

Aus dem Institut für Molekulare und Klinische Immunologie der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Charakterisierung einer Maus mit spezifischer Deletion des  
Adapterproteins ADAP in Thrombozyten

## **D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.  
(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Clara Antonia Meinke

aus Berlin

Magdeburg 2022

## Bibliographische Beschreibung

Meinke, Clara:

Charakterisierung einer Maus mit spezifischer Deletion des Adapterproteins ADAP in Thrombozyten. – 2022. 93 Bl., 22 Abb., 8 Tab., 1 Anlage

### Kurzreferat

Das *adhesion and degranulation-promoting adaptor protein* (ADAP) gehört zu den zytosolischen Adapterproteinen. ADAP wird in den Immunzellen der hämatopoetischen Linie wie T-Zellen, Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen), myeloischen Zellen und Thrombozyten exprimiert, während es in reifen B-Zellen nicht vorkommt. ADAP spielt eine wichtige Rolle bei der Integrinaktivierung und Adhäsion der Zellen. Der komplette Knock-out von ADAP ist bereits gut untersucht. Um eine differenzierte Betrachtung der zellspezifischen Rolle von ADAP bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen zu ermöglichen, wurden konditionalen Knock-outs in den genannten Zelllinien generiert.

In dieser Arbeit wurde die Charakterisierung des Immunsystems einer konditionalen Knock-out Maus mit dem spezifischen Verlust von ADAP in den Thrombozyten (ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>) durchgeführt. Hierbei zeigte sich im konditionalen Knock-out ähnlich wie bei dem kompletten Knock-out von ADAP gegenüber den Kontrolltieren eine Thrombozytopenie und Einschränkungen in der Funktion von Thrombozyten. Im Krankheitsmodell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) wurde ein erhöhter Schweregrad der Erkrankung bei den konditionalen Knock-out-Mäusen beobachtet. Es lässt sich eine durch die Thrombozytenfehlfunktion verminderte anti-inflammatorische Wirkung vermuten.

Die Ergebnisse tragen zur Aufklärung der Immunpathogenese der EAE bei und sind eine wichtige Voraussetzung zur Entwicklung möglicher neuer Ansatzpunkte für Therapieoptionen bei neuroinflammatorischen Erkrankungen.

### Schlüsselwörter

ADAP, EAE, Konditionale Knock-out Maus, Thrombozyten

# Inhaltsverzeichnis

Kurzreferat .....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	IV
1. Einleitung .....	1
1.1. Das Adapterprotein ADAP .....	1
1.2. Rolle von ADAP in Thrombozyten.....	6
1.3. EAE.....	11
1.4. Zielstellung.....	16
2. Material und Methoden .....	17
2.1. Verwendete Mauslinien und Genotypen .....	17
2.2. Isolierung von genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien.....	18
2.3. Genotypisierung mittels qualitativer PCR .....	19
2.4. Agarose-Gelelektrophorese .....	21
2.5. Charakterisierung der Mäuse .....	22
2.5.1. Präparation der Mäuse.....	22
2.5.2. Verteilung der Leukozytenzahl und Differentialblutbild .....	24
2.5.3. ELISA für die Bestimmung von PF4 im Plasma .....	24
2.5.4 FACS-Färbung für Spleen, Thymus und Medulla ossium flava .....	24
2.5.5 FACS-Färbung für das periphere Blut .....	26
2.6. Herstellung gewaschener Thrombozyten .....	27
2.7. Stimulation der Thrombozyten .....	28
2.8 Proteinbestimmung .....	30
2.9. Western Blot.....	31
2.10 Induktion der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) .....	35
2.10.1 Generierung von 2D2-T-Zellen und Induktion der passiven EAE .....	35
2.10.2 Induktion der aktiven EAE .....	37
2.11. Präparation für die histologische Aufbereitung .....	38
2.12 Statistik.....	39

<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1. Genetischer Nachweis der konditionalen ADAP-Knock-out-Konstrukte in Versuchstieren.....</b>	<b>40</b>
<b>3.2. Leukozytenzahl und Differentialblutbild .....</b>	<b>42</b>
<b>3.3. Thymus.....</b>	<b>44</b>
<b>3.4. Medulla ossium flava.....</b>	<b>46</b>
<b>3.5. Splen.....</b>	<b>48</b>
<b>3.6. Peripheres Blut.....</b>	<b>51</b>
<b>3.7. Stimulation der Thrombozyten in vitro .....</b>	<b>53</b>
<b>3.8. Verhalten der konditionalen ADAP Knock-out Maus in der aktiven und passiven EAE.....</b>	<b>58</b>
<b>3.9. Histologische Überprüfung des Krankheitsverlauf der EAE.....</b>	<b>61</b>
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>62</b>
<b>4.1. Der genetische Nachweis des konditionalen ADAP Knock-outs in Thrombozyten.....</b>	<b>62</b>
<b>4.2. Die immunologische Charakterisierung der konditionalen ADAP Knock-out Maus .....</b>	<b>63</b>
<b>4.3. Untersuchung der Thrombozytenaktivierung in vitro .....</b>	<b>65</b>
<b>4.4. Verlauf der EAE bei der konditionalen ADAP Knock-out Maus .....</b>	<b>67</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>70</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>72</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>79</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>81</b>
<b>Publikationen .....</b>	<b>82</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>83</b>
<b>Ehrenerklärung .....</b>	<b>85</b>
<b>Darstellung des Bildungsweges .....</b>	<b>86</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACK	Ammonium-Chloride-Kalium
ADAP	<i>adhesion and degranulation-promoting adaptor protein</i>
ADAP KO	ADAP Knock-out
ADP	Adenosindiphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
CARMA1	<i>caspase recruitment domain (CARD) membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) protein 1</i>
CBM-Komplex	CARMA1-Bcl-10-Malt1
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvant</i>
CLEC-2	<i>C-type lectin-like receptor 2</i>
Cre	Cre-Rekombinase
CXCL	<i>chemokine CXC ligand</i>
DN	doppelt negative Zellen
DP	doppelt positive Zellen
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EMMA	<i>European Mouse Mutant Archive</i>
Fc $\gamma$	<i>fragment crystallisable gamma</i>
Flp	Flippase
FRT	<i>flippase recognition target</i>
FYB	<i>Fyn binding protein</i>
GP	Glykoprotein
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
hemi-ITAM	hemi-Immunorezeptor-Tyrosin-Aktivierungsmotiv
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
Kinase ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated protein kinases 1/2</i>
LAT	<i>linker of activated T cells</i>
LacZ	lacZ-Gen
loxP	<i>locus of x-over in P1</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MBP	Myelin basisches Protein

MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
Nck	<i>Non-catalytic region of tyrosine kinase</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PAF	plättchenaktivierender Faktor
PALS	periarterielle Lymphscheide
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI3K	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PLP	Proteolipid-Protein
PF4	<i>Platelet factor 4</i>
RPMI-1640 Medium	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium</i>
S1PR	<i>Sphingosine-1-phosphate receptor</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SKAP55	<i>Src Kinase-Associated Phosphoprotein of 55 kDa</i>
SKAP-HOM	<i>SKAP-55 Homologue</i>
SLP-76	<i>SH2 domain containing Leukocyte Phosphoprotein of 76 kDa</i>
SLAP-130	<i>SLP-76-associated phosphoprotein of 130 kDa</i>
SP	einfach positive Zellen
Syk	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
TAK 1	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math> (TFG-<math>\beta</math>)-activated protein kinase</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TGF- $\beta$ 1	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TZR	T-Zellrezeptor
vWF	von-Willebrand-Faktor
WASp	Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein

## 1. Einleitung

### 1.1. Das Adapterprotein ADAP

Die Adapterproteine sind Moleküle, die eine Interaktion zwischen Proteinen oder Proteinen und Lipiden vermitteln und keine eigene enzymatische oder transkriptionelle Funktion haben. Entsprechend ihrer Lokalisation in der Zelle unterscheidet man zytosolische und transmembranöse Adapterproteine. Das *adhesion and degranulation-promoting adaptor protein* **ADAP** gehört zu den zytosolischen Adapterproteinen.

ADAP wurde erstmals von der Arbeitsgruppe von Christopher Rudd im Jahr 1992 beschrieben (da Silva et al., 1992). Nach einer T-Zellstimulation wurden zwei Isoformen des Proteins im Westernblot mit einem Molekulargewicht von 120 kDa und 130 kDa detektiert. Da das Molekül mit der Src-Kinase Fyn interagiert, wurde es als *Fyn binding protein* (**FYB**) benannt (da Silva et al., 1997).

Unabhängig davon wurde in der Arbeitsgruppe von Gary Koretzky ein Protein mit dem Molekulargewicht von 130 kDa identifiziert, das nur in hämatopoetischen Zellen vorkommt und an das Adapterprotein SLP-76 (*SH2 domain containing Leukocyte Phosphoprotein of 76 kDa*) bindet (Reinhold, 2015). Daher erhielt es von dieser Arbeitsgruppe die Bezeichnung **SLAP-130** (*SLP-76-associated phosphoprotein of 130 kDa*) (Musci et al., 1997). Anhand der Aminosäuresequenz wurden beide Proteine als identisch nachgewiesen (Veale et al., 1999). Bei der Etablierung eines Mausmodells im Jahre 2001 mit ADAP-defizienten Mäusen zur funktionellen Charakterisierung der T-Zellen wurde das Molekül einheitlich als ADAP (*adhesion and degranulation promoting adapter protein*) bezeichnet (Peterson et al., 2001).

Die beiden Isoformen von 120 kDa (Isoform 2) und 130 kDa (Isoform 1) unterscheiden sich durch eine Insertion von 46 Aminosäuren (138 bp) und zeigen keinen funktionellen Unterschied auf. Unterschiedlich ist die Expression in verschiedenen Zelltypen. In Prothymozyten tritt nur die 120 kDa-Isoform auf. Bei der Thymozytenentwicklung wandelt sich das Verhältnis in 60 % 120 kDa-Isoform und 40 % 130 kDa-Isoform um. Schließlich bilden reife T-Zellen fast nur die 130 kDa-Isoform (Veale et al., 1999).

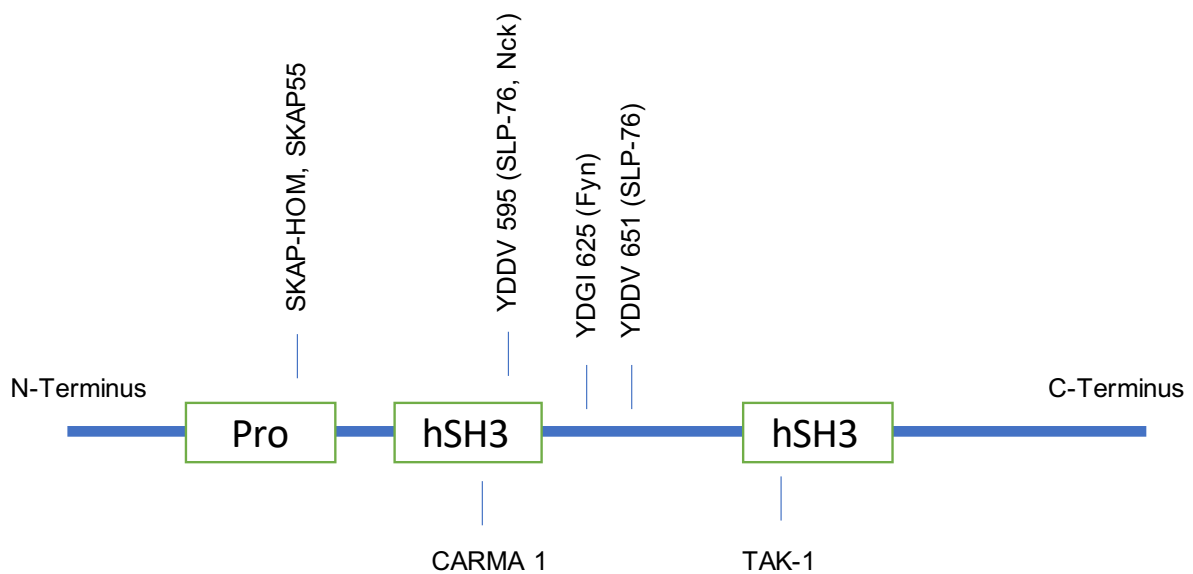


Abbildung 1 Dargestellt ist das Adapterprotein ADAP. **Pro** bezeichnet die prolinreiche Domäne am N-Terminus, gefolgt von den mit **hSH3** bezeichneten helikalen Src-Homologie-Domänen. Die Bindungsstellen für **SKAP-HOM** und **SKAP55** befinden sich in der prolinreichen Domäne, die für **SLP-76** an YDDV 595 und YDDV 651 und für **Fyn** an YDGI 625. **CARMA 1** bindet an der N-terminalen und **TAK-1** an der C-terminalen hSH3-Domäne. Modifiziert nach Witte, A. (Witte et al., 2013).

