, bleibt die Zielzelle unversehrt. Mangelt es dieser jedoch an MHC-I (wie es bei virusinfizierten Zellen der Fall ist), überwiegen die NK-Zell-aktivierenden Signale und es wird die Apoptose der Zielzelle induziert (Janeway et al., 2005).

Die wichtigste Funktion von B-Zellen ist die Differenzierung in Antikörper produzierende Plasmazellen und in ruhende Gedächtniszellen. Nach ihrer Stimulation durch Zytokine oder durch unmittelbaren Kontakt mit einer CD4<sup>+</sup> T-Helferzelle (MacLennan, 1994) differenzieren sich B-Zellen zu Plasmazellen und Gedächtniszellen. Plasmazellen sind in der Lage, große Mengen monoklonaler Antikörper zu produzieren. Dabei entspricht die Antigenpezifität des produzierten Antikörpers exakt dem membran-gebundenen Rezeptor des B-Zell-Klons, aus dem die jeweilige Plasmazelle entstanden ist. Gedächtniszellen nehmen nicht an der akuten Immunreaktion teil. Sie sistieren inaktiviert und dienen im Fall eines erneuten Kontakts mit dem Antigen als schnell rekrutierbare Reserve, die sich zu Plasmazellen differenziert und eine schnellere, Antikörper basierte Immunantwort bereitstellen kann.

### 1.2.2 Herkunft der Lymphozyten

Lymphozyten gehören zur Gruppe der Leukozyten. Anhand ihrer Funktion, sowie durch Oberflächenmoleküle kann man zwischen B- und T-Lymphozyten unterscheiden. Beide Typen entstehen aus pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Aus diesen differenzieren sich Progenitorzellen für Lymphozyten und NK-Zellen. Der Ort der endgültigen Ausdifferenzierung zur immunkompetenten Zelle ist für B- und T-Zellen unterschiedlich. Während B-Zellen ihr spezifisches Oberflächenmolekül- und Rezeptormuster (und damit ihre funktionellen Eigenschaften) im Knochenmark erhält, muss die unreife, immuninkompetente T-Zelle in den Thymus auswandern. Dort erfolgt die Differenzierung in entweder  $CD4^+$  T-Helferzellen oder  $CD8^+$ , zytotoxische T-Zellen. Desweiteren erfährt sie zwei Selektionsmechanismen (positiv und negativ), bei denen die Funktionalität des TZR hinsichtlich Immunkompetenz (Erkennung von über MHC-Moleküle präsentierten Fremdproteinen) und Immuntoleranz (Erkennung und Tolerierung von körpereigenen Proteinen) geprüft wird (Robey und Fowlkes, 1994; Chan et al., 1998). Erst im Anschluss daran handelt es sich um immunkompetente, naive (noch nicht mit Antigenen in Kontakt gekommene) T-Lymphozyten (Viret und Janeway, 1999; Huseby et al., 2005).

Jeder Lymphozyt (sowohl B als auch T) besitzt einen spezifischen Antigenrezeptor auf seiner Oberfläche. Bei B-Lymphozyten entspricht dieser der Membran gebundenen Form des Antikörpers, welcher die B-Zelle (bzw. ihr wichtigstes Differenzierungsprodukt, die Plasmazelle) zu produzieren im Stande ist. T-Zellen bilden den Antigen spezifischen TZR aus, der von seinem molekularen Aufbau, wie von seiner Funktionalität strikt vom Oberflächenrezeptor der B-Zellen zu trennen ist.

### 1.2.3 Morphologie der Lymphozyten

Inaktivierte bzw. naive Lymphozyten sind kleine, rundliche Zellen mit wenig Zytoplasma und einem chromatindichten Kern, der das kaum Organellen enthaltende Zytoplasma fast völlig ausfüllt. Durch Antigenkontakt oder durch Zytokin vermittelte Signale anderer Immunzellen erfolgt ihre Aktivierung. Dies hat im Vergleich zur

inaktivierten Form eine Größenzunahme und damit eine Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zugunsten des Zytoplasmas, sowie eine Dekondensation des Chromatins und damit eine lichtmikroskopische Auflockerung der Kernbinnenstruktur zur Folge (Janeway et al., 2005).

#### 1.2.4 Mechanismen der leukozytären Extravasation: Homing

Im Lauf einer immunologischen Reaktion bedarf es mehrfachen Kontakt zwischen Immunzellen und dem Antigen. Dazu gehört auch die eigentliche Elimination des Antigens. Diese Kontakte spielen sich meistens nicht intravasal, sondern im Parenchym solider Organe ab. Zu diesem Zweck müssen Immunzellen das Gefäßsystem verlassen und das vaskuläre Endothel penetrieren können, um – zum einen – an „dahinter“ gelegene Antigene zu gelangen und – zum anderen – um, im Falle der Immunüberwachung, das zu überwachende Terrain zu erreichen. Diesen Prozess nennt man allgemein Extravasation, bzw. im speziellen Fall der Lymphozyten: *Homing*. Dieser Begriff steht nicht nur für die zielgerichtete lymphozytäre Extravasation in parenchymatöse Organe, sondern auch für die in Lymphknoten über hochendotheliale Venolen (z. B. in von Andrian und M'Rini, 1998).

Im Folgenden sollen die zwei Mechanismen erläutert werden, die nach heutiger Lehrmeinung die Extravasation von Immunzellen bewerkstelligen:

##### a) Diapedese

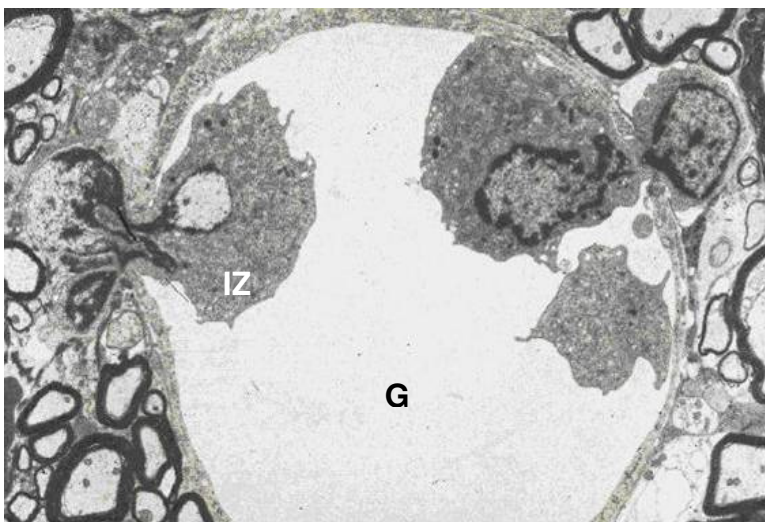
Sie beschreibt die parazelluläre Route der Immunzellen und wird in vier Phasen eingeteilt: (1) Bindung und *Rolling*, (2) Aktivierung, (3) Adhäsion und letztlich die eigentliche (4) Diapedese, d.h. das Durchdringen der Endothelzellschicht (Piccio et al, 2002).

Phase 1 stellt den initialen Kontakt eines im Gefäßsystem zirkulierenden Lymphozyten dar. Dabei interagieren lymphozytäre Selektine mit endothelständigen Adressin-Molekülen, was den Prozess des Abrollens auf der Endotheloberfläche (*rolling*) zur Folge hat. Letzteres wird maßgeblich durch alpha-4-Integrin der Lymphozyten erreicht,

was Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern gegen alpha-4-Integrin zeigen konnten (Johnston et al., 2000).

In (2) erfolgt die Aktivierung des an der Lymphozytenoberfläche exprimierten *Leukocyte function-associated antigen-1* (LFA-1) sowie von *Very-late-antigen-4* (VLA-4) via von Endothelzellen dargebotener Chemokine (Ransohoff et al., 2003). Dies ist ein essentieller Schritt, um die in (3) folgende Adhäsion, also die feste Bindung des Lymphozyten an die Endothelzelle, zu ermöglichen. Dabei bindet das endotheliale ICAM-1 an das lymphozytäre LFA-1 und – parallel dazu – VCAM-1 an VLA-4. Somit ist das Abrollen abgeschlossen und der Lymphozyt fest an das Endothel gebunden. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass die funktionelle Bedeutung der Bindungspaare ICAM-1/LFA-1 und VCAM-1/VLA-4 vom Aktivierungszustand des Lymphozyten und der Endothelzellen abhängig ist und dass monoklonale Antikörper gegen jedes einzelne dieser Moleküle die lymphozytäre Extravasationsrate im EAE-Modell (experimentelle Autoimmunenzephalitis, das Tiermodell der beim Menschen bekannten Multiplen Sklerose) deutlich zu reduzieren vermag (Oppenheimer-Marks et al., 1991; Johnston et al., 2000; Piccio et al., 2002).

Auf diese Weise fest verankert, vermag sich der Lymphozyt in den Interzellularspalt zweier Gefäßendothelzellen zu erstrecken und schließlich das Blutgefäß zu verlassen (4). Diesen letzten Schritt zeigt das elektronenmikroskopische Bild in Abbildung 1.



### Abb.1: Diapedese

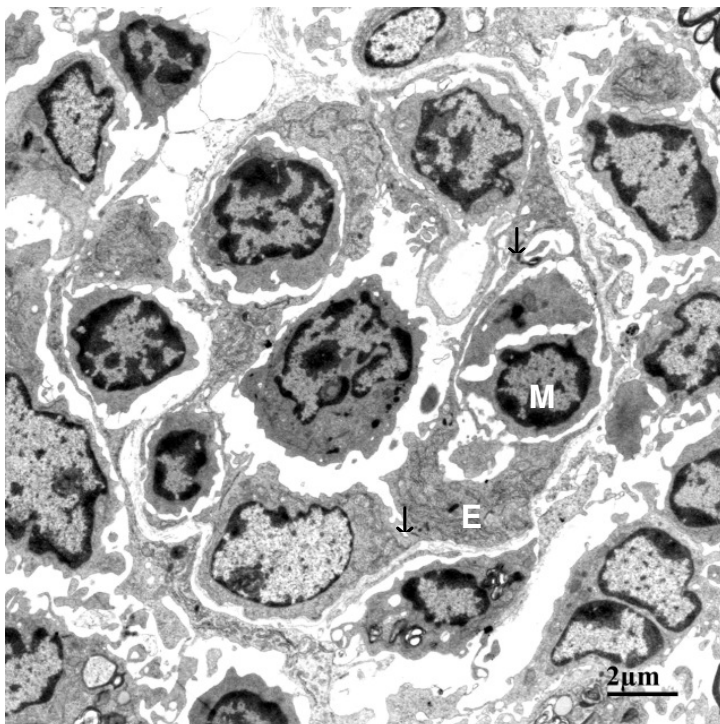
Eine Immunzelle (IZ) verlässt das Lumen eines Blutgefäßes (G) durch den Interzellularspalt zweier Endothelzellen (Schritt 4 der Diapedese).

(Wekerle et al., 1986)

## b) Emperipolesis

Bereits in den frühen Jahren der Elektronenmikroskopie taten sich Indizien für einen alternativen Mechanismus, mithilfe dessen zirkulierende Immunzellen das Gefäßsystem verlassen könnten, auf. Mehrere Untersucher widmeten sich dem inflammatorisch veränderten Endothel von Gefäßen. Dabei stellten sie fest, dass trotz erhöhter Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (BBB, aus dem Englischen für *blood brain barrier*) und stattfindender Leukozytenextravasation die vaskuläre endotheliale Barriere keinen morphologischen Veränderungen unterworfen zu sein schien (Engelhardt und Wolburg, 2004). Wenngleich dies durch moderne molekulare Analysen nicht mehr völlig haltbar ist (siehe Kapitel 1.2.5), so waren diese Beobachtungen dennoch der Stein des Anstoßes, weitere Extravasationsmechanismen zu diskutieren.

Heute sind die Untersuchungen von Wolburg und Engelhardt maßgebend für den Prozess der Emperipolesis, der – im Gegensatz zur Diapedese – eine *transzelluläre* Extravasationsroute für Lymphozyten beschreibt (gr. em: innerhalb; peripólēsis: das Umhergehen, Umgehen [Das Große Fremdwörterbuch, Dudenverlag 2003]).



*Abb. 2: Emperipolesis*

Die elektronenmikroskopische Aufnahme einer Endothelzelle (E), die eine mononukleäre Zelle (M) in einer Transmigrationsvakuole durchschleust.

TJs in der Nachbarschaft bleiben dabei intakt (↓).

(Wolburg et al., 2005)

Dabei adhären zirkulierende Lymphozyten in ähnlicher Weise wie unter (a) beschrieben; jedoch mit dem Unterschied, dass nun die Endothelzelle mikrovilliartige

Ausstülpungen ausprägt, die den Lymphozyten umschließen und ihn somit innerhalb einer „Transmigrationsvakuole“ auf die abluminale Seite der Endothelzelle durchschleusen. Dabei bleiben nachweislich *tight junctions* (TJs) in unmittelbarer Nähe des transendothelialen Vorgangs intakt (siehe auch Abbildung 2).

Dies untermauernd konnte demonstriert werden, dass der an dem transmigratorischen Vorgang beteiligte Zellmembranausschnitt unmittelbar vor der Transmigration eine luminale, nach abgeschlossener Durchschleusung eine abluminale Polarität aufweist, sodass ein tatsächlicher räumlicher, transzellulärer Wechsel der Membraneigenschaften von luminal nach abluminal stattgefunden haben muss. Derartige Prozesse wurden anhand von Serienschnitten zerebraler Venolen von Mäusen mit EAE elektronenmikroskopisch beobachtet (Wolburg et al., 2005).

Es soll hier ausdrücklich keine apodiktische Trennung zwischen Diapedese und Emperipolesis vorgenommen werden. Weder die beiden Modelle noch die jeweiligen Autoren erheben den Anspruch auf alleinige Gültigkeit. Beide Mechanismen existieren parallel nebeneinander. Dennoch sind bis jetzt die Faktoren, welche die „Entscheidung“ eines Lymphozyten beeinflussen, die para- oder transzelluläre Route zu wählen, nicht bekannt.

Unabhängig vom Mechanismus ist die Extravasation in das Hirnparenchym in erster Linie vom Aktivierungszustand des Lymphozyten abhängig und, interessanterweise, von seiner Antigenpezifität *unabhängig*. Wegweisende Experimente von William F. Hickey wiesen dies eindrücklich nach: Er injizierte Lewis-Ratten vier verschiedene Typen von T-Lymphozyten und beobachtete immunhistochemisch ihre jeweilige Verteilung im ZNS. Zu diesen Typen zählten T-Zellen gegen Myelin basisches Protein (MBP, also ein im ZNS vorhandenes Antigen), T-Zellen gegen Histonproteine des Kalbs (ein für Ratten irrelevantes Antigen), unselektierte T-Zellen aus aktivierten Lymphknoten und Milz (also T-Zellen gegen eine größtmögliche Bandbreite an Antigenen) und schließlich nicht aktivierte, ruhende T-Zellen. Die Ergebnisse zeigten, dass außer den nicht aktivierten, ruhenden T-Zellen alle T-Zell-Typen im ZNS in großen Mengen nachweisbar waren und dass nur die gegen das im ZNS auftretende



MBP gerichteten Immunzellen dort auch länger verweilen und dieses nicht nach einigen Stunden wieder verlassen (Hickey et al, 1991).

Fakt bleibt, dass Lymphozyten das ZNS-Parenchym erreichen, unabhängig davon, ob sie durch ein Antigen direkt stimuliert und auf der Suche nach demselben sind, oder ob sie im Sinne der in dieser Arbeit zur Sprache kommenden Immunüberwachung unterwegs sind.

### 1.2.5 Lymphozytäre Wege in das ZNS

In 1.2.4 wurden die molekularen Mechanismen, die zur lymphozytären Extravasation notwendig sind, beschrieben. Im Folgenden soll das Augenmerk nun auf die „Marschrouten“, die von Lymphozyten auf ihrem Weg in das ZNS eingeschlagen werden, gerichtet werden.

#### a) Über Zirkumventrikuläre Organe (CVO) und Plexus choroideus

Nach dem bisher Gesagten, erscheint es einleuchtend, dass ein Lymphozyt bei jedem parazellulärem Migrationsprozess die interendothelialen TJs überwinden muss. Aufgrund ihrer anatomischen Besonderheiten (siehe Kapitel 1.4.1), sowie einer speziellen BBB-Konfiguration, die mehr den unmittelbaren Kontakt mit dem Blutmilieu als die protektive Abschirmung vorsieht, d.h. faktisch eine drastisch reduzierte Ausbildung interendothelialer TJs aufweist, scheinen die CVO, ebenso wie der Plexus choroideus äußerst geeignete Eintrittspforten in das ZNS für Immunzellen zu sein.

Während EAE bei Mäusen ist im Plexus choroideus immunhistochemisch eine deutlich höhere Expression von ICAM-1, VCAM-1 und anderen Adhäsionsmolekülen festzustellen (Steffen et al. 1996; Engelhardt et al., 2001). Folgerichtig konnten im Tiermodell unter EAE in CVO und Plexus eine extrem hohe Dichte an Immunzellen gefunden werden, was diese Regionen als mögliche Eintrittspforten für Immunzellen in das ZNS ins Spiel bringt (Schulz und Engelhardt, 2005).

### b) Über parenchymale Hirngefäße

Auch an den Stellen im zerebralen Gefäßsystem, an denen die BBB in maximaler Form ausgeprägt ist, können Lymphozyten das Endothel via postkapilläre Venolen penetrieren und das dahinter gelegene ZNS erreichen. Dabei muss gezwungenermaßen die BBB überwunden werden. Je nach dem, welchen der beiden in 1.2.4 erwähnten Extravasationsmechanismen man diskutiert, nimmt dieses Überwinden unterschiedliche Gestalt an. Die Diapedese würde ein kurzzeitiges Auflösen der interendothelialen TJs fordern, damit ein parazellulärer Weg möglich werden könnte. Angesichts der vitalen Funktionen der TJs und deren Bedeutung für die BBB ein nicht ganz ungefährliches Unterfangen! Das Konzept der Emperipolesis umgeht dies elegant, indem die Endothelzelle selbst zum Transportsystem für Immunzellen wird.

### c) Über den Subarachnoidalraum

Kerfoot und Kubes beobachteten mithilfe intravitaler Mikroskopie an Mäusen mit induzierter EAE das lymphozytäre Abrollen an Kapillaren an der Oberfläche der *Pia mater* (Kerfoot und Kubes, 2002). Hier ist die Vorstellung, dass Immunzellen das Gefäßsystem im Bereich der Leptomeningen verlassen und so den Subarachnoidalraum erreichen. Damit im Liquorsystem angekommen, können sie praktisch jedes ZNS-Areal erreichen. Durch Kontakt mit im Liquorraum befindlichen antigenpräsentierenden Zellen der monozytären/myeloischen Zellreihe oder mit perivaskulären Zellen der Virchow-Robin-Räume (die ja in direktem Kontakt zum Subarachnoidalraum stehen) erhalten die Zellen das Signal, in das ZNS-Parenchym einzudringen, womit gewissermaßen ein Homing gewährleistet wird.

## 1.2.6 Das Konzept der Immunüberwachung

Das Gehirn wurde jahrelang als immunologisch isoliert angesehen (Medawar, 1948; Barker und Billingham, 1977; Cuzner et al., 1988). Dahinter verbarg sich die Annahme,

dass Immunzellen keinen Zugang zum gesunden, weder traumatisch, infektiös noch neoplastisch veränderten Gehirn hätten. Bis in die 90er Jahre noch galt es bei vielen Autoren als wissenschaftlich akzeptierte Tatsache, dass es „keine immunologische Routineüberwachung des gesunden Gehirns“ gebe (aus Hickey et al., 1991). Tatsächlich ist das lymphozytäre Vorkommen im gesunden ZNS-Parenchym zahlenmäßig nicht mit dem bei Inflammation zu vergleichen (Hickey, 2001). Ebenso sind Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 oder VCAM-1, die oben als *conditio sine qua non* der lymphozytären Migration in das ZNS-Parenchym vorgestellt wurden, im gesunden Gehirn deutlich weniger exprimiert als im inflammatorischen (Engelhardt et al., 2001; Wolburg et al., 1999). Aber sie *sind* exprimiert und damit als mögliche Eintrittspforten für patrouillierende Lymphozyten nicht zu ignorieren.

Zehn Jahre später hatten sich die Ansichten diametral geändert. Spätestens seit den oben dargelegten Untersuchungen von Hickey ist das Konzept der routinemäßigen immunologischen Überwachung des ZNS nicht mehr von der Hand zu weisen. Hickey lehrte uns (entgegen seiner ursprünglichen Ansichten), dass aktivierte Lymphozyten grundsätzlich Zugang zum ZNS erhalten. Dabei spielt es keine Rolle, ob das Zielantigen dieser Immunzellen im ZNS ortständig ist. Ja sogar Lymphozyten mit artfremder Antigenspezifität passieren die Barrieren auf dem Weg in das Gehirn (Wekerle et al., 1991). Ganz im Sinne des Bildes des lymphozytären Patrouillierens verlassen die Zellen, die ihr Antigen im ZNS nicht finden konnten, nach einigen Stunden dieses wieder (Hickey et al., 1991).

Aber der Aktivierungsstatus der Immunzellen ist nicht die einzige Determinante für die Immunüberwachung. Das Gehirn selbst ist in der Lage, mithilfe regulierender Zytokine wie TGF- $\beta$ , den Grad der Immunüberwachung zu steuern. Dies gelingt, da TGF- $\beta$  die Proliferation von ins ZNS eindringenden Lymphozyten inhibiert und die Produktion von attraktiv wirkenden Chemokinen durch Astrozyten reduziert (Taylor und Streilein, 1996).

Darüber hinaus hat die Präsenz von Immunzellen im ZNS protektiven Charakter:

Dies wurde zum einen von Kwok et al. anhand von peritoneal induzierter Listeriose gezeigt. Auch hier erschienen Listerien-spezifische T-Zellen im ZNS, obwohl dieses nie an der Infektion beteiligt war. Bei einer Reinfektion mit demselben Erreger wurde eine rasche Aktivierung der das ZNS überwachenden T-Zellen beobachtet, die in der Lage

waren, eine zerebrale Listeriose zu verhindern (Kwok et al., 2002). Diese Untersuchungen unterstreichen den präventiv-protektiven Charakter der Immunüberwachung.

Zum anderen wurde 1999 erstmals von der Gruppe um Kerschensteiner *in vitro* demonstriert, dass aktivierte humane T-Zellen den Faktor BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), der neuroprotektive Effekte während Inflammation und Neurodegeneration besitzt, sezernieren (Kerschensteiner et al., 1999). BDNF wird gewöhnlich von zerebralen Neuronen selbst ausgeschüttet. Die Erkenntnis, dass Immunzellen ebenfalls BDNF produzieren, wirft ein neues Licht auf die Immunüberwachung im Sinne einer konstitutiven Überwachung und Wartung zerebraler Neurone. Heute ist BDNF weiterhin Gegenstand der Forschung, da sein Potenzial zur Therapie neuroinflammatorischer und –degenerativer Erkrankungen längst erkannt wurde. Aktuelle Bemühungen gehen dahin, Th1- und Th2-Zellen zu stimulieren, sodass sie hohe Mengen an BDNF sezernieren, um so die zerstörerischen Auswirkungen der Inflammation bei Multipler Sklerose zu dämpfen (Ziemssen et al., 2005).

### 1.3 DIE BLUT-HIRN-SCHRANKE

#### 1.3.1 Die Anfänge

Der menschliche Organismus besitzt – gleichsam wie zahllose Wirbeltiere – eine Einrichtung, die das parenchymale Milieu des ZNS von dem der hirnversorgenden Blutwege trennt und somit zerebrale Neurone vor Xenobiotika und mikrobiellen Invasoren schützt: die sogenannte Blut-Hirn-Schranke (BBB). Dieser zunächst sehr weit gefasste und unscharf begrenzte Begriff diente Jahrzehnte lang als Siegel für die anerkannte Tatsache, das Gehirn sei von kontinuierlichen stofflichen und zellulären Austauschvorgängen regelrecht abgeschottet. Bereits im Jahre 1885 wies Paul Ehrlich einen besonderen Schrankenmechanismus zwischen Blutbahn und Hirnparenchym nach: Er stellte fest, dass sich das Gehirn nach Injektion verschiedener Farbstoffe in die Blutbahn von Mäusen nicht anfärbte, wogegen die übrigen Gewebe des Körpers den applizierten Farbstoff aufnahmen (z. B. Ehrlich, 1885).

Erst in den sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts gelang es Reese et al. (1967) und wenig später Brightman und Reese (1969) dank der Entwicklung elektronenmikroskopischer Verfahren, durch die Meerrettich-Peroxydase-Tracer Untersuchungen möglich wurden, ein erster struktureller Nachweis der BBB in Form von interendothelialen Adhäsionsstrukturen, die nachweislich den sich zwischen Blutgefäßendothelzellen ergebenden Interzellularspalt mechanisch abdichteten. Diese bereits von Farquhar und Palade 1963 an zahlreichen Hohlorganen und Drüsenausführungsgängen von Ratten und Schweinen nachgewiesenen *tight junctions* (TJs) als Teil eines der luminalen Zellseite zugewandten Haftkomplexes galt von diesem Zeitpunkt an als das anatomische Korrelat der BBB.

Darüber hinaus zeigten Reese et al., sowie Brightman und Reese, dass zerebrale Endothelzellen eine äußerst geringe Rate transzytotischer Aktivität aufweisen, was eine weitere Maßnahme zur kompartimentalen Trennung darstellt (Reese et al., 1967; Brightman und Reese, 1969).

Heutzutage ist die molekulare Struktur von TJs bis zu einem gewissen Grad aufgeklärt (siehe Kapitel 1.3.4). Ihre Anwesenheit ist von essentieller Bedeutung, das ZNS-Kompartiment zur Blutseite hin abzudichten:

Medawar, sowie später Barker und Billingham wiesen daraufhin, dass zelluläre Blutbestandteile (v.a. im Hinblick auf Immunzellen) von der Passage in das ZNS ausgeschlossen seien und formulierten so das Konzept des „privilegierten Immunstatus“ des Gehirns (Medawar, 1948; Barker und Billingham, 1977), ein Konzept, das in dieser Arbeit weiter diskutiert werden soll.

Bundgaard (1982) zeigte, dass interendotheliale TJs des Frosches sogar Lanthanum-Ionen an der parazellulären Passage aus den Gefäßen hindern.

Crone und Olesen (1982) demonstrierten mit ihren Bestimmungen des elektrischen Widerstands entlang des intrazerebralen Kapillarendothels von Fröschen, dass der eigentliche Sitz der BBB – eine bis dahin viel diskutierte Frage – das Gefäßendothel (also der Sitz der TJs) selbst ist. So rückt die Endothelzelle zerebraler Gefäße ins Zentrum der anatomischen und anatomisch-funktionellen Betrachtungen zur BBB (Rohen und Lütjen-Drecoll, 2006).

### 1.3.2 Schranke oder Schleuse?

Ausgehend von den Untersuchungen von Cserr und Bundgaard (1984), sowie Banks und Kastin (1985) galt der Grad der Lipophilie eines Moleküls als die mit Abstand wichtigste Determinante für das Passieren der Blut-Hirn-Schranke.

In den vergangenen fünfzehn Jahren wurden Stimmen, die das Dogma der strikten kompartimentalen Trennung von ZNS und hämatogener Versorgungswege sachte in Frage zu stellen begannen, zusehends lauter. So wie die protektive Notwendigkeit eines auf TJs fußenden Schutzwalls des ZNS anerkannt wurde, wuchs gleichermaßen die Annahme, Lipophilie könne nicht der einzige Passierschein in das ZNS sein. Beobachtungen zeigten, dass stark hydrophile Moleküle wie manche Aminosäuren und Nucleoside für den Aufbau essentieller Substanzen des ZNS (wie zum Beispiel Neurotransmitter) unabdingbar sind, die das ZNS aber selber nicht herzustellen in der Lage ist und daher „von außen“ importieren muss. Ebenso, dass bestimmte Elektrolyte importiert werden müssen, um elektrische Gradienten über Zellmembranen aufrechterhalten und um das richtige intra- wie extrazelluläre Milieu schaffen zu können. Nicht zu vergessen ist der hohe Bedarf zerebraler Neurone an Glukose, die

ihrerseits ebenfalls von der Blutseite hinter die BBB befördert werden muss. Für jeden einzelnen der genannten Faktoren weisen die TJ ausbildenden Endothelien der zerebralen Endstrombahn spezifische Transportproteine auf, die – asymmetrisch auf luminaler und abluminaler Zellseite verteilt – aktiv das Ein- und Ausströmen ihrer jeweiligen Transportmedien regulieren (Hawkins et al., 2002). Bis dato sind multiple Transportsysteme für die verschiedensten Substrate gefunden und kategorisiert worden: So konnten passive Transportkanäle für Glutamin und Glutamat auf luminaler, Na<sup>+</sup>-abhängige, sekundär aktive Transporter auf abluminaler Membranseite, sowie ein die Aminosäure-Aufnahme regulierenden Gamma-Glutamyl-Zyklus von der Arbeitsgruppe um Hawkins (2002) nachgewiesen werden. Für die oben erwähnte Glukose-Versorgung des Gehirns existieren Hexose-Transportsysteme aus der SGLT- und GLUT-Familie (Nishizaki et al., 1995). Desweiteren wurden organische Kationen-Transporter der OCT-Familie z.B. für monoamine Neurotransmitter identifiziert (Busch et al., 1998; Wu et al., 1998). Dazu passend konnten Schluesener und Meyermann bereits drei Jahre zuvor zeigen, dass die kationischen Defensine neutrophiler Granulozyten die BBB zu penetrieren imstande sind (Schluesener und Meyermann, 1995). Gerhart et al. wiesen 1997 Monocarboxylat-Transporter in zerebralen Endothelzellen von Ratten nach. Die Liste kann beliebig fortgesetzt werden.

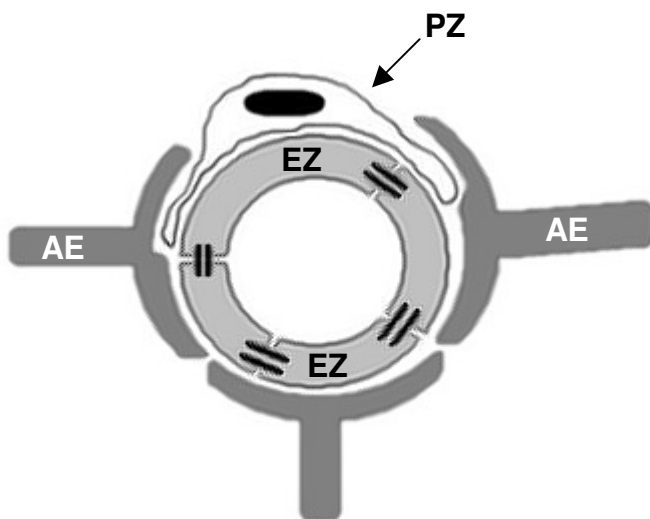
Eine weitere Facette der BBB ist ein System aus metabolisierenden Enzymen, die – von den Endothelzellen exprimiert – sowohl endo- als auch exogene, lipophile, potenziell toxische Substanzen in polare Metabolite umwandeln, sodass diese die BBB nicht weiter durchdringen können (Review von el-Bacha und Minn, 1999).

Das Bild der BBB wird somit grundlegend verändert: Zum ersten handelt es sich dabei offenbar nicht um ein monomodales System, das sich einzig und allein in der Existenz passiv wirkender TJs manifestiert. Es müssen gleichfalls weitere Funktionen der kapillären Endothelzellen betrachtet werden. Zum zweiten und anders als der Terminus „Schranke“ vermuten lässt, handelt es sich – wie die ausführliche Aufzählung oben zeigt – bei dem Komplex Blut-Hirn-Schranke darüber hinaus um eine *selektive* Transportschleuse, um eine „dynamische Schaltstelle“ (Tsuji, 2005), die es – den molekularen Ein- und Ausstrom in bzw. aus dem ZNS-Parenchym regulierend – erlaubt, ein ZNS spezifisches homöostatisches Milieu aufrechtzuhalten. Zum dritten übt die

BBB eine aktive Schutzwirkung dem ZNS gegenüber aus, indem sie eine Serie von Enzymen rekrutiert, die als Biotransformations- und Entgiftungssystem fungieren und somit einen metabolischen Schutz des Gehirns leisten (el-Bacha und Minn, 1999).

### 1.3.3 Anatomisch-morphologisches Korrelat der BBB

Das lichtmikroskopisch nachvollziehbare, anatomisch histologische Korrelat der BBB stellt einen Komplex mehrerer Zellen und Zelltypen dar. Dabei handelt es sich maßgeblich um Gefäßendothelzellen, Astrozyten und Perizyten (Haseloff et al., 2005). Wie bereits oben erwähnt, stellen die untereinander mit TJs verknüpften Endothelzellen den Hauptsitz der BBB dar. Astrozyten, von denen ursprünglich angenommen wurde, sie seien der eigentlichen Ort der BBB, bilden nun zusätzlich Fortsätze, sogenannte Endfüße, aus, die die gesamte Zirkumferenz der Endothelzellen und Perizytenausläufer umgeben (siehe Abbildung 3).



*Abb. 3: Schemazeichnung der BBB bildenden Zellen.*

Die mit TJs verbundenen Endothelzellen (EZ) werden von einem Perizyten (PZ) flankiert und von Astrozytenendfüßen (AE) erreicht.

Somit werden Astrozyten zu den einzigen Mediatoren zwischen ZNS-Milieu und Endothelzellen. Perizyten liegen in enger Nachbarschaft zu den Endothelzellen, interagieren mit diesen via Endothelin-1 (Dehouck et al., 1997) und besitzen phagozytische Eigenschaften. Ihre genaue Rolle hinsichtlich Blut-Hirn-Schranken-Bildung und -Wartung ist bisher nicht völlig aufgeklärt.



#### 1.3.4 Molekulare Zusammensetzung der BBB

Die genaue molekulare Zusammensetzung der zur BBB beitragenden TJs ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Zu den integralen Membranproteinen, die ausschließlich in TJs zu finden sind, gehören die Claudine und Occludine, wobei Letztere nicht entscheidend für die Ausbildung intakter TJs sind, was an Mäusen mit Nullmutationen, (d.h., eine Mutation, die nicht zur Ablesung des korrekten Genprodukts führt) im Occludin-Gen gezeigt werden konnte (Saitou et al., 2000). Heutzutage wächst die Ansicht, dass das Claudin-Expressionsmuster entscheidend für die selektive Permeabilität ist und zwar in dem Sinne, dass das Vorhandensein eines bestimmten Claudins die Permeabilität für eine bestimmte Stoff- bzw. Molekülgruppe nach sich zieht. Wen und Kollegen zeigten eine Abhängigkeit von Claudin-5 für die Permeabilität bestimmter Ionen (Wen et al., 2004). Einer anderen Gruppe gelang es, nach isolierter, cAMP abhängiger Herunterregulation von Claudin-5 Mannitol, das normalerweise eine intakte BBB nicht penetrieren kann, im ZNS nachzuweisen (Soma et al., 2004).

Darüber hinaus existieren TJ assoziierte Membranproteine aus der Familie der Membran assoziierten Guanylatkinase (MAGUK) wie zum Beispiel ZO-1, -2 und -3 (Review von Tsukita et al., 1999).

#### 1.3.5 Unterschiedliche Ausprägungsmuster der BBB im Gehirn

Nicht nur ist die BBB in sich kein starres Konstrukt defensiv protektiver Systeme, auch die Verteilung im Gehirn, respektive die Expressivität und damit ihre Permeabilität variiert in bestimmten Regionen des Gehirns. Dieses Phänomen ist zentraler Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Paul Ehrlich bereits hat mit seinen oben beschriebenen Färbeexperimenten feststellen können, dass vereinzelte Anteile des Gehirns seine applizierten Farbstoffe aufzunehmen imstande sind (Ehrlich, 1885). Diese Regionen werden heute in den zirkumventrikulären Organen (CVO) zusammengefasst (siehe dazu Kapitel 1.4). Andere Regionen, wie zum Beispiel der gesamte Neokortex (in dieser Arbeit durch den visuellen Kortex repräsentiert), blieben frei von Farbstoff. Hier liegt eine BBB-Konfiguration vor, die sich vornehmlich durch zahlreiche, dicht

abschließende TJs auszeichnet, bei denen die stoffliche Austauschrate zwischen Blut- und ZNS-Milieu streng limitiert und reguliert ist. Dies wird durch jüngere Untersuchungen mehrfach untermauert: Vorbrodt und Dobrogowska zeigten mit ihren immunhistochemischen Analysen, dass TJ spezifische integrale Membranproteine wie das oben erwähnte Claudin-5, Occludin, ZO-Proteine und andere TJ-Adhäsionsmoleküle in kortikalen Gefäßen (und damit auch in denen des visuellen Kortex) im sehr hohem Maße exprimiert sind (Vorbrodt und Dobrogowska, 2004). Außerdem konnte Cadherin-10, ein Adhäsionsmolekül, welches dichte Zellkontakte vermittelt, an humanen kortikalen Mikrogefäßen in besonders hoher Dichte, an denen der CVO jedoch fast gar nicht nachgewiesen werden (Williams et al., 2005).

Der Umkehrschluss, CVO würden keinerlei BBB aufweisen, ist jedoch falsch: Wie in 1.3.2 dargelegt, fußt der Komplex, den wir heute als BBB bezeichnen, auf mehreren Säulen. Das Fehlen von endothelialen TJs zieht nicht das Fehlen der anderen, oben beschriebenen Komponenten der BBB nach sich. Im Gegenteil: Wie von el-Bacha und Minn (1999) beschrieben, ist – im Vergleich zu Endothelien kortikaler Regionen – im Bereich der CVO die Aktivität der Fremdstoffe metabolisierenden Enzyme um ein Vielfaches erhöht. So, als würde die gesteigerte Aktivität des Enzymsystems das geringere Vorhandensein von endothelialen TJs kompensieren.

Auch außerhalb der CVO existieren ZNS-Regionen, die eine besondere BBB-Konfiguration aufzuweisen scheinen: Belova und Jonsson stellten fest, dass nach Injektion von Trypanblau in die Blutbahn von Ratten der Farbstoff nicht nur von den CVO, sondern gleichfalls von ventralen Anteilen der Medulla oblongata und des Pons aufgenommen wurde, während alle übrigen ZNS-Areale frei von Farbstoff blieben (Belova und Jonsson, 1982). Nimmt man erhöhte Permeabilität für lösliche Blutbestandteile als Maß für das Abdichtungsvermögen der lokalen BBB, so kann anhand des oben Gesagten postuliert werden, dass die ventralen Bereiche von Medulla oblongata und Pons eine den CVO zumindest ähnliche BBB-Konfiguration aufweisen müssen, ein Phänomen, das in der vorliegenden Studie im Rahmen seiner Bedeutung für die Immunüberwachung weiter untersucht werden soll (siehe auch Kapitel 4.1.2).

Darüber hinaus existieren nicht nur Regionen spezifische Unterschiede im Konfigurationsmuster der BBB. Es kommt offenbar auch darauf an, welchen Abschnitt des kapillären Gefäßsystems betrachtet wird. Bereits 1987 wiesen Rutten und Kollegen an Rindergehirnen nach, dass verschiedene Anteile der kapillären Endstrombahn einen unterschiedlichen transendothelialen elektrischen Widerstand aufweisen (Rutten et al, 1987). Fünfzehn Jahre später zeigte die Arbeitsgruppe um Virgintino, dass der ATP-abhängige Transporter P-Glykoprotein, der lipophile Substanzen – vor allem Xenobiotika – aus dem ZNS-Parenchym zur Blutseite transportiert, primär in kortikalen Kapillaren und signifikant weniger in meningealen oder denen des Marklagers exprimiert wird (Virgintino et al., 2002).

Folgernd kann gesagt werden, dass die BBB nicht nur ein Mehr-Komponenten-System ist. Vielmehr scheint es mehrfach bewiesen, dass die einzelnen Komponenten in unterschiedlich starker Ausprägung vorliegen, abhängig von der betrachteten Hirnregion (am Beispiel CVO versus visueller Kortex) und vom jeweiligen mikroanatomischen Teil der kapillären Endstrombahn des Cerebrums (am Beispiel des P-Glykoprotein in Kapillaren der Rinde und des Marklagers). Die BBB ist somit mehr als die „dynamische Schaltstelle“ (Tsuji, 2005), die lokal reguliert, welche Substanzen und Moleküle Zugang zum ZNS erhalten und welche nicht. Sie selbst, genauer ihre Komponenten, unterliegen dynamischen Aufbauprinzipien, die den Anforderungen der regionalen Hirnareale unterworfen sind. Steht dabei die Wahrnehmung peripherer Hormonspiegel und neuroendokrine Aktivität im Vordergrund (wie am Beispiel der Area postrema) sind interendotheliale TJs herunter- und protektive Enzymsysteme hochreguliert. Gilt es, kortikale Neurone vor Fremdeinflüssen zu schützen und ihnen ein adäquates Milieu zu generieren (wie am Beispiel des visuellen Kortex), existieren vor allem dichte TJs und ein ausgeprägtes, selektives Orchester aus aktiven und passiven Transportproteinen.

### 1.3.6 Modulierende Einflüsse auf die BBB

Die oben mehrfach erwähnte Dynamik der BBB soll einen weiteren Aspekt erhalten: Es existieren Faktoren, Zustände und zelluläre ZNS-Bestandteile, die Struktur und

Permeabilität der BBB beeinflussen und *in vivo* modifizieren.

Die beiden bedeutsamsten und klinisch relevantesten Zustandsänderungen des ZNS sind zweifellos die (traumatische) Verletzung des ZNS und die Inflammation (sei es als Reaktion auf ein eingedrungenes Pathogen oder eine autoimmune Genese wie bei Multipler Sklerose diskutiert). Wir haben die BBB als eine hoch adaptive und ebenso variable Zugangsschleuse zum ZNS, die das für ZNS-Neurone notwendige Mikromilieu reguliert, kennengelernt. Es scheint plausibel, dass sich die Anforderungen an dieses Milieu unter den oben beschriebenen Zustandsänderungen des ZNS gleichfalls ändern.

Im Großteil der zu diesem Thema publizierten Untersuchungen werden als Maß für die Modulation der BBB die elektronenmikroskopisch darstellbaren Änderungen in den TJ-Komplexen, deren molekulare Zusammensetzung, die Proteindurchlässigkeit mithilfe von Protein-Tracer-Untersuchungen, Messungen des transendothelialen Widerstands und das Expressionsmuster von Oberflächenproteinen auf den kapillären Endothelzellen herangezogen.

Nach mechanischer Verletzung des Gehirns kann eine Permeabilitätserrhöhung der kapillären Endothelzellen beobachtet werden (Brightman, 1989). Protein-Tracer sind nach applizierten Gehirnläsionen in den Extrazellulärräumen der lädierten Areale nachweisbar, wogegen in gesunden Kontrollbereichen kein nennenswertes Vorkommen des Tracers zu verzeichnen ist (Cancilla et al., 1979; Vorbrodt et al., 1985).

Zerebrale Inflammation kann durch einen pathogenen Mikroorganismus, durch eine autoimmune Genese oder, sekundär, durch oben beschriebene traumatische Verletzungen des Gehirns verursacht werden. Unter diesen Bedingungen erhalten u.a. mononukleäre Immunzellen, v.a. Lymphozyten, verstärkt Zugang zum ZNS. Dies gelingt maßgeblich durch die von zerebralen Endothelzellen vermehrte Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1, welche den Prozess der Leukozytenextravasation (siehe Kapitel 1.2.4) ermöglichen. Die Arbeitsgruppe von Eralinna wies dies immunhistochemisch an virusinfizierten Mäusen nach. Gleichzeitig beschrieben sie im Zusammenhang mit diesem inflammatorischen Prozess das Auflösen interendothelialer TJs (Eralinna et al., 1996). Bereits zwei Jahre zuvor zeigten Engelhardt und Mitarbeiter an Mäusen, dass sogar nach lokaler Injektion abgetöteter Pathogene eine inflammatorische ZNS-Reaktion, die sich in Hochregulation von ICAM-1 und VCAM-1 manifestiert, zu beobachten ist. Dies erfolgt zunächst uni-

hemisphärisch, zwei Tage später generalisiert (Engelhardt et al., 1994). Die inflammatorisch bedingten molekularen und strukturellen Veränderungen der BBB sind zentral gesteuerte Prozesse und bedürfen nicht zwingend eines anwesenden Pathogens oder einer offensichtlichen traumatischen Läsion des ZNS: Zytokin vermittelter inflammatorischer Schmerz verursacht bereits eine vermehrte ICAM-1-Expression, wie mittels *real time*-PCR gezeigt werden konnte. Dabei ist der Grad der Expression von peripher zirkulierenden proinflammatorischen Mediatoren unabhängig (Huber et al., 2005). Chronisch inflammatorisch bedingter Schmerz interagiert mit der Proteinzusammensetzung der BBB bildenden TJs. Brooks und Mitarbeiter zeigten eine hoch signifikante Abnahme von Occludin und eine massive Zunahme von Claudin-3 und -5 unter Mediator induziertem chronischen Schmerz bei Ratten (Brooks et al., 2005).

Im Widerspruch zu Huber steht die Arbeit von Stolp, der an neonatalen Ratten zeigen konnte, dass systemische Inflammation während der ersten sechzig Tage p.n. zu einer dauerhaft erhöhten Permeabilität der BBB im Bereich der weißen Substanz führt und damit die Suszeptibilität für entzündlich demyelinisierende Prozesse erhöht (Stolp et al., 2005).

Auch die Permeabilität reduzierende Faktoren wurden gefunden: Das von Astrozyten gebildete *src-supprimierte C-Kinase-Substrat* (SSeCKS) ist in der Lage, vaskulären Endothelzellen in Zellkultur einen BBB-ähnlichen Phänotyp zu verleihen, indem es die Bildung von interendothelialen TJs fördert und die parazelluläre Permeabilität deutlich herabsetzt. SSeCKS kann somit als möglicher Reifungsfaktor für die BBB diskutiert werden (Lee et al., 2003).

Die Ausprägung der BBB stellt – betrachtet man das bisher Gesagte – vor allem eine Leistung zerebraler Kapillarendothelzellen dar. Allerdings existieren zahlreiche Belege dafür, dass andere, parenchymale Zellen wie Neurone und vor allem Gliazellen einen unerlässlichen Einfluss auf eine intakte BBB ausüben. Nur ein *in vitro* Modell der BBB, bei dem Endothelzellen zusammen mit Astrozyten gezüchtet werden, zeigt eine mit *in vivo* gemessenen Werten vergleichbare niedrige Permeabilität für kleine Protein-Tracer. Entfernt man die Astroglia aus der Kultur, erhöht sich die trans- und parazelluläre Durchlässigkeit der BBB dramatisch, wobei interessanterweise das

Proteinexpressionsmuster der Claudine, Occludin und der ZO-Proteine keine Veränderungen wahrnehmen lässt (Hamm et al, 2004).

Auch das von Astrozyten produzierte *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), dessen Aufgabe es ist, unter neuroinflammatorischen Bedingungen mononukleäre Immunzellen (v.a. Lymphozyten) in das ZNS-Parenchym zu dirigieren, besitzt permeabilitätserhöhende Einflüsse auf die BBB. Wie sonst könnte ein Mediator, der „hinter“ der BBB produziert wird, ein an in Gefäßen zirkulierende Lymphozyten gerichtetes Signal sein (Song und Pachter, 2004; Stamatovic et al. 2005)?

### 1.3.7 Zusammenfassung: BBB

Was mit Paul Ehrlichs Färbeexperimenten Ende des 19. Jahrhunderts und mit dem simplen Modell des „Schutzwalls“ des Gehirns begann, hat heute um ein Vielfaches an Komplexität gewonnen und ist zentraler Gegenstand neuroimmunologischer Forschung. Der strukturelle und mechanistische Schlüssel der BBB ist das Gefäßendothel. Das Gefäßendothel, dessen Bedeutung für den gesunden und kranken Organismus die medizinische Forschung lange unterschätzt hat. Man denke in diesem Zusammenhang an die Genese (kardio-)vaskulärer Erkrankungen, für die heute die Endothelschädigung unbestrittener Ausgangspunkt arteriosklerotischer Prozesse und damit Verursacher der KHK, der arteriellen Hypertonie und der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit ist. Parallel dazu war die Entdeckung der Tatsache, dass das kapilläre Gefäßendothel der eigentliche Sitz der BBB ist, ein Meilenstein. Die Endothelzellen mit ihrer geringen transzytotischen Aktivität bilden zusammen mit astrozytären Faktoren *tight junction*-Komplexe zur parazellulären Abdichtung, Transportproteine zur selektiven Ein- und Ausschleusung von Molekülen und Enzymsysteme zur Metabolisierung von Xenobiotika aus. Darüber hinaus ist sie ein hochadaptives System, das in seiner Ausprägung zum einen regionale (am Beispiel der CVO), zum anderen Gefäßabschnitt spezifische Besonderheiten aufweist.

Und, schlussendlich, ist die BBB eine wichtige Kommunikationsplattform für inflammatorische Prozesse, indem sie peripher zirkulierenden Immunzellen im Falle der Neuroinflammation den Zugang zum ZNS ermöglicht.

Unter diesen Gesichtspunkten erscheint es äußerst nahe liegend, bei der Untersuchung der Immunüberwachung des gesunden ZNS die BBB als immunologisch bedeutsame Entität miteinzubeziehen, sodass diese Arbeit den Grad der lymphozytären Immunüberwachung an Regionen unterschiedlicher BBB-Konstitution untersucht.

## 1.4 ZIRKUMVENTRIKULÄRE ORGANE (CVO)

Zu den CVO gehören die Neurohypophyse, das Corpus pineale, die Eminentia mediana, das Organum subfornicale, das Organum subcommissurale, das Organum vasculosum laminae terminalis und die in der Medulla oblongata befindliche Area postrema, die in dieser Arbeit näher beleuchtet werden soll.

### 1.4.1 Anatomische Besonderheiten

Alle CVO treten unpaar auf und liegen entlang der Mittellinie des Gehirns orientiert in den ependymalen Wänden des dritten und vierten Ventrikels und zeigen damit eine besonders enge anatomische Beziehung zum Ventrikelsystem des Gehirns (McKinley et al., 2003).

Darüber hinaus sind sie ungewöhnlich dicht vaskularisiert (Gross, 1992). Dabei handelt es sich um fenestrierte Kapillaren, sodass eine möglichst unmittelbare Kommunikation zwischen Blutmilieu und den sekretorischen bzw. sensorischen neuronalen Zellen bestehen kann. Mehrfach konnte der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) als der die Fenestrierung induzierender Faktor nachgewiesen werden (Roberts und Palade, 1995; Esser et al., 1998).

Entgegen häufig anzutreffender Ansichten existieren in den CVO sehr wohl interendotheliale TJs. Allerdings zeigen diese ein anderes molekulares Expressionsmuster. Die Immunfluoreszenz-Untersuchungen des TJ assoziierten Proteins ZO-1 (siehe Kapitel 1.3.4) zeigten bei den CVO im Vergleich zum Hirnparenchym ein diskontinuierliches und eher punktuell verteiltes Verteilungsmuster (Petrov et al. 1994). Allerdings konnte bereits 1978 am Rattenhirn elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden, dass interzelluläre TJs zwischen den Fortsätzen spezialisierter ependymaler Zellen, sog. Tanyzyten, sehr wohl existieren (Krisch et al., 1978), was von Petrov später mittels Immunfluoreszenz bestätigt werden konnte (Petrov et al. 1994). Dies bedeutet also, dass die CVO eng mit dem Milieu des Blutes verbunden, gleichzeitig aber zum Neuropil des ZNS, ebenso wie zu angrenzenden Liquorräumen durch TJs abgedichtet sind. Hierin liegt *der* wesentliche morphologische Unterschied



der CVO-BBB zu der des Kortex (und so auch zum in dieser Arbeit untersuchten visuellen Kortex). Dort findet sich ein dichtes Netzwerk aus TJs, die die Neurone „hinter“ der BBB vor den im Blut befindlichen, potenziell schädigenden Molekülen, Substanzen und Mikroorganismen schützt. Ob die BBB Konfiguration der ventralen Areale von Medulla oblongata und Pons (die ja dieselben Permeabilitätseigenschaften für lösliche Faktoren des Blutes aufweisen wie die CVO; siehe Kapitel 1.3.5) ultrastrukturelle Verwandtschaft mit der CVO-BBB aufweist, ist bisher nicht untersucht worden.

#### 1.4.2 Funktion der CVO

Die in 1.4.1 erläuterten anatomischen Besonderheiten sind nachvollziehbar, wenn man bedenkt, dass CVO neuroendokrine Funktionen wahrnehmen. Das Wissen, dass beispielsweise die Neurohypophyse die Hormone ADH (Antidiuretisches Hormon) und Oxytocin speichert und sezerniert, oder dass das Corpus pineale Melatonin in zirkadianer Rhythmik absondert, hat es heutzutage in praktisch jedes anatomische Lehrbuch geschafft. Forschungen der 80er und 90er Jahre gingen über das Konzept der reinen sekretorischen Funktion weit hinaus. 1993 wiesen Johnson und Gross auf die weitreichenden Aufgaben der CVO im Hinblick auf die Aufrechterhaltung homöostatischer Prozesse durch die Aufnahme, Verarbeitung und Weitergabe hämatogener endokriner Signale hin und fügten damit endgültig die sensorische Komponente dem Aufgabenbereich der CVO hinzu (Johnson und Gross, 1993). Heute zählen die sensorischen CVO als eine eigene Untergruppe und umfassen das Organum vasculosum laminae terminalis, das Organum subfornicale und die Area postrema. Die Sensorik dieser Untergruppe scheint vor allem zwei Schwerpunkte zu besitzen: zum einen den Bereich der Kreislaufregulation, zum anderen immunologische Komponenten.

Heutzutage akkumulieren Beweise für eine Verbindung systemischer Kreislaufregulation und zentraler Steuermechanismen via zirkumventrikulärer Organe:

Im Organum subformicale und im Organum vasculosum laminae terminalis wurden Angiotensin-II- und ANP-Rezeptoren gefunden (McKinley et al., 1999). Die Gruppe um Watanabe wies den Natriumspiegel abhängigen Natriumkanal  $Na(x)$  in den CVO nach (Watanabe et al., 2005). An Ratten konnte demonstriert werden, dass ein intaktes Organum subformicale notwendig ist, um bei diätätisch veränderter Salzaufnahme einen konstanten arteriellen Mitteldruck aufrechtzuerhalten (Hendel und Collister, 2005).

Es scheint, als würden einige der CVO vegetativen Zentren im ZNS ein Abbild der aktuellen Kreislaufsituation vermitteln, sodass zentrale, regulative Steuermechanismen initiiert werden können.

Da für diese Arbeit das Vorkommen von Lymphozyten in der Area postrema als Teil der CVO eine Rolle spielt, sei nun vor allem auf die immunologischen Aspekte der CVO hingewiesen: Dabei geht es einerseits um die Vermittlung inflammatorischer Signale an das ZNS, andererseits um die mögliche Rolle der CVO bei zerebraler Inflammation.

Durch direkte Stimulation via intrazerebroventrikulärer Kanülen mit im Blut zirkulierenden Pyrogenen konnte dem Organum subformicale eine Sensibilität für Pyrogene und damit eine zentrale Rolle in der Fieberentstehung nachgewiesen werden (Takahashi et al., 1997).

Auch für andere Zytokine konnten Rezeptoren in den CVO entdeckt werden: Toll-like-Rezeptor-4 wird während systemischer Inflammation hochreguliert (Chakravarty und Herkenham, 2005). Nach Stimulation mit LPS kann in den CVO von Mäusen erhöhte Konzentrationen des proinflammatorischen Zytokins TNF-alpha (bzw. seiner mRNA) und wenig später eine erhöhte Dichte von TNF-alpha-Rezeptoren beobachtet werden (Bette et al., 2003).

All dies lässt vermuten, dass CVO dem ZNS Informationen über systemische Inflammation vermitteln, sodass dieses zentrale Mechanismen wie zum Beispiel Fieber, Übelkeit und Erbrechen induzieren kann.

Im Rahmen der Diskussion möglicher Zugangswege für Immunzellen in das ZNS (siehe Kapitel 1.2.5) muss seit kurzem eine weitere Route in Betracht gezogen werden: Schulz und Engelhardt konnten mit immunhistochemischen Untersuchungen an Mäusen mit

EAE zeigen, dass – im Vergleich zu gesunden Mäusen – in den CVO zum einen Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1 (siehe Kapitel 1.2.4) vermehrt exprimiert werden und zum anderen signifikant höhere Zahlen CD45<sup>+</sup>-Lymphozyten vorkommen. Die Schlussfolgerung ist, dass CVO während zerebraler immunpathologischer Prozesse eine Eintrittsschleuse für Immunzellen in das ZNS-Parenchym sind (Schulz und Engelhardt, 2005).

#### 1.4.3 Die Area postrema (AP) im Besonderen

Die AP liegt im Metencephalon, genauer am Boden der Rautengrube. Sie ist eine an der Mittellinie des Hirnstamms orientierte, bilaterale Struktur mit makroskopisch gelatinösem Erscheinungsbild (Brizze und Klara, 1984). Der hauptsächliche Zelltyp in der AP sind gliale Zellen, v.a. Astrozyten. Darüber hinaus sind kleine Neurone und abgeflachte, auskleidende ependymale Zellen anzutreffen. Wie die anderen CVO ist auch die AP besonders dicht vaskularisiert. Um die Gefäße findet sich ein sinusoider perivaskulärer Raum.

Die AP vermittelt zentralchemosensible Brechreflexe an den Nucleus tractus solitarius im Hirnstamm. Auch die Vermittlung von Übelkeit durch die AP wird diskutiert; insofern als dass Übelkeit als eine mildere Form des Brechreizes, bzw. Brechreiz als die ultimative Steigerung der Übelkeit betrachtet wird. Durch Elektroablation der AP bei Mäusen konnte eindrucksvoll demonstriert werden, welche Substanzen via AP Brechreize auslösen können. Zu diesen zählen beispielsweise Apomorphine und das Chemotherapeutikum Cis-Platin. Diese Reize werden über Rezeptoren vermittelt, derer bis dato zahlreiche nachgewiesen werden konnten (Opiat-, GABA-, ADH-, 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren und viele andere) (Shefner et al., 1981; Pratt und Boverly, 1989; Phillips et al., 1990). Hierin liegt gleichfalls die Grundlage für antiemetische Therapien, die sich der jeweiligen Rezeptorantagonisten bedienen.