Die Struktur von ADAP, wie in Abbildung 1 dargestellt, weist am N-terminalen Anfang mehrere Proline auf, die prolinreiche Regionen bilden und als Bindungspartner für SKAP55 (*Src Kinase-Associated Phosphoprotein of 55 kDa*) (Reinhold, 2015) und SKAP-HOM (*SKAP-55 Homologue*) (Reinhold, 2015) dienen (Musci et al., 1997; Veale et al., 1999). Darauf folgen verschiedene Tyrosin-Phosphorylierungsstellen, wobei die erste Sequenz YDDV 595 als Bindungsstelle für SLP-76 zur Verfügung steht. Eine zweite Bindungsstelle für SLP-76 ist an YDDV 651 zu finden (Geng et al., 1999). Der Bindungspartner Fyn hat seine Interaktionssequenz an YDGI 625 (Raab et al., 1999). Weitere Bindungspartner von ADAP sind die Adapterproteine Nck (*Non-catalytic region of tyrosine kinase*) (Reinhold, 2015), CARMA1 (*caspase recruitment domain (CARD) membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) protein 1*) und die Kinase TAK 1 (*transforming growth factor- $\beta$  (TFG $\beta$ )-activated protein kinase*). Die beiden helikalen SH3-Domänen von ADAP können keine prolinreichen Liganden mehr erkennen, aber sie können eine direkte Bindung an Phospholipide der Membran ermöglichen (Heuer et al., 2005, 2006).

ADAP wird in den Immunzellen der hämatopoetischen Linie wie T-Zellen, Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen), myeloischen Zellen und Thrombozyten exprimiert. In reifen B-Zellen kommt das ADAP-Molekül nicht vor (Dluzniewska et al., 2007; Witte et al., 2013).



Die Funktion von ADAP in T-Zellen wurde sehr ausführlich am Modell der ADAP-Knock-out Maus charakterisiert. Von den Ergebnissen der Untersuchung der ADAP-defizienten T-Zellen konnten Rückschlüsse auf die T-Zellfunktion des Adapterproteins gezogen werden. Bereits während der thymischen Reifung wirkt sich der Verlust von ADAP aus. Die Gesamtzellzahl im Thymus ist vermindert und es entwickeln sich weniger einfach positive Thymozyten (CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup>) (Wu et al., 2006). Werden reife T-Zellen von ADAP-Knock-out-Mäusen über den T-Zellrezeptor stimuliert, so ist die Proliferation und IL-2-Produktion deutlich vermindert. Die detaillierte Untersuchung der T-Zellrezeptor-Signaltransduktion einschließlich des Calcium-Einstroms ergab allerdings keine Veränderungen in Abwesenheit von ADAP. Die weiterführenden Untersuchungen der ADAP-defizienten T-Zellen zeigten jedoch eine gestörte Funktion der Integrine und eine verminderte Adhäsion nach Stimulation des T-Zellrezeptors. Dieser Prozess der Aktivierung der Integrine nach T-Zellrezeptor-Stimulation wird als *inside-out-signaling* bezeichnet. ADAP war das erste Adapterprotein, das als zentrales Element dieses Prozesses identifiziert wurde (Griffiths et al., 2001; Peterson et al., 2001). Dieser Prozess der Integrinaktivierung ist beispielsweise wichtig für die Interaktion von T-Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen im Rahmen der Immunantwort. Fehlt ADAP in den T-Zellen, kommt es zu Störungen der Konjugatbildung mit antigenpräsentierenden Zellen und es kann keine optimale T-Zellaktivierung stattfinden (Mueller et al., 2007).

Unabhängig von der Integrinaktivierung ist ADAP auch an der NF-κB-vermittelten T-Zellaktivierung beteiligt. Dabei bindet ADAP direkt an das Adapterprotein CARMA1 und vermittelt so die Aktivierung des sogenannten CBM-Komplexes (CARMA1-Bcl-10-Malt1). Fehlt ADAP in den T-Zellen, so ist die Aktivierung dieses Komplexes gestört und nachfolgend die Aktivierung und Translokation des Transkriptionsfaktors NF-κB in den Zellkern und die Transkription von Genen für Zytokine und Chemokine (Medeiros et al., 2007). Dabei zeigte sich, dass in der T-Zelle zwei unabhängige Pools von ADAP existieren, die auch zwei unterschiedliche Signalwege beeinflussen: die Integrinaktivierung und die NF-κB-Aktivierung. Während für die Integrinaktivierung die Bindung an die SKAP-Proteine wichtig ist, interagiert ADAP bei der NF-κB-Aktivierung mit dem CBM-Komplex. Somit sind die beiden Pools von ADAP in der T-Zelle biochemisch und funktionell unabhängig.

Die Bindung von ADAP und CARMA1 spielt auch eine Rolle für die Zellzyklusregulation in den T-Zellen. In Abwesenheit von ADAP kommt es zu einem Block in der G1/S-Phase des Zellzyklus und die Proliferation wird gehemmt (Srivastava et al., 2012). Dieser Mechanismus erklärt den bereits erwähnten Proliferationsdefekt der ADAP-defizienten T-Zellen.

Eine weitere Funktion von ADAP ist die Beteiligung an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts nach Stimulation. Nach T-Zellrezeptor-Stimulation bilden die Proteine ADAP, SLP-76, Nck und WASp (Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein) einen stabilen Komplex (Pauker et al., 2011). Fehlt ADAP oder ein anderes Molekül dieses tetramolekularen Komplexes, ist die Aktin-Polymerisation und somit die Adhäsion der Zellen gestört.

Interessanterweise zeigte der Verlust von ADAP einen starken Effekt auf die CD4<sup>+</sup>-T-Zellaktivierung, -entwicklung und -funktion, wobei CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nur eine milde Beeinträchtigung bei ADAP-Defizit vorweisen (Parzmair et al., 2017). Zugleich haben Fiege et al. (Fiege et al., 2015) einen Nachweis geliefert, dass ADAP an der negativen Regulation der Konversion der naiven CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in einen Gedächtnisphänotyp beteiligt ist. Weiterhin ist ADAP ein positiver Regulator für die Differenzierung residenter CD8<sup>+</sup>- Gedächtnis-T-Zellen während einer akuten pathogenen Infektion (Fiege et al., 2016). ADAP scheint somit einen unterschiedlichen Einfluss auf die Funktion verschiedener T-Zellsubpopulationen auszuüben.

ADAP wird in NK-Zellen exprimiert und ist dort auch an der Ausbildung von Signalkomplexen beteiligt. Da NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen gemeinsame Effektorfunktionen wie Zytotoxizität und Zytokinproduktion aufweisen, wurde auch eine Rolle von ADAP in NK-Zellen postuliert. Erste Untersuchungen ergaben jedoch eine normale Reifung und Entwicklung der NK-Zellen sowie eine normale Zytotoxizität und IFN- $\gamma$ -Produktion in Abwesenheit von ADAP (Fostel et al., 2006). Einige Jahre später wurden Ergebnisse publiziert, die eine Beteiligung von ADAP an der IFN- $\gamma$ -Produktion und an der Degranulierung von NK-Zellen zeigen (May et al., 2013). Kurze Zeit später wurde der Signalweg in NK-Zellen beschrieben, der unter Beteiligung von Fyn, ADAP und dem CBM-Komplex ausschließlich zur Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen führt. Die NK-Zell-Zytotoxizität scheint von diesem Signalweg unbeeinflusst zu sein (Rajasekaran et al., 2013). Die Bedeutung dieser Entdeckung liegt darin, dass die wesentlichen NK-Zell-Effektorfunktionen Zytotoxizität und Zytokinproduktion funktionell voneinander unabhängig sind. Fehlt konditionalen Knock-out-Mäusen ADAP ausschließlich in NK-Zellen, so erkrankten die Tiere schwerer an einer systemischen Infektion mit *Listeria monocytogenes*. ADAP-defiziente NK-Zellen wiesen dabei eine verminderte zytotoxische Kapazität *in vivo* auf (Böning et al., 2020). Insgesamt sind die Daten zur Funktion von ADAP in NK-Zellen teilweise uneinheitlich.

Zur Rolle von ADAP in den verschiedenen Zellpopulationen der myeloischen Reihe sind nur wenige Publikationen verfügbar. Wird Mäusen durch kurzzeitiges beidseitiges Abklemmen des

Nierenhilus ein Ischämie-Reperfusionsschaden gesetzt, entwickelt sich eine durch neutrophile Granulozyten vermittelte akute Nierenentzündung. In diesem Mausmodell waren ADAP-defiziente Mäuse vor der Entzündung geschützt, da deutlich weniger neutrophile Granulozyten die Niere infiltrierten (Block et al., 2012). Für die Auswanderung der Neutrophilen aus dem Gefäßsystem in das entzündete Gewebe ist ein initialer Kontakt zwischen Leukozyten und Endothelzellen und ein anschließendes Rollen der Leukozyten an der Gefäßwand bis zum Integrin-vermittelten Arrest notwendig. Es konnte nachgewiesen werden, dass ADAP zusammen mit SLP-76 für die E-Selektin-vermittelte Integrinaktivierung und das langsame Rollen der Neutrophilen notwendig ist (Block et al., 2012).

Zu einer möglichen Bedeutung von ADAP für die Adhäsion und Migration von Makrophagen liegen keine Veröffentlichungen vor. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass SKAP-HOM (SKAP2) für die Integrinaktivierung von Makrophagen benötigt wird (Alenghat et al., 2012). Da ADAP mit den SKAP-Proteinen einen funktionellen Komplex bildet, lässt sich eine Rolle von ADAP für adhäsive Prozesse in Makrophagen vermuten. Bei der Phagozytose finden ebenfalls Prozesse der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts statt. Nach Aktivierung der Phagozytose durch den Fc $\gamma$ -Rezeptor bildet sich in Makrophagen ein multimolekularer Komplex, der neben anderen Molekülen ADAP, SLP-76 und Nck enthält (Coppolino et al., 2001). Die Rolle in anderen gewebeständigen Makrophagen ist bis jetzt weitgehend ungeklärt. Ein ADAP-Defekt bewirkt in Mikroglia keine Funktionseinschränkung wie NO-Freigabe und Zytokinausschüttung (Engelmann et al., 2013).

Das Akronym ADAP steht für *adhesion and degranulation promoting adapter protein* und deutet auf eine Beteiligung von ADAP bei der Degranulation hin, die am Modell einer ADAP-überexprimierenden Mastzelllinie *in vitro* auch gezeigt werden konnte (Geng et al., 2001). Im Tiermodell der passiven Anaphylaxie wiesen ADAP-defiziente Mäuse eine normale Histaminfreisetzung vergleichbar mit den Wildtyp-Mäusen auf (Wu & Koretzky, 2004). Die Ergebnisse der *in vitro*-Versuche und der *in vivo*-Versuche sind bisher widersprüchlich und lassen keine eindeutige Schlussfolgerung zur Rolle von ADAP in Mastzellen zu.

Dendritische Zellen sind im Rahmen der Immunantwort am besten in der Lage naive T-Zellen antigenspezifisch zu aktivieren. ADAP-defiziente dendritische Zellen zeigten eine normale Verteilung in der Mausohr-Epidermis sowie normale Adhäsion und Migration. Deutlich vermindert war jedoch die Fähigkeit, antigenspezifische Konjugate mit T-Zellen zu bilden.

Allerdings hatte diese reduzierte Konjugatbildung keinen Einfluss auf die T-Zellaktivierung. Zusätzlich war in Abwesenheit von ADAP in den dendritischen Zellen die Produktion der Zytokine IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10 nach Stimulation des Integrins CD11c vermindert (Togni et al., 2012). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass ADAP nur an bestimmten Integrin-vermittelten Funktionen der dendritischen Zellen beteiligt ist.

Das murine ADAP-Gen ist auf dem Chromosom 15 lokalisiert, das humane ADAP-Gen befindet sich auf dem Chromosom 5. Beide Proteine weisen eine Homologie von 77 % auf (da Silva et al., 1997).

Im humanen Genom wurde erstmals 2014 in einer mehrköpfigen nordirakischen Familie eine Non-sense-Deletion im *fyb*-Gen nachgewiesen, die ein Stop-Codon induziert. Bei einer Homozygotie dieser Variation kam es bei 3 verwandten Familienmitgliedern zu einer stärkeren Blutungsneigung in Form von Petechien. Im Differentialblutbild waren die Erythrozyten und Leukozyten normwertig. Es lag eine Thrombozytopenie vor und die Thrombozyten wiesen eine unterdurchschnittliche Größe auf. Es traten keine Immundefekte und außer einer Epistaxis keine weiteren Symptome auf. Es wird aufgrund der Blutverwandtschaft der Eltern angenommen, dass es sich um eine autosomale rezessive Thrombozytopenie handelt (Hamamy et al., 2014).