Die AP ist neuronal mit zahlreichen anderen ZNS-Regionen verknüpft. Der Nucleus tractus solitarius im Hirnstamm wurde bereits erwähnt. Darüber hinaus ließen sich Verbindung zum limbischen System, sowie zu motorischen Kernen der Hirnnerven V, VII und IX finden (Miller und Leslie, 1994).

#### 1.4.4 Zusammenfassung: CVO

Einige Autoren taufte die CVO „Fenster des Großhirns“. Obwohl wir – nach dem bisher über die BBB Gesagten – wissen, dass der molekulare und zelluläre Austausch des ZNS in der Vergangenheit stets unterschätzt wurde, da man lange von dem veralteten Bild eines hinter einer undurchlässigen BBB verbarrikadiertem Großhirn ausgegangen war, ist dieser Vergleich dennoch treffend; vor allem angesichts der oben genannten Bedeutung der sensorischen CVO für systemische Regulationsmechanismen und der daraus folgenden, besonderen Ausprägung der BBB.

### 1.5 ZIELE DER ARBEIT UND FRAGESTELLUNG

Der besondere, privilegierte immunologische Status des Gehirns ist bis heute anerkannt. Allerdings ist das ZNS vom Immunsystem nicht etwa isoliert. Es wird vielmehr kontinuierlich von patrouillierenden Lymphozyten überwacht, die trotz fehlender inflammatorischer Signale Zugang zum ZNS erhalten. Dieses Konzept der Immunüberwachung des ZNS ist beim Menschen bisher noch wenig charakterisiert.

Die meisten Arbeiten zu diesem Thema widmen sich lymphozytärer Aktivierung, Antigenpezifität oder Muster vaskulärer Adhäsionsmoleküle, die zur Extravasation der Immunzellen benötigt werden. Dabei werden fast ausschließlich Tiermodelle herangezogen.

In der vorliegenden Arbeit soll bei einer Population aus gesunden, menschlichen Gehirnen untersucht werden, ob die Dichte an Lymphozyten im ZNS-Parenchym mit der Ausprägung der Blut-Hirn-Schranke assoziiert ist. Dabei werden Regionen unterschiedlicher BBB-Konfiguration aus Kortex und Hirnstamm immunhistochemisch untersucht und miteinander verglichen.

Darüber hinaus soll mithilfe molekularer Marker klassifiziert werden, welche Subtypen an Lymphozyten vornehmlich an der Immunüberwachung beteiligt sind. Dies soll zur näheren Charakterisierung und zum weiteren Verständnis der Immunüberwachung des humanen ZNS beitragen.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 PATIENTENDATEN

#### 2.1.1 Definition des Normalhirns und Ausschluss pathologischer Zustände

Für die vorliegende Arbeit wurde ein Kollektiv von 23 Patienten zwischen 22 und 75 Jahren aus der Normalhirnbank des Instituts für Hirnforschung Tübingen ausgewählt.

Die Patienten durften in ihrer früheren Krankengeschichte keine neurologischen oder neuropathologischen Auffälligkeiten aufweisen. Auch die Todesursache musste extrazentralnervöser Natur sein.

Patienten mit zerebralen Neoplasien, behandelt oder unbehandelt, wurden von der Studie ausgeschlossen, da bekannt ist, dass neoplastische Veränderungen häufig mit einer lokalen lymphozytären Infiltration einhergehen (Morioka et al., 1992; Saitoh et al., 1997). Selbstverständlich wurden ebenso wenig Patienten mit Entzündungen des Gehirns oder der Hirnhäute, seien sie infektiös oder autoimmun, in die Untersuchungen mitaufgenommen. Ebenso ausgeschlossen wurden Patienten mit zerebralen Ischämien, Blutungen oder Degenerationen (für M. Alzheimer im Speziellen wird eine inflammatorische Genese diskutiert [Shepherd et al., 2005]), da all diese Faktoren das normal funktionierende Milieu und/oder die intakte Blut-Hirn-Schranke beeinträchtigen und daher das lymphozytäre Vorkommen im ZNS beeinflussen. Im Hinblick auf mögliche perimortale Hypoxie wurde auch auf eine kurze Todesphase geachtet.

Auch Patienten mit Erkrankungen des Immunsystems selbst (Lymphome, Autoimmunerkrankungen), sowie Knochenmarkstransplantierte wurden ausgeschlossen. In den Fällen 1-20 lag desweiteren auch keine *extrazentralnervöse* Inflammation vor, während die Fälle 21-23 gezielt nach der Todesursache Sepsis ausgewählt wurden, um exemplarisch zu untersuchen, ob eine systemische Infektion auch Auswirkungen auf zerebrale Lymphozytenpopulationen hat.

Um oben genannte pathologische Zustände sicher ausschließen zu können, bedarf es einer Reihe immunhistochemischer Untersuchungen. Da ein Großteil der in dieser

Arbeit untersuchten Fälle bereits Teil der Patientenpopulation der Arbeit von Mittelbronn et al. war, wird an dieser Stelle auf die in jener Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Ausschluss pathologischer Alterationen verwiesen (Mittelbronn et al. 2001).

Dabei kamen immunhistochemische Untersuchungen ebenso wie Färbemethoden aus dem Routinelabor des Instituts für Hirnforschung, Tübingen, zum Tragen.

Die Immunhistochemie umfasste Untersuchungen mit folgenden Antikörpern:

- a)  $\beta$ -APP (= Beta-Amyloid-Precursor-Protein)
- b) Neurofilament
- c) Tau-Protein
- d) Ubiquitin
- e) Ki-67 (= Kernprotein bei proliferativen Veränderungen)

Keines dieser Proteine konnte in den Geweben der vorliegenden Patientenpopulation in pathologischer Verteilung nachgewiesen werden, was somit keinen Anhalt für eine ischämische, traumatische, inflammatorische oder degenerative Alteration der untersuchten Gewebe liefert.

Alle Gehirne zeigten in der neuropathologischen Beurteilung im Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen keine makroskopischen oder histologischen Veränderungen, die auf Alterationen des Nervensystems hinweisen könnten. Leichte präterminale hypoxische Schädigungen wurden im Rahmen der im Verlauf des Todes eintretenden hypoxischen Ereignisse als natürlich auftretende Prozesse angesehen und nicht von der Studie ausgeschlossen.

## 2.1.2 Klinische Daten

Unter Berücksichtigung der unter 2.1.1 aufgeführten Kriterien, konnte das folgende Patientenkollektiv erstellt werden:

*Tab. 2: Patientendaten mit Todesursache*

Fall-Nr.	Geschlecht	Alter	Todesursache
1	m	39	Hinterwandinfarkt
2	m	22	Unklar
3	m	33	Unklar
4	w	25	Ruptur Sinus-valsalvae-Aneurysma
5	w	26	Akutes Linksherzversagen
6	w	56	Aortenruptur
7	m	25	Hämorrhagischer Schock
8	w	36	Lungenembolie
9	m	54	Kardiorespiratorische Insuffizienz
10	w	75	Multiorganversagen nach hepatorenaler Dekompensation
11	m	44	Myokardiale Ischämie
12	m	22	Vena-Cava-Ruptur
13	m	32	Unklar
14	m	73	Lungenembolie
15	m	54	Myokardiale Ischämie
16	w	58	Aspirationspneumonie
17	w	39	Leberausfallskoma
18	w	59	Lungenembolie
19	m	25	Akute Rechtsherzinsuffizienz
20	m	59	Kardiorespiratorische Insuffizienz
21	m	68	Nierenversagen; Sepsis
22	w	45	Toxische Hepatitis; Sepsis
23	w	42	Thrombose der Aorta; Niereninfarkt; Sepsis

m = männlich, w = weiblich



## 2.2 UNTERSUCHTE HIRNREGIONEN

Um den Grad der lymphozytären Immunüberwachung vergleichen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit Regionen des ZNS unterschiedlicher BBB-Konfiguration untersucht, die ein Kortex- und drei Hirnstammareale umfassten:

- 1) Visueller Kortex (VC)
- 2) Medulla oblongata, ventraler Anteil (vMO)
- 3) Medulla oblongata, dorsaler Anteil, ohne Area postrema (dMO)
- 4) Medulla oblongata, Area postrema (AP)

Die Unterscheidung in ventrale und dorsale MO wurde lediglich beim CD8-Antikörper getroffen. Wenn bei den übrigen von der Medulla oblongata die Rede ist, umfasst dies stets ventrale *und* dorsale Anteile, ohne Area postrema.

Bei der Auswahl war entscheidend, dass – wie in den Kapiteln 1.3 und 1.4 ausführlich dargelegt – die BBB-Konfiguration der einzelnen der Regionen unterschiedlich ist. Ventrale Anteile der Medulla oblongata und die Area postrema haben aufgrund ihrer neuroendokrinen sekretorischen bzw. sensorischen Funktionen molekularbiologisch eine unterschiedliche Zusammensetzung interendothelialer TJs (siehe Kapitel 1.3.5 bzw. 1.4.1). In kortikalen Regionen dagegen ist die BBB vor allem auf Neuroprotektion und Aufrechterhaltung des hirnspezifischen Mikromilieus abgerichtet (siehe Kapitel 1.3.5) und damit dort stark ausgebildet.

Daher sind die genannten Regionen geeignet, eine mögliche BBB-Assoziation der Immunüberwachung zu untersuchen.

### 2.3 HERSTELLUNG HISTOLOGISCHER PRÄPARATE

Die Gehirne wurden mit 4%-igem Formalin in phosphatgepufferter Kochsalzlösung fixiert (pH 7.4). Die entnommenen Proben wurden nach Fixierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 70%, 80%, 96%), zweimal in einem Gemisch aus 100%-igem Alkohol und Chloroform sowie zweimal in unverdünntem Chloroform entwässert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden von den Paraffinblöcken an einem Mikrotom (Microm HM 355 S, Walldorf, Germany) ca. 3,5µm dicke Schnitte gefertigt und auf Superfrost-Plus-Objektträger (Fa. R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Teningen, Deutschland) aufgezogen.

Zur Vorbereitung der Schnitte für immunhistochemische Methoden erfolgte die Entparaffinierung zuerst in Chloroform (3 x 10 min.), danach eine Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 100%, 96%, 70 %, destilliertes Wasser, jeweils 5 min.).

## 2.4 IMMUNHISTOCHEMIE

### 2.4.1 Verwendete Antikörper

Im Folgenden finden sich die in den Untersuchungen verwendeten Antikörper. Sie sind stets jeweils gegen die unten aufgeführten Antigene gerichtet. Dabei wurden alle untersuchten CD-Marker-, sowie der MHC-II-Antikörper bei sämtlichen Hirnregionen aller Patienten angewendet, während die Antikörper gegen Granzym B und Laminin exemplarisch bei einer Auswahl des Patientenkollektivs zum Einsatz kamen.

#### 2.4.1.1 Antikörper gegen CD3

Das CD3-Molekül kann auf peripheren T-Lymphozyten sowie auf Thymozyten gefunden werden (Reinherz und Schlossman, 1980). Es ist eng mit dem T-Zell-Rezeptor assoziiert und besitzt auf der zytoplasmatischen Seite Tyrosinkinasen, mit deren Hilfe eine Signaltransduktion nach erfolgter Bindung zwischen Rezeptor und Antigen stattfinden kann. (Tsoukas et al., 1985; Law et al., 2002, Janeway et al., 2005).

Der Antikörper gegen CD3 stammte aus dem Klon PS1 der Firma Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle upon Tyne, UK.

#### 2.4.1.2 Antikörper gegen CD4

Zwei Drittel aller CD4-Moleküle werden auf der T-Helferzell-Population gefunden (Janeway et al., 2005). Der Rest ist auf Thymozyten, Monozyten und Makrophagen exprimiert. Bei der Präsentation von Antigenen durch APCs benötigen T-Helferzellen das CD4-Oberflächenmolekül, um das präsentierte Antigen ablesen zu können. Dazu interagiert es mit dem MHC-II-Molekül der APC.

Bei dem verwendeten Antikörper gegen CD4 handelte es sich um den Klon 4B12 der Firma BioGenex, San Ramon, USA.

#### 2.4.1.3 Antikörper gegen CD8

Das CD8-Oberflächenmolekül ist auf Thymozyten, zytotoxischen T-Zellen, T-Gedächtniszellen (Masopust et al., 2004), NK-Zellen (Janeway et al., 2005) und auf möglicherweise vorhandenen T-Suppressorzellen (Chess und Jiang, 2004) lokalisiert. Es

besitzt zwei Untereinheiten und liegt in einer hetero- oder homodimeren Form vor (Zamoyska, 1994 und 1998). Seine primäre Funktion besteht darin, die Bindung zwischen dem MHC-I-Molekül Antigen präsentierender Zellen und dem TZR zu ermöglichen. Es wird daher von den meisten Autoren als Ko-Rezeptor des TZR bezeichnet. Durch die erfolgreiche Bindung löst das transmembrane CD8 eine Signaltransduktionskaskade aus, die die Aktivierung der T-Zelle, bzw. – im Fall einer unreifen T-Zelle im Thymus – die Vermittlung essentieller Überlebenssignale zur Folge hat (Janeway et al., 2005). Diese Signalvermittlung findet mithilfe einer mit dem zytoplasmatischen Teil der CD8-Kette assoziierten Tyrosin-Kinase statt (Purbhoo et al., 2001). Auch wird seit langem vermutet, dass CD8 die zelluläre Interaktion zwischen Lymphozyt und APC, die nötig ist, damit der TZR das Antigen erkennen kann, assistierend unterstützt (Norment et al., 1988).

Außerdem konnten Daniels und Jameson mittels monoklonaler Antikörper gegen CD8 am Tiermodell zeigen, dass eine Bindung des TZR an das mit Antigen beladene MHC-I-Molekül nicht erfolgen kann, wenn das CD8-Molekül funktionsuntüchtig (weil mit Antikörper gebunden) ist (Daniels und Jameson, 2000). Damit wurde CD8 eine aktive Rolle nicht nur in der Signaltransduktion, sondern auch in der eigentlichen Bindung zwischen T-Zelle und APC nachgewiesen.

Der CD8-Antikörper für die vorliegende Arbeit war aus dem Klon C8/144B von DakoCytomation, Glostrup, Dänemark.

#### 2.4.1.4 Antikörper gegen CD20

CD20 findet sich bei frühen B-Vorläuferzellen und auf allen reifen B-Zellen, nicht jedoch auf Plasmazellen (Nadler et al., 1984). Seine genaue Funktion ist noch unklar; dem Molekül werden jedoch Funktionen im Rahmen der Zellzykluskontrolle, B-Zellaktivierung und -differenzierung zugeschrieben (Bubien et al., 1993).

Der Antikörper gegen CD20 entstammte dem Klon L26 der Firma DakoCytomation, Glostrup, Dänemark.

#### 2.4.1.5 Antikörper gegen CD137 (4-1BB)

Das CD137-Molekül ist ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Familie. Es ist auf aktivierten T-Lymphozyten (Kroczek und Hamelmann, 2005) und Antigen

präsentierenden Zellen exprimiert. CD137 besitzt möglicherweise eine tragende Rolle bei der Interaktion zwischen APC und Lymphozyten (Lindstedt et al., 2003).

Bei dem hier verwendeten Antikörper handelte es sich um den Klon S16 der Firma Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle upon Tyne, UK.

#### 2.4.1.6 Antikörper gegen MHC-II (HLA-DR; -DP; -DQ)

MHC-II steht hier repräsentativ für eine Gruppe humaner leukozytärer Antigene, von denen der in dieser Arbeit eingesetzte Antikörper die Subtypen DR, DP und DQ detektiert. Das MHC-II-Molekül ist ein  $\alpha\beta$ -Heterodimer, das von allen Zellen exprimiert wird, die die Fähigkeit zur Antigenpräsentation besitzen. Die prozessierten Antigene werden über das MHC-II-Molekül an der Zelloberfläche dargeboten, wodurch die Interaktion mit T-Zellen stattfinden kann (Schwartz, 1985).

Der MHC-II-Antikörper stammte aus dem Klon CR3/43 von DakoCytomation, Glostrup, Dänemark.

#### 2.4.1.7 Antikörper gegen Granzym B

Granzyme stellen eine Reihe von zytolytischen Enzymen, genauer Serin-Esterasen, dar, die zelluläre Apoptose auslösen können und mit deren Hilfe  $CD8^+$  zytotoxische T-Zellen Virus befallene Zellen abtöten (Bratke et al, 2005). In der vorliegenden Arbeit soll der Einsatz dieses Antikörpers der weiteren Charakterisierung der gefundenen  $CD8^+$  Lymphozyten dienen.

Der Antikörper entstammte dem Klon GB7 (ab11198) der Fa. Abcam Ltd., Cambridge, UK.

#### 2.4.1.8 Antikörper gegen Laminin

Laminine sind die Hauptvertreter menschlicher Membranproteine. Es existieren zahlreiche Isoformen, die gewebespezifisch im Organismus verteilt sind (Fujiwara et al., 2001). Die Basallaminae mikrovaskulärer Endothelzellen weisen eine hohe Dichte von Laminin auf, welches hier mechanische Stabilität durch interzelluläre Adhäsion bewirkt (Kramer et al., 1984). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird der Laminin-Antikörper genutzt, kleinste Gefäße darzustellen, um abzuschätzen, wie groß der Anteil

kernhaltiger intravasaler Zellen ist, die sonst fälschlicherweise als parenchymale Zellen registriert werden würden.

Hier handelte es sich um einen Antikörper aus dem Klon 4C7 von DakoCytomation, Glostrup, Dänemark.

#### 2.4.2 Begründung der Antikörperauswahl

Wie in 1.5 dargelegt, ist eines der Ziele dieser Arbeit, die an der Immunüberwachung des ZNS beteiligten Lymphozyten-Subpopulationen zu charakterisieren. Dies gelingt am besten, wenn man zur Unterscheidung einzelner Subtypen deren charakteristisches CD-Oberflächenprofil heranzieht. Dabei war es in dieser Arbeit angestrebt, zwischen B- und T-Zellen zu unterscheiden, indem nach dem für B-Zellen spezifischen CD20- und dem für T-Zellen spezifische, mit dem TZR-assoziierten CD3-Oberflächenmolekül gesucht wurde.

In einem zweiten Schritt sollte nach den beiden T-Zellpopulationen, CD4- und CD8-positive T-Lymphozyten, gefahndet werden, damit die T-Helferzellpopulation (CD4<sup>+</sup>) von der Gruppe der CD8-positiven, welche zytotoxische T-Zellen, T-Gedächtniszellen (Masopust et al., 2004), NK-Zellen (Janeway et al., 2005) und Suppressorzellen (Chess und Jiang, 2004) und) umfasst, abgegrenzt werden konnte.

Da – wie oben aufgeführt – mehrere Subtypen von CD8<sup>+</sup> Lymphozyten existieren, wurde mithilfe des Granzym-B-Antikörpers der Anteil der zytotoxischen T-Zellen an den gefundenen CD8-positiven ermittelt.

Mittels der MHC-II-Färbungen wurden alle Antigen präsentierenden Mikroglia gefärbt. Dies diente der Klärung der Frage, ob die Dichte lymphozytärer Präsenz im ZNS mit der Dichte Antigen präsentierender Zellen korreliert.

*Per definitionem* wurden intravasal gelegene Zellen nicht in die Auswertung mit aufgenommen. Bei der Auswertung stellte sich heraus, dass in den immunhistochemisch gefärbten Geweben gerade kleine und kleinste Gefäße nicht immer mit größter Sicherheit identifiziert werden konnten. Aus diesem Grund wurden exemplarisch eine Serie von Schnitten aus der Studienpopulation gegen Laminin gefärbt, um zu ermitteln, wie hoch der Anteil mononukleärer Zellen in diesen Gefäßen war.

### 2.4.3 Protokoll der Immunhistochemie

Für alle oben genannten immunhistochemischen Färbungen war nach der in 2.3 beschriebenen Entparaffinierung und Rehydrierung eine Vorbehandlung der Gewebeschnitte erforderlich. Diese erfolgte durch 4 mal 5 Minuten Mikrowellenerhitzung bei 750 W. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die endogene Peroxidaseaktivität mittels in reinem Methanol gelöstem 3%-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid) geblockt. Um unspezifische Bindungsstellen unwirksam zu machen, wurden die Schnitte 15 Minuten lang mit 1:10 in TRIS-gepufferter Salzlösung verdünntem und Rinderserumalbumin-haltigem Standardschweineserum versetzt. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers nach der für den jeweiligen Antikörper spezifischen Konzentration (siehe Tabelle 3) für 1 Stunde bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4°C.

Nach einem Spülgang in TBS-Lösung erfolgte die 30-minütige Inkubation mit dem biotinylierten anti-Maus F(ab')<sub>2</sub> Sekundärantikörper in einer Konzentration von 1:400. Da alle verwendeten Primärantikörper monoklonal waren und aus der Maus stammten, konnte bei sämtlichen Färbeserien der gleiche Sekundärantikörper benutzt werden. Es wurde erneut mit TBS gespült, wonach die Schnitte mit Peroxidase-gekoppeltem Avidin-Biotin-Komplex (ABC, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) für 30 Minuten versetzt wurden. Anschließend wurden die spezifischen Antigen-Antikörper-Komplexe mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) als Chromogen unter Mikroskopkontrolle sichtbar gemacht. Die Entwicklungszeiten waren für jeden Antikörper unterschiedlich (siehe Tabelle 3).

Die Kerngegenfärbung wurde mit Hämatoxylin, die Differenzierung mit HCl-Alkohol und 5 Minuten Leitungswasserspülung erreicht. Bevor die Schnitte mit Deckgläsern versehen werden konnten, mussten alle Gewebe eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 2x 100%), sowie 3 mal ein 10-minütiges Xylolbad durchlaufen.

Die Spezifität der Methode wurde mithilfe von Positivkontrollen (Lymphknoten und Tonsille) überprüft. Zum Ausschluss unspezifischer Bindungsstellen und artifizieller Färbesignale ersetzte bei den Negativkontrollen 100ml TBS-Lösung den Primärantikörper.

*Tab. 3: Verwendete Antikörper und ihre Eigenschaften*

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Spezifität</b>	<b>Vorbehandlung</b>	<b>Entwicklungszeit</b>
CD3	1:100	monoklonal	Mikrowelle	6'00''
CD4	gebrauchsfertig	monoklonal	Mikrowelle	7'00''
CD8	1:50	monoklonal	Mikrowelle	2'30''
CD20	1:200	monoklonal	Mikrowelle	4'00''
CD137	1:80	monoklonal	Mikrowelle	3'00''
MHC-II	1:50	monoklonal	Mikrowelle	2'30''
Granzym B	1:100	monoklonal	Mikrowelle	6'00''
Laminin	1:40	monoklonal	Mikrowelle	1'15''

#### 2.4.4 Immunhistochemische Doppelfärbung

Bei den Doppelfärbungen glich im ersten Durchgang das Protokoll bis zur Auftragung des Sekundärantikörpers dem der Standard-Immunhistochemie (wie unter 2.4.3 beschrieben). Anstelle der ABC-Methode wurde nun mit dem AP-Komplex (Alkalische Phosphatase, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) inkubiert. Entwickelt wurde mit Fast Blue BB Salz (Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Im folgenden, zweiten Durchgang wurde eine Immunhistochemie nach ABC-Methode angeschlossen, ohne jedoch die endogene Peroxidase zu blockieren. Es wurde ein zweiter monoklonaler Antikörper aufgetragen, mit einem Sekundärantikörper und AB-Komplex inkubiert und schlussendlich mit DAB (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) entwickelt.

Abschließend wurde nicht mit Hämatoxylin gegengefärbt und aufgrund der Alkohollöslichkeit des Fast Blue-Reagenz die Gewebeschnitte nicht in der Alkoholreihe entwässert, sondern direkt mit Immumount (Shandon, Pittsburgh, USA) eingedeckt.



## 2.5 FÄRBUNGEN AUS DEM ROUTINELABOR

### 2.5.1 Hämatoxylin/Eosin (H.E.)-Färbung

Die H.E.-Färbung als Standard-Übersichts- und Orientierungsfärbung kam auf dem Gewebe der vorliegenden Arbeit zur Anwendung, um zum einen nochmals Hirngewebe alterierende, neoplastische und infektiöse Prozesse (im Rahmen der Möglichkeiten einer H.E.-Färbung) auszuschließen, zum anderen um – im Falle der Medulla oblongata – die korrekte Schnitthöhe (Höhe Area postrema!) zu kontrollieren.

Hierzu wurden die entparaffinierten Schnitte eine Minute in Meyers Hämalaunlösung und nach Leitungswasserspülung eine weitere Minute in 0,1%-igem Erythrosin getränkt.

### 2.5.2 Klüver-Barrera (kombinierte Luxol Fast Blue [LFB]- und Nissl-Färbung)

Mit der LFB wurden das Myelin der Markscheiden der Nervenfasern, mit dem Kresylviolett der Nissl-Färbung die Nissl-Substanz der Perikarya der Nervenfasern detektiert. Diese Färbung kam zum Ausschluss demyelinisierender Prozesse zur Anwendung.

Die Schnitte wurden dazu 30 Minuten lang bei 56°C im Luxol Fast Blue-Reagenz inkubiert und anschließend in 96%-igem Alkohol und Natronlauge differenziert. Zur Darstellung der Nissl-Substanz kam das Gewebe dann noch für 30 Sekunden mit Kresylviolett (0,1%) in Kontakt, wonach mit Essigsäure (1%) differenziert wurde.

### 2.5.3 Retikulin-Versilberung nach Novotny

Die Retikulin-Versilberung dient der Darstellung retikulärer Bindegewebsfasern. Diese Färbung kam im Rahmen dieser Arbeit als Teil der experimentellen Doppelfärbungen zur gleichzeitigen Darstellung von Lymphozyten und Gefäßwänden zum Einsatz.

Zur Herstellung einer Retikulin-Färbung mussten die entparaffinierten Gewebeschnitte für 10 Minuten in eine 1%-ige Kaliumpermanganat-Lösung, für 2 Minuten in 2%-ige Oxalsäure, 10 Minuten lang in 2,5%-iges Eisenalaun und für 15 Minuten in ammoniakalische Silberlösung, gefolgt von reinem Alkohol und einer Reduktionslösung. Zwischen diesen Schritten erfolgte jeweils eine Spülung mit Aqua dest. und Leitungswasser. Anschließend musste das Gewebe 10 Minuten lang in 0,2%-iges Goldchlorid eingetaucht werden, wonach sich erneut Oxalsäure und schließlich 5%-iges Natriumthiosulfat anschlossen (wiederum jeweils mit Zwischenspülungen).

#### 2.5.4 Elastica van Gieson-Färbung (EvG)

Die EvG stellt eine Trichromfärbung dar, die elastische Fasern schwarz, kollagenes Bindegewebe rot und das meiste sonstige Gewebe gelb zur Geltung bringt. Auch sie war Teil der Doppelfärbungen zur Darstellung von Gefäßen und Immunzellen.

## 2.6 LICHTMIKROSKOPISCHE AUSZÄHLUNG UND AUSWERTUNG

Die Auswertung erfolgte an einem Lichtmikroskop (Polyvar HBO 200 W/4, Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland) mithilfe eines Zähllokulars (Vanox AHBT3, Fa. Olympus, Hamburg, Deutschland) bei 250-facher Vergrößerung. Bei einer realen Kantlänge des Zählquadrats von 1 mm errechnete sich die Seitenlänge der Gewebefläche, die mit einem Zählquadrat erfasst wurde, mit 0,4 mm.

Bei den CD- und MHC-II-Antikörpern wurden für die Sehrinde, die ventrale und dorsale Medulla oblongata-Areale (ohne AP) wenigstens 3 mal 20 Zählfelder aus unterschiedlichen Bereichen des Gewebeschnittes ausgezählt.

Die gesamte Area postrema wurde bei allen Antikörpern mit 10 Feldern beidseits des Sulcus medianus posterior, d.h. insgesamt 20 Zählfeldern, abgedeckt.

Bei den Lymphozyten wurden lediglich die Signale zur Auswertung gebracht, die zum einen einem deutlich erkennbaren Kern zugeordnet werden konnten und zum anderen mit der bekannten lymphozytären Morphologie (siehe Kapitel 1.2.3) in Einklang standen. Nicht gezählt wurden intravasal oder leptomeningeal gelegene Lymphozyten. Alle Lymphozyten wurden nach ihrem Verteilungsraum in perivaskuläre, also solche, die in den Virchow-Robin-Räumen zu finden waren, und parenchymale, solche, die sich inmitten des ZNS-Gewebes aufhielten, klassifiziert.

Die Kriterien für Mikroglia waren deutlich erkennbar gefärbter, bipolar elongierter Kern und charakteristische Mikroglia-Ausläufer. Hierbei wurde bewusst in Kauf genommen, dass damit nur eine bestimmte Mikrogliapopulation erkannt wird (Mittelbronn et al., 2001).