Im Jahr 2015 wurde eine weitere Studie veröffentlicht, die eine arabisch-christliche Familie untersuchte. In dieser Familie kam es zu gehäuften Petechien, starken menstrualen Blutungen und intraabdominalen Blutungen bei der Ruptur des Corpus Luteum. Eine Vollblut-Präparation wurde mittels Elektronenmikroskopie-Scanmethode (scanning electron microscopy, SEM) auf Unregelmäßigkeiten überprüft. Im Ergebnis wurde festgestellt, dass die Thrombozyten eine verringerte Größe und Anzahl aufweisen (Levin et al., 2015). Zudem bildeten sie verminderte Pseudopodien aus, was auf einen Funktionsverlust der Thrombozyten schließen lässt.

Somit steht der Thrombozytendefekt im Vordergrund bei den betroffenen Patienten mit Mutationen im *fyb*-Gen, das für das Protein ADAP kodiert. Weitere ADAP-assoziierte Erkrankungen des Menschen sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht bekannt.

## 1.2. Rolle von ADAP in Thrombozyten

Thrombozyten sind in erster Linie an der primären Hämostase beteiligt, indem sie als erste Akteure bei einer Endothelverletzung rekrutiert werden. Das freiliegende Kollagen aktiviert die Thrombozyten und induziert die Adhäsion, die zwischen dem immobilisierten von-Willebrand-

Faktor (vWF) auf der Oberfläche des Endothels und dem Glykoprotein GP Ib-IX-V der Thrombozyten entsteht (Abbildung 2 ①). Der Kollagenrezeptor Glykoprotein GPVI verstärkt die Adhäsion (Abbildung 2 ②). Diese Bindungen lösen intrazelluläre Signale aus, die durch eine erhöhte Aktivität der Thrombozyten zu einer Zunahme ihrer Adhäsivität und zur Ausbildung von Pseudopodien führen. Zudem werden von den Thrombozyten mehrere Mediatoren ausgeschüttet (wie zum Beispiel ADP und Thromboxan; Abbildung 2 ③). Durch das neusynthetisierte Thromboxan A<sub>2</sub> und den plättchenaktivierenden Faktor (PAF) werden weitere Thrombozyten rekrutiert und die bereits aktivierten Thrombozyten werden auf einem hohen Aktivierungsniveau gehalten (Abbildung 2 ④). Die Thrombozyten vernetzen sich untereinander mit Fibrinogen über das Glykoprotein GP IIb/IIIa (Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3). Dies führt zur reversiblen Aggregation der Thrombozyten, die stärker an das beschädigte Endothel über das Glykoprotein GP Ia /IIa (Integrin  $\alpha$ 2 $\beta$ 1) binden (Abbildung 2 ⑤) (Estevez & Du, 2017).

Bei der Thrombozytenaktivierung kommt es zum Entleeren der Thrombozyten-Granula (Degranulation). Die freigesetzten Stoffe induzieren einerseits die Degranulation weiterer Thrombozyten und leiten andererseits die plasmatische Blutgerinnung (sekundäre Hämostase) ein. Thrombozyten sind jedoch nicht nur für die Hämostase wichtig, sondern spielen auch eine wichtige Rolle im Bereich der Immunabwehr. Durch die Freisetzung von biogenen Aminen (Histamin, Serotonin), Zytokinen (PF4, PAF, TGF- $\beta$ 1) und Enzymen (Matrix-Metalloproteinasen, Hyaluronidase) beeinflussen sie wesentlich eine Entzündungsreaktion.

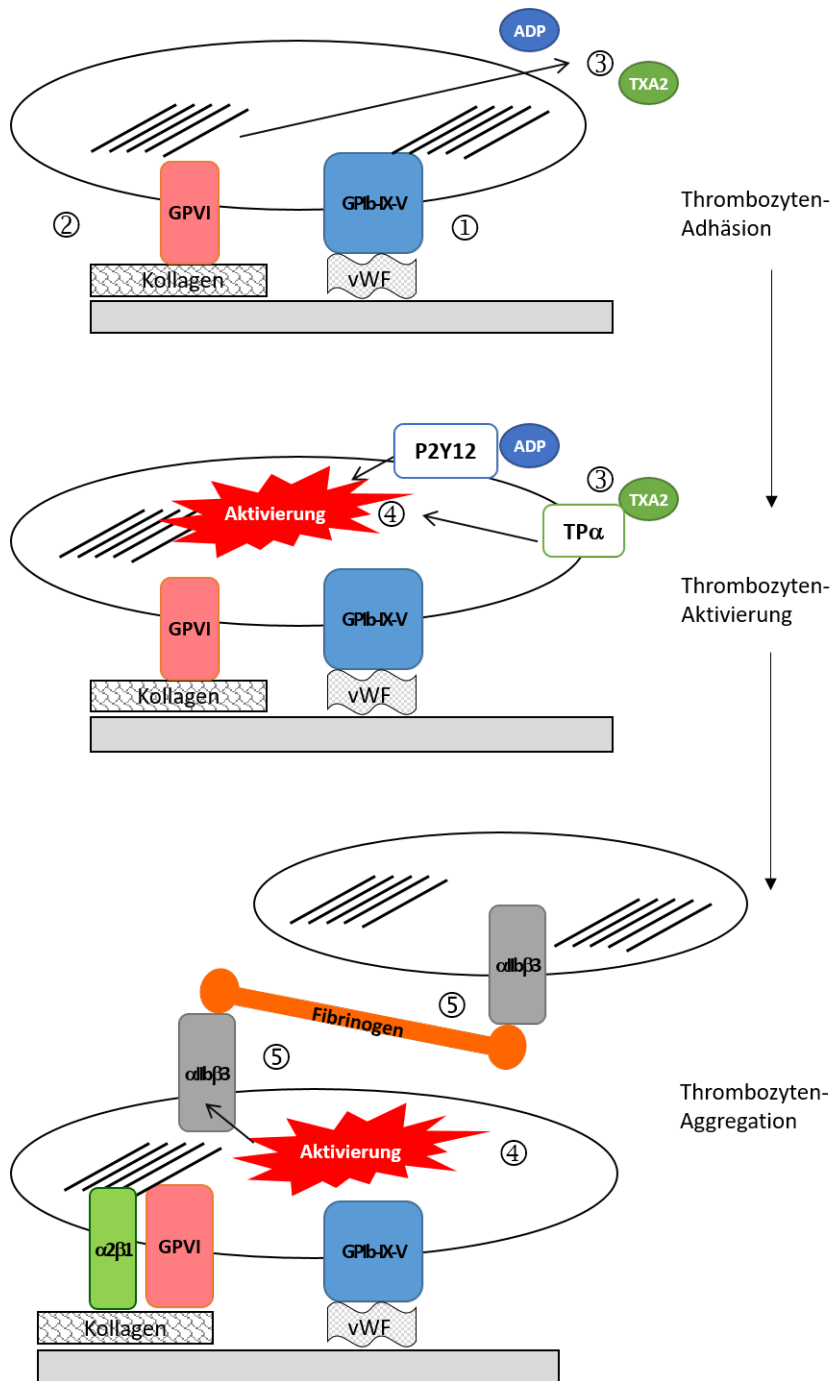


Abbildung 2 Dargestellt ist die primäre Hämostase. Im ersten Schritt werden über den von-Willebrand-Faktor (vWF) und Kollagen die Thrombozyten an das beschädigte Endothel adhärirt ①. Kollagen bindet direkt an Thrombozyten über GPVI ②. Dies aktiviert die Thrombozyten im zweiten Schritt und sie degranulieren verschiedene Mediatoren wie ADP oder synthetisieren Thromboxan A<sub>2</sub> neu ③. Dies setzt das Aktivierungsniveau der Thrombozyten hoch ④ und im letzten Schritt werden die Thrombozyten stärker an das Kollagen durch GP $\alpha$ 2 $\beta$ 1 gebunden und es findet eine Vernetzung mit anderen Thrombozyten über das Integrin  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 und Fibrinogen statt ⑤.

Das Glykoprotein  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 gehört zu den Integrinen und wird auch als Fibrinogenrezeptor bezeichnet. Dieser Rezeptor vermittelt die Bindung an Fibrinogen und ermöglicht damit die Vernetzung (Aggregation) mit anderen Thrombozyten. Für die  $\alpha$ IIB $\beta$ 3-vermittelte Thrombozytenfunktion ist ADAP ein entscheidender Faktor. ADAP ist sowohl am *inside-out signaling* nach Aktivierung des Glykoproteins GPIb-IX-V beteiligt als auch am *outside-in signaling* nach Bindung an Fibrinogen (Kasirer-Friede et al., 2007, 2010). Es wurde nachgewiesen, dass ADAP mit dem Integrin-bindenden Protein *talin* und *kindlin-3* interagiert. Im Falle einer ADAP-Defizienz findet keine Interaktion mit *talin* und *kindlin-3* statt, was zu einer verminderten Aktivität von Integrin  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 und damit zu einer verminderten Fibrinogenbindung führt (Kasirer-Friede et al., 2014). Dementsprechend wurde gezeigt, dass es bei einer ADAP-defizienten Maus zu einer verstärkten Nachblutung aus Wunden kommt. Bei einem experimentellen Carotidenverschluss wurde nachgewiesen, dass die gebildeten Thromben bei ADAP-defizienten Mäusen instabil sind (Kasirer-Friede et al., 2010).

ADAP ist außerdem an der Kollagen-induzierten Thrombozyten-Aktivierung beteiligt, die durch den Kollagenrezeptor GPVI und das Integrin  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 vermittelt wird (Jarvis et al., 2012). Unlängst konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von ADAP bereits während der Megakaryopoese im Knochenmark eine Rolle spielt. ADAP-defiziente Mäuse weisen eine leichte Thrombozytopenie auf. Als Ursache wurde die gestörte Bildung und Adhäsion von Podosomen beschrieben. Von diesen langen zytoplasmatischen Ausläufern der Megakaryozyten werden die Thrombozyten abgeschnürt und in die Blutzirkulation abgegeben. Fehlt ADAP, entstehen Mikrothrombozyten und die Anzahl der Thrombozyten im Blut ist reduziert (Spindler et al., 2018).

Vor etwa 15 Jahren wurde eine bis dahin unbekannte Thrombozytenfunktion entschlüsselt: die Beteiligung bei der Entwicklung der lymphatischen Gefäße während der Embryonalentwicklung. Durch die Bildung von Thrombozytenaggregaten wird eine Separation der neu gebildeten Lymphgefäße von den Blutgefäßen gewährleistet und ein Kurzschluss zwischen beiden Gefäßsystemen verhindert.

Das Zusammenspiel von Thrombozyten und lymphatischen Endothelzellen wird maßgeblich von dem auf den lymphatischen Endothelzellen sitzenden Molekül Podoplanin und dem Thrombozytenrezeptor CLEC-2 bestimmt. Unabhängig davon reguliert die Interaktion von Podoplanin mit dem Thrombozytenrezeptor CLEC-2 die Integrität von hochendothelialen Venolen (*high endothelial venules*) im Lymphknoten (Herzog et al., 2013). Auch für die Gefäßentwicklung im Gehirn ist die Wechselwirkung der beiden Moleküle erforderlich. Fehlt

CLEC-2 auf den Thrombozyten, kommt es bereits während der Embryonalentwicklung zu Einblutungen im Gehirn (Lowe et al., 2015).

CLEC-2 wurde erstmals als Thrombozytenrezeptor beschrieben, an den das Schlangengift der malaysischen Mokassinotter bindet (Suzuki-Inoue et al., 2007). Wenn CLEC-2 stimuliert wird, beginnt die Integrinaktivierung, Thrombozytenaggregation und eine Ausschüttung von Botenstoffen. Der CLEC-2-Rezeptor beinhaltet ein Hemi-Immunozeptor-Tyrosin-Aktivierungsmotiv (hemi-ITAM). Wird der Rezeptor aktiviert, kommt es zur Dimerisierung und eine Bindung und Aktivierung der Syk-Kinase werden möglich. Die Adapterproteine LAT und SLP-76 sind auch bei den CLEC-2 Signalwegen beteiligt (Pollitt et al., 2010).

Der Verlust von CLEC-2, Syk, SLP-76 führte jeweils zu einer schwerwiegenden Malformation der Lymphgefäße in der Embryogenese (Abtahian et al., 2003; Bertozzi et al., 2010; Ichise et al., 2009). Es wurden blutgefüllte Lymphgefäße beobachtet, die als *blood-lymphytic mixing phenotype* bezeichnet werden. In allen 3 Mauslinien wurde eine erhöhte perinatale (SLP-76) bzw. postnatale (Syk, CLEC-2) Letalität festgestellt. Bei CLEC-2-defizienten Mäusen trat allerdings nur eine sehr geringe Blutungsstörung auf.