Alle in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen sind Digitalaufnahmen, mit einer Camedia E-20 P der Fa. Olympus (Hamburg, Deutschland) angefertigt.

## 2.7 STATISTISCHE METHODEN

Der Quotient aus immunreaktiven Zellen und gezählten Feldern wurde für die jeweiligen Vergleiche zur weiteren statistischen Untersuchung mit Hilfe des dekadischen Logarithmus transformiert. Hierzu wurde zu allen Anteilen 0,01 addiert, da bei den Quotienten von immunreaktiven Zellen und Gesamtzellzahl auch 0-Werte als Ergebnis vorkamen. Vergleiche hinsichtlich der regionalen Verteilung einzelner Antigene, sowie der Zuordnung zu verschiedenen Kompartimenten wurden mit Hilfe der matched-pairs Analyse durchgeführt. Die Vergleiche von nach Sepsis und Geschlecht getrennten Gruppen wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Rangsummentests analysiert. Im Ergebnisteil wurden die Werte als Overlay-Plot dargestellt. Für die Untersuchung der Einflussgröße „Alter“ wurde eine Korrelationsanalyse für die jeweiligen Regionen und Antikörper mit dem Alter durchgeführt. Insgesamt wurde für alle Untersuchungen eine Signifikanzschwelle von 5% gewählt. Für alle statistischen Berechnungen wurde das Statistikprogramm JMP IN verwendet ([www.jmp.com](http://www.jmp.com)).

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 AUSSCHLUSS PATHOLOGISCHER ZUSTÄNDE

Bezüglich der immunhistochemischen Untersuchungen zum Ausschluss pathologischer Zustände sei auf das Kapitel 2.1.1 verwiesen.

Neben den immunologischen Untersuchungen kamen Färbemethoden aus dem Routinelabor des Instituts für Hirnforschung, Tübingen, zum Tragen, die speziell für diese Arbeit durchgeführt wurden.

Die Routineuntersuchungen beinhalteten folgende Färbungen:

- a) Hämatoxylin/Eosin (H.E.)
- b) Klüver-Barrera (LFB, Nissl)

Aufgrund dieser Färbungen ergaben sich keine Hinweise auf morphologische Alterationen jedweder Ursache, noch auf demyelinisierende Erkrankungen.

Somit erfüllt der vorliegende Patientenpool die in Kapitel 2.1.1 aufgestellte Normalhirndefinition.

### 3.2 VORBEMERKUNGEN ZUR ERGEBNISDARSTELLUNG

In den folgenden Kapiteln 3.3 bis 3.6 werden die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen deskriptiv dargelegt.

Da sich jeder detektierte Lymphozyt in dieser Studie anhand von den drei Merkmalskategorien Lokalisation (VC, MO, AP), exprimierte Marker (CD3, CD4, CD8, Granzym B) und Zuordnung zu einem Verteilungsraum (perivaskulär, parenchymal) eindeutig definieren lässt, soll die Ergebnisdarstellung aus drei verschiedenen Perspektiven erfolgen. Dabei werden nicht etwa dieselben Beobachtungen immer wieder neu dargeboten, sondern es werden – je nach Ausgangspunkt – stets neue statistische Zusammenhänge und Erkenntnisse beschrieben.

Wenn dabei im Folgenden von „Gesamtzahl“ oder „Gesamtverteilung“ die Rede ist, ist damit stets die Menge perivaskulärer + parenchymaler Lymphozyten mit einer bestimmten CD-Marker-Expression gemeint.

Die Mittelwerte und 95%-Konfidenzintervalle (95%-KI) für die Gesamtverteilung der CD-Marker CD3, CD8, CD20 und MHC-II seien bereits an dieser Stelle erwähnt:

CD3: 1,13; 95%-KI 0,04-0,08. CD8: 4,43; 95%-KI 0,17-0,28. CD20: 0,20; 95%-KI 0,01-0,02. MHC-II: 79,95; 95%-KI 3,13-5,10.

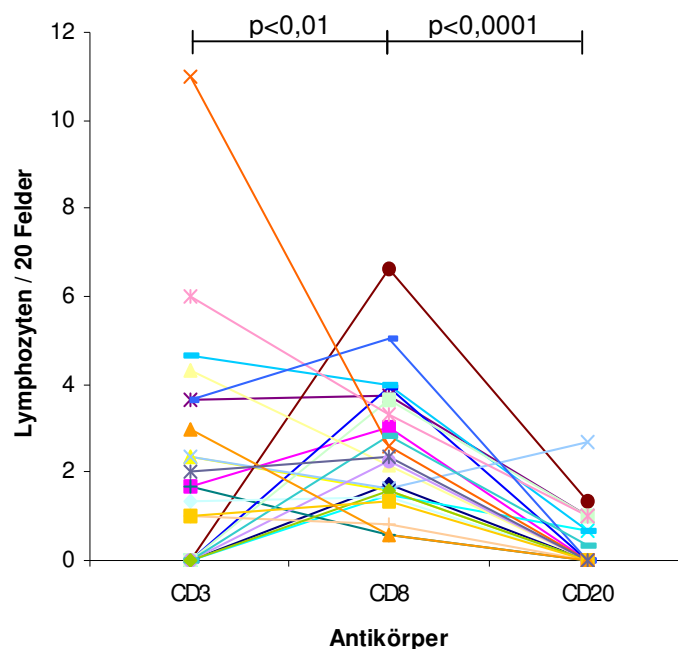
In den Abbildungen 4, 5, 6 und 9 repräsentiert jede der Linien einen untersuchten Fall aus dem Patientenkollektiv, dessen jeweilige Markerexpression anhand der Linie nachvollzogen werden kann.

### 3.3 LYMPHOZYTÄRE VERTEILUNG IN DEN EINZELNEN REGIONEN SEPARAT BETRACHTET

#### 3.3.1 Visueller Kortex (VC)

Der VC ließ signifikant mehr CD8-positive als CD3-positive ( $p < 0,05$ ; 0,32; 95%-KI 0,03-0,61) und hochsignifikant mehr CD8-positive als CD20-positive Lymphozyten ( $p < 0,0001$ ; 0,81; 95%-KI 0,65-0,97) erkennen. CD3-positive überwiegen im Vergleich zu CD20-positiven wiederum deutlich ( $p < 0,01$ ; 0,49; 95%-KI 0,17-0,81).

Damit lässt sich das lymphozytäre Verteilungsverhältnis wie folgt darstellen:

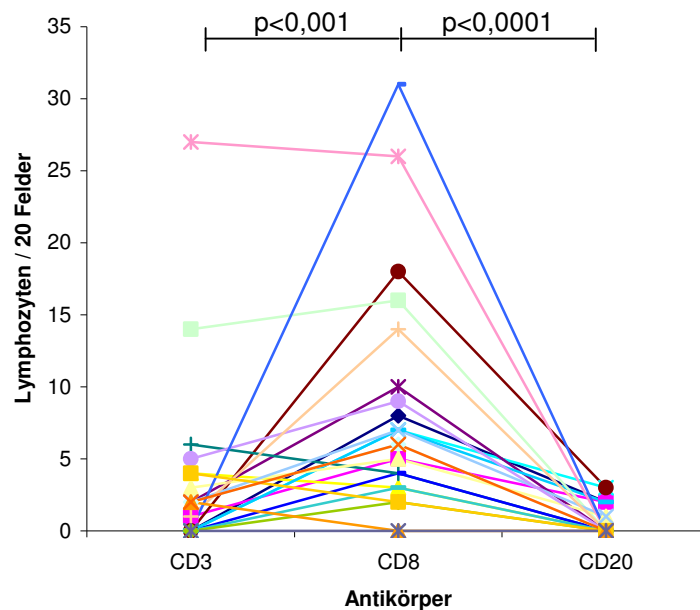


*Abb. 4: Lymphozytendichte im visuellen Kortex*

Trennt man die Werte nach parenchymal und perivaskulär gelegene Lymphozyten auf, so wurde deutlich, dass sich Lymphozyten aller drei CD-Marker im VC stets hochsignifikant zugunsten des Perivaskulärtraumes aufhalten ( $p$ -Werte jeweils  $< 0,0001$ ; 1,00; 95%-KI 0,87-1,13).

### 3.3.2 Area postrema (AP)

Auch in der AP fanden sich deutlich mehr CD8-positive als CD3- oder CD20-positive Lymphozyten (siehe Abbildung 5). Die Werte der Matched-Pairs-Analysen lagen mit p-Werten von  $p < 0,001$  (0,66; 95%-KI 0,31-1,01) bzw.  $p < 0,0001$  (1,11; 95%-KI 0,83-1,39) im hochsignifikanten Bereich. Desweiteren überwiegen CD3-positive im Vergleich zu CD20-positiven signifikant ( $p < 0,05$ ; 0,45; 95%-KI 0,03-0,88).



*Abb. 5: Lymphozytendichte in der Area postrema*

Betrachtet man die nach perivaskulär und parenchymal aufgetrennten Werte ergibt sich, dass sich sowohl CD3- als auch CD20-positive Lymphozyten signifikant häufiger perivaskulär als parenchymal aufhalten ( $p < 0,01$ ; 0,61; 95%-KI 0,21-1,02 bzw.  $p < 0,001$ ; 0,71; 95%-KI 0,34-1,09), während sich in der AP für CD8-positive interessanterweise kein signifikanter Unterschied im räumlichen Verteilungsmuster finden ließ, sodass hier der Anteil parenchymaler als besonders hoch einzustufen ist.

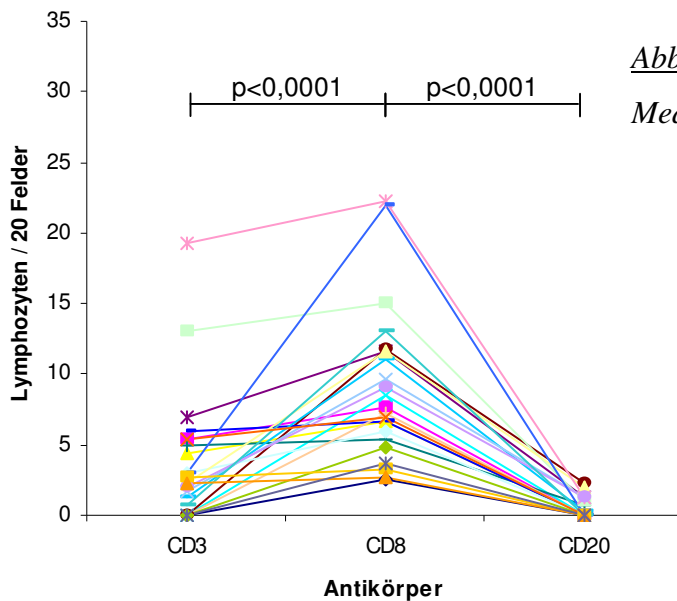
### 3.3.3 Medulla oblongata (MO)

In dem in dieser Arbeit untersuchten Teil der MO finden sich ähnliche Verteilungsverhältnisse der CD-Marker wie in der AP. D.h. auch hier überwiegen – wie



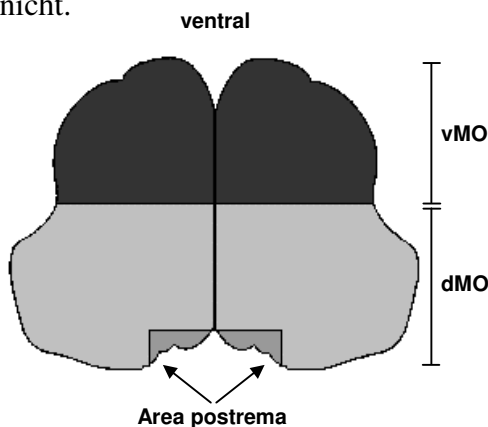
in Abbildung 6 ersichtlich – CD8-positive Zellen zahlenmäßig im Vergleich zu den CD3- und CD20-positiven, wobei erneut Letztere den quantitativ geringsten Anteil ausmachen. Die p-Werte für alle drei Vergleichspaare liegen in dieser Region mit  $p < 0,0001$  (1,27; 95%-KI 1,11-1,43) im hochsignifikanten Bereich.

Für CD8, CD3 und CD20 gilt gleichermaßen: hochsignifikant mehr perivaskuläre als parenchymale Lymphozyten.



*Abb. 6: Lymphozytendichte in der Medulla oblongata*

Für die CD8-positiven wurde die Auswertung aufgrund der bereits erwähnten Arbeit von Belova und Jonsson (1982) zusätzlich hinsichtlich ventraler und dorsaler Anteile der MO (vMO bzw. dMO) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass ventral hochsignifikant mehr CD8<sup>+</sup>-Zellen zu finden waren als dorsal und in der AP ( $p < 0,0001$ ; 0,22; 95%-KI 0,15-0,30). Abbildung 7 zeigt dies zunächst schematisch (für die genaue statistische Darstellung, sowie für den Vergleich der Hirnstammregionen zum VC siehe Abbildung 9, S.54). Der Unterschied zwischen dMO und der AP erreichte die Signifikanzschwelle nicht.



*Abb. 7: Verteilung von CD8 im Hirnstamm*

Die Graustufen symbolisieren die mittlere Dichte der CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten.

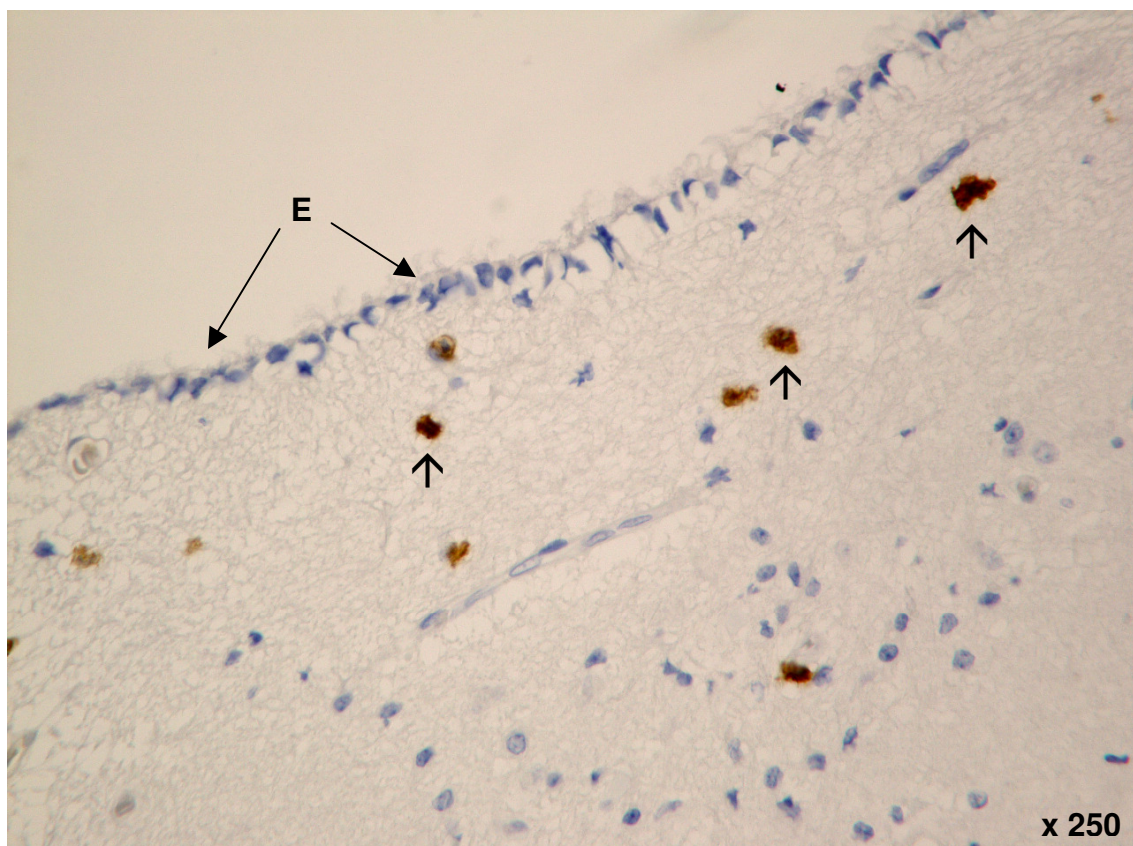
Mittlere CD8-Dichte / 20 Zählfelder

- 11,04
- 6,54
- 8,32

### 3.4 VERGLEICH DER EINZELNEN REGIONEN IM HINBLICK AUF DIE EXPRIMIERTEN MARKER

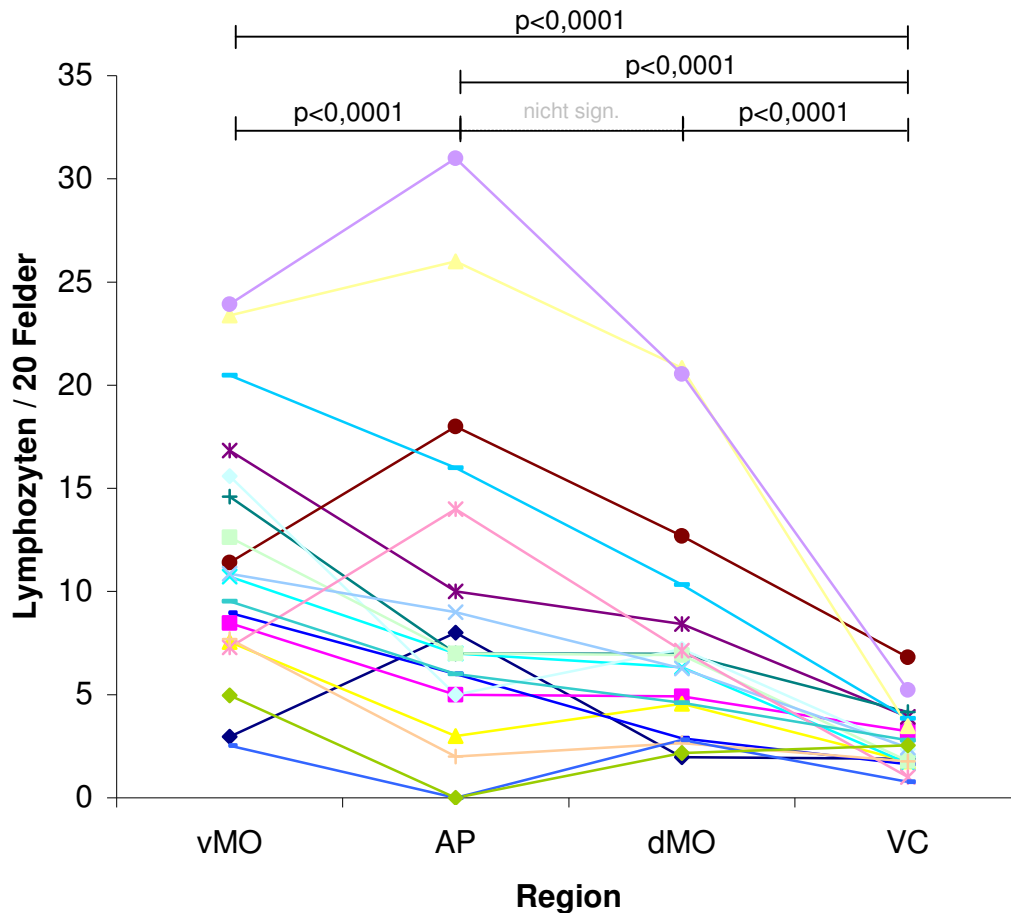
#### 3.4.1 CD8

Die Untersuchungen mit dem CD8-Antikörper (Abbildung 8) ergaben für die Gesamtzahl der Lymphozyten in der Matched-Pairs-Analyse für VC und AP bzw. VC und MO (ventral und dorsal) mit  $p < 0,0001$  (0,61; 95%-KI 0,51-0,70) eine hochsignifikant höhere Expression CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten in vMO bzw. dMO und mit  $p < 0,01$  (0,13; 95%-KI 0,22-0,47) ebenfalls signifikant höhere Expression in der AP. Im Vergleich der Hirnstammareale untereinander zeigten sich die meisten CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten in der vMO ( $p < 0,0001$ ; 0,22; 95%-KI 0,15-0,30), während AP und dMO statistisch nicht differierten (siehe Abbildung 9, S.54).



*Abb. 8:* CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten (↑) in der Area postrema, welche sich morphologisch gut an den ependymalen Zellen (E) und am dahinter gelegenen, etwas aufgelockerten Gewebe abgrenzen lässt.

Bemerkenswert bei der Verteilung der CD8-positiven war, dass dabei eine fallbezogene, relative Abhängigkeit zwischen den einzelnen Regionen bestand. D.h., finden sich bei einem bestimmten Patienten im Vergleich zu den übrigen hohe bzw. niedrige CD8-Werte im Kortex, so sind bei dem gleichen Patienten die Werte für AP und MO gleichfalls in entsprechender Relation erhöht bzw. erniedrigt. Abbildung 9 verdeutlicht diesen Zusammenhang.



*Abb. 9: Overlay-Plot der regionalen CD8-Verteilung der untersuchten Fälle.*

Jede der Linien entspricht einem untersuchten Fall und verbindet die Punkte der vier möglichen Lokalisationen. Die Tendenz zur Parallelität der Verbindungslinien zwischen den einzelnen Regionen zeigt die fallbezogene Abhängigkeit der CD8-Verteilung. Hohe CD8-Werte in der AP ziehen also tendenziell hohe Werte in den anderen Regionen (VC, vMO und dMO) nach sich und umgekehrt.

Beobachtet man die perivaskulär gelegenen CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten isoliert, so stellte sich ebenfalls ein hochsignifikant vermehrtes Auftreten in der MO gegenüber der AP und dem VC dar, wohingegen zwischen VC und AP in diesem Fall keine relevanten Unterschiede zu verzeichnen waren. Bei den parenchymalen CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten waren – im Vergleich zu MO bzw. AP – erneut im Kortex deutlich weniger Zellen zu finden (p-Werte jeweils < 0,0001).

In den Korrelationsanalysen stellte sich eine geringfügige positive Korrelation der Expression von CD8 zu der von CD20 heraus ( $p < 0,05$ ; 95%-KI 0,06-0,55). Die Korrelationen zu allen anderen eingesetzten Antikörpern überstiegen den Signifikanzschwellenwert nicht.

## 3.4.2 CD3

Die Gesamt-CD3-Verteilung verhielt sich im Vergleich zwischen den einzelnen Regionen und Arealen ausgeglichener: Zwischen den Hirnstammarealen (siehe Abbildung 10) und dem VC zeigten sich keine signifikanten Differenzen. Auch im direkten Vergleich zwischen MO und AP waren keine maßgeblichen Unterschiede feststellbar.

Die Verhältnisse bei rein perivaskulär gelegenen CD3-positiven waren denen der Gesamtzellenzahlen ähnlich. Signifikante Unterschiede finden sich bei parenchymalen CD3-positiven im Vergleichspaar MO/VC ( $p < 0,001$ ; 0,70; 95%-KI  $-0,30-1,09$ ), wobei wieder die MO die weitaus größeren Lymphozytenzahlen aufzuweisen hatte. Auch im Vergleich zur AP wies die Sehrinde signifikant geringere Zahlen parenchymaler CD3-positiver auf, wobei das Signifikanzniveau bei einem p-Wert von  $p < 0,05$  (0,45; 95%-KI 0,07-1,00) nur gering war. Im Vergleich AP/MO ergab sich keine bezeichnende Differenz.



*Abb. 10:* CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten (↑) im Perivaskulärraum von Blutgefäßen (G).

## 3.4.3 MHC-II

Die Expression von MHC-II-Molekülen war in der Sehrinde (siehe hierzu Abbildungen 11a und b) hochsignifikant geringer als in der MO ( $p < 0,0001$ ; 0,29, 95%-KI 0,18-0,39), jedoch nicht signifikant unterschiedlich zu der in der AP. Die MO wies ihrerseits eine signifikant höhere Dichte MHC-II-positiver Mikroglia auf als die AP mit p-Werten von  $p < 0,01$  (0,22; 95%-KI 0,08-0,36). Bei Korrelationsanalysen mit den CD-Markern stellte sich eine geringe negative Korrelation mit  $CD20^+$ -Lymphozyten ( $p < 0,05$ ; 95%-KI 0,19-0,28) heraus. Zu allen übrigen lymphozytären Populationen verhielt sich MHC-II unabhängig.

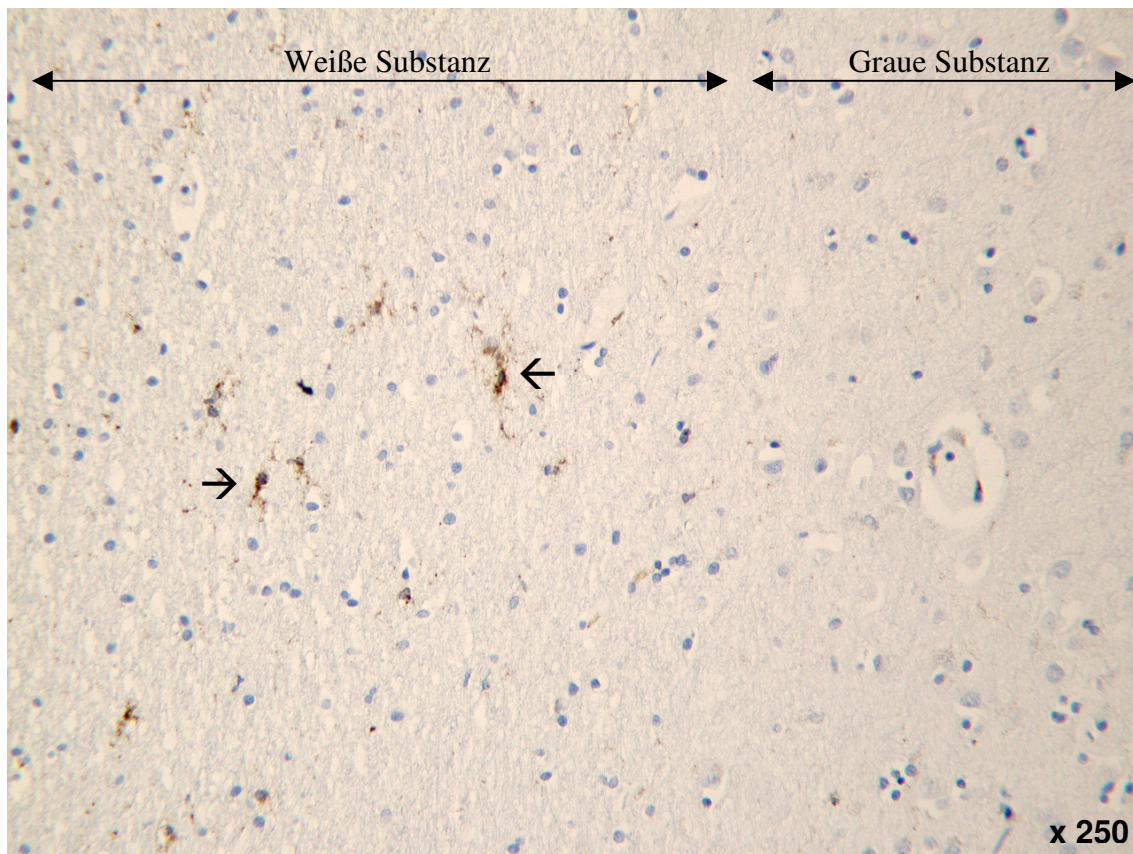
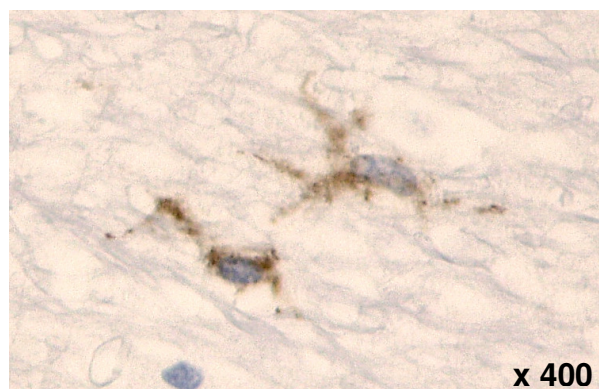


Abb. 11a (oben): Mark-Rinden-Grenze; hier Mikroglia ( $\uparrow$ ) typischerweise in der weißen Substanz in höherer Dichte als in der grauen.

Abb. 11b (rechts): Zwei Mikrogliazellen mit charakteristischen Fortsätzen.



#### 3.4.4 CD20

Bei der Untersuchung der Immunzellen mit dem CD20-Oberflächenmarker ergaben sich weder für die Gesamtzahlen noch für die isolierte Betrachtung nach perivaskulären und parenchymalen Zellen signifikante Unterschiede zwischen den betrachteten Arealen.

#### 3.4.5 Antikörper gegen CD4 und Granzym B

Für die Antikörper gegen CD4 und Granzym B fanden sich in keinem der untersuchten Fälle und in keiner der untersuchten Regionen detektierbare Mengen. Eine positive, signalintense Positivkontrolle wurde für beide Antikörper etabliert (siehe Abbildungen 12 und 13), sodass postuliert werden darf, dass sämtliche untersuchten Gewebe so gut wie keine detektierbaren Mengen an CD4- und Granzym B-positiven Zellen enthielten.

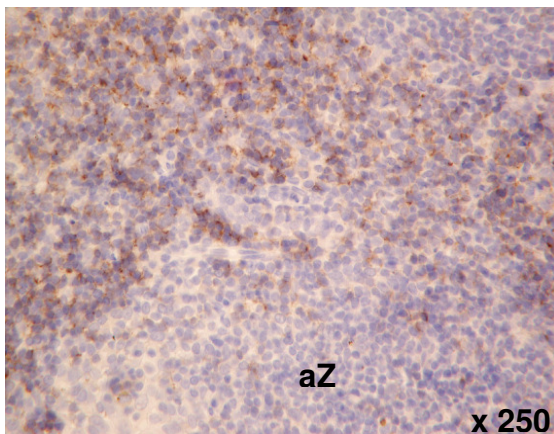


Abb. 12: CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, scharen sich in loco typico um das aktive Zentrum (aZ) eines Lymphfollikels.

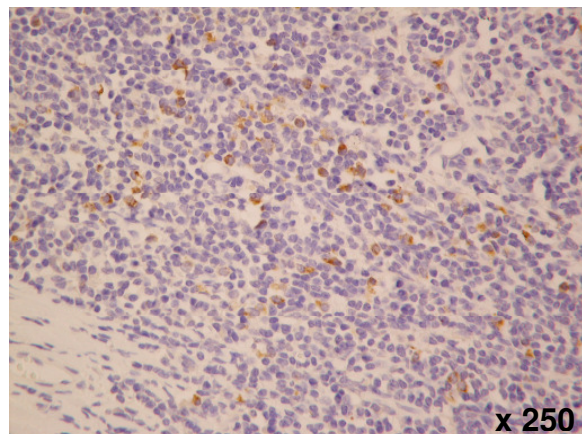


Abb. 13: Vereinzelt Granzym B<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen in der T-Zone eines Lymphknotens.

### 3.4.6 CD137

Bei der Etablierung des CD137-Antikörpers stellte sich heraus, dass dieser vornehmlich Oligodendrozyten und in geringerem Maße auch Mikroglia detektierte. Dies wurde lichtmikroskopisch an Hand von morphologischen Kriterien der Signal gebenden Zellen nachgewiesen. Dabei stimmte die Häufung in der weißen Substanz und dort eine annähernd regelmäßige Verteilung mit dem bekannten und zu erwartenden Auftreten von Oligodendrozyten überein.

Zur weiteren Bestätigung kam der Antikörper probeweise auf zwei Oligodendrogliomen, die der Gewebekbank des Instituts für Hirnforschung der Universität Tübingen entnommen wurden und nichts mit dem Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit zu tun haben, zum Einsatz.

Hierbei zeigten sich starke Signale über die gesamte Ausdehnung des Tumors. Dabei konnte der Tumor meist scharf vom gesunden, nicht neoplastisch veränderten ZNS-Gewebe abgegrenzt werden.

Der CD137-Antikörper wurde aufgrund seiner mangelnden Spezifität für aktivierte Lymphozyten nicht in die Auswertung dieser Arbeit miteinbezogen.



### **3.5 VERGLEICH DER EINZELNEN REGIONEN IM HINBLICK AUF DIE KOMPARTIMENTALE VERTEILUNG**

#### **3.5.1 Parenchymale Lymphozyten**

CD3- und CD8-positive parenchymale Lymphozyten waren im Vergleich zum VC in der AP und MO am häufigsten, während im direkten Vergleich zwischen den beiden Hirnstammarealen ein signifikanter Unterschied knapp verfehlt wurde. CD20 ließ keine Unterschiede zwischen VC, MO und AP deutlich werden.

#### **3.5.2 Perivaskuläre Lymphozyten**

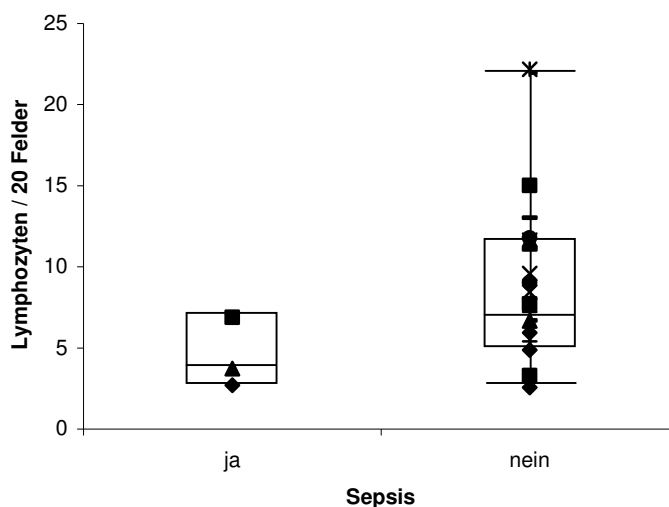
Bei den perivaskulären Lymphozyten zeigte die MO – entsprechend der Lymphozyten-Gesamtzahlen – das dichteste Vorkommen (p-Werte jeweils  $p < 0,0001$ ; 0,19; 95%-KI 0,11-0,26) und damit auch dichter als in der AP. Hinzu kam, dass die AP und Sehrinde keine signifikant unterschiedlichen perivaskulären Lymphozytenzahlen erkennen ließen.

### 3.6 EVALUATION POTENZIELLER EINFLUSSGRÖSSEN AUF DIE IMMUNÜBERWACHUNG DES ZNS

#### 3.6.1 Sepsis

Anhand von drei Fällen des Patientenkollektivs sollte die Auswirkung der klinischen Diagnose „Sepsis“ auf das lymphozytäre Vorkommen im ZNS exemplarisch dargestellt werden. Es war von Interesse, ob eine generalisierte, systemische Infektion extrazerebralen Ursprungs Auswirkungen auf den Grad und die Dichte der zerebralen Immunüberwachung hat.

Dabei ergaben die statistischen Analysen aller Regionen und Antikörper, dass in den drei untersuchten Fällen, die Diagnose „Sepsis“ keine signifikanten Auswirkungen auf Art und Zahl im ZNS vorkommender Lymphozyten hat. Wie Abbildung 14 zeigt (hier beispielhaft das Vorkommen CD8-positiver in der MO), liegt die dichte der CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten gänzlich im Streubereich der übrigen, nicht septischen Fälle.



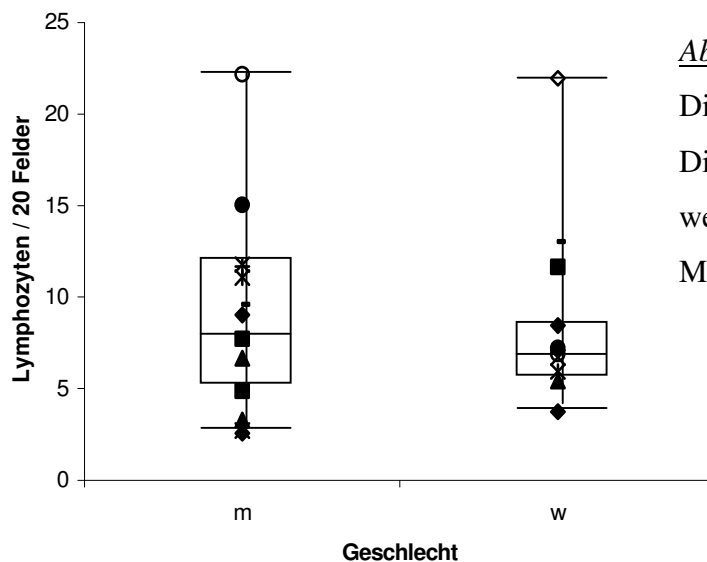
*Abb. 14: Einfluss der Diagnose Sepsis auf die Lymphozytendichte*

Vergleich lymphozytärer Verteilung der CD8-positiven in der MO bei Sepsis und nicht septischem Zustand.

### 3.6.2 Geschlecht

Desweiteren wurde statistisch erhoben, ob das Geschlecht des Patienten einen Einfluss auf die lymphozytäre Dichte im ZNS hat. Im vorliegenden Patientenkollektiv betrug das Geschlechterverhältnis  $m : w = 13 : 10$ .

Die Statistik konnte keine geschlechtsspezifischen Unterschiede im Grad der Immunüberwachung hinsichtlich aller Regionen und Antikörper ermitteln. In Abbildung 15 kann nachvollzogen werden, dass die Lymphozytendichte (hier wieder repräsentativ für alle Regionen und Antikörper am Beispiel CD8-positiver in der MO) vom Geschlecht unabhängig ist.



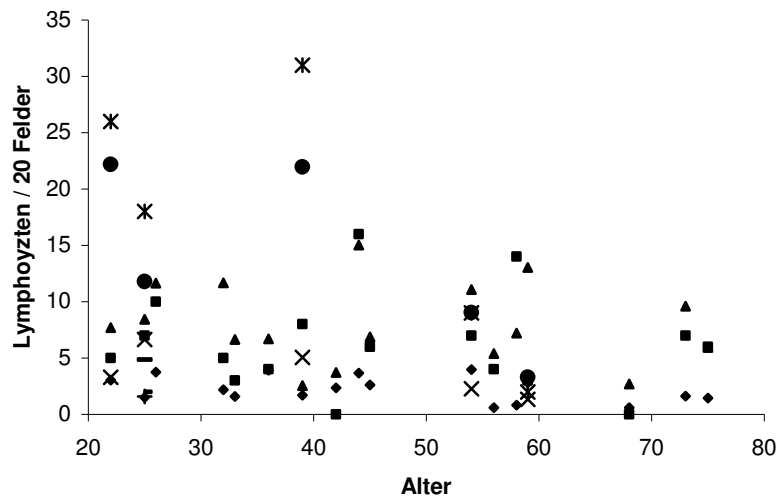
*Abb. 15: Geschlechtervergleich*

Die Streuungen der lymphozytären Dichte zwischen männlichem und weiblichem Gehirn zeigen ähnliche Muster.

### 3.6.3 Alter

Die 23 Fälle des vorliegenden Patientenkollektivs erstreckten sich über einen Bereich von 22 bis 75 Jahren, wobei das mediane Alter 42 und das arithmetische Mittel aller Alterswerte 44 Jahre betrug, was auf eine balancierte Altersverteilung im genannten Bereich hinweist.

Mit einem p-Wert von  $p < 0,05$  (95%-KI 0,002-0,01; 43,96) ergab sich für die Gesamtzahl an CD8-positiven aller Regionen eine inverse Beziehung schwacher Signifikanz zum Patientenalter. D.h., mit zunehmendem Alter nimmt die Dichte der im ZNS vorzufindenden CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten tendenziell ab. Abbildung 16 veranschaulicht diesen Zusammenhang.



*Abb. 16: Altersabhängigkeit*

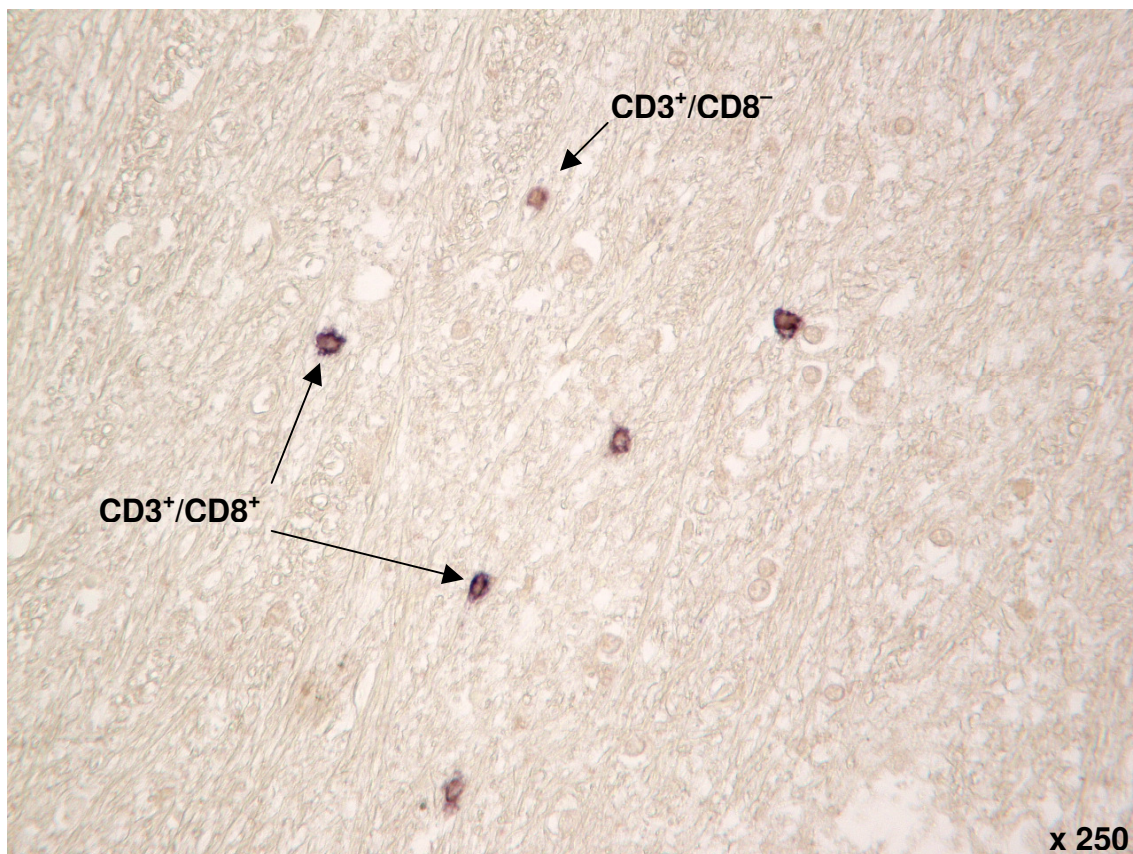
Zu erkennen ist eine tendenziell inverse Beziehung zwischen Lymphozytendichte und Alter. Beispielhaft dargestellt ist die CD8-Verteilung in der Sehrinde (Steigungskoeffizient: -0,007).

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen – obwohl nicht zentraler Gegenstand dieser Arbeit – dass die Gesamt-MHC-II-Dichte mit zunehmendem Patientenalter tendenziell ansteigt ( $p < 0,05$ ; 43,96; 95%-KI 0,0005-0,02), sich also im Gegensatz zu CD8 konkordant zum Alter verhält (Steigungskoeffizient: 0,01). Die damit entgegengesetzte Beziehung zwischen CD8 und MHC-II in Bezug auf Patientenalter ließ sich in den Pairwise-Korrelationen nicht bestätigen.

### 3.7 ERGEBNISSE DER DOPPELFÄRBUNG UND GEFÄßDARSTELLUNG

#### 3.7.1 CD3/CD8-Doppelfärbung

Mit der CD3/CD8-Doppelfärbung konnte gezeigt werden, dass – wie Abbildung 17 zeigt – CD3 zu einem gewissen Prozentsatz mit dem CD8-Oberflächenmolekül von den immunüberwachenden T-Zellen koexprimiert wird. Dabei sind in den Schnitten neben Lymphozyten mit eben dieser Koexpression Lymphozyten mit reinem CD3- und solche mit reinem CD8-Besatz zu finden, was als interne Positivkontrolle für beide Teilfärbungen betrachtet werden konnte.



*Abb. 17: CD3/CD8-Doppelfärbung*

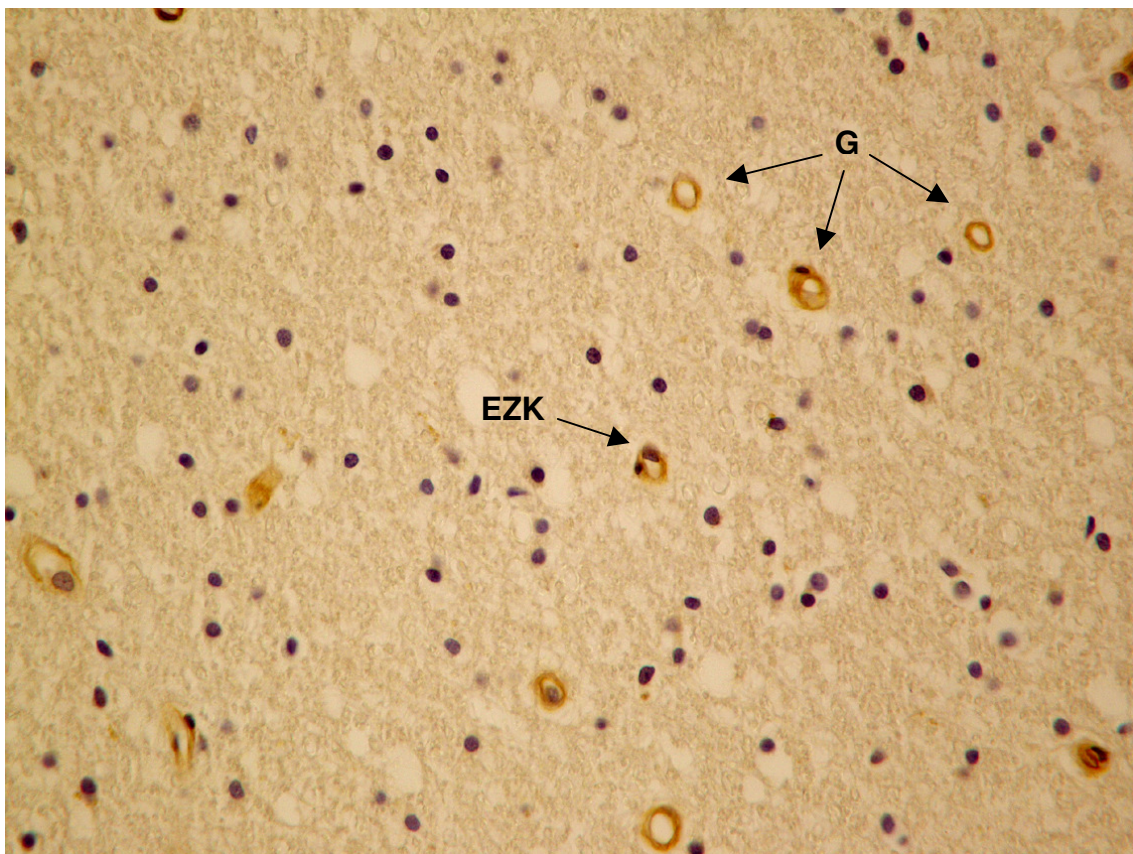
CD8 wurde mit Fast Blue, CD3 mit DAB, entwickelt. Das Bild zeigt einen Lymphozyten mit reiner CD3-Expression ( $CD3^+/CD8^-$ ) und mehrere mit CD3/CD8-Koexpression ( $CD3^+/CD8^+$ ).

Nicht auf der Abbildung gezeigt sind die ebenfalls anzutreffenden  $CD3^-/CD8^+$ -Lymphozyten.

### 3.7.2 Laminin-Färbung zur Gefäßdarstellung

Es war die Absicht dieser Studie perivaskuläre und parenchymale Immunzellen zu detektieren, was intravasal gelegene Lymphozyten explizit ausschließt (siehe Kapitel 2.4.2 und 2.6). In den angefertigten immunhistochemischen Färbung von 3.4.1 bis 3.4.6 war es – gerade bei kleinen und kleinsten Gefäßen – nicht immer möglich, die intravasale Lage der Immunzellen mit letzter Sicherheit auszuschließen.

Aus diesen Gründen wurde eine immunhistochemische Färbung gegen Laminin durchgeführt, womit auch kleine und kleinste Arteriolen und Venolen zur Darstellung gebracht wurden. Dabei zeigte sich, dass weniger als 1% der detektierten Gefäße kernhaltige Zellen beinhalteten (siehe Abbildung 18). Somit sind statistische Fehler durch das versehentliche Zählen intravasaler Lymphozyten sehr unwahrscheinlich.



*Abb. 18: Laminin-Färbung*

Die dargestellten Gefäßen (G) enthalten keine kernhaltigen Zellen in ihrem Lumen. Lediglich Endothelzellkerne (EZK) sind in den Gefäßwänden ab und an sichtbar.

## 4. DISKUSSION

### 4.1 BLUT-HIRN-SCHRANKEN-ASSOZIIERTE IMMUNÜBERWACHUNG DES ZNS

Ziel dieser Arbeit war es, die Immunüberwachung des gesunden menschlichen Gehirns mit immunhistochemischen Methoden näher zu charakterisieren. Dabei war die zentrale Frage, ob der Grad der Immunüberwachung, d.h. de facto die lymphozytäre Dichte im ZNS, mit der lokalen Ausprägung und Konfiguration der Blut-Hirn-Schranke assoziiert ist. Beim humanen Gehirn hatte sich die Forschung bisher noch wenig mit dieser Frage auseinandergesetzt. Bisherige Untersuchungen zielten vor allem darauf ab, molekulare Adhäsionsmechanismen, lymphozytäre Extravasation, sowie Aktivierungszustand und -ort der Lymphozyten zu analysieren. Die vorliegende Arbeit unternahm den Versuch, die Rolle der BBB im Rahmen der Immunüberwachung näher zu beleuchten. Dazu wurden ZNS-Regionen unterschiedlicher BBB-Konfiguration hinsichtlich des lymphozytären Vorkommens verglichen. Anders als die allermeisten Arbeiten zu diesem Thema, ist der Fokus der hiesigen Untersuchungen gänzlich auf menschliches Gewebe gerichtet. Unter Einbeziehung bisheriger Veröffentlichungen soll die Bedeutung der BBB für die Immunüberwachung im Folgenden diskutiert werden.

#### 4.1.1 Gibt es eine Assoziation zwischen BBB und der Immunüberwachung in Kortex und Hirnstamm?

Die untersuchte Verteilung der molekularen Marker CD3 und CD8 zeigte in den Hirnstammarealen AP und MO (ventraler und dorsaler Anteil zusammengefasst) ein hochsignifikant höheres Vorkommen von CD3 und CD8 als im VC. Mit anderen Worten: Es waren im Hirnstamm (zumindest in den hier betrachteten Teilen) deutlich mehr Lymphozyten zu finden als in der Sehrinde. Interessant sind diese Ergebnisse im Hinblick auf die BBB-Eigenschaften der jeweiligen Regionen, deren Unterschiede in der Literatur mannigfaltig belegt wurden: Es sei noch einmal daran erinnert, dass die in Kapitel 1.3.4 angesprochene Komposition aus integralen Membranproteinen (Claudine,

Occludine u.a.) maßgeblich für die Permeabilitätseigenschaften der BBB-assoziierten TJs hinsichtlich *löslicher* Substanzen verantwortlich ist (Wen et al., 2004). Vorbrodt und Dobrogowska wiesen mit ihren Untersuchungen auf die besonders hohe Expression dieser Moleküle in kortikalen Gefäßendothelien hin (Vorbrodt und Dobrogowska, 2004) und Williams unterstrich dies ein Jahr später durch seinen angestellten Vergleich der Cadherin-10-Expression (ein dichte Zellkontakte vermittelndes, interzelluläres Membranprotein) zwischen Kortex und CVO, indem er feststellte, dass den CVO das abdichtende Cadherin-10 fast völlig fehlte (Williams, 2005). Für die *zelluläre* Durchlässigkeit sind endotheliale Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1 verantwortlich. Den CVO und im besonderen dem Plexus choroideus konnten unter inflammatorischen Bedingungen im Tiermodell nachgewiesen werden, dass gerade sie diese Moleküle hochregulieren (Steffen et al. 1996; Engelhardt et al., 2001; Schulz und Engelhardt, 2005) und sie daher im Zustand der EAE Eintrittspforten für Immunzellen in das ZNS werden.

Die etwas plakative aber eindrückliche Terminologie, die die Wörter „dicht“ und „undicht“, besser jedoch „durchlässig“ und „undurchlässig“ (da „undicht“ eine mangelhafte Konstruktion impliziert) verwendet, sei zum besseren Verständnis nun auf die bisherigen Erkenntnisse angewendet: So kann festgehalten werden, dass auch im gesunden, nicht inflammatorischen Zustand die BBB-Konstitution der AP und der MO beim Menschen offenbar mehr Immunzellen passieren lässt, als die undurchlässigere BBB des VC. Was also für lösliche Faktoren des Blutes gilt, scheint auch auf dessen zelluläre Bestandteile anwendbar zu sein. Daher macht es den Eindruck, als müssten die CVO – zumindest aber die AP – auch in puncto Immunüberwachung als Eintrittspforten und Tor zum ZNS in Erwägung gezogen werden.

#### 4.1.2 Betrachtung der Hirnstammareale

Es fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede der Lymphozytendichte im direkten Vergleich der Hirnstammregionen AP und MO. Dies war zunächst überraschend, ist die AP doch explizit Teil der CVO und hat demnach eine BBB-Konfiguration, die – ultrastrukturell nachgewiesenermaßen – abdichtende TJs nur



punktuell ausprägt (Petrov et al. 1994). Wie sich herausstellen sollte, darf, um dieses Phänomen zu erklären, der Fokus nicht auf der AP liegen:

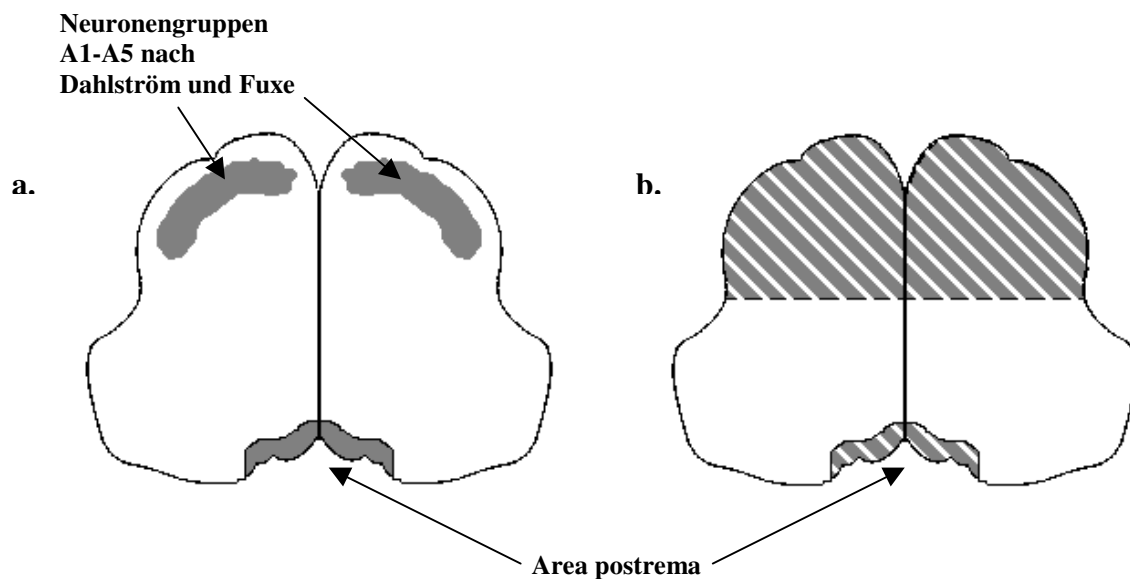
In den 80er Jahren war es das Ziel der schwedischen Forscher Belova und Jonsson, die regionale Ausprägung der BBB in Hirnstamm und Thalamus, sowie Permeabilitätsänderung der BBB (zellulär wie enzymatisch) nach Immobilisationsstress bei Mäusen zu untersuchen. Gewiss sind Belovas und Jonssons Ergebnisse und Schlussfolgerungen heute mithilfe molekularbiologischer Methoden vielfach genauer belegt und zahlreiche Inhalte derer exakter beschrieben. Sie machten aber eine für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit interessante Entdeckung, die sich heute wie damals wissenschaftlicher Gültigkeit erfreut:

Belova und Jonsson beobachteten, dass nach Applikation des Farbstoffs Trypanblau dieser sowohl von den CVO als auch von ventralen Anteilen des Pons und der Medulla oblongata verstärkt aufgenommen wurde (Belova und Jonsson, 1984). Diese Arbeit wurde zum Anlass genommen, in der vorliegenden Studie die Lymphozytendichte der CD8-positiven in der MO hinsichtlich ventraler und dorsaler Lokalisation auszuwerten. Dabei stellte sich heraus, dass in ventralen Anteilen der MO die CD8-positiven-Dichte hochsignifikant höher war als in dorsalen oder in der AP. Die AP ihrerseits zeigte im Mittel zwar mehr CD8-positive als die dorsalen Teile der MO. Die Unterschiede verfehlten jedoch knapp das Signifikanzniveau. Diese Erkenntnisse sind sehr gut mit denen von Belova und Jonsson vereinbar.

Als Erklärungsmodell ziehen die beiden Schweden eine neuroanatomische Grundlagenarbeit von Dahlström und Fuxe heran, welche Monoamine (genauer Katecholamine) produzierende Neurone im Hirnstamm lokalisierten. Dahlström und Fuxe fassten diese Neurone in fünf Gruppen (A1-5) zusammen. Sie liegen in kaudorostraler Richtung an der ventralen Seite von MO und Pons und sind damit nicht den CVO zuzurechnen (Dahlström und Fuxe, 1964).