Eine mögliche Beteiligung von ADAP an den CLEC-2 Signalwegen in Thrombozyten ist bisher nicht beschrieben worden. Da ADAP direkt mit SLP-76 und Syk interagieren kann, lässt sich zumindest ein indirekter Einfluss von ADAP auf die CLEC-2-vermittelte Signaltransduktion in Thrombozyten vermuten.



### 1.3. EAE

Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist eine durch CD4<sup>+</sup>-T-Zellen vermittelte Autoimmunerkrankung, die durch eine Infiltration der aktivierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen eine Demyelinisierung der Axone des zentralen Nervensystems von caudal bewirkt. Autoreaktive T-Zellen sind dabei gegen Myelin-assoziierte Proteine gerichtet wie MOG (Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein) oder PLP (Proteolipid-Protein) und MBP (Myelin basisches Protein). Das Krankheitsmodell erlaubt Studien zur Pathogenese und Immunregulation von CD4<sup>+</sup> Th1/Th17-vermittelten Gewebeschäden und wird als Mausmodell der menschlichen autoimmunvermittelten und demyelinisierenden Erkrankung der Multiplen Sklerose betrachtet. In Abhängigkeit vom Mausstamm, dem genetischen Hintergrund und dem zur Immunisierung verwendeten Antigen können unterschiedliche Aspekte der Pathogenese der Erkrankung untersucht werden. In SJL/J (H-2<sup>S</sup>)-Mäusen verläuft die Paralyse schubförmig-remittierend und erlaubt dadurch verschiedene Strategien der Immunmodulation. In C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>)-Mäusen zeigt sich ein chronisch-progressiver Verlauf der Erkrankung, wobei in anderen Mäusestämmen wie bei PL/J (H-2<sup>u</sup>) und B10.PL (H-2<sup>u</sup>) der Verlauf akut und selbstlimitierend ist.

Die EAE kann aktiv induziert werden durch die subkutane Applikation von Myelin-Peptiden in Kombination mit dem *Complete Freund's Adjuvant* (CFA). CFA stellt eine Wasser-in-Öl-Emulsion dar, der abgetötete Mykobakterien (*Mycobacterium tuberculosis*) zugesetzt werden. Dadurch wird eine Th1-dominierte Immunantwort induziert. Zusätzlich wird die Krankheitsinduktion verstärkt durch die gleichzeitige Gabe von Pertussis-Toxin. Neben dieser aktiven Immunisierung mit Myelin-Peptiden gibt es auch die passive Induktion der EAE. Dabei werden immunisierten Mäusen die aktivierten Myelin-spezifischen autoreaktiven T-Zellen entnommen und nach Restimulation *in vitro* durch adoptiven Transfer in naive Empfängermäuse übertragen (Stromnes & Goverman, 2006a, 2006b).

Außerdem existieren verschiedene Mauslinien mit transgenen T-Zellrezeptoren (TZR), die spezifisch Myelinpeptide erkennen wie beispielsweise MOG<sub>35-55</sub>. Bei diesen Tieren kann sich die EAE auch spontan entwickeln (Bettelli et al., 2003). Durch die Weiterentwicklung der Protokolle zur Induktion der passiven EAE können die TZR-transgenen myelinspezifischen T-Zellen *in vitro* durch das Myelinpeptid und Antikörper gegen den T-Zellrezeptor aktiviert werden. Die zusätzliche Gabe von Zytokinen kann eine Polarisation in Th1 und/oder Th17-Effektorzellen hervorrufen (Bettelli et al., 2006; Yang et al., 2009).

Klinisch manifestiert sich die EAE in der Maus durch eine aufsteigende Paralyse, die am Schwanz beginnt und über die Hinterläufe bis zu den Vorderläufen aufsteigen kann (Miller et al., 2010).

Die aktive EAE erfolgt in verschiedenen Stadien:

- Die Aktivierung von Myelin-spezifischen T-Zellen in der Peripherie, Proliferation und Differenzierung in Effektorzellen.
- Die Migration von aktivierten Myelin-spezifischen T-Zellen in das zentrale Nervensystem, die eine Überwindung der *tight junctions* des Endothels der Blut-Hirn-Schranke beinhaltet.
- Reaktivierung der Myelin-spezifischen T-Zellen im ZNS sowie Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen, die das Einwandern von weiteren peripheren mononukleären Phagozyten in das ZNS-Parenchym bewirkt.
- Aktivierung der peripheren mononukleären Phagozyten und ZNS-ständigen Mikroglia durch T<sub>H</sub>-Zellen vermittelte Zytokine.
- Die Demyelinisierung der ZNS-Axone durch Phagozytose der aktivierten mononukleären Zellen und durch die Inflammation und zytotoxischen Effekt der Zytokine (z.B: IFN- $\gamma$ , LT/TNF- $\beta$ , IL-17, TNF- $\alpha$  und NO), die von den aktivierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und Monozyten ausgeschüttet werden (Miller et al., 2010).

Auch wenn Tiermodelle die Erkrankung der Multiplen Sklerose nicht vollständig abbilden können, so wurde das Tiermodell der EAE in der Vergangenheit erfolgreich genutzt, um immunologische Therapieansätze für die Multiple Sklerose zu erforschen.

Die Immuntherapeutika Natalizumab, Fingolimod und Siponimod, Ozanimod werden eingesetzt, um die Migration von T-Zellen zu hemmen. Natalizumab ist ein humanisierter monoklonaler IgG4-Antikörper, der an das alpha4-Integrin bindet. Hiermit wird die Interaktion von Liganden VCAM1 an Endothelzellen unterdrückt und die Adhäsion und Diapedese verhindert. Fingolimod ist ein strukturelles Analogon des Lipidmediators Sphingosin-1-Phosphats (S1P) und bindet in phosphorylierter Form an vier der fünf Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren (S1PR1, S1PR3, S1PR4 und S1PR5). S1PR1 ist der Hauptwirkort von Fingolimod. Die Bindung von S1P an den S1PR1 auf Lymphozyten führt zur Internalisierung des Rezeptors (Matloubian et al., 2004). Fehlt der Rezeptor, kann der Konzentrationsunterschied von S1P nicht mehr von den Lymphozyten erfasst werden und es erfolgt eine Sequestrierung der Zellen im sekundären lymphatischen Gewebe. Das betrifft vor allem die naiven T-Zellen und „central

memory“ T-Zellen und die naiven B-Zellen. Siponimod und Ozanimod wirken ähnlich wie Fingolimod und binden an S1PR1- und S1PR5-Rezeptoren.

Zur Entzündungshemmung werden Glukokortikosteroide, Mitoxantron und Dimethylfumarat benutzt, um die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen zu verhindern. Glukokortikosteroide wie Methylprednisolon wirken anti-inflammatorisch und immunsuppressiv, werden zur akuten Schubtherapie eingesetzt und sind etablierte Therapiestandards. Mitoxantron wirkt als Zytostatikum und hat eine immunsuppressive Wirkung auf B-, T-Lymphozyten und Makrophagen. Es wird nur noch bei hochaktiver schubförmiger MS eingesetzt, bei der andere Therapieoptionen versagt haben und eine rasche Behinderung erfolgt. Dimethylfumarat wirkt anti-inflammatorisch, da pro-inflammatorische Zytokine und Adhäsionsmoleküle vermindert exprimiert werden. Zudem wird eine neuro- und Myelin-protective Wirkung diskutiert (Linker et al., 2011; Wilms et al., 2010).

Zur Immunmodulation wird Interferon-beta 1a und Glatirameracet verwendet. Der genaue Wirkmechanismus für die Interferone in der Behandlung der Multiplen Sklerose ist noch nicht geklärt, allgemein wirken Interferone antiviral, antiproliferativ und immunmodulierend. Interferone-beta 1a ist die Standardtherapie für schubförmige Verläufe. Der genaue immunmodulierende Wirkmechanismus für Glatirameracet ist nicht bekannt. Es handelt sich hierbei um ein synthetisch hergestelltes Gemisch von Peptiden unterschiedlicher Länge aus vier natürlichen Aminosäuren. Diskutiert wird eine Induktion regulatorisch wirkender T-Suppressor-Zellen und eine Balancierung des Th1/Th2-Zytokin-Ungleichgewichts. Zudem wird die Bildung von Nervenwachstumsfaktoren vermutet (Weinstock-Guttman et al., 2017).

Die Antimetabolite Cladribin und Teriflunomid werden zur Hemmung der Proliferation eingesetzt. Cladribin ist ein synthetisches Purin-Nukleosid-Analogon und sorgt in seiner aktiven Form als Cladribin-Triphosphat für eine Inhibition von DNA-Reparaturmechanismen bzw. eine Inhibition der DNA-Synthese und führt damit zu einer Lymphopenie. Dieser Effekt betrifft besonders CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Der Wirkmechanismus von Teriflunomid ist die nicht-kompetitive, reversible Blockade des Enzyms Dihydroorotat-Dehydrogenase, das für die de-novo-Synthese von Pyrimidin-Nukleotiden zuständig ist (Warnke et al., 2013).

Um zirkulierende Effektorzellen zu eliminieren, werden monoklonale Antikörper eingesetzt. Dabei eignen sich Ocrelizumab und Rituximab für die B-Zellen und Alemtuzumab für T- und

B-Zellen. Ocrelizumab und Rituximab sind monoklonale Antikörper, die sich gegen das CD20-Antigen auf B-Zellen richten. Dies bewirkt eine Depletion der CD20-positiven Zellen im Blut, die vor allem die zirkulierenden B-Zellen betreffen. Alemtuzumab ist ein monoklonaler Antikörper gegen das CD52-Antigen, das auf reifen Lymphozyten zu finden ist.

Die genannten Therapieoptionen der Immunotherapie sind aus der aktuellen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie e.V. entnommen. (Hemmer, 2021), Stand: 11.05.2021

In der Pathogenese der EAE sind die enzephalitogenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen hauptverantwortlich für die Induktion der Erkrankung. Die Entzündungsreaktion führt zur Rekrutierung und Aktivierung zahlreicher anderer Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Batoulis et al., 2010).

Die Rolle der Thrombozyten bei der EAE wird kontrovers diskutiert. Es wurde klar gezeigt, dass Thrombozyten in dem entzündeten Rückenmark der Maus nach der EAE-Induktion vorhanden sind (Sotnikov et al., 2013). Die Depletion der Thrombozyten während der frühen Immunisierungsphase hatte keinen Effekt auf die EAE-Entwicklung. Im Gegensatz dazu unterdrückte die Depletion der Thrombozyten den Schweregrad der EAE, wenn diese während der Effektorphase der EAE erfolgte. Die Beobachtung wurde mit der Tatsache erklärt, dass Thrombozyten Chemokine und pro-inflammatorische Zytokine ausschütten, die eine aktive Invasion der Leukozyten und die Aktivierung der residenten Mikroglia bewirken (Langer et al., 2012). Eine andere Studienreihe zeigte, dass die Verabreichung von antithrombotischem Serum zur Depletion der Thrombozyten während der späten Phase der EAE die Erkrankung stärker ausbrechen ließ. Es wurde gezeigt, dass aktivierte Thrombozyten Aggregate mit CD4<sup>+</sup>-T-Zellen bilden, so dass die CD4-T-Zell-Aktivierung verringert wird (Starossom et al., 2015). Die Anwendung von Glatirameracetat bei der EAE inhibierte die Aktivierung der Thrombozyten und führte zu einer verminderten Interaktion mit anderen Immunzellen wie beispielsweise Makrophagen (Starossom et al., 2014). Zusammengefasst ist es eine anerkannte Tatsache, dass die Thrombozyten direkt oder indirekt über die freigesetzten Thrombozytenmediatoren an den entzündlichen Prozessen während der EAE beteiligt sind. Dennoch bleibt die genaue Rolle der Thrombozyten während der unterschiedlichen Phasen der EAE weiter aufzuklären.

Wie bereits beschrieben, wird das Adapterprotein ADAP in hämatopoetischen Zellen mit Ausnahme von reifen B-Zellen exprimiert. Alle diese Zellen sind an der komplexen Pathogenese der EAE beteiligt. So war es nicht verwunderlich, dass ADAP Knock-out-Mäuse

mit einem kompletten Verlust des Adapterproteins einen veränderten Schweregrad der EAE aufweisen. Die Krankheit verläuft in den ADAP Knock-out-Mäusen deutlich milder als in den Wildtyp-Mäusen unabhängig davon, ob die EAE aktiv durch Immunisierung mit dem Peptid MOG<sub>35-55</sub> induziert wurde oder passiv durch adoptiven Transfer von ex vivo-aktivierten TZR-transgenen MOG<sub>35-55</sub> spezifischen T-Zellen (Engelmann et al., 2013). Weiterführende Untersuchungen unter Einsatz von Knochenmark-Chimären ergaben, dass der mildere Verlauf der EAE in den ADAP Knock-out-Mäusen teilweise T-zellunabhängig ist und möglicherweise andere hämatopoetische Zellen eine Rolle spielen. Ein ADAP-Defekt in Mikroglia bewirkte keine Funktionseinschränkung wie NO-Freisetzung und Zytokinausschüttung (Engelmann et al., 2015). Unklar bleibt der mögliche Einfluss von ADAP in Thrombozyten auf den Verlauf der EAE.