Wie in Kapitel 1.4.2 dargelegt, besitzen CVO neuroendokrine Funktionen. Entweder sezernieren sie Hormone oder sie bilden Rezeptoren für periphere Hormone aus, um Signalkaskaden an das ZNS weiterzuleiten. Es wird angenommen, dass hier TJs deswegen weniger dicht exprimiert werden, damit die produzierten Hormone die Blutbahn erreichen bzw. die wahrzunehmenden Hormone aus der Peripherie ihre Rezeptoren erreichen können. Es ist nun folgerichtig und legitim anzunehmen, dass es

den Katecholamine produzierenden Neuronen nicht anders ergeht als den CVO. Die auszuschüttenden Monoamine müssen an die Blutzirkulation abgegeben werden und dazu muss die BBB in umgekehrter Richtung überwunden werden. Hierzu bedarf es, ähnlich den CVO, eine besondere BBB-Konfiguration; eine, die nicht maßgeblich auf abdichtende, protektive TJs fußt, sondern eine, die die Kommunikation mit dem Blutmilieu in den Vordergrund stellt. Somit ist in den Kernregionen A1-5 von Dahlström und Fuxe eine BBB-Architektur zu erwarten, die für lösliche Stoffe permeabler ist als die BBB der übrigen MO oder als die kortikale BBB. Die vorliegende Arbeit legt jetzt nahe, dass diese Areale nicht nur für lösliche Stoffe, sondern eben auch für zelluläre Blutbestandteile, genauer für immunüberwachende Lymphozyten, zugänglicher sind als andere Regionen des ZNS, womit der Grad der Immunüberwachung hier im Vergleich zu kortikalen Neuronen erhöht ist (siehe Abbildung 19a + b).



*Abb. 19: Querschnitt des Hirnstamms. Räumlicher Vergleich neuroanatomischer Strukturen (a.) und Areale hoher Lymphozytendichte (b.)*

In (a.) sind ventral der auf dieser Schnittebene getroffene Bereich der Katecholamine produzierenden Neuronengruppen A1-5 nach Dahlström und Fuxe, sowie die AP grau hervorgehoben. Zum Vergleich daneben (b.) schraffiert die Bereiche der höchsten mittleren CD8-Dichte. Dies veranschaulicht die Parallelität zwischen besonderer BBB-Konfiguration und Lymphozyten-Präsenz im ZNS.

Die These der Blut-Hirn-Schranken-Assoziation der Immunüberwachung wird so durch das vermehrte Auftreten von T-Lymphozyten in ventralen Arealen der MO nicht unterminiert. Im Gegenteil, sie wird im Hinblick auf das oben Gesagte untermauert.

#### 4.1.3 Assoziation mit dem Alter

Am Rande solle hier Erwähnung finden, dass unter den untersuchten Einflusskriterien das Patientenalter eine geringfügig inverse Korrelation mit lymphozytärer Präsenz im ZNS aufwies. D.h., Patienten höheren Alters zeigten tendenziell einen geringeren Grad an Immunüberwachung auf als jüngere. Ob die mit höherem Alter gemeinhin angenommene reduzierte Funktionsfähigkeit des Immunsystems dieses Phänomen zu erklären in der Lage ist, sei dahin gestellt. Es sei jedoch erwähnt, dass – wenngleich bisher nicht publiziert – am Institut für Hirnforschung, Tübingen, im Laufe der Jahre die Beobachtung angestellt wurde, dass sich unpathologische Liquores jüngerer Patienten überzufällig mit höheren Zellzahlen präsentieren als solche älterer. Ob sich dieser Zusammenhang mit statistischer Signifikanz erhärten lässt, muss noch geklärt werden. Interessant wäre die Parallele zum in dieser Studie erhobenen Befund.

## 4.2 TYP DER IMMUNÜBERWACHENDEN LYMPHOZYTEN

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, näher zu klassifizieren, welche Lymphozyten-Subtypen an der Immunüberwachung des humanen Gehirns maßgeblich beteiligt sind. In bisherigen zur zentralnervösen Immunüberwachung publizierten Studien schien der genaue Lymphozyten-Subtyp, der das immunologische Screening de facto vollzieht, von untergeordnetem Interesse zu sein. In seiner viel zitierten, wegweisenden Arbeit zur Immunüberwachung konzentrierte sich William F. Hickey vor allem auf Herkunft und Aktivierungszustand der Lymphozyten (Hickey et al, 1991). Richard M. Ransohoff, der sich in seinem Review auf die lymphozytären Zugangswege konzentrierte, erwähnte fast nebensächlich die Oberflächenmarker der Lymphozyten und ließ nur sachte die Idee aufkeimen,  $CD4^+$ -Gedächtniszellen könnten immunüberwachende Funktionen einnehmen (Ransohoff et al., 2003). Erst in den vergangenen Jahren rückten die genauen Oberflächeneigenschaften der immunüberwachenden Zellen in den Fokus wissenschaftlichen Interesses. Die ganz überwiegende Mehrheit der Ergebnisse dieser Publikationen stammt aus Tiermodellen. Die vorliegende Studie widmet sich der Situation im gesunden menschlichen Gehirn, ohne dabei die Entdeckungen anderer Studien an Tiermodellen aus den Augen zu verlieren.

### 4.2.1 Wer überwacht das menschliche Gehirn?

Die Lymphozyten, die in der vorliegenden Arbeit im gesunden, humanen ZNS gefunden wurden, exprimierten vor allem CD8, CD3 und in geringem Maße CD20. CD4 konnte nicht nachgewiesen werden, was sich mit den Ergebnissen der Arbeit von Mittelbronn und Kollegen deckt (Mittelbronn et al., 2001). Ebenso wenig konnten im ZNS Signale für Granzym B detektiert werden. Aus diesen Informationen lassen sich Schlussfolgerungen über den Subtyp der immunüberwachenden Lymphozyten-Spezies ziehen.

Zunächst sei an dieser Stelle daran erinnert, dass die Tatsache CD8-, CD3- und CD20-positive Lymphozyten nachgewiesen zu haben, nicht zwangsläufig bedeutet, dass damit

drei separat nebeneinander existierende Lymphozyten-Subpopulationen beschrieben werden dürfen.

CD20 identifiziert eindeutig B-Zellen, also eine klar von CD8- und CD3-positiven Lymphozyten (welche in jedem Fall T-Zellen repräsentieren) getrennte Spezies an Immunzellen, da diese qua Funktion keinen TZR besitzen und auch keine Interaktion mit MHC-Molekülen betreiben. Angesichts der geringen Zahlen der hier gefundenen B-Zellen, kann formuliert werden, dass B-Zellen im Vergleich zu T-Zellen eine untergeordnete Rolle im Rahmen der Immunüberwachung des menschlichen ZNS einnehmen. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen von Hickey: Er stellte fest, dass B-Zellen zwar grundsätzlich die Fähigkeit besitzen, das nicht-pathologische ZNS zu betreten, dies aber nur in geringem Maße tun (Hickey et al., 2001). Die Bedeutung B-zellulärer Präsenz im ZNS scheint vornehmlich an dort vorhandene Antigene gebunden zu sein. Erst in einem solchen Fall übertreten sie in größerer Anzahl die BBB, expandieren klonal, differenzieren zu Plasmazellen und produzieren große Mengen an Immunglobulin G, welche sich schließlich diagnostisch als oligoklonale Banden im Liquor manifestieren (Knopf et al., 1998). Die niedrigen Zahlen CD20<sup>+</sup>-Lymphozyten der vorliegende Studie liefern Hinweise darauf, dass die beschriebenen Verhältnisse der Situation im humanen Gehirn ähneln. Darüber hinaus zeigt dies einmal mehr, dass im hier untersuchten Gewebe keine oder zumindest nur eine vernachlässigbar geringe Menge Antigene präsentiert werden, was ein weiteres Indiz dafür ist, dass die im humanen Gehirn gefundenen Lymphozyten nicht im Zusammenhang mit Inflammation auftreten.

Die CD3/CD8-Doppelfärbung zeigte uns, dass zu einem gewissen Prozentsatz CD3 und CD8 koexprimiert werden. Diese Beobachtung ist konkordant mit der bekannten Funktion von CD3 als Korezeptor des T-Zell-Rezeptors (TZR) (Tsoukas et al., 1985; Law et al., 2002). Das CD3-Molekül alleine ist nicht zur Differenzierung zwischen den klassischen T-Zell-Typen, T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen, geeignet, besitzen doch beide TZRs, die jeweils mit dem gleichen CD3 assoziiert sind.

Festzuhalten ist, dass in allen untersuchten ZNS-Regionen CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten die prädominante Lymphozyten-Subpopulation darstellten. Dies galt sowohl für die Gruppe der perivaskulär als auch für die der parenchymal gelegenen. In anderen neuroimmunologischen Arbeiten zur Immunüberwachung des ZNS wurden mitunter

Beobachtungen angestellt, die diese Ergebnisse unterstützen: Am gesunden menschlichen Rückenmark ein ähnliches, von CD8 dominiertes Bild zeigen Schleich et al. (2004). Bradl et al. demonstrierten für das gesunde Rückenmark von Ratten ebenfalls das Vorherrschen CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten (Bradl et al., 2005). Masopust beschrieb die postinfektiöse Auswanderung CD8-positiver in nicht-lymphatisches Gewebe (Masopust et al., 2004).

Aufgrund des oben erwähnten Nachweises der partiellen Koexpressivität von CD3 und CD8 ist der Immunphänotyp der hier beobachteten Zellen als CD3<sup>(+)</sup>/CD8<sup>+</sup> zu bezeichnen, welcher die beiden Gruppen CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> und CD3<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup> umfasst. Bedenkt man, dass keinem der gefundenen Lymphozyten Granzym B nachzuweisen war, ist die Bezeichnung als CD3<sup>(+)</sup>/CD8<sup>+</sup>/Granzym B<sup>-</sup> zu erweitern.

Es stellt sich folgerichtig die Frage nach dem Funktionstyp, der sich hinter den gefundenen CD8-positiven verbirgt. Dieser Frage wird in den Kapiteln 4.2.2 bzw. 4.2.3. weiter nachgegangen.

Darüber hinaus zeigten sich in der Doppelfärbung CD3<sup>+</sup>-Zellen *ohne* ein gleichzeitiges CD8-Signal. Vor dem Hintergrund der festgestellten CD4-Negativität der gefundenen Immunzellen, kann ein dritter Subtyp an immunüberwachenden Lymphozyten festgehalten und als CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>/Granzym B<sup>-</sup> beschrieben werden (wobei „Granzym B<sup>-</sup>“ in diesem Fall eine redundante Information ist, da das Vorhandensein von Granzym B stets an CD8-Positivität gekoppelt ist). Beide Typen sollen im Folgenden Gegenstand der Diskussion sein.

#### 4.2.2 Immunzellen vom Typ CD3<sup>(+)</sup>/CD8<sup>+</sup>/Granzym B<sup>-</sup>

Nach heutigem Kenntnisstand sind sowohl auf zytotoxischen T-Zellen, T-Gedächtniszellen (Masopust et al., 2004), als auch auf möglicherweise vorhandenen T-Suppressorzellen (Chess und Jiang, 2004) CD8-Oberflächenmoleküle vorhanden. Nachweislich waren alle gefundenen Lymphozyten der vorliegenden Arbeit Granzym B-negativ. Da Granzym B obligater Bestandteil lysierender Granula zytotoxischer T-Zellen ist, ist es evident, dass es sich bei den immunüberwachenden T-Zellen nicht um zytotoxische T-Zellen handelt.

In der Literatur gibt es verschiedene Hinweise auf den in Frage kommenden Funktionstyp, der sich hinter den CD8-positiven verbergen kann. Masopust et al. beobachteten an Mäusen, dass CD8<sup>+</sup>-Gedächtniszellen nach induzierter Rota- bzw. Sendaivirus-Infektion in alle nicht-lymphatischen Gewebe, einschließlich des Gehirns, auswanderten und dies obwohl der eigentliche Infektionsort keinem dieser Organe entsprach (Masopust et al., 2004). Masopust diskutierte, ob dieses Phänomen im Sinne einer postinfektiösen immunologischen Kontrolle aller Organe zu verstehen sei. Eine Art Immunüberwachung bei erhöhter Alarmstufe? Es ist nicht bekannt, ob jede Infektion, die mit der Bildung von Gedächtniszellen einhergeht, eine Auswanderung CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten in das Gehirn nach sich zieht. Es gibt allerdings derzeit auch keinen Anlass, das Gegenteil zu glauben. Seit Hickey wissen wir, dass aktivierte Lymphozyten grundsätzlich Zugang zum ZNS erhalten, warum also nicht auch Gedächtniszellen? Folgerichtig muss in Betracht gezogen werden, dass auch eine Infektion außerhalb des ZNS die Lymphozytenzahlen im ZNS zu erhöhen vermag. In der vorliegenden Studie wurde dem exemplarisch anhand von drei Fällen, die präterminal klinisch eine Sepsis aufwiesen, nachgegangen. Keiner dieser Fälle zeigte jedoch im Vergleich zur nicht-septischen Gruppe einen erhöhten Grad lymphozytärer Immunüberwachung. Umgekehrt, betrachtet man die fünf (nicht-septischen) Fälle mit den höchsten CD8-Werten (siehe Tabelle 4) und vergleicht man diese mit vorliegenden Informationen aus den klinischen Berichten über die entsprechenden Patienten, muss man feststellen, dass nur in einem einzigen Fall, nämlich in dem der Myokarditis, eine entzündliche Erkrankung nachzuweisen war und dass bei den übrigen weder eine Infektionskrankheit zum Tode geführt, noch präterminal eine solche vorgelegen hat.

*Tab. 4: Die 5 Fälle mit dem höchsten Vorkommen CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten.*

Nr.	Geschlecht	Alter	CD8*	Todesursache
5	w	26	11,64	Akutes Linksherzversagen bei Myokarditis
7	m	25	11,78	Hämorrhagischer Schock bei rezidivierender Ulkusblutung
11	m	44	15,03	Myokardiale Ischämie
12	m	22	22,18	Vena-Cava-Ruptur nach Verkehrsunfall
17	w	39	21,96	Leberausfallskoma bei Leberkarzinom

\*angegeben ist die durchschnittliche Zahl CD8-positiver Zellen pro 20 Zählfelder in der MO

Anhand des für diese Arbeit zur Verfügung stehenden Patientenkollektivs ergibt sich kein Anhalt für eine mit entzündlichen Erkrankungen assoziierte Immunüberwachung des menschlichen Gehirns. Daher liegen auch keine Indizien vor, dass es sich bei den beobachteten CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten um postinfektiös auftretende Gedächtniszellen – wie sie von Masopust et al. bei Mäusen beschrieben wurden – handelt.

Im Zuge sich häufender Indizien und im Rahmen eines stets wachsenden und sich verbessernden Verständnisses immunologischer Prozesse und Komponenten, ist in den vergangenen Jahren die Suche nach Immunabläuferegulierenden und supprimierenden Mechanismen verstärkt worden. Bei der Erforschung von Ursachen und Entstehung autoimmuner Prozesse, ist man derzeit bemüht, dem Terminus „Immuntoleranz“ ein konkretes zelluläres Gesicht zu verleihen. Die Diskussion um CD8<sup>+</sup>-Suppressorzellen ist – nach der großen Abstinenz während der 80er Jahre – in den vergangenen Jahren wieder aufgeflammt; soweit gehend, dass Chess und Jiang von der „Wiedergeburt“ der CD8<sup>+</sup>-Suppressorzellen sprachen (Chess und Jiang, 2004).

An Mäusen wurde *in vivo* nachgewiesen, dass aktivierte B-Zellen mittels des Peptids Qa-1 (beim Menschen: HLA-E) CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten zu immunsupprimierender Aktivität zu stimulieren im Stande waren (Noble et al., 1998). Hierzu wurden nach Antigen-Applikation Antikörperspiegel im Serum von (CD8-)Knockout-Mäusen mit praktisch keinen CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten gemessen und mit dem Wildtyp verglichen. Die Knockout-Mäuse reagierten im Vergleich zu den Wildtyp-Exemplaren mit bis zu vierfach erhöhten Antikörpertitern. Die Erklärung von Noble et al.: Der Mangel an CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten hatte bei den Knockout-Mäusen eine reduzierte Immunregulation



und –suppression zur Folge, sodass hier höhere Antikörperspiegel produziert werden konnten. Die CD8-Zellen, die nach entsprechender Stimulation die immunhemmenden Effekte ausübten, zeigten keinerlei zytotoxische Aktivität und hätten folglich – obwohl von der Gruppe von Noble nicht explizit untersucht – den Phänotyp  $CD3^{(+)}/CD8^{+}/Granzym\ B^{-}$  gezeigt, der in dieser Arbeit beschriebene Subtyp!

Auch auf neuroimmunologischer Ebene finden sich Indizien für die Existenz einer  $CD8^{+}$ -Lymphozytenspezies, die imstande ist, Immunreaktionen mit potenziellem Schaden für das ZNS zu limitieren: Hu et al. zeigten eindrucksvoll die Folgen einer  $Qa-1$ -Defizienz bei Mäusen. Selbige wiesen eine erhöhte Suszeptibilität für EAE auf und entwickelten extreme CD4-Zell-vermittelte Reaktionen gegen eigene und Fremdproteine (Hu et al., 2004).

Derartige Untersuchungen belegen zum einen, dass – zumindest im Tiermodell – die Existenz eines regulativ supprimierenden Arms des Immunsystems unabdingbar ist. Wichtiger für die hiesige Fragestellung: Diese immunologische Funktion muss es (Hu et al. zu folgen) auch auf zentralnervöser Ebene geben, sodass spekuliert werden darf, ob die in der vorliegenden Arbeit gefundenen  $CD3^{+}/CD8^{+}/Granzym\ B^{-}$ -Lymphozyten Teil dieser regulativen Komponente des Immunsystems sein könnten.

#### 4.2.3 Immunkzellen vom Typ $CD3^{-}/CD8^{+}/Granzym\ B^{-}$

Warum aber sind nicht auf allen  $CD8^{+}$ -Zellen CD3-Moleküle nachzuweisen? Ausgehend vom oben Gesagten, müsste man annehmen dürfen, dass jede T-Zelle unabhängig von ihrer weiteren molekularen und funktionellen Subklassifikation ein dem TZR assoziiertes CD3 aufzuweisen habe. Und folgerichtig müssten die quantitativen Analysen CD3-positiver mindestens genauso hoch ausfallen wie die der  $CD8^{+}$ -Zellen. *CD3-negative* T-Zellen wurden bisher nur in T-Zell-Lymphomen beschrieben und fast immer konnte ihnen ein genetisches *Rearrangement* im CD3-Gen nachgewiesen werden (Picker et al., 1987; Robb et al., 1994).

An dieser Stelle sei auf eine Arbeit von Olson et al. hingewiesen. Sie analysierten Expressionsmuster und -dichte von Oberflächenmolekülen auf T-Lymphozyten gesunder Probanden und solcher mit T-Zell-Leukämien mithilfe fluoreszenz-aktivierter

Zellsortierung (FACS) und stellten dabei fest, dass das CD3-Oberflächenantigen keineswegs in konstanter Dichte auf den T-Zell-Subpopulationen exprimiert wird, sondern dass auf CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-Zellen die Dichte von CD3-Molekülen 1,7-fach höher ist als auf CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Zellen. Eine Korrelation zwischen der Zellgröße und der exprimierten CD3-Dichte gelang in diesem Fall nicht. Auch maßen Olson und Kollegen dieser Beobachtung keine immunologische Bedeutung zu (Olson et al., 2004). Allerdings liefert sie einen Erklärungsansatz für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen CD3<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup>-Zellen: Ausgehend davon, dass die CD3-Dichte auf CD8<sup>+</sup>-Zellen geringer ist, könnte angenommen werden, dass die beschriebenen Zellen mit ihren geringen Mengen an exprimiertem CD3 unter die Detektionsschwelle des eingesetzten monoklonalen CD3-Antikörpers fallen. Somit wäre die Beobachtung der CD3<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup>-Zellen falsch-negativ bezüglich CD3 und in Wahrheit verbärgen sich dahinter die oben bereits erwähnten CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Zellen.

Ein anderes Erklärungsmodell wäre, dass mit den beschriebenen CD3<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten eine Subpopulation von NK-Zellen detektiert wurde. Diese müsste dann allerdings zusätzlich CD56-positiv sein, was im Widerspruch zu den CD56-negativen Befunden im Rückenmark von Schleich et al. stehen würde (Schleich et al., 2004).

Schlussendlich kann mit den hier erhobenen Daten nicht sicher gesagt werden, welche funktionelle Lymphozytensubpopulation mit den CD3<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup>-Zellen erkannt wurde.

#### 4.2.4 Immunkzellen vom Typ CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>

Diese doppelt negativen T-Zellen wurden zum ersten Mal 1989 von Strober und Kollegen nachgewiesen (Strober et al., 1989). Diese bedingten seinerzeit einen Paradigmenwechsel. Bis dato bestand die weit verbreitete Annahme, dass periphere CD3<sup>+</sup> T-Zellen entweder CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> sein müssten. Die seither bekannten CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>, also doppelt negativen T-Zellen, besitzen regulatorische, immunsuppressive Funktion und werden daher in der Literatur als *DN Treg cells* (double-negative T regulatory cells; hier im Weiteren als *DN T-Zellen* geführt) bezeichnet. Sie sind in der Lage, MHC-Peptidkomplexe von APCs zu akquirieren und – auf dieselbe Weise wie APCs – mit Effektor-T-Zellen (zum Beispiel einer CD8<sup>+</sup>

zytotoxischen T-Zelle) zu interagieren. Erfolgt eine positive Bindung zwischen DN T-Zelle und dem TZR der Effektor-T-Zelle, induziert erstere via *Fas/Fas-Ligand* eine Kaskade in der Effektor-T-Zelle, die zu ihrer Apoptose und damit also zu ihrem physiologisch eingeleiteten Untergang führt (Zhang et al., 2000; Chen et al., 2004). Jüngst konnte gezeigt werden, dass der  $CD3^+/CD4^-/CD8^-$  regulatorische T-Zelltyp natürlicherweise im humanen Gefäßsystem zirkuliert und zwischen 1 und 3% aller peripheren  $CD3^+$ -T-Zellen ausmacht (Fischer et al., 2005). Letzteres ist entscheidend im Rahmen der Immunüberwachung des Gehirns, denn: Allen in Kapitel 1.2.5 aufgezeigten Zugangswegen zum ZNS ist gemein, dass das ZNS patrouillierende Zellen stets an irgendeiner Stelle das Blutgefäßsystem verlassen müssen. Im Umkehrschluss bedeutet das, dass alle im Blut zirkulierende Immunzellen potenzielle Kandidaten sind, das gesunde menschliche Gehirn zu überwachen. Das schließt folglich auch die DN T-Zellen ein!

### 4.3 WARUM IMMUNÜBERWACHUNG?

#### 4.3.1 Ist Immunüberwachung gleichbedeutend mit Immunsuppression auf neuronaler Ebene?

Das unter 4.2 Angeführte unterstreicht stark die immunregulierende Note, die der Immunüberwachung als Gesamtphänomen unterstellt werden kann. Diese Diskussion hat jedoch erst dann ihre Existenzberechtigung, wenn man die Sinnhaftigkeit und Notwendigkeit eines oder mehrerer immunregulierender Mechanismen in ZNS-Kompartimenten anerkennt. Muss das menschliche Gehirn vor dem körpereigenen Immunsystem geschützt werden?

Zuallererst sei darauf aufmerksam gemacht, dass seit langem bekannt ist, dass sich das Gehirn aktiv vor den Schaden bringenden Folgen inflammatorischer Prozesse zu schützen im Stande ist. Die Arbeitsgruppe um Flügel konnte mit immunhistochemischen Methoden zeigen, dass Neurone *in vitro* in Anwesenheit enzephalitogener T-Zellen, d.h. T-Zellen, die in das ZNS-Parenchym zu emigrieren in der Lage waren, den oben bereits erwähnten Apoptose-Induktor *FasL* produzierten. Blockierende Antikörper gegen *FasL* erhöhten dabei die Überlebenszeit ausgewanderter Lymphozyten (Flügel et al., 2000). Hier ist der Schutz des Gehirns keine Leistung des Immunsystems, sondern des Gehirns selbst.

In der vorliegenden Arbeit werden nicht-zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen und DN T-Zellen als zelluläre Exekutive der Immunüberwachung beschrieben. Letzteren wurden mehrfach immunsuppressive Effekte nachgewiesen: Die Untersuchungen von Young et al. zielten darauf ab, den Einfluss von DN T-Zellen auf sogenannte *Graft-versus-Host*-(*GvH*-)Reaktionen an Mäusen zu messen. Es zeigte sich, dass die Tiere, die vor Transplantation eine Infusion von DN T-Zellen des Spendertiers erhalten hatten, später deutlich seltener, bzw. weniger intensive *GvH*-Reaktionen erlitten. Auch wurden Haut- und Herztransplantate von den Empfängern besser akzeptiert, nachdem sie DN T-Zellen von den jeweils entsprechenden Spendertieren transfundiert bekommen hatten. Diese Spender spezifische Toleranz wird durch die Fähigkeit der DN T-Zellen vermittelt, selektiv aktivierte CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten apoptotisch zu zerstören und somit Immunreaktionen zu unterbinden (Young et al., 2003).

Läuft das menschliche Gehirn denn permanent Gefahr, Opfer einer *Host-versus-Brain*-Reaktion zu werden? – Ja und nein. Natürlich geht man davon aus, dass ein gesundes, funktionierendes Immunsystem nicht in jeder Lebensminute darauf aus ist, das ZNS anzugreifen und so letztendlich zum Urheber seines eigenen Untergangs zu werden. Die größte Gefahr für den Organismus, die vom körpereigenen Immunsystem ausgeht, jedoch ist die tickende Zeitbombe der Autoimmunität, deren multifaktorieller Entstehung gänzlich zu verstehen die Medizin heute immer noch weit entfernt ist. Für die Entstehungsprozesse neurologischer Erkrankungen mit inflammatorischer Genese werden Theorien diskutiert, die sich mit dem Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Komponenten auseinandersetzen. Bei Multipler Sklerose sind möglicherweise antiinflammatorische, T-Zellen hemmende Mechanismen defizient oder fälschlicherweise inhibiert, sodass es zu einem massiven autoimmunen Angriff auf zerebrales Myelin kommen kann (diskutiert von Comi et al., 2006). Zum Formenkreis der über Jahre und Jahrzehnte verlaufenden Multiplen Sklerose gehören auch akute Krankheitsbilder wie die akute demyelinisierende Enzephalomyelitis (ADEM) oder der foudroyant verlaufende M. Hurst, die akute hämorrhagische Enzephalomyelitis. Beiden gemein ist nicht nur ihr meist letaler Ausgang, sondern auch ihre immunologische, post-infektiöse (Mumps, Masern, Herpesviren, u.a.) oder post-vakzinale (Rabies, Influenza, u.a.) Genese (Garg, 2003). D.h., die oben genannten Fehlsteuerungen immunologischer Prozesse sind in der Lage, akute, verheerende Krankheitsbilder hervorzurufen, die unmittelbar zum Tode führen können. Dies unterstreicht ihre klinische Bedeutung und die Wichtigkeit des heiklen Gleichgewichts inflammatorischer und antiinflammatorischer Komponenten des Immunsystems. Auch mit degenerativen Erkrankungen wie M. Alzheimer werden fehlgesteuerte bzw. überschießende Immunreaktionen in Verbindung gebracht (Shepherd et al., 2005). Derartige Indizien sprechen eine klare Sprache: Das Gehirn benötigt Einrichtungen, die es vor den potenziellen Auswirkungen des Immunsystems bis zu einem gewissen Grad zu schützen vermögen. Diese stellt es zum Teil selbst her (*FasL* produzierende Neurone), zum Teil sind es regulatorische T-Zellen des Immunsystems, die diesen Schutz gewährleisten. Und natürlich muss dieser Schutz präventiv, also im *gesunden* Gehirn greifen!

Eine der bedeutendsten protektiven Errungenschaften des menschlichen Gehirns wurde bisher – obwohl zentraler Gegenstand dieser Studie – noch nicht erwähnt: die Blut-Hirn-Schranke. In Kapitel 1.2.4 wurden die Abläufe, die es bedarf, dass Lymphozyten das Gehirn überhaupt erreichen, angerissen. Dieses komplexe Gefüge aus (niedrig exprimierten!) Adhäsionsmolekülen, Oberflächenrezeptoren und molekularen Bindungsstellen (all das ist Emperipolesis und Diapedese weitgehend gemein) kann auch im Sinne einer protektiven Barriere vor destruktiver Inflammation gesehen werden. Die BBB ist dabei gleichzeitig die Regulationsschaltstelle, der Zugangsregulator für ins ZNS einwandernde Lymphozyten. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen, nämlich der hochsignifikante Dichteunterschied zwischen Immunüberwachung im Kortex und in Regionen des Hirnstamms sind hier ein weiteres Indiz.

#### 4.3.2 Einfluss der Präsenz von Immunzellen auf Neurone

In Anbetracht der bis heute erworbenen Erkenntnisse über zellvermittelte Immunreaktionen muss das Konzept der Immunüberwachung als mehr als nur Immunregulation auf neuronaler Ebene angesehen werden. So verheerend die Folgen der Inflammation in ihrer Radikalität auch sein mögen, die Präsenz von Lymphozyten hat nachgewiesenermaßen auch unmittelbar positive Effekte auf zerebrale Neurone, was der Immunüberwachung eine neue Facette verleiht.