#### **1.4. Zielstellung**

Das Adapterprotein ADAP wird in verschiedenen hämatopoetischen Zellen exprimiert wie T-Zellen, NK-Zellen, myeloischen Zellen und Thrombozyten. Alle diese Immunzellen spielen eine Rolle bei der Pathogenese der EAE. Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Annegret Reinhold ergaben, dass bei Mäusen mit einem kompletten ADAP-Knock-out der Schweregrad der EAE deutlich vermindert ist. Der komplette ADAP-Knock-out lässt jedoch keine Unterscheidung zu, welche ADAP-exprimierenden Immunzellen inwieweit an dem Prozess beteiligt sind und somit den Schweregrad der EAE mitbestimmen. Mit Hilfe von konditionalen Knock-out-Mäusen ist eine differenzierte Betrachtungsweise möglich, da ADAP gezielt in einer Zellreihe deletiert wird und somit die Auswirkungen einer Zelllinien-spezifischen Deletion von ADAP untersucht werden können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die konditionale Knock-out Maus mit dem spezifischen Verlust von ADAP in den Thrombozyten detailliert untersucht werden. Daraus ergaben sich folgende Teilaufgaben:

1. Immunologische Charakterisierung der konditionalen ADAP-Knock-out Maus,
2. Analyse von Thrombozytenfunktionen der konditionalen ADAP-Knock-out Maus,
3. Untersuchungen zum EAE-Verlauf der konditionalen ADAP-Knock-out Maus.

Diese Untersuchungen sollen im Allgemeinen zur Aufklärung der Bedeutung von Immunzellen in Autoimmunerkrankungen beitragen und im Speziellen der Aufklärung der Rolle des Adapterproteins ADAP in der Pathologie der EAE als Modell für die Multiple Sklerose dienen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Verwendete Mauslinien und Genotypen

Die verwendeten Mäuse C57BL/6N-Fyb<sup>tm1a(EUCOMM)Hmgu/Cnrm</sup> mit dem sogenannten „Knock-out First Allel“ wurden von dem *European Conditional Mouse Mutagenesis Program* (EUCOMM) Projekt hergestellt und vom *European Mouse Mutant Archive* (EMMA) erworben (Skarnes et al., 2011). Die LacZ- und Neomycin-Resistenzgenkassette wurde eliminiert durch die Verpaarung mit transgenen Mäusen, die die Flp-Rekombinase exprimieren (siehe Abbildung 3). Daraus resultiert das gefloxtete Allel mit zwei flankierenden loxP-Sequenzen und es wird der Wildtyp wieder erzeugt. Um Mäuse mit einer ausschließlichen Deletion des ADAP-Gens in der Megakaryozytenlinie zu erzeugen, wurden die Tiere mit den gefloxteten Allelen mit den Mäusen verpaart, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des *platelet factor 4* (PF4) Promotors exprimieren (Tiedt et al., 2007). Diese Tiere wurden uns dankenswerterweise von Bernhard Nieswandt aus Würzburg in Deutschland zu Verfügung gestellt. Das Vorhandensein oder das Fehlen der FRT-Sequenzen, der loxP-Sequenzen, des Exon 2 vom ADAP-Gen und des Gens für die Cre-Rekombinase wurde durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) überprüft.

Für die Experimente wurden 8 bis 14 Wochen alte Tiere verwendet. Um den spezifischen Effekt der ADAP-Deletion zu untersuchen, wurden ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> (Cre-Kontrolle) und ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4<sup>tg</sup> (konditionaler Knock-out) immer als Wurfgeschwister benutzt.

Die konventionelle ADAP-Knock-out Maus wurde rückgekreuzt auf den genetischen Hintergrund von C57BL/6JBom über mindestens zehn Generationen.

MOG<sub>35-55</sub>-spezifische T-Zellrezeptor transgene Mäuse (2D2-Mäuse) wurden uns freundlicherweise von Vijay Kuchroo (Bettelli et al., 2003) zur Verfügung gestellt.

Alle Mäuse wurden unter spezifisch-pathogenfreien Bedingungen im Zentralen Tierlabor der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg gehalten. Die neugeborenen Tiere wurden nach 4 Wochen entwöhnt und zu maximal 5 Tieren in einem Käfig gehalten. Sie wurden unter Standardbedingungen in einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus versorgt. Die Kost wurde auf eine Standarddiät eingestellt und den Mäusen wurde Leitungswasser nach eigenem Ermessen angeboten.

Die Charakterisierung der Mäuse erfolgte in Übereinstimmung mit dem §4 Absatz 3 des Tierschutzgesetzes (Tötung zu wissenschaftlichen Zwecken). Das Versuchsvorhaben „Induktion der Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) bei konditionalen ADAP-defizienten

Mäusen und entsprechenden Wildtypmäusen“ war von der regionalen Zuständigkeitsbehörde (Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt; Aktenzeichen: 42502-2-1273 Uni MD) genehmigt worden.

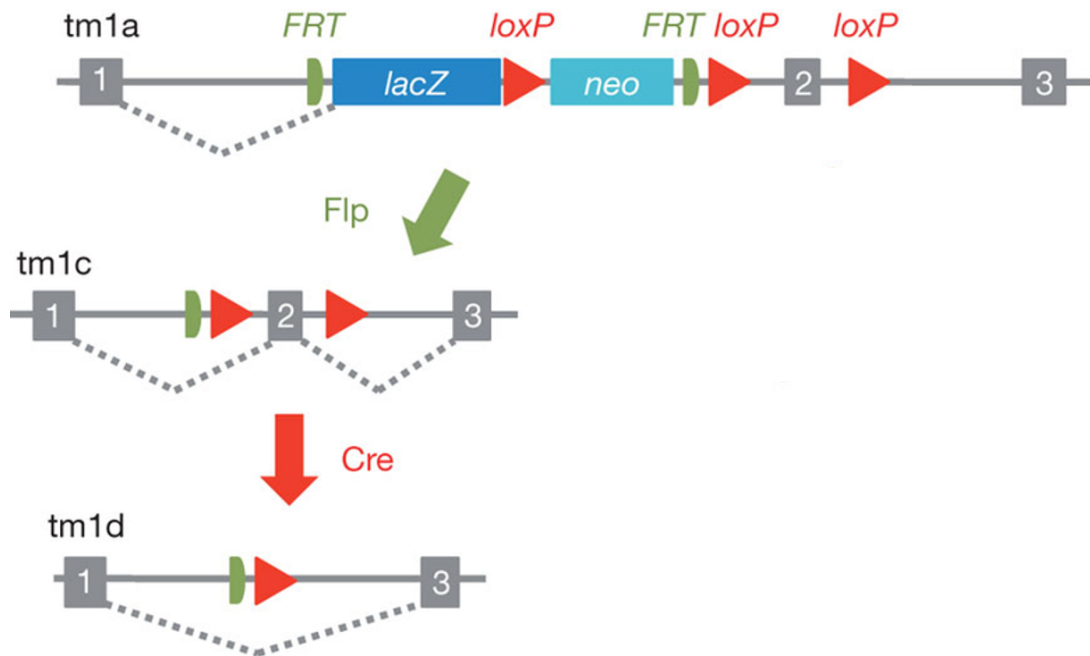


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Generierung der konditionalen Knock-out-Mäuse mit ausschließlicher Deletion des ADAP-Gens in der Megakaryozytenlinie (modifiziert nach <https://www.eummc.org>)

Das “Knock-out First Allel“ enthält eine Kassettenstruktur mit dem Neomycin-Resistenzgen (*neo*) und dem *lacZ*-Reportergen (*lacZ*). Die flankierenden FRT-Sequenzen (grün) werden spezifisch von der FLP-Rekombinase erkannt. Es entsteht das konditionale *tm1c*-Allel und der Wildtyp wird wiederhergestellt. Die Exons 1, 2 und 3 (grau) gehören zum ADAP-Gen. Nach Erkennung der beiden *loxP*-Sequenzen wird das Exon 2 des ADAP-Gens deletiert (*tm1d*). Es entsteht ein konditionaler ADAP-Knock-out in Megakaryozyten und reifen Thrombozyten.

## 2.2. Isolierung von genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien

Für die Isolierung der genomischen DNA wurden 3-6 Wochen alte Mäuse verwendet und eine Schwanzspitzenbiopsie durchgeführt. Das gewonnene Material wurde mit einem Verhältnis 1:1 von Schwanzbiopsie, 400 µl Schwanz-Lyse-Puffer und 10 µl Protein K (20 mg/ml) über Nacht bei 55 °C im Thermomixer comfort von Eppendorf lysiert.

Anschließend wurden die Gewebsrückstände bei 16.100 x g für 5 min bei 22 °C zentrifugiert. Das hieraus gewonnene Lysat von 400 µl wurde in ein neues Eppendorf-Röhrchen pipettiert und es wurden 400 µl Isopropanol hinzugefügt. Anschließend wurde erneut zentrifugiert bei 16.100 x g für 10 min bei 22 °C.



Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit 400 µl 70 % Ethanol versetzt und gevortext mit Heidolph Relax top. Es wurde erneut bei 16.100 x g für 5 min bei 22 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zuletzt wurde das Pellet in 300 µl Aqua dest. resuspendiert und für 30 min bei 60 °C im Thermomixer comfort gelöst.

#### Schwanz-Lyse-Puffer

Tris 1 M pH 8,0	25 ml
EDTA 100 mM	100 ml
NaCl 100 mM	50 ml
SDS 10 %	50 ml
Ad 500 ml H <sub>2</sub> O	275 ml

### 2.3. Genotypisierung mittels qualitativer PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) diente in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis der verwendeten Genotypen. Die PCR erfolgt in drei Schritten zur Amplifizierung der spezifischen DNA-Sequenzen. Die in dieser Arbeit verwendete Mastermixe für die unterschiedlichen PCR-Nachweise sind in Tabelle 1 aufgeführt. Der erste Schritt beinhaltet die Denaturierung der DNA-Stränge bei Temperaturen von 92 °C bis 98 °C. Im zweiten Schritt lagern sich die entsprechenden Sequenz-spezifischen Primer an die DNA-Stränge an. Im dritten Schritt wird die komplementäre DNA mit der hitzebeständigen Taq-Polymerase amplifiziert. Die jeweiligen Programme, die für die PCR verwendet wurden, sind in Tabelle 2 aufgelistet. Weiterhin sind die Gensequenzen in Tabelle 3 für die Primer der PCR-Nachweise aufgezählt. Durch diese Prozedur wird genug Material gewonnen, um die einzelnen DNA-Fragmente in der Agarose-Gelelektrophorese nachzuweisen. In dieser Arbeit wurden vier verschiedene PCR-Produkte nachgewiesen.

**Tabelle 1 Zusammensetzung des Mastermixes für LAR3-, conADAP-, Flp- und PF4-iCre-PCR für 20  $\mu$ l**

<b>PCR Mix</b>	<b>LAR3</b>	<b>conADAP</b>	<b>Flp</b>	<b>PF4-iCre</b>
5x-Puffer	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
dNTPs (10 mM)	0,4 $\mu$ l	0,4 $\mu$ l	0,4 $\mu$ l	0,4 $\mu$ l
Taq Promega	0,1 $\mu$ l	0,1 $\mu$ l	0,1 $\mu$ l	0,1 $\mu$ l
Primer 1	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Primer 2	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Primer 3	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	-	-
H <sub>2</sub> O aqua dest.	9,5 $\mu$ l	9,5 $\mu$ l	10,5 $\mu$ l	9,5 $\mu$ l
DNA	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l

**Tabelle 2 Temperaturprofil der LAR3-, conADAP-, Flp- und PF4-iCre-PCR mit dem Thermocycler T3000 von Biometra®**

<b>PCR-Schritte</b>	<b>LAR3</b>		<b>conADAP</b>		<b>Flp</b>		<b>PF4-iCre</b>	
	T (°C)	t (s)	T (°C)	t (s)	T (°C)	t (s)	T (°C)	t (s)
Initiale Aktivierung	95	300	95	300	95	300	94	300
Denaturierung	95	60	95	60	95	60	94	45
Primer-Anlagerung	62	45	66	45	65	45	56	45
Elongation	72	90	72	60	72	60	72	30
Finale Elongation	72	600	72	600	72	600	72	600
Stopp	10	$\infty$	10	$\infty$	10	$\infty$	4	$\infty$

**Tabelle 3 PCR-Primer für die Genotypisierung**

PCR	Primer	Primersequenz
LAR3	LAR3 fwd	5'-ggg agg tgg gaa tat ggg tg-3'
	LAR3 rev1	5'-cac aac ggg ttc ttc tgt tag tcc-3'
	LAR3 rev2	5'-ggt caa ggg gag gtt tga tgt-3'
conADAP	cA Exon2 fwd	5'-aaa cat caa acc tcc cct tga c-3'
	cA Exon2 rev	5'-tca cga ggt gag atc gtc tg-3'
	cALoxp3 rev2	5'-ggc gag ctc aga cca taa ctt cg-3'
Flp	cADAP Frt fwd	5'-ggc gcc gga acc gaa gtt-3'
	Flp rev	5'-ccc cag acc tag cac tca ca-3'
PF4-iCre	Cre fwd	5'-ccc ata cag cac acc ttt tg-3'
	Cre rev	5'-tgc aca gtc agc agg tt-3'

#### 2.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient zur Auftrennung und Darstellung der durch die PCR erworbenen DNA-Fragmente. Es wird ein Agarosegel von 2 % benutzt. Dieses wird durch 2 g Agarose und 100 ml TAE-Puffer hergestellt. Das Gemisch wird erhitzt und mit Ethidiumbromid in einer 1:10.000 Verdünnung versetzt (die Konzentration der Stammlösung beträgt 10 mg/ml). Dieses Gemisch wird in einer Form ausgegossen und ein Kamm für die späteren Taschen eingesetzt. Nach dem Auskühlen wird das Gel in eine Gelkammer (Sub-Cell GT von Bio-Rad) gelegt, mit TAE-Puffer aufgefüllt und mit dem DNA-Marker (GeneRuler 100 bp Plus von Molecular biology), den Proben und der Blindprobe (H<sub>2</sub>O) beladen. Der DNA-Marker GeneRuler 100 bp Plus wurde in jedem Gel in der ersten Tasche aufgetragen. Die letzte Tasche beinhaltet eine Wasserprobe zur Kontrolle.

Bei einer Spannung von 110 V und 40 min wurde die Gelelektrophorese durchgeführt. Unter der Spannung wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle zur Anode. Nach abgelaufener Zeit wurde das Gel unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit dem Geldokumentationssystem Transilluminator von Herolab dokumentiert.

### 50 x TAE-Puffer

Tris	121 g
Essigsäure	28,55 ml
EDTA	18,6 g
Ad 1000 ml Aqua dest.	

## 2.5. Charakterisierung der Mäuse

### 2.5.1. Präparation der Mäuse

Die Mäuse wurden nach der oben beschriebenen Genetik ausgewählt. Zuerst erfolgte eine Betäubung durch Inhalation mit CO<sub>2</sub>, gefolgt von einer zervikalen Dislokation zur sicheren Tötung der Mäuse. Durch den Ohrreflex und das Setzen eines Schmerzreizes an der Hinterlaufspote wurde die Tötung überprüft. Die Präparation erfolgte auf einem Styroportablett und die Mäuse wurden an allen Extremitäten fixiert. Danach erfolgte eine Desinfektion mit 70 % Ethanol.

Danach wurde die Dermis entlang der Linia mediana anterior von der Os pubis bis zu dem zervikalen Ansatz eröffnet, ohne die Bauchdecke zu beschädigen. Dann wurde der Thorax unter Schonung von Pulmo und Cor eröffnet.

Zur Blutentnahme wurde eine mit 0,1 ml Citrat gespülte Spritze (1 ml) mit einer 27<sup>''</sup> G-Kanüle (Becton Dickinson) benutzt und eine kardiale Punktion durchgeführt. Das gewonnene Blut wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 50 µl Citrat überführt.

Der Thymus wurde unterhalb der Clavicula aufgesucht und durch Zupfpräparation gewonnen. Bis zur weiteren Verwendung wurde der Thymus in einer Petrischale mit PBS (Biochrom) auf Eis aufbewahrt.

Danach erfolgte die Eröffnung der Cavitas abdominalis und die Darstellung von Gaster, intestinalen Trakt, Splen, Hepar, Ren und Vescia urinaria. Hepar und Splen wurden durch Zupfpräparation entfernt und in einer Petrischale mit PBS auf Eis aufbewahrt.

Zuletzt erfolgte die Skelettierung des Femurs. Das Femur wurde am proximalen und distalen Ende mit einer Schere durchtrennt. Bei der so eröffneten Cavitas medullaris wurde eine mit PBS gefüllte 2 ml Spritze eingeführt und das Medulla ossium flava herausgedrückt. Das Medulla ossium flava wurde in einen 15 ml Falcon aufgefangen, auf 10 ml PBS aufgefüllt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt.

### Herstellung der Einzelzellsuspensionen

In einer mit PBS gefüllten Petrischale wurde in dem Zellfilter (Zellsieb 100 µm; Falcon) jeweils der Splen und der Thymus platziert und mit dem Stempel einer Spritze (2 ml) zerdrückt. Die Zellen wurden insgesamt in 13 ml PBS gelöst und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Dann wurden die Proben zentrifugiert bei 485 x g für 7 min. Danach wurden die Röhrchen dekantiert. Die Zellen des Thymus wurden auf 10 ml aufgefüllt.

### Erythrozyten-Lyse von Splen und Medulla ossium flava

Die Zellen der Medulla ossium flava und des Splens wurden zentrifugiert bei 485 x g für 7 min. Danach wurden die Proben dekantiert. Auf die Pellets wurde 3 ml ACK Puffer gegeben und bei 37 °C für 5 min inkubiert.

Nach dieser Zeit wurden die Proben auf 10 ml PBS aufgefüllt, um einerseits die Lyse der Erythrozyten zu stoppen und andererseits, um die Zellen zu waschen. Danach wurden die Proben bei 485 x g für 7 min zentrifugiert. Die Proben wurden dekantiert und der Rest der Flüssigkeit wurde abgesaugt. Die Proben des Splens wurden auf 10 ml PBS aufgefüllt und die Zellen der Medulla ossium flava wurden auf 5 ml aufgefüllt.

### ACK-Puffer

10 mM NaHCO <sub>2</sub>	420 mg / 500 ml
150 mM NH <sub>4</sub> Cl	4012 mg / 500 ml
0,1 mM EDTA	100 µl EDTA 0,5 M / 500 ml

### Zellzählung der gewonnenen Einzelzellsuspensionen

Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurde 2 µl der Einzelzellsuspension in 98 µl Trypanblau-Lösung verdünnt. Durch die defekte Zellmembran toter Zellen gelangte das Trypanblau in das Zellinnere und färbte die Zellen bläulich. Es wurden 15 µl der so hergestellten Zellsuspension auf eine Zellkammer Neubauer *improved* aufgetragen. Die Zellzählung erfolgte nach dem üblichen Standard der vitalen Zellen in 16 Kleinstquadraten unter einem Inversmikroskop.

Die Lebendzellzahl pro ml wurde mit der ermittelten Auszählung durch die folgende Formel bestimmt:

$$\text{Zellzahl / ml} = \frac{\text{ermittelte Lebendzellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Kammeranzahl} \times \text{Kammerfaktor}}$$

### 2.5.2. Verteilung der Leukozytenzahl und Differentialblutbild

Zur Messung der Leukozyten und des Differentialbildes wurde die mit Citrat versetzte Blutprobe im offenen Modus am Hämatologie-Automaten AcT diff2 von Beckman Coulter gemessen.

### 2.5.3. ELISA für die Bestimmung von PF4 im Plasma

Für die Bestimmung von PF4 im Plasma wurde thrombozytenfreies Plasma gewonnen. Dazu wurde das Citratblut bei 400 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein anderes Eppendorfgesäß überführt und bei 5900 x g für 15 min zentrifugiert. Dieser Überstand wurde erneut in ein anderes Eppendorfgesäß überführt. Für eine spätere Verwendung wurden die Proben bei -70 °C gelagert. Für den ELISA wurde das Mouse CXCL4/PF4 Quantikine ELISA Kit der Firma R&D Systems verwendet. Alle Reagenzien wurden zunächst auf Raumtemperatur gebracht. Die benötigte Anzahl von Kavitäten einer Mikrotiterplatte wurde aus der Verpackung geholt und bereitgestellt. In die jeweilige Kavität wurde 50 µl von *Assay Diluent RDI-40* gegeben. Es wurden nach Schema 50 µl Standardlösung, Kontrolllösung und die Proben in doppelter Ausführung gegeben. Die befüllte Mikrotiterplatte wurde durch Klopfen auf den Tisch durchmischt und mit dem beigefügten Deckel verschlossen. Danach erfolgte eine Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit 400 µl Waschpuffer viermal gewaschen. Anschließend wurden pro Kavität 100 µl Konjugatlösung hinzugegeben. Danach erfolgte eine weitere Inkubationszeit für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Waschung wiederholt. Danach wurde 100 µl Substrat hinzugefügt und es erfolgte eine weitere Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur. Danach wurde 100 µl Stopplösung hinzugefügt, um die Reaktion zu beenden. Es erfolgte eine Messung bei 450 nm am Tecan Safire innerhalb der nächsten 30 min.

### 2.5.4 FACS-Färbung für Splen, Thymus und Medulla ossium flava

Von der wie oben beschrieben hergestellten Zellsuspension von den drei Organen Splen, Thymus und Medulla ossium flava wurden jeweils 4 µl genommen. Diese wurde dann zu 196 µl Trypanblau in PBS gelöst und 0,01 % Natriumazid hinzugefügt. Zur Lebendzellzahlzählung wurden 20 µl dieser Verdünnung auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und wie zuvor oben beschrieben ausgezählt und die relative Zellzahl bestimmt. In Abhängigkeit von der benötigten Zellzahl wurde das zu verwendende Volumen berechnet nach folgender Formel:

$$\text{gesuchtes Volumen in } \mu\text{l} = \frac{\text{benötigte Zellzahl}}{\text{ermittelte Zellzahl}}$$

Das so ermittelte Volumen wurde von der Einzelzellsuspension in ein FACS-Röhrchen überführt und es wurden je 2 ml PBS hinzugefügt. Die Proben wurden bei 485 x g für 7 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben dekantiert. Zu den Proben wurden die Antikörper, wie in Tabelle 4 angegeben, für jedes Organ hinzugefügt und für 30 min ohne Lichteinfall bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Proben zu waschen, wurden diese mit PBS auf 2 ml aufgefüllt. Die Proben wurden ein weiteres Mal mit 485 x g für 7 min zentrifugiert. Die Proben wurden wieder dekantiert und mit PBS auf 300 µl aufgefüllt. Die Messung erfolgte direkt im Anschluss darauf. Zum Fixieren der Proben wurden zu den dekantierten Proben 300 µl 1 % PFA in PBS gelöst hinzugefügt. Um eine homogene Zellverteilung zu gewährleisten, wurden die Proben vor dem Messen noch einmal gevortext.

**Tabelle 4 Master-Mix der verwendeten Antikörper**

<b>Zellpopulation</b>	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>PerCP</b>	<b>APC</b>
Isotypkontrolle	IgG2a	IgG1	IgG2b	IgG
T-Zellen	CD4	CD8	CD3	CD69
NK-Zellen	CD11c	DX5 und NK1.1	NKp46	CD3
B-Zellen	IgD	CD3	B220	IgM

**Tabelle 5 Verwendete Antikörper**

Antikörper	Markierung	Hersteller	Klon-ID
IgG1	PE	Biolegend	RTK 2071
IgG2a	FITC	Biolegend	RTK 2758
IgG2b	PerCP	Biolegend	RTK 4530
IgG	APC	Biolegend	HTK 888
CD4	FITC	Biolegend	GK1.5
CD4	PerCP	Biolegend	GK1.5
CD8	PE	Biolegend	53-6.7
CD3	PerCP	Biolegend	145-2C11
CD62L	PE	eBioscience	MEL-14
CD69	APC	Biolegend	H1.2F3
CD11c	FITC	Biolegend	N418
DX5	PE	BD Biosciences	DX5
NK1.1	PE	BD Biosciences	PK136
NKp46	PerCP	Biolegend	29A1.4
IgD	FITC	BD Pharmingen	11-26c2a
B220	PerCP	Biolegend	RA3-6B2
IgM	APC	Biolegend	RMM-1
Valpha 3.2	FITC	BD Biosciences	RR3-16
Vbeta11	FITC	BD Biosciences	RR3-15

### 2.5.5 FACS-Färbung für das periphere Blut

Es wurden jeweils 50 µl Citrat in Eppendorfgefäße vorgelegt und 0,5 ml vom gewonnenen Mausblut hinzugefügt. Das mit Citrat versetzte Mausblut wurde verwendet, um das Differentialblutbild am Hämatologie-Automaten zu bestimmen. Die 4 Antikörper-Master-Mixe wurden wie in Tabelle 4 dargestellt angesetzt mit jeweils 2 µl Antikörper und 200 µl PBS. Die jeweilige Herkunft und Markierung der Antikörper ist in Tabelle 5 dargelegt. In die FACS-Röhrchen wurden 50 µl Mausblut gefüllt und es wurden 50 µl des jeweiligen Antikörper-Master-Mix hinzugefügt. Die so befüllten FACS-Röhrchen wurden 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurde 1 ml Lyselösung (1x BD Lysing Solution, BD Biosciences) inklusive Paraformaldehyd zum Fixieren hinzugefügt und erneut für



20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurde 2 ml Cellwash (BD Biosciences) hinzugefügt und bei 300 x g für 7 min zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der überwiegende Teil der Flüssigkeit abgesaugt. Das so gewonnene Pellet wurde mit 300 µl Cellwash resuspendiert. Anschließend erfolgte die Messung am FACS-Gerät (FACS Calibur) und die Auswertung mit der Software *CellQuestPro* (alles BD Biosciences).