Mehrere publizierte Untersuchungen weisen auf den neuroprotektiven, ja sogar remyelinisierenden Effekt der Inflammation hin: Bieber und Kollegen induzierten demyelinisierende Prozesse an Mäusen mittels Lysolecithin. Ein Lysolecithin vermittelter Myelinverlust ist bei Mäusen bekanntlich nach spätestens 35 Tagen vollständig reversibel. Bieber et al. stellten fest, dass bei Mäusen, die genetisch keine CD4- oder CD8-positiven Lymphozyten produzieren konnten, die erwartete Remyelinisierung auch nach 60 Tagen nicht eintrat. Auch bei Gabe von Anti-CD4- bzw. Anti-CD8-Antikörpern konnte der regenerative Myelinaufbau signifikant gehemmt werden (Bieber et al., 2003). Mit anderen Worten: Ins ZNS abgewanderte T-Zellen

waren bei der Kontrollgruppe der Studie von Bieber in ganz entscheidender Weise an der Regeneration des Myelins zerebraler Axone beteiligt.

Auch wurde ermittelt, dass aktivierte T- und B-Zellen, einmal im ZNS-Milieu angelangt, den neurotrophen Gewebefaktor BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) ausschütten. Dieser wirkt lokal auf die Neurone in protektiver Weise, indem er posttraumatischen neuronalen Abbau verhindert (Kerschensteiner et al. 1999).

Diese Beispiele sollen repräsentativ für zahllose Belege in der Literatur stehen, dass immunologische Präsenz auch präventiv protektive Effekte hat. Das bedeutet im Umkehrschluss, dass die Immunzellen, die zur Immunüberwachung das ZNS betreten, ähnliche Schutzeffekte besitzen und eine Art Wartung zerebraler Neurone betreiben könnten.

Hat man erst einmal Immunüberwachung als ein Präventiv- und Protektionsmedium des ZNS verstanden, so sieht man die in der vorliegenden Arbeit gefundene BBB-assoziierte Verteilung der immunüberwachenden Zellen in neuem Lichte: Möglicherweise sind die im gesunden ZNS auffindbaren Lymphozyten als Teil des weit gefassten Konzeptes Blut-Hirn-Schranke zu verstehen. Rollen wir die Komplexität dieser höchst diffizilen Einrichtung des Gehirns noch einmal kurz auf: Wie in Kapitel 1.3 ausführlich dargelegt, darf die BBB bei weitem nicht auf die An- oder Abwesenheit von TJs reduziert werden. Zur BBB gehören auch Perizyten und Astrozytenendfüße, asymmetrisch angeordnete, selektive Transportproteine, eine reduzierte transzytotische Aktivität der Gefäßendothelzellen und metabolisierende, biotransformatorische Enzyme. All diese Einrichtungen sorgen auf ihre jeweilige spezielle Art und Weise dafür, dass eine Barriere – eine Schranke eben! – zwischen Blut- und ZNS-Milieu errichtet wird. Darüber hinaus wurde mehrfach dargelegt, dass unterschiedliche Hirnareale unterschiedliche Bedürfnisse bezüglich im Blut herantransportierter Substanzen haben. Die Folge ist eine entsprechend unterschiedlich konfigurierte BBB, wie am Beispiel der CVO (und wahrscheinlich gilt Selbiges auch für die ventrale MO) deutlich gemacht wurde. Hier prägen die Gehirngefäße deutlich weniger TJs aus. Ist damit jedoch die Schranke weniger effektiv? Erlaubt es sich das menschliche Gehirn, nachdem es seine am höchsten entwickelte Errungenschaft, den Neokortex, mit dichten TJs verriegelt hat, Stellen im Hirnstamm und um den dritten Ventrikel herum ungeschützt und vulnerabel zu lassen? – Nein. Wir haben bereits in Kapitel 1.3.5

metabolisierende Enzyme im Bereich der CVO erwähnt, die hier ausgleichend vermehrt exprimierten sind, um den fehlenden Schutz durch TJs zu kompensieren. Und jetzt wurde in der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass in eben diesen Bereichen die lymphozytäre Präsenz im Vergleich zu kortikalen Regionen um ein vielfaches erhöht ist; so, als würde das Immunsystem seine Wächter an eben den Stellen besonders vermehrt positionieren, an denen das Gehirn besonders angreifbar und vulnerabel ist. Möglicherweise bedeuten herabregulierte TJs ein Sicherheitsrisiko. Aber das Immunsystem tritt kompensierend auf und nivelliert die scheinbare Lücke in der Schranke und wird damit Teil dieser.

#### 4.3.3 Immunüberwachung – ein Zufallsphänomen?

Auch wenn die Existenz der immunologischen Routineüberwachung des ZNS heute weitestgehend anerkannt ist, könnte immer noch argumentiert werden, dass es sich bei den im ZNS detektierbaren Lymphozyten um zufällig vorhandene Immunzellen handelt, die entsprechend ihrer Natur die in geringen Mengen exprimierten Adhäsionsmoleküle der zerebralen Gefäßendothelzellen nutzen, um das Blutssystem zu verlassen und dann eben zufällig im ZNS landen, ohne dort spezifischen Aufgaben nachzukommen.

Die Behauptung jedoch ist mehrfach widerlegbar: Das Spektrum der gefundenen Immunzellen ist zu spezifisch, als dass Zufälligkeit unterstellt werden könnte. In der vorliegenden Studie werden vor allem CD8-positive (also CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> und CD3<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup>) und doppelt negative T-Zellen beschrieben. Beiden Gruppen können der Literatur folgend immunregulatorische Funktionen nachgewiesen werden. Wenn also die Präsenz von Immunzellen im ZNS ein Zufall ist, wie ist dann die überzufällige Häufung regulatorischer T-Zellen zu erklären? Fände man ein „buntes Bild“ immunologischer Zellen im ZNS, die sich proportional zu den in der Zirkulation befindlichen Mengen verhielten, wäre man geneigt von Zufall zu sprechen. Das Gegenteil jedoch ist der Fall: T-Helfer- und zytotoxische Zellen konnten in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden, Schleich et al. detektierten praktisch keine NK-Zellen im gesunden menschlichen Rückenmark (Schleich et al., 2004) und Leukozyten aus der polymorph-nukleären Zellreihe (Granulozyten) sind nicht im gesunden ZNS



anzutreffen. Die Arbeitsgruppe um Bradl bestätigte an Ratten, dass im Gesunden die extrem niedrigen Zahlen  $CD4^+$ -Zellen erst bei Inflammation oder degenerativen Prozessen in die Höhe schnellten (Bradl et al., 2005). Carrithers et al. demonstriert das unterschiedliche Muster vaskulärer Adhäsionsmoleküle bei Immunüberwachung und Inflammation (Carrithers et al., 2000). All das lässt auf spezifische Mechanismen des Gehirns schließen, die in einem bestimmten Zustand einer bestimmten Zellpopulation Zugang gewähren. Zellulären Blutbestandteilen obliegen also strikten Zugangsbedingungen in Form von spezifischen Mechanismen und spezifischen Zugangsorten, wie diese Arbeit zeigt. So deutet alles darauf hin, dass Immunüberwachung kein Zufall ist!

#### 4.4 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Als wichtigste Schlussfolgerungen dieser Arbeit sind zu nennen:

- 1) Vergleicht man kortikale mit metenzephalen Regionen zeigt sich für die Dichte von CD3- und CD8-positiven Lymphozyten eine hochsignifikante Blut-Hirn-Schranken-Abhängigkeit. Dabei unterliegen kortikale Areale einer geringeren immunologischen Überwachung als metenzephal.
- 2) Bei Regionen innerhalb des Hirnstamms zeigen sich zwischen der ventralen Seite im Vergleich zur dorsalen hochsignifikant mehr Lymphozyten. Dies lässt sich mit Dahlströms und Fuxes erstmalig beschriebenen, Katecholamine produzierenden Neuronengruppen erklären, die möglicherweise ein den CVO ähnliche BBB-Konfiguration aufweisen.
- 3) CD8 ist bei perivaskulären und parenchymalen Lymphozyten im VC wie in AP und MO der prädominant exprimierte Marker.
- 4) Aufgrund von partieller Koexpression von CD3 und CD8 müssen als immunüberwachende Zelltypen sowohl Lymphozyten vom Typ  $CD3^+/CD8^+/Granzym\ B^-$ ,  $CD3^-/CD8^+/Granzym\ B^-$ , als auch solche vom Typ  $CD3^+/CD4^-/CD8^-$  in Betracht gezogen werden.  
Im Hinblick auf die Funktion dieser Zelltypen müssen Immunregulation und Neuroprotektion in Betracht gezogen werden.
- 5) T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen sind nicht an der Immunüberwachung des menschlichen Gehirns beteiligt.
- 6)  $CD20^+$ -Lymphozyten, also B-Zellen, sind nur in sehr geringem Maße an der Immunüberwachung beteiligt. Ihr Auftreten ist nicht mit der Blut-Hirn-Schranke assoziiert.

- 7) Mit zunehmendem Alter nimmt der Grad der Immunüberwachung geringfügig ab.
- 8) Die Immunüberwachung ist nicht mit der lokalen Mikroglia-Dichte assoziiert.
- 9) Den Faktoren „Geschlecht“ und „Sepsis“ kann keine Assoziation mit der Immunüberwachung nachgewiesen werden.

#### 4.5 AUSBLICK

Die vorliegende Studie wirft einige neue Fragen auf, deren Klärung in weiteren Studien anzustreben ist.

- 1) Wie stellt sich die Immunüberwachung in anderen ZNS-Arealen, v.a. in weiteren kortikalen Arealen und den übrigen zirkumventrikulären Organen dar? Wird es gelingen, eine Art Landkarte der Immunüberwachung für das ZNS zu erstellen?
- 2) Welche genauen Funktionen kommen den immunüberwachenden Lymphozyten zu? Können ihnen auch beim Menschen immunregulatorische bzw. immunsuppressive Mechanismen nachgewiesen werden?
- 3) Welche Interaktionen bestehen zwischen den immunüberwachenden Lymphozyten und ortständigen Neuronen?
- 4) Welche weiteren, Immunüberwachung regulierenden Faktoren existieren?
- 5) Welche Konsequenzen entstehen im Tiermodell, wenn durch experimentelle Modifikation (z.B. Knockout-Mäuse) Immunüberwachung verhindert wird?
- 6) Auf welche anderen zentralnervösen Mechanismen und Funktionen hat die Blut-Hirn-Schranke einen Einfluss? Ist ihr als zentrale Regulationseinheit des stofflichen und zellulären Austausches des ZNS in Zukunft möglicherweise eine tragende Rolle bei der Pathogenese neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen zuzuschreiben?
- 7) Gelingt es in Zukunft beim Menschen durch gezielte medikamentöse Beeinflussung der BBB die immunologische Präsenz im ZNS zu steuern, um so Krankheitsprozesse, die dort situiert sind, besser angehen oder verhindern zu können?

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Trotz der Tatsache, dass das Phänomen der routinemäßigen Patrouille des ZNS durch Lymphozyten seit nunmehr 15 Jahren anerkannt ist, hat es bisher nur wenige Arbeiten gegeben, die dies am menschlichen Gehirn untersuchten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob die Immunüberwachung des gesunden humanen Gehirns mit der jeweiligen Konfiguration der Blut-Hirn-Schranke unterschiedlicher Hirnareale assoziierbar ist. Außerdem standen die an der Immunüberwachung beteiligten zellulären Komponenten des Immunsystems im weiteren Fokus der Arbeit.

Dazu wurde ein Patientenkollektiv aus der Normalhirnbank des Instituts für Hirnforschung zusammengestellt. Als Regionen unterschiedlicher BBB-Konfiguration wurden visueller Kortex, Medulla oblongata (ohne Area postrema) und die Area postrema selbst, als Teil der zirkumventrikulären Organe, gewählt, histologische Schnitte angefertigt und mit immunhistochemischen Methoden gefärbt.

Dabei zeigte sich, dass die Präsenz von Immunzellen im visuellen Kortex hochsignifikant geringer ausfiel als in den Hirnstammarealen. Hier konnten zunächst keine signifikanten Unterschiede zwischen Area postrema und der übrigen Medulla oblongata festgestellt werden. Erst nach Auswertung der CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten unter räumlich-anatomischen Gesichtspunkten war ersichtlich, dass die ventrale MO hochsignifikant mehr Lymphozyten enthielt als die AP und dorsale MO.

Die in allen Regionen prädominant exprimierten Marker waren CD8 und CD3. CD20 war in nur sehr geringen Mengen, CD4 und Granzym B gar nicht nachweisbar. Eine CD3/CD8-Doppelfärbung konnte zeigen, dass CD3 und CD8 nur teilweise koexprimiert werden und dass neben CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>- auch CD3<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup>- ebenso wie CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>-Zellen im gesunden menschlichen Gehirn anzutreffen sind. MHC-II-Expression war in allen untersuchten Geweben erwartungsgemäß darstellbar, zeigte aber keinerlei signifikante Korrelation mit irgendeinem der CD-Moleküle, was bedeutet, dass die Mikroglia in dieser Studie keine Einflussnahme auf den Grad der lymphozytären Immunüberwachung nachgewiesen werden konnte.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass eine Assoziation zwischen BBB und Immunüberwachung zu existieren scheint. Die Blut-Hirn-Schranke stellt offenbar eine entscheidende Determinante, ob eine Hirnregion weniger oder verstärkt immunologisch überwacht wird, dar. Der Kortex mit seiner BBB-Konfiguration, die Neuroprotektion und Homöostase in den Vordergrund stellt, unterliegt nur spärlich dem immunologischen Screening der Lymphozyten. Die AP, als Teil der zirkumventrikulären Organe mit einer kommunizierenden, durchlässigeren BBB, ebenso wie die ventralen Anteile der MO mit ihren hormon-produzierenden Neuronengruppen sind durch starke immunologische Präsenz gekennzeichnet. Dies sind starke Indizien dafür, dass die Immunüberwachung beim Menschen Blut-Hirn-Schranken abhängig ist. Anderen Variablen wie der lokalen Mikroglia-Dichte oder klinisch diagnostizierter Sepsis konnten keine Einflussnahme auf die Lymphozytendichte im ZNS nachgewiesen werden. Einzig zeigte sich ein leicht abnehmender Immunüberwachungsgrad bei älteren Patienten.

Als Hauptakteure der zentralnervösen Immunüberwachung beim Menschen konnten in allen untersuchten Regionen  $CD3^+/CD8^+$  nicht-zytotoxische T-Zellen,  $CD3^-/CD8^+$ -Zellen sowie doppelt-negative,  $CD3^+$ -Zellen, die möglicherweise regulatorische DN T-Zellen darstellen, identifiziert werden. Alle drei Zelltypen implizieren, dass die Immunüberwachung mehr ist, als die Suche nach einem potentiellen Antigen in einem besonders kritischen Part des Organismus. Vielmehr zeigt sich hier der immun-regulatorische, neuroregenerative Charakter des Immunsystems, dessen klinische Bedeutung für immunmodulatorische Therapien von Autoimmunerkrankungen sowie in der Transplantationsmedizin der Zukunft – glaubt man der aktuellen Studienlage – viel größer und weitreichender ist, als wir derzeit gemeinhin zu ahnen wagen.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

1. von Andrian UH, M'Rini C: *In situ analysis of lymphocyte migration to lymph nodes.* (1998). *Cell Adhes Commun* 6(2-3):85-96.
2. Banks WA, Kastin AJ: *Peptides and the blood-brain barrier: lipophilicity as a predictor of permeability.* (1985). *Brain Res Bull* 15(3):287-92.
3. Barker CF, Billingham RE: *Immunological privileged sites.* (1977). *Adv Immunol* 25:1-6.
4. Belova I, Jonsson G: *Blood-brain barrier permeability and immobilization stress.* (1982). *Acta Physiol Scand* 116(1):21-9.
5. Bette M, Kaut O, Schafer MK, Weihe E: *Constitutive expression of p55TNFR mRNA and mitogen-specific up-regulation of TNF alpha and p75TNFR mRNA in mouse brain.* (2003). *J Comp Neurol* 465(3):417-30.
6. Bieber AJ, Kerr S, Rodriguez M: *Efficient central nervous system remyelination requires T cells.* (2003). *Ann Neurol* 53(5):680-4.
7. Bradl M, Bauer J, Flugel A, Wekerle H, Lassmann H: *Complementary contribution of CD4 and CD8 T lymphocytes to T-cell infiltration of the intact and the degenerative spinal cord.* (2005). *Am J Pathol* 166(5):1441-50.
8. Bratke K, Kuepper M, Bade B, Virchow JC Jr, Luttmann W: *Differential expression of human granzymes A, B, and K in natural killer cells and during CD8+ T cell differentiation in peripheral blood.* (2005) *Eur J Immunol* 35(9):2608-16.
9. Brightman MW: *The anatomic basis of the blood-brain barrier.* In: *Implications of the blood-brain barrier and its manipulation.* (1989). Vol. 1. Neuwelt E.A. (ed). Plenum Publishing Corp. New York. Pp 53-83.
10. Brightman MW, Reese TS: *Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain.* (1969). *J Cell Biol* 40(3):648-77.
11. Brizzee KR, Klara PM: *The structure of the mammalian area postrema.* (1984). *Fed Proc* 43(15):2944-8.
12. Brooks TA, Hawkins BT, Huber JD, Egleton RD, Davis TP: *Chronic inflammatory pain leads to increased blood-brain barrier permeability and tight junction protein alterations.* (2005). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(2):H738-43.

13. Bubien JK, Zhou LJ, Bell PD, Frizzell RA, Tedder TF: *Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca<sup>2+</sup> conductance found constitutively in B lymphocytes.* (1993). *J Cell Biol* 121(5):1121-32.
14. Bundgaard, M: *Ultrastructure of frog cerebral and pial microvessels and their impermeability to lanthanum ions.* (1982). *Brain Res* 241(1):57-65.
15. Busch AE, Karbach U, Miska D, Gorboulev V, Akhoundova A, Volk C, et. al. *Human neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2 which translocates monoamine neurotransmitters, amantadine, and memantine.* (1998). *Mol Pharmacol* 54:342-352.
16. Cancilla PA, Frommes SP, Kahn LE, DeBault LE: *Regeneration of cerebral microvessels: a morphologic and histochemical study after local freeze-injury.* (1979). *Lab Invest* 40(1):74-82.
17. Carrithers MD, Visintin I, Kang SJ, Janeway CA Jr.: *Differential adhesion molecule requirements for immune surveillance and inflammatory recruitment.* (2000). *Brain* 123 (Pt 6):1092-101.
18. Chakravarty S, Herkenham M: *Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines.* (2005). *J Neurosci* 25(7):1788-96.
19. Chan, S., Correia-Neves M, Benoist C, Mathis D. *CD4/CD8 lineage commitment: matching fate with competence.* (1998). *Immunol. Rev* 165:195.
20. Chen W, Ford MS, Young KJ, Zhang L: *The role and mechanisms of double negative regulatory T cells in the suppression of immune responses.* (2004). *Cell Mol Immunol* 1(5):328-35.
21. Chess L, Jiang H: *Resurrecting CD8+ suppressor T cells.* (2004). *Nat Immunol* 5(5):469-71.
22. Comi C, Gaviani P, Leone M, Ferretti M, Castelli L, Mesturini R, Ubezio G, Chiocchetti A, Osio M, Muscia F, Bogliun G, Corso G, Gavazzi A, Mariani C, Cantello R, Monaco F, Dianzani U: *Fas-mediated T-cell apoptosis is impaired in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.* (2006). *J Peripher Nerv Syst* 11(1):53-60
23. Cserr HF, Bundgaard M: *Blood-brain interfaces in vertebrates: a comparative approach.* (1984). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 246:R277-R288.
24. Crone C, Olesen, SP: *Electrical resistance of brain microvascular endothelium.* (1982). *Brain Res* 241(1):49-55.



25. Cuzner ML, Hayes GM, Newcombe J, Woodroffe MN: *The nature of inflammatory components during demyelination in multiple sclerosis. J Neuroimmunol.* (1988). 20(2-3):203-9.
26. Dahlström A, Fuxe K: *Localization of monoamines in the lower brain stem.* (1964). *Experientia* 20(7):398-9.
27. Daniels MA, Jameson SC: *Critical role for CD8 in T cell receptor binding and activation by peptide/major histocompatibility complex multimers.* (2000). *J Exp Med* 191(2):335-46.
28. Das Große Fremdwörterbuch: Herkunft und Bedeutung der Fremdwörter. (2003). Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich: Dudenverlag.
29. Dehouck MP, Vigne P, Torpier G, Breittmayer JP, Cecchelli R, Frelin C: *Endothelin-1 as a mediator of endothelial cell-pericyte interactions in bovine brain capillaries.* (1997). *J Cereb Blood Flow Metab* 17(4):464-9.
30. Ehrlich P: *Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus; eine farbanalytische Studie.* (1885). Hirschwald, Berlin.
31. el-Bacha RS, Minn A: *Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain Cell.* (1999). *Mol Biol (Noisy-le-grand)* 45(1):15-23.
32. Engelhardt B, Conley FK, Butcher EC: *Cell adhesion molecules on vessels during inflammation in the mouse central nervous system.* (1994). *J Neuroimmunol* 51(2):199-208.
33. Engelhardt B, Wolburg H: Mini-review: *Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house?* (2004). *Eur J Immunol* 34(11):2955-63.
34. Engelhardt B, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H: *Involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation.* (2001). *Microsc Res Tech* 52(1):112-29.
35. Eralinna JP, Soilu-Hanninen M, Roytta M, Hukkanen V, Salmi AA, Salonen R: *Blood-brain barrier breakdown and increased intercellular adhesion molecule (ICAM-1/CD54) expression after Semliki Forest (A7) virus infection facilitates the development of experimental allergic encephalomyelitis.* (1996). *J Neuroimmunol* 66(1-2):103-14.
36. Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W: *Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro.* (1998). *J Cell Biol* 140(4):947-59.

37. Farquhar MG, Palade GE: *Junctional complexes in various epithelia*. (1963). *Cell Biol* 17:375-412.
38. Fischer K, Voelkl S, Heymann J, Przybylski GK, Mondal K, Laumer M, Kunz-Schughart L, Schmidt CA, Andreesen R, Mackensen A: *Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8-double-negative regulatory T cells*. (2005). *Blood* 105(7):2828-35.
39. Flügel A, Schwaiger FW, Neumann H, Medana I, Willem M, Wekerle H, Kreutzberg GW, Graeber MB: *Neuronal FasL induces cell death of encephalitogenic T lymphocytes*. (2000). *Brain Pathol* 10(3):353-64.
40. Fujiwara H, Kikkawa Y, Sanzen N, Sekiguchi K: *Purification and characterization of human laminin-8. Laminin-8 stimulates cell adhesion and migration through alpha3beta1 and alpha6beta1 integrins*. (2001). *J Biol Chem* 276(20):17550-8.
41. Garg RK: *Acute disseminated encephalomyelitis*. (2003). *Postgrad Med J* 79(927):11-7.
42. Gerhart DZ, Enerson BE, Zhdankina OY, Leino RL, Drews LR: *Expression of monocarboxylate transporters MCT1 by brain endothelium and glia in adult and suckling rats*. (1997). *Am J Physiol (Lond)* 273:E207-E213.
43. Gross PM: *Circumventricular organ capillaries*. (1992). *Prog Brain Res* 91:219-33.
44. Groux H, Torpier G, Monte D, Mouton Y, Capron A, Ameisen JC: *Activation-induced death by apoptosis in CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals*. (1992). *J Exp Med* 175: 331-340.
45. Hamm S, Dehouck B, Kraus J, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H, Risau W, Cecchelli R, Engelhardt B, Dehouck MP: *Astrocyte mediated modulation of blood-brain barrier permeability does not correlate with a loss of tight junction proteins from the cellular contacts*. (2004). *Cell Tissue Res* 315(2):157-66.
46. Haseloff RF, Blasig IE, Bauer HC, Bauer H: *In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro*. (2005). *Cell Mol Neurobiol* 25(1):25-39.
47. Hawkins RA, Peterson DR, Vina JR: *The complementary membranes forming the blood-brain barrier*. (2002). *IUBMB Life* 54(3):101-7.
48. Hendel MD, Collister JP: *Sodium balance, arterial pressure, and the role of the subfornical organ during chronic changes in dietary salt*. (2005). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(1):H426-31.

49. Hickey WF: *Basic principals of immunological surveillance of the normal central nervous system.* (2001). *Glia* 36:118-124.
50. Hickey WF, Hsu BL, Kimura H: *T-lymphocyte entry into the central nervous system.* (1991). *J Neurosci Res* 28(2):254-60.
51. Hu D, Ikizawa K, Lu L, Sanchirico ME, Shinohara ML, Cantor H: *Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice.* (2004). *Nat Immunol* 5(5):516-23. Epub 2004 Apr 18.
52. Huber JD, Campos CR, Mark KS, Davis TP: *Alterations in blood-brain barrier ICAM-1 expression and brain microglial activation following {lambda}-carrageenan induced inflammatory pain.* (2005). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290(2):H732-40.
53. Huseby ES, White J, Crawford F, Vass T, Becker D, Pinilla C, Marrack P, Kappler JW: *How the T cell repertoire becomes peptide and MHC specific.* (2005). *Cell* 122(2):247-60.
54. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M: *Immunobiology. The immune system in health and disease.* (2005). 6<sup>th</sup> edition, Garland Science Publishing, New York, USA, S.6, S.90-91, S.214, S.220, S.731.
55. Johnson AK, Gross PM: *Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways.* (1993). *FASEB J* 7:678-686.
56. Johnston B, Chee A, Issekutz TB, Ugarova T, Fox-Robichaud A, Hickey MJ, Kubes P: *Alpha 4 integrin-dependent leukocyte recruitment does not require VCAM-1 in a chronic model of inflammation.* (2000). *J Immunol* 164(6):3337-44.
57. Kerfoot SM, Kubes P: *Overlapping roles of P-selectin and alpha 4 integrin to recruit leukocytes to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis.* (2002). *J Immunol* 169(2):1000-6.
58. Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle RL, Bartke I, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H, Hohlfeld R: *Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation?* (1999). *J Exp Med* 189(5):865-70.
59. Knopf PM, Harling-Berg CJ, Cserr HF, Basu D, Sirulnick EJ, Nolan SC, Park JT, Keir G, Thompson EJ, Hickey WF: *Antigen-dependent intrathecal antibody synthesis in the normal rat brain: tissue entry and local retention of antigen-specific B cells.* (1998). *J Immunol* 161(2):692-701.

60. Kramer RH, Bensch KG, Davison PM, Karasek MA: *Basal lamina formation by cultured microvascular endothelial cells.* (1984). *J Cell Biol* 99(2):692-8.
61. Krisch B, Leonhardt H, Buchheim W: *The functional and structural border between the CSF- and blood-milieu in the circumventricular organs (organum vasculosum laminae terminalis, subfornical organ, area postrema) of the rat.* (1978). *Cell Tissue Res* 195(3):485-97.
62. Kroczek R, Hamelmann E: *T-cell costimulatory molecules: optimal targets for the treatment of allergic airway disease with monoclonal antibodies.* (2005). *J Allergy Clin Immunol* 116(4):906-9.
63. Kwok LY, Miletic H, Lutjen S, Soltek S, Deckert M, Schluter D: *Protective immunosurveillance of the central nervous system by Listeria-specific CD4 and CD8 T cells in systemic listeriosis in the absence of intracerebral Listeria.* (2002). *J Immunol* 169(4):2010-9.
64. Law CL, Hayden-Ledbetter M, Buckwalter S, McNeill L, Nguyen H, Habecker P, Thorne BA, Dua R, Ledbetter JA: *Expression and characterization of recombinant soluble human CD3 molecules: presentation of antigenic epitopes defined on the native TCR-CD3 complex.* (2002). *Int Immunol* (4):389-400.
65. Lee SW, Kim WJ, Choi YK, Song HS, Son MJ, Gelman IH, Kim YJ, Kim KW: *SSECKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier.* (2003). *Nat Med* 9(7):900-6.
66. Lindstedt M, Johansson-Lindbom B, Borrebaeck CA: *Expression of CD137 (4-1BB) on human follicular dendritic cells.* (2003). *Scand J Immunol* 57(4):305.
67. MacLennan, IC: *Germinal centers.* (1994). *Annu Rev Immunol* 12:117.
68. Masopust D, Vezys V, Usherwood EJ, Cauley LS, Olson S, Marzo AL, Ward RL, Woodland DL, Lefrancois L: *Activated primary and memory CD8 T cells migrate to nonlymphoid tissues regardless of site of activation or tissue of origin.* (2004). *J Immunol* 172(8):4875-82.
69. McKinley MJ, Gerstberger R, Mathai ML, Oldfield BJ, Schmid H: *The lamina terminalis and its role in fluid and electrolyte homeostasis.* (1999). *J Clin Neurosci* 6(4):289-301.
70. McKinley MJ, McAllen RM, Davern P, Giles ME, Penschow J, Sunn N, Uschakov A, Oldfield BJ: *The sensory circumventricular organs of the mammalian brain.* (2003). *Adv Anat Embryol Cell Biol* 172:III-XII, 1-122, back cover.
71. Medawar, P.B: *The fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye.* (1948). *Br. J. Exp. Pathol* 29, 58-69.