## 2.6. Herstellung gewaschener Thrombozyten

Es wurde 5 ml 1 x TBS (10 x TBS bestehend aus 121 g Tris und 87 g NaCl auf pH 7,5 eingestellt) in ein Natrium-Heparin-Röhrchen mit 102 IU gefüllt und das Heparin gelöst. Dies entspricht 20 IU/ml Heparin. Von dieser Verdünnung wurden 200 µl Heparin in ein Eppendorfgefäß vorgelegt. Darauf wurde 0,5 ml Mauseblut, das aus einer kardialen Punktion gewonnen wurde, hinzugefügt. Die Spritze und Kanüle wurden vor der Blutabnahme mit Heparin gespült. Das Blut wurde dann bei 500 x g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Aus der Zentrifugation ergaben sich zwei Phasen. Die obere Phase stellte das Thrombozytenreiche Plasma dar. Die untere Phase enthielt die Leukozyten und Erythrozyten. Die obere Phase wurde abgenommen unter Schonung des Thrombozytenreichen Plasma. Dies entsprach einem Volumen von 200 µl bis 400 µl pro Maus. Um die Thrombozytenaggregation zu verhindern, wurde 0,5 µM Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>, SIGMA) hinzugegeben. Die Prostacyclin-Vorverdünnung wurde auf 1/100 des Volumens angesetzt. Dann wurde erneut zentrifugiert bei 1300 x g für 5 min bei Raumtemperatur. Das so entstandene Pellet wurde in 1,0 ml Tyrodes ohne CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Danach erfolgte die Zugabe von 0,5 µM PGI<sub>2</sub> mit der Entsprechung 10 µl Vorverdünnung auf 1,0 ml der Probe und die Zugabe von 0,02 U/ml Apyrase (SIGMA) mit der Entsprechung von 10 µl Vorverdünnung auf 1 ml Probe. Dies wurde dann für 5 min bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 1300 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde dann erneut in 0,5 ml Tyrodes ohne CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Dann wurde erneut 0,02 U/ml Apyrase mit der Entsprechung von 5 µl Vorverdünnung auf 0,5 ml der Probe hinzugefügt. Dies wurde nun für 30 min bei 37 °C inkubiert. Dieser Vorgang gab den Thrombozyten Zeit zu „ruhen“.

### 10 x TBS

Tris            121 g  
NaCl            87 g  
Aqua dest. ad 1000 ml  
pH 7,5 eingestellt

### Tyrodes-Puffer

NaCl	5 M	5,36 ml	}	7,0 pH
KCl	1 M	0,58 ml		
Na <sub>2</sub> HPO <sub>2</sub>	0,1 M	0,68 ml		
NaHCO <sub>3</sub>	0,1 M	24 ml		
HEPES	1 M	4 ml		
Glucose	1 M	10 ml		
BSA (fettfrei)		700 mg		

Ad 200 ml Aqua dest.

## 2.7. Stimulation der Thrombozyten

Die aus dem oben beschriebenen Verfahren gewonnenen gewaschenen Thrombozyten wurden zunächst im FACS-Calibur gemessen und unter Verwendung von *True Count Beads* (BD Biosciences) die Thrombozyten-Konzentration bestimmt. Es wurde eine 1:50 Verdünnung der gewaschenen Thrombozyten wie folgt hergestellt.

PBS	490 µl
Gewaschene Thrombozyten	10 µl

Diese Verdünnung wurde in ein *True Count Tube* überführt. Die Messung erfolgte mit der Software *CellQuest Pro*. Es wurde einerseits im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht auf die Thrombozyten gated (R1) wie in Abbildung 4 dargestellt und andererseits auf die *Beads* gated (R2) und 2000 *Beads* gemessen. Die Konzentration der Thrombozyten wurde unter Berücksichtigung der Verdünnung über folgende Formel ausgerechnet:

$$\frac{\text{Thrombozyten in R1}}{\text{Beads in R2}} = \frac{\text{Beads pro Test}}{\text{Testvolumen}}$$

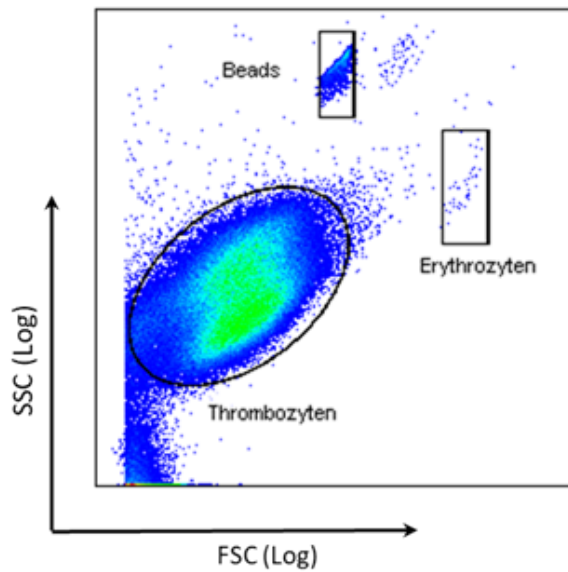


Abbildung 4 Dargestellt ist die Gatingstrategie zur Ermittlung der Absolutzellzahlen der Thrombozyten. Beads zeigt die detektierten Beads (R2). Die Erythrozyten und Thrombozyten (R1) sind jeweils in ihrem Gate dargestellt.

Nach der Messung wurden die Thrombozyten erneut bei 1300 x g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und danach in Tyrodes-Puffer resuspendiert. Dabei wurde die Konzentration der Thrombozyten so eingestellt, dass  $40 \times 10^3/\mu\text{l}$  (entspricht  $40 \times 10^6/\text{ml}$ ) Thrombozyten vorhanden waren. Dies entspricht 10 Millionen Thrombozyten absolut in 250  $\mu\text{l}$  des Stimulationsansatzes. Es wurden mehrere Probenansätze mit jeweils 10 Millionen Thrombozyten in 250  $\mu\text{l}$  auf Eppendorfgefäße verteilt. Danach wurden die Thrombozyten mit dem rekombinanten murinen Fusionsprotein Podoplanin (PDPN)-Fc (R&D Systems) beladen. Es wurden 5  $\mu\text{l}$  auf 250  $\mu\text{l}$  Thrombozytensuspension gegeben, was eine 1:50 Verdünnung ergab (Endkonzentration 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Die Proben wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde erneut bei 1300 x g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Es folgte eine Resuspension in 250  $\mu\text{l}$  Tyrodes mit 1 mM  $\text{CaCl}_2$ . Die Stimulation erfolgte nun durch die Zugabe eines kreuzvernetzenden Antikörpers. Um eine unspezifische Stimulation zu vermeiden, wurde ein  $\text{F}(\text{ab}')_2$ -Fragment verwendet (Ziege anti-Maus IgG  $\text{Fc}\gamma$ ; Endkonzentration 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Dianova). Dabei wurden unterschiedliche Zeitabstände gewählt. Es wurde mit der längsten Stimulation von 15 min begonnen, dann folgte die für 5 min, 1 min und zum Schluss wurde eine unstimulierte Probe durch Zugabe von 4,0  $\mu\text{l}$  Tyrodes-Puffer hergestellt. Es wurden jeweils 4,0  $\mu\text{l}$  des kreuzvernetzenden Antikörper-Fragments auf 250  $\mu\text{l}$  Thrombozytensuspension gegeben und für 1 bis 2 Sekunden gevortext. Zusätzlich wurde eine direkte Stimulation mit Thrombin (Endkonzentration 2 U/ml; Roche) durchgeführt. Die Stimulation fand bei

Raumtemperatur statt. Die Stimulation wurde in doppeltem Ansatz mit den beiden Mauslinien ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> und ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> durchgeführt. Durch den zeitversetzten Beginn der Stimulation konnten alle Proben zum Ende gleichzeitig beendet werden, indem 1,0 ml PBS auf Raumtemperatur hinzugefügt wurde. Danach wurden die Proben für 5 min bei 1300 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 30 µl Lysepuffer resuspendiert. Die Lysate wurden bei – 20 °C gelagert. Dann wurde die Proteinbestimmung durchgeführt.

### Lysepuffer

NP-40 (10 %)	100 µl
Lauryl Maltoside (10 %)	100 µl
Natrium Orthovanadat (100 mM)	10 µl
Proteaseinhibitoren	40 µl
Tris pH 7,5 (1 M)	50 µl
NaF (500 mM)	20 µl
EDTA (500 mM)	20 µl
NaCl (5 M)	33 µl
PMSF (100 mM)	10 µl
H <sub>2</sub> O	617 µl

### 2.8 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) durchgeführt. Die BCA-Methode (*Bicinchoninic acid*) beruht darauf, dass Proteine in einer alkalischen Lösung Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>1+</sup> reduzieren können. Die Cu<sup>1+</sup> Kupfer-Kationen bilden dann mit dem Chelatbildner BCA einen violetten Farbstoff-Komplex. Diese kolorimetrische Reaktion kann bei einer Wellenlänge von 562 nm quantifiziert werden.

Für die Proteinbestimmung wurde zunächst eine Verdünnungsreihe mit der Standardlösung aus bovinen Serumalbumin (BSA) und H<sub>2</sub>O hergestellt in dem Konzentrationsbereich von 500 µg/ml bis 0 µg/ml. Dabei wurde in einer 96-Well-Platte im Doppelansatz in der ersten Reihe 40 µl BSA Standardlösung (500 µg/ml) aufgebracht und in die nächsten sieben wells wurde H<sub>2</sub>O gefüllt. Dann erfolgte die Verdünnung mit der 20 µl Standardlösung bis zur siebten Reihe. Die achte Reihe diente als Blindprobe. Die Probenlysate wurden in einem Doppelansatz mit 20 µl daneben platziert. Für die Verdünnung der Probenlysate wurde eine 1:20 Verdünnung hergestellt und davon ebenfalls 20 µl in die Platte gegeben.

Dann wurde nach der im Kit enthaltenen Vorschrift die beschriebene Menge des *working reagent* hergestellt und allen Proben zugesetzt. Dann erfolgte eine Inkubation von 30 min bei 37 °C. Anschließend wurde die optische Dichte bei 562 nm am Photometer (Tecan Safire) gemessen und die Proteinkonzentration errechnet.

## 2.9. Western Blot

### Gelherstellung

Zunächst wurde ein Gel für die Proteinauftrennung vorbereitet. Die Glasplatten der Gelkammer wurden zuerst mit Ethanol gereinigt. Die gereinigten Glasplatten wurden in den Gelgießstand eingespannt und es wurde mit destilliertem Wasser überprüft, ob die Kammern luftdicht eingesetzt wurden. Dann wurden zuerst das Trenngel und dann ein Sammelgel nach folgender Zusammensetzung, wie in Tabelle 6 beschrieben, hergestellt:

**Tabelle 6 Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE**

Komponente	Sammelgel	Trenngel (10 %)
H <sub>2</sub> O	1,8 ml	4,06 ml
0,5 M Tris pH 6,8	0,75 ml	-
1,5 M Tris pH 8,8	-	2,46 ml
Acrylamide/ Bis Acrylamid (29:1) 30 %	0,37 ml	3,33 ml
SDS 10 %	30 µl	98,4 µl
APS 10 %	30 µl	49,2 µl
TEMED	3 µl	4,9 µl
Gesamtvolumen für 1 Gel	3,0 ml	10,0 ml

Das Trenngel wurde zuerst hergestellt und in die Kammer bis zur vorher markierten Stelle aufgefüllt. Dann wurde durch die Zugabe von Isopropanol das Gel luftdicht abgeschlossen und mindestens 30 min ausgehärtet. Nach dieser Zeit wurde mit Wasser das Isopropanol ausgewaschen und anschließend wurden die Reste mit Filterpapier entfernt. Dann wurde das Sammelgel hergestellt und auf das Trenngel gegossen und der Kamm für die Taschenvorlage eingefügt. Das Sammelgel wurde für ca. 15 min ausgehärtet. Wurde das Gel nicht direkt am gleichen Tag verwendet, wurde es in feuchte Tücher geschlagen und in einer Plastiktüte im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

### Beladung des Gels

Das ausgehärtete Gel wurde in die Laufkammer (Mini-Protean, BioRad) eingespannt und gegebenenfalls auch eine Blindplatte hinzugefügt. Der Innenraum wurde mit 1 x Laufpuffer aufgefüllt, wobei darauf zu achten war, dass er nicht herausläuft. Der Laufpuffer wurde nach folgendem Rezept hergestellt.