72. Miller AD, Leslie RA: *The area postrema and vomiting*. (1994). *Front Neuroendocrinol* 15(4):301-20.
73. Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R: *Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude*. (2001). *Acta Neuropathol (Berl)* 101(3):249-55.
74. Morioka T, Baba T, Black KL, Streit WJ: *Inflammatory cell infiltrates vary in experimental primary and metastatic brain tumors*. (1992). *Neurosurgery* 30(6):891-6.
75. Nadler LM, Korsmeyer SJ, Anderson KC, Boyd AW, Slaughenhaupt B, Park E, Jensen J, Coral F, Mayer RJ, Sallan SE, et al: *B cell origin of non-T cell acute lymphoblastic leukemia. A model for discrete stages of neoplastic and normal pre-B cell differentiation*. (1984). *J Clin Invest* 74(2):332-40.
76. Nishizaki T, Kammesheidt A, Sumikawa K, Asada T, Okada Y: *A sodium- and energy-dependent glucose transporter with similarity to SGLT1-2 is expressed in bovine cortical vessels*. (1995). *Neurosci Res* 22:13-22.
77. Noble A, Zhao ZS, Cantor H: *Suppression of immune responses by CD8 cells. II. Qa-1 on activated B cells stimulates CD8 cell suppression of T helper 2 responses*. (1998). *J Immunol* 160(2):566-71.
78. Norment AM, Salter RD, Parham P, Engelhard VH, Littman DR: *Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules*. (1988). *Nature* 336(6194):79-81.
79. Olson DP, Dombkowski DM, Kelliher AS, Pontillo C, Anderson DC, Preffer FI: *Differential expression of cell surface antigens on subsets of CD4+ and CD8+ T cells*. (2004). *Med Sci Monit* 10(9):BR339-45.
80. Oppenheimer-Marks N, Davis LS, Bogue DT, Ramberg J, Lipsky PE: *Differential utilization of ICAM-1 and VCAM-1 during the adhesion and transendothelial migration of human T lymphocytes*. (1991). *J Immunol* 147(9):2913-21.
81. Petrov T, Howarth AG, Krukoff TL, Stevenson BR: *Distribution of the tight junction-associated protein ZO-1 in circumventricular organs of the CNS*. (1994). *Brain Res Mol Brain Res* 21(3-4):235-46.
82. Phillips PA, Widdop RE, Chai SY, Kelly J, Mooser V, Trinder D, Johnston CI: *Reduced V1 vasopressin binding in the rat nucleus solitarii after nodose ganglionectomy*. (1990). *Clin Exp Pharmacol Physiol* 17(4):321-5.
83. Piccio L, Rossi B, Scarpini E, Laudanna C, Giagulli C, Issekutz AC, Vestweber D, Butcher EC, Constantin G: *Molecular mechanisms involved in lymphocyte recruitment in inflamed brain microvessels: critical roles for P-*

- selectin glycoprotein ligand-1 and heterotrimeric G(i)-linked receptors.* (2002). J Immunol 168(4):1940-9.
84. Picker LJ, Brenner MB, Weiss LM, Smith SD, Warnke RA: *Discordant expression of CD3 and T-cell receptor beta-chain antigens in T-lineage lymphomas.* (1987). Am J Pathol 129(3):434-40.
85. Pratt GD, Bowery NG: *The 5-HT3 receptor ligand, [3H]BRL 43694, binds to presynaptic sites in the nucleus tractus solitarius of the rat.* (1989). Neuropharmacology 28(12):1367-76.
86. Purbhoo MA, Boulter JM, Price DA, Vuidepot AL, Hourigan CS, Dunbar PR, Olson K, Dawson SJ, Phillips RE, Jakobsen BK, Bell JI, Sewell AK: *The human CD8 coreceptor effects cytotoxic T cell activation and antigen sensitivity primarily by mediating complete phosphorylation of the T cell receptor zeta chain.* (2001). J Biol Chem 276(35):32786-92.
87. Ransohoff RM, Kivisäkk P, Kidd G: *Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system.* (2003). Nat Rev Immunol 3(7):569-81.
88. Reese TS, Karnovsky MJ: *Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase.* (1967). J Cell Biol 34(1):207-17.
89. Reinherz EL, Schlossman SF: *The differentiation and function of human T lymphocytes.* (1980). Cell 19(4):821-7.
90. Robb LG, Rockman S, Begley CG, Boyd AW, McGrath K: *A study of granular lymphoproliferative disorders including a CD3 negative case with a rearrangement of the T-cell receptor locus.* (1994). Leuk Lymphoma 13(1-2):143-50.
91. Roberts WG, Palade GE: *Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor.* (1995). J Cell Sci 108 (Pt 6):2369-79.
92. Robey, EA, Fowlkes, BJ: *Selective events in T cell development.* (1994). Annu Rev Immunol 12:675.
93. Rohen, JW, Lütjen-Drecoll, E: *Funktionelle Anatomie des Menschen. Lehrbuch der makroskopischen Anatomie nach funktionellen Gesichtspunkten.* (2006). Stuttgart, New York: Schattauer Verlag; 11., überarb. u. erw. Aufl.
94. Rutten MJ, Hoover RL, Karnovsky MJ: *Electrical resistance and macromolecular permeability of brain endothelial monolayer cultures.* (1987). Brain Res 425(2):301-10.

95. Saitoh S, Kurisaka M, Mori K, Maeda N, Fujimoto S: *Induction of specific cytotoxic T lymphocytes against autologous brain tumor by crossreactive allo-tumor cell stimulation.* (1997). Jpn J Cancer Res 88(3):289-95.
96. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S: *Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands.* (2000). Mol Biol Cell 11(12):4131-42.
97. Schleich A, Stoll M, Bekure K, Meyermann R, Mittelbronn M: *Lymphocyte distribution in normal and pathological human spinal cord.* (2004). Acta Neuropathol 108:366.
98. Schluesener H, Meyermann R: *Neutrophilic defensins penetrate the blood-brain barrier.* (1995). J Neurosci Res 42(5):718-23.
99. Schulz M, Engelhardt B: *The circumventricular organs participate in the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis.* (2005). Cerebrospinal Fluid Res 2:8.
100. Schwartz RH: *T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex.* (1985). Annu Rev Immunol 3:237.
101. Shefner SA, North RA, Zukin RS: *Opiate effects on rabbit vagus nerve: electrophysiology and radioligand binding.* (1981). Brain Res 221(1):109-16.
102. Shepherd CE, Gregory GC, Vickers JC, Halliday GM: *Novel 'inflammatory plaque' pathology in presenilin-1 Alzheimer's disease.* (2005). Neuropathol Appl Neurobiol 31(5):503-11.
103. Soma T, Chiba H, Kato-Mori Y, Wada T, Yamashita T, Kojima T, Sawada N: *Thr(207) of claudin-5 is involved in size-selective loosening of the endothelial barrier by cyclic AMP.* (2004). Exp Cell Res 300(1):202-12.
104. Song L, Pachter JS: *Monocyte chemoattractant protein-1 alters expression of tight junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells.* (2004). Microvasc Res 67(1):78-89.
105. Stamatovic SM, Shakui P, Keep RF, Moore BB, Kunkel SL, Van Rooijen N, Andjelkovic AV: *Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability.* (2005). J Cereb Blood Flow Metab 25(5).
106. Steffen BJ, Breier G, Butcher EC, Schulz M, Engelhardt B: *ICAM-1, VCAM-1, and MAdCAM-1 are expressed on choroid plexus epithelium but not endothelium and mediate binding of lymphocytes in vitro.* (1996). Am J Pathol 148(6):1819-38.

107. Stolp HB, Dziegielewska KM, Ek CJ, Habgood MD, Lane MA, Potter AM, Saunders NR: *Breakdown of the blood-brain barrier to proteins in white matter of the developing brain following systemic inflammation.* (2005). *Cell Tissue Res* 320(3):369-78.
108. Strober S, Dejbachsh-Jones S, Van Vlasselaer P, Duwe G, Salimi S, Allison JP: *Cloned natural suppressor cell lines express the CD3+CD4-CD8- surface phenotype and the alpha, beta heterodimer of the T cell antigen receptor.* (1989). *J Immunol* 143(4):1118-22.
109. Takahashi Y, Smith P, Ferguson A, Pittman QJ: *Circumventricular organs and fever.* (1997). *Am J Physiol* 273(5 Pt 2):R1690-5.
110. Taylor AW, Streilein JW: *Inhibition of antigen-stimulated effector T cells by human cerebrospinal fluid.* (1996). *Neuroimmunomodulation* 3(2-3):112-8.
111. Tsoukas CD, Valentine M, Lotz M, Vaughan JH, Carson DA: *The role of the T3 molecular complex on human T lymphocyte-mediated cytotoxicity.* (1985). *Adv Exp Med Biol* 184:365-85.
112. Tsukita S, Furuse M, Itoh M: *Structural and signalling molecules come together at tight junctions.* (1999). *Curr Opin Cell Biol* 11(5):628-33.
113. Tsuji A: *Small molecular drug transfer across the blood-brain barrier via carrier-mediated transport systems.* (2005). *NeuroRx* 2(1):54-62.
114. Viret C, Janeway CA Jr: *MHC and T cell development.* (1999). *Rev Immunogenet* 1(1):91-104.
115. Virgintino D, Robertson D, Errede M, Benagiano V, Girolamo F, Maiorano E, Roncali L, Bertossi M: *Expression of P-glycoprotein in human cerebral cortex microvessels.* (2002). *J Histochem Cytochem* 50(12):1671-6.
116. Vorbrodt AW, Dobrogowska DH: *Molecular anatomy of interendothelial junctions in human blood-brain barrier microvessels.* (2004). *Folia Histochem Cytobiol* 42(2):67-75.
117. Vorbrodt AW, Lossinsky AS, Wisniewski HM, Suzuki R, Yamaguchi T, Masaoka H, Klatzo I. *Ultrastructural observations on the transvascular route of protein removal in vasogenic brain edema.* (1985). *Acta Neuropathol (Berl)* 66(4):265-73.
118. Watanabe E, Hiyama TY, Shimizu H, Kodama R, Hayashi N, Miyata S, Yanagawa Y, Obata K, Noda M: *Sodium-level-sensitive sodium channel Na(x) is expressed in glial laminate processes in the sensory circumventricular organs.* (2005). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290(3):R568-76.



119. Wekerle H, Engelhardt B, Risau W, Meyermann R: *Interaction of T lymphocytes with cerebral endothelial cells in vitro.* (1991). *Brain Pathol.* 1(2):107-14.
120. Wekerle H, Linington C, Lassmann H, Meyermann R: *Cellular immune reactivity within the CNS.* (1986). *Trends Neurosci* 9:271–277.
121. Wen H, Watry DD, Marcondes MC, Fox HS: *Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: role of the first extracellular domain of claudin-5.* (2004). *Mol Cell Biol* 24(19):8408-17.
122. Williams MJ, Lowrie MB, Bennett JP, Firth JA, Clark P: *Cadherin-10 is a novel blood-brain barrier adhesion molecule in human and mouse.* (2005). *Brain Res* 1058(1-2):62-72.
123. Wolburg K, Gerhardt H, Schulz M, Wolburg H, Engelhardt B.: *Ultrastructural localization of adhesion molecules in the healthy and inflamed choroid plexus of the mouse.* (1999). *Cell Tissue Res* 296(2):259-69.
124. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Engelhardt B: *Diapedesis of mononuclear cells across cerebral venules during experimental autoimmune encephalomyelitis leaves tight junctions intact.* (2005). *Acta Neuropathol (Berl)* 109(2):181-90.
125. Wu X, Kekuda R, Huang W, Fei Y-J, Leibach FH, Chen J, et al. *Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter and evidence for the expression of the transporter in the brain.* (1998). *J Biol Chem* 273:32776-32786.
126. Young KJ, DuTemple B, Phillips MJ, Zhang L: *Inhibition of graft-versus-host disease by double-negative regulatory T cells.* (2003). *J Immunol* 171(1):134-41.
127. Zamoyska R: *CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses?* (1998). *Curr Opin Immunol* 10(1):82-7.
128. Zamoyska R: *The CD8 coreceptor revisited: one chain good, two chains better.* (1994). *Immunity* 1(4):243-6.
129. Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B, Zhang L: *Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression.* (2000). *Nat Med* 6(7):782-9.
130. Ziemssen T, Kumpf T, Schneider H, Klinkert WE, Neuhaus O, Hohlfeld R: *Secretion of brain-derived neurotrophic factor by glatiramer acetate-reactive T-helper cell lines: Implications for multiple sclerosis therapy.* (2005). *J Neurol Sci* 233(1-2):109-12.

## 7. ANHANG

### 7.1 TABELLEN

Im Folgenden sind die Tabellen der lichtmikroskopischen Auszählung aller angewendeter Antikörper aufgeführt. Dabei gehört stets ein Triplet aus Sehrinde, AP und MO zu einem Fall. Alle Werte sind dabei in „Zellen pro 20 Zählfelder“ angegeben.

*Tab. 5: Auszählung des CD8-Antikörpers.*

Antikörper	Lokalisation	perivaskulär	parenchymal	gesamt
CD8	Sehrinde	1,48	0,22	1,70
CD8	AP	3,00	5,00	8,00
CD8	MO	1,63	0,94	2,57
CD8	Sehrinde	2,90	0,14	3,04
CD8	AP	1,00	4,00	5,00
CD8	MO	5,54	2,17	7,71
CD8	Sehrinde	1,36	0,23	1,59
CD8	AP	1,00	2,00	3,00
CD8	MO	4,65	2,01	6,66
CD8	Sehrinde	1,34	0,16	1,50
CD8	AP	2,00	5,00	7,00
CD8	MO	7,03	1,41	8,44
CD8	Sehrinde	3,46	0,28	3,74
CD8	AP	5,00	5,00	10,00
CD8	MO	5,40	6,24	11,64
CD8	Sehrinde	5,98	0,66	6,64
CD8	AP	1,00	17,00	18,00
CD8	MO	7,69	4,09	11,78
CD8	Sehrinde	0,57	0,02	0,59
CD8	AP	0,00	4,00	4,00
CD8	MO	4,74	0,67	5,41
CD8	Sehrinde	3,80	0,13	3,93
CD8	AP	1,00	3,00	4,00
CD8	MO	5,74	0,95	6,69
CD8	Sehrinde	2,67	1,30	3,97
CD8	AP	3,00	4,00	7,00
CD8	MO	9,68	1,39	11,07
CD8	Sehrinde	1,39	0,06	1,45
CD8	AP	2,00	4,00	6,00
CD8	MO	4,93	1,01	5,94
CD8	Sehrinde	3,39	0,28	3,67

CD8	AP	13,00	3,00	16,00
CD8	MO	11,66	3,37	15,03
CD8	Sehrinde	2,07	0,10	2,17
CD8	AP	2,00	3,00	5,00
CD8	MO	9,11	2,56	11,67
CD8	Sehrinde	1,28	0,33	1,61
CD8	AP	3,00	4,00	7,00
CD8	MO	3,94	5,65	9,59
CD8	Sehrinde	3,14	0,16	3,30
CD8	AP	10,00	16,00	26,00
CD8	MO	13,39	8,79	22,18
CD8	Sehrinde	2,07	0,19	2,26
CD8	AP	6,00	3,00	9,00
CD8	MO	7,47	1,56	9,03
CD8	Sehrinde	0,69	0,13	0,82
CD8	AP	6,00	8,00	14,00
CD8	MO	5,33	1,90	7,23
CD8	Sehrinde	3,71	1,34	5,05
CD8	AP	16,00	15,00	31,00
CD8	MO	15,21	6,75	21,96
CD8	Sehrinde	2,67	0,15	2,82
CD8	AP	1,00	2,00	3,00
CD8	MO	9,76	3,27	13,03
CD8	Sehrinde	1,45	0,14	1,59
CD8	AP	1,00	1,00	2,00
CD8	MO	4,12	0,75	4,87
CD8	Sehrinde	1,25	0,08	1,33
CD8	AP	0,00	2,00	2,00
CD8	MO	2,81	0,49	3,30
CD8	Sehrinde	0,55	0,05	0,60
CD8	AP	0,00	0,00	0,00
CD8	MO	2,52	0,19	2,71
CD8	Sehrinde	1,89	0,73	2,62
CD8	AP	5,00	1,00	6,00
CD8	MO	5,01	1,87	6,88
CD8	Sehrinde	2,27	0,09	2,36
CD8	AP	0,00	0,00	0,00
CD8	MO	3,51	0,22	3,73

*Tab. 6: Auszählung des CD8-Antikörpers in der MO nach ventralen und dorsalem Abschnitt.*

Ak	Lokalisation	perivaskulär		parenchymal	
		ventral	dorsal	ventral	dorsal
CD8	MO	1,72	1,28	1,01	0,68
CD8	MO	6,08	3,56	2,40	1,36
CD8	MO	5,32	3,06	2,23	1,50
CD8	MO	9,43	4,81	1,29	1,53
CD8	MO	7,21	4,29	9,69	4,14
CD8	MO	7,79	7,46	3,61	5,22
CD8	MO	13,63	5,11	0,97	1,88
CD8	MO	7,27	2,57	1,67	0,32
CD8	MO	15,55	8,31	4,94	2,02
CD8	MO	11,89	5,95	3,70	1,26
CD8	MO	4,08	3,68	6,92	3,24
CD8	MO	14,49	12,15	8,89	8,68
CD8	MO	9,17	4,92	1,70	1,35
CD8	MO	5,62	4,90	1,66	2,24
CD8	MO	16,47	14,30	7,46	6,23
CD8	MO	6,48	2,28	1,21	0,38
CD8	MO	2,35	2,62	0,19	0,19
CD8	MO	6,47	3,76	3,06	0,85
CD8	MO	4,57	2,17	0,39	0,00

Tab. 7: Auszählung des CD3-Antikörpers.

Antikörper	Lokalisation	perivaskulär	parenchymal	gesamt
CD3	Sehrinde	0,00	0,00	0,00
CD3	AP	0,00	0,00	0,00
CD3	MO	0,00	0,00	0,00
CD3	Sehrinde	1,67	0,00	1,67
CD3	AP	1,00	0,00	1,00
CD3	MO	4,33	1,00	5,33
CD3	Sehrinde	2,00	0,33	2,33
CD3	AP	0,00	4,00	4,00
CD3	MO	1,67	2,67	4,33
CD3	Sehrinde	0,00	0,00	0,00
CD3	AP	0,00	0,00	0,00
CD3	MO	0,00	0,00	0,00
CD3	Sehrinde	3,00	0,67	3,67
CD3	AP	2,00	0,00	2,00
CD3	MO	5,33	1,67	7,00
CD3	Sehrinde	0,00	0,00	0,00
CD3	AP	0,00	0,00	0,00
CD3	MO	0,00	0,00	0,00
CD3	Sehrinde	1,00	0,67	1,67
CD3	AP	2,00	4,00	6,00
CD3	MO	4,67	0,33	5,00
CD3	Sehrinde	0,00	0,00	0,00
CD3	AP	0,00	0,00	0,00
CD3	MO	4,33	1,67	6,00
CD3	Sehrinde	3,33	1,33	4,66
CD3	AP	0,00	0,00	0,00
CD3	MO	1,00	0,33	1,33
CD3	Sehrinde	1,33	0,00	1,33
CD3	AP	1,00	1,00	2,00
CD3	MO	2,00	1,00	3,00
CD3	Sehrinde	0,00	0,00	0,00
CD3	AP	8,00	6,00	14,00
CD3	MO	10,67	2,33	13,00
CD3	Sehrinde	3,33	1,00	4,33
CD3	AP	2,00	1,00	3,00
CD3	MO	2,00	0,33	2,33
CD3	Sehrinde	2,33	0,00	2,33
CD3	AP	0,00	2,00	2,00
CD3	MO	0,33	1,33	1,67
CD3	Sehrinde	5,33	0,67	6,00
CD3	AP	9,00	18,00	27,00
CD3	MO	9,00	10,33	19,33
CD3	Sehrinde	0,00	0,00	0,00
CD3	AP	3,00	2,00	5,00
CD3	MO	1,33	0,67	2,00

CD3	Sehrinde	1,00	0,00	1,00
CD3	AP	0,00	1,00	1,00
CD3	MO	0,00	0,00	0,00
CD3	Sehrinde	3,00	0,67	3,67
CD3	AP	0,00	0,00	0,00
CD3	MO	2,67	0,33	3,00
CD3	Sehrinde	0,00	0,00	0,00
CD3	AP	0,00	0,00	0,00
CD3	MO	0,67	0,00	0,67
CD3	Sehrinde	0,00	0,00	0,00
CD3	AP	0,00	0,00	0,00
CD3	MO	0,00	0,00	0,00
CD3	Sehrinde	1,00	0,00	1,00
CD3	AP	2,00	2,00	4,00
CD3	MO	2,33	0,33	2,67
CD3	Sehrinde	3,00	0,00	3,00
CD3	AP	2,00	0,00	2,00
CD3	MO	2,00	0,33	2,33
CD3	Sehrinde	11,00	0,00	11,00
CD3	AP	2,00	0,00	2,00
CD3	MO	3,67	1,67	5,33
CD3	Sehrinde	2,00	0,00	2,00
CD3	AP	0,00	0,00	0,00
CD3	MO	0,00	0,00	0,00

Tab. 8: Auszählung des CD20-Antikörpers.

Antikörper	Lokalisation	perivaskulär	parenchymal	gesamt
CD20	Sehrinde	0,00	0,00	0,00
CD20	AP	2,00	0,00	2,00
CD20	MO	0,00	0,00	0,00
CD20	Sehrinde	0,00	0,00	0,00
CD20	AP	1,00	1,00	2,00
CD20	MO	0,00	0,00	0,00
CD20	Sehrinde	0,00	0,00	0,00
CD20	AP	0,00	0,00	0,00
CD20	MO	0,00	0,00	0,00
CD20	Sehrinde	0,33	0,33	0,66
CD20	AP	0,00	3,00	3,00
CD20	MO	0,00	0,00	0,00
CD20	Sehrinde	0,67	0,33	1,00
CD20	AP	0,00	0,00	0,00
CD20	MO	0,33	1,00	1,33
CD20	Sehrinde	1,33	0,00	1,33
CD20	AP	0,00	3,00	3,00
CD20	MO	1,67	0,67	2,33
CD20	Sehrinde	0,00	0,00	0,00
CD20	AP	0,00	0,00	0,00
CD20	MO	0,33	0,33	0,67
CD20	Sehrinde	0,00	0,00	0,00
CD20	AP	0,00	0,00	0,00
CD20	MO	0,00	0,00	0,00
CD20	Sehrinde	0,67	0,00	0,67
CD20	AP	2,00	0,00	2,00
CD20	MO	0,33	0,00	0,33
CD20	Sehrinde	0,00	0,00	0,00
CD20	AP	0,00	0,00	0,00
CD20	MO	0,00	0,00	0,00
CD20	Sehrinde	0,67	0,33	1,00
CD20	AP	0,00	0,00	0,00
CD20	MO	1,00	0,00	1,00
CD20	Sehrinde	0,00	0,00	0,00
CD20	AP	0,00	1,00	1,00
CD20	MO	1,67	0,33	2,00
CD20	Sehrinde	2,67	0,00	2,67
CD20	AP	0,00	1,00	1,00
CD20	MO	1,00	0,33	1,33
CD20	Sehrinde	0,67	0,33	1,00
CD20	AP	0,00	0,00	0,00
CD20	MO	1,33	0,00	1,33
CD20	Sehrinde	0,00	0,00	0,00
CD20	AP	0,00	0,00	0,00
CD20	MO	0,33	1,00	1,33





*Tab. 9: Auszählung des MHC II-Antikörpers.*

Da es bei den MHC-II-Färbungen nicht um das Detektieren von Lymphozyten ging, wurde auf eine Unterteilung in „parenchymal“ und „perivaskulär“ verzichtet.

Antikörper	Lokalisation	gesamt
MHC II	Sehrinde	15
MHC II	AP	5
MHC II	MO	58
MHC II	Sehrinde	16
MHC II	AP	16
MHC II	MO	104
MHC II	Sehrinde	58
MHC II	AP	30
MHC II	MO	110
MHC II	Sehrinde	17
MHC II	AP	12
MHC II	MO	23
MHC II	Sehrinde	80
MHC II	AP	193
MHC II	MO	210
MHC II	Sehrinde	18
MHC II	AP	16
MHC II	MO	55
MHC II	Sehrinde	38
MHC II	AP	6
MHC II	MO	37
MHC II	Sehrinde	128
MHC II	AP	248
MHC II	MO	255
MHC II	Sehrinde	364
MHC II	AP	514
MHC II	MO	385
MHC II	Sehrinde	145
MHC II	AP	138
MHC II	MO	184
MHC II	Sehrinde	48
MHC II	AP	296
MHC II	MO	255
MHC II	Sehrinde	96
MHC II	AP	66
MHC II	MO	122

Lokalisation	gesamt
Sehrinde	51
AP	81
MO	114
Sehrinde	9
AP	52
MO	56
Sehrinde	161
AP	214
MO	224
Sehrinde	54
AP	46
MO	103
Sehrinde	150
AP	133
MO	178
Sehrinde	88
AP	90
MO	101
Sehrinde	93
AP	80
MO	122
Sehrinde	38
AP	152
MO	101
Sehrinde	101
AP	190
MO	170
Sehrinde	76
AP	84
MO	108
Sehrinde	179
AP	220
MO	193

Die Antikörper gegen CD4 und Granzym B lieferten negative Ergebnisse. Die Laminin- und die Doppelfärbungen dienten der exemplarischen Darstellung und wurden daher nicht ausgezählt.

## 7.2 DANKSAGUNGEN

Mein Dank gilt

...dem gesamten Laborpersonal des Instituts für Hirnforschung für die entgegengebrachte Freundlichkeit, Hilfsbereitschaft und Geduld bei der Einarbeitung in die Laborroutine. Ganz besonders danken möchte ich dabei Frau Ott, Frau Schlarbaum, Frau Schilling und Frau Gualtiero.

...Frau Trautmann, Herrn Schlaszus und Herrn Nguyen für die große Hilfe und Unterstützung bei allen labortechnischen Fragen und Problemen.

...Ariane Schleich für die Einführung in die Thematik und das Bestellen von Antikörpern, sowie Patrick Harter für die Einarbeitung in die Immunhistochemie.

...Frau Albrecht für wertvolle Tipps bei der grafischen Gestaltung.

...Herrn Prof. Dietz für die tatkräftige Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

...Herrn Prof. Dr. Wolburg für hochinteressante Gespräche über die Blut-Hirn-Schranke und die Emperipolexis. Ebenso für die freundliche Bereitstellung von Büchern, Publikationen und eines seiner elektronenmikroskopischen Bilder (S.11).

...im besonderen Herrn Prof. Dr. Meyermann für das entgegengebrachte Vertrauen, die Bereitstellung des Themas, seine Unterstützung während der Promotionszeit und die zahlreichen Fachgespräche zur weiteren Planung der Arbeit.

Ein ganz besonderes großes Dankeschön geht an Dr. med. Michel Mittelbronn, der durch seinen unermüdlichen Einsatz, seine immense Hilfsbereitschaft und durch zahllose Stunden investierter Zeit diese Promotion überhaupt erst möglich gemacht hat. Ich danke ihm für viele gute Gespräche, die mitunter weit über Hirnforschung hinausreichten.

**7.3 LEBENSLAUF**

17. Januar 1982	geboren in Freiburg i. Brsg. als Sohn des Rechtsanwalts Dr. Reinhard Löffler und seiner Ehefrau Daniele Löffler, geb. Pillin, Oberstudienrätin
September 1988	Grundschule (Franz-Schubert-Schule, Stuttgart-Botnang); Klavierunterricht in der privaten Musikschule Helmut Klimek
1991	Umzug mit der Familie nach Potomac, Maryland, USA. Dort Fortsetzung von Grundschule an der German School Washington (DSW). Ebenso Fortsetzung des Klavierunterrichts.
September 1992	5. Klasse Gymnasium an der DSW
Januar 1993	Rückkehr nach Stuttgart, Besuch des Dillmann-Gymnasiums
seit 1997	Organist in der kath. Kirchengemeinde St. Clemens Stuttgart
1997 – 2000	Beginn der Ausbildung zur Erlangung der kirchenmusikalischen Teilbereichsqualifikation, Hauptfach Orgel, an der Hochschule für Kirchenmusik in Rottenburg
Juni 2001	Abitur
August 2001	Beginn des Zivildienstes im urologischen OP des Katharinenhospitals Stuttgart
Oktober 2002	Studium der Medizin, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
seit Januar 2003	Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes
September 2004	Physikum
2004 – 2009	Promotion
August 2005	Famulatur Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Saarburg
Februar/März 2006	Famulatur, Eerste River Hospital Kapstadt, Südafrika
August/Sept. 2006	Famulatur Neurologie, Marienhospital Stuttgart
Februar/März 2007	Famulatur HNO und Dermatologie, Universitätsklinik Tübingen
2007 – 2008	PJ, Marienhospital Stuttgart und Kantonsspital Baden, Schweiz
5. Juni 2009	Staatsexamen