#### **Laufpuffer 10 x**

Tris	30,2 g
Glycin	188 g
SDS	2,5 g

Ad 1000 ml Aqua dest.

Dann wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit dem Laufpuffer mittels einer Spritze gespült, um Gelreste zu entfernen. Die hergestellten Probenlysate wurden bei 99 °C für 5 min gekocht und anschließend auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Probenlysate entsprechend der gewünschten Gesamteinkonzentration in das Gel geladen. Der Marker (PageRuler; Thermo Scientific) wurde in die erste Tasche aufgetragen. Dann wurden die Proben mit der ausgerechneten Proteinkonzentration in 5 X *Sample* Puffer verdünnt und gleiche Volumina pro Tasche geladen und die Laufbedingungen eingestellt (konstant 125 V für 1 Stunde).

#### **5 x *Sample* Puffer**

Tris 0,5 M pH 6,8	10,0 ml
Glycerol	25 g
Bromphenolblau	1 Spatelspitze
SDS 20 %	12,5 ml

Aqua dest. ad 50 ml

Unmittelbar vor der Anwendung wurden 900 µl 5 x *Sample* Puffer mit 100 µl β-Mercaptoethanol versetzt und dann sofort zur Verdünnung der Lysate verwendet.

## Blotten

Nach der Auftrennung der Proteine in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Blotting) im Semi-Dry-Verfahren. Dazu wurde das Gel in einen *blotting* Puffer gelegt. Der *blotting* Puffer setzte sich wie folgt zusammen.

### ***Blotting Puffer 1 x***

Tris	3,02 g
Glycin	14,42 g
SDS / 20%iges SDS	0,185 g / 0,925 ml
Methanol	200 ml
Ad 1000 ml Aqua dest.	

Dann wurde eine Nitrocellulose-Membran (Hybond C Extra; Amersham) in destilliertes Wasser für 2 min und dann für 3 min in den *blotting* Puffer gelegt. Dann wurde das Gel in folgender Anordnung eingebettet.

	- (Kathode)
Oben	Filterpapier
	Gel
	Nitrocellulose-Membran
Unten	Filterpapier
	+ (Anode)

Dabei war darauf zu achten, dass der Marker auf der linken Seite platziert wurde. Luftblasen wurden mit einer Pipettenspitze entfernt. Dann wurde diese Anordnung auf eine Granitplatte gelegt und mit dem *blotting* Puffer durchtränkt. Die Blot-Einheit (Nova Blot; Pharmacia Biotech) wurde geschlossen und ein Stromfluss von konstant 140 mA (für 1 Gel) oder 280 mA (für 2 Gele) für eine Stunde am Stromversorgungsgerät (PowerPac 3000; BioRad) eingestellt. Nach abgelaufener Zeit wurde die Nitrocellulose-Membran mit den geblotteten Proteinen entnommen und zunächst mit einem Aquarellstift der Marker gekennzeichnet.

Zur Detektion der spezifischen Proteine erfolgte zuerst die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran mit Milch für eine Stunde, wobei die Membran komplett benetzt wurde. Für die Blockierungslösung wurde in TBS gelöstes Milchpulver (5 %) verwendet. Anschließend wurde die Nitrocellulose-Membran mit Waschlösung für 5 min auf höchster Stufe auf einem Schüttler gerüttelt. Die Waschlösung wurde wie folgt hergestellt:

## Waschlösung

TBS + 0,1 % Tween 20

## Immundetektion

Die Waschlösung wurde entfernt und die Nitrocellulose-Membran im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt oder gleich weiterverwendet. Die Nitrocellulose-Membran wurde erneut mit frischer Waschlösung für 5 min auf höchster Stufe geschüttelt (DuoMax 1030; Heidolph). Sollte die Detektion mit zwei unterschiedlichen Antikörpern erfolgen, wurde die Membran an der entsprechenden Stelle mit einem Skalpell getrennt. Die Antikörper wurden jeweils in Waschlösung verdünnt. Die verwendeten Antikörper und die Inkubationsbedingungen sind in der Tabelle 7 aufgeführt.

**Tabelle 7 Für den Westernblot verwendete Antikörper**

Antikörper	Spezies (Wirt)	Verdünnung	Inkubationsbedingungen	Hersteller
Primärantikörper				
Anti-Phospho-Tyrosin (Klon 4G10)	Maus monoklonal	1:200	Über Nacht, 4 °C	Merck Millipore
Anti-Beta-Actin	Maus Monoklonal	1:2000	1 h Raumtemperatur	Proteintech
Sekundärantikörper				
Anti- ADAP	Schaf Polyklonal	1:1.000	Über Nacht, 4 °C	(Peterson et al., 2001)
Anti-Maus HRP	Ziege Polyklonal	1:10.000	1 h Raumtemperatur	Dianova
Anti-Schaf HRP	Esel Polyklonal	1:10.000	1 h Raumtemperatur	Dianova

Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln für eine Stunde. Danach wurde die Membran dreimal mit Waschlösung für 5 min bei intensivem Schütteln gewaschen. Die Waschlösung wurde anschließend verworfen. Danach wurden die Substrat-Reagenzien A und B (Signal Fire ECL Reagent; Cell Signaling) 1:1 hinzugefügt und 1 min mit der Hand geschüttelt. Dabei war darauf zu achten, dass das Substrat die Membran vollständig benetzt. Die Membran wurde mit Folie luftblasenfrei umschlossen in



einer Röntgenfilmkassette platziert. In der Dunkelkammer wurde dann die Filmfolie (Amersham Hyperfilm ECL) hinzugefügt und die Filmkassette verschlossen. Es wurden verschiedene Entwicklungszeiten abgenommen. Die Exposition erfolgte über verschiedene Zeiträume von 30 Sekunden bis 5 oder 15 Minuten. Nach dieser Zeit wurde der Film unter Rotlicht herausgenommen und in die Entwicklermaschine (Cawomat 2000 IR) gelegt. Nach der Entwicklung und Fixierung wurden auf den Filmen die Entwicklungszeit, Datum, beladene Proteinmenge, erster und zweiter Antikörper mit Verdünnung, Marker und Probe notiert.

### Strippen der Blotmembran

Sollte die Membran erneut mit weiteren Antikörpern inkubiert werden, wurde diese vorher gestrippt, d.h. Aktivität der Peroxidase des ersten Sekundäntikörpers (HRP *horseradish peroxidase*) wurde durch Zugabe von Natriumazid zerstört. Dazu wurde die Membran in Stripping Puffer gelegt und für 45 min auf höchster Stufe geschüttelt. Dann wurde die Membran zweimal für 5 min auf höchster Stufe mit Waschlösung gerüttelt. Anschließend wurde der nächste Primäntikörper, gefolgt von dem entsprechenden Sekundäntikörper, hinzugefügt und es wurde erneut, wie oben beschrieben, verfahren.

### Stripping Puffer

10 x TBS	40 ml
10 % NaN <sub>3</sub>	40 ml
Aqua dest.	320 ml

## 2.10 Induktion der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)

### 2.10.1 Generierung von 2D2-T-Zellen und Induktion der passiven EAE

Zunächst wurden die Splenes der 2D2-Mäuse geschlechtsspezifisch isoliert und im Mausmedium (RPMI-1640 Medium, 10 % fetales Kälberserum, Penicillin und Streptomycin 1 %, 50 µM 2-Mercaptoethanol) kultiviert. Dazu wurde unter sterilen Bedingungen das 70 µM Zellsieb mit 5 ml Mausmedium zunächst gespült. Dann wurden die Splenes einzeln im Sieb zerrieben und in einer Petrischale aufgefangen. Die gewonnene Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Petrischale wurde noch einmal mit dem Mausmedium gespült und der Zellsuspension hinzugefügt. Die Zellsuspensionen wurden dann bei 500 x g für 7 min zentrifugiert.

Der Überstand der Zellsuspension der Splenes wurde dekantiert. Für die Lyse der Erythrozyten wurde das Zellpellet von drei Splenes in 5 ml ACK-Puffer gebracht. Dies wurde dann resuspendiert und die Zellsuspension für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Falcon-Röhrchen bis zum Rand mit Mausmedium aufgefüllt und erneut bei 500 x g für 7 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Mausmedium resuspendiert. Danach wurde die Lebendzellzahl mittels Trypanblau-Färbung bestimmt wie in 2.5.1. beschrieben.

Anschließend wurde eine FACS-Färbung durchgeführt, um den Aktivierungszustand der Zellen vor Stimulation zu überprüfen. Die Färbungen wurden wie unter 2.5.4 beschrieben angesetzt. Die verwendeten Antikörper sind in der Tabelle 5 aufgeführt. Das Gating erfolgte über die Marker CD4 und den transgenen TZR Valpha 3.2, Vbeta 11. Danach wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD62L analysiert.

Kleine Zellkulturflaschen (T25; TPP) wurden mit 12,5 ml Mausmedium befüllt und es wurden 2,5 ml der Zellsuspension mit jeweils 50 Millionen Milzzellen hinzugefügt. Die Stimulation erfolgte durch Zugabe von 300 µl MOG<sub>35-55</sub>-Peptid in der Konzentration von 1 mg/ml (Endkonzentration 20 µg/ml) und durch Zugaben von jeweils 7,5 µl der Zytokine IL-2 und IL-7 (Miltenyi Biotech, Endkonzentration 10 ng/ml). Diese Flaschen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für zwei Tage inkubiert. Die Zellsuspension wurde regelmäßig auf Verunreinigungen kontrolliert. Ein Farbumschlag von rot zu gelb zeigte den Nährstoffverbrauch und damit das Wachstum der Zellen an.

Nach den zwei Tagen wurde die Flasche gekippt, um die Zellen zu sammeln und mit 13 ml Mausmedium abzuspülen. Diese Suspension wurde in ein 50 ml Falcon überführt und bei 500 x g für 7 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurden die Zellen (ca. 50 Millionen) in eine 75 ml-Zellkultur-Flasche (T75; TPP) mit 17,5 µl IL-2, 17,5 µl IL-7 (Endkonzentration 10 ng/ml) und 35 ml Mausmedium überführt. Dies wurde wieder bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für zwei Tage inkubiert. Am Tag 5 wurden die Zellen erneut geerntet, gezählt und jeweils 50 Millionen Zellen in frisches Medium eingesät in eine 75 ml-Zellkultur-Flasche (T75; TPP) mit 50 ml Mausmedium und 25 µl IL-2 und 25 µl IL-7 (Endkonzentration 10 ng/ml). Für die finale Reaktivierung der Zellen wurden 75 ml-Zellkultur-Flaschen mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern beschichtet. Dazu wurde in jede Flasche 10 ml PBS und jeweils 10 µl anti-CD3 (Endkonzentration 1 µg/ml; BD Biosciences) und 10 µl anti-CD28 (Endkonzentration 1 µg/ml BD Biosciences) gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Flaschen dreimal mit PBS gespült.

Am Tag 7 wurden dann erneut die Zellen wie oben beschrieben gesammelt und gezählt. Dann wurden die vorbeschichteten Zellkultur-Flaschen mit 50 ml Mausmedium und mit

100 Millionen Zellen befüllt und es wurden 20 µl IL-12 (R&D Systems, Endkonzentration 20 ng/ml) und 20 µl IL-18 (R&D Systems, Endkonzentration 20 ng/ml) zugegeben. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach Geschlecht gepoolt und einmal manuell mit der Neubauer-Zählkammer gezählt und auf eine Zelldichte von  $50 \times 10^6$ /ml in PBS eingestellt. Pro Empfängertier wurden 4-6 Millionen aktivierte 2D2-T-Zellen intraperitoneal appliziert (siehe Abbildung 5). Vor der Applikation wurde wie oben beschrieben eine FACS-Färbung durchgeführt, um den Aktivierungszustand der Zellen nach der Stimulation zu überprüfen.

#### 2.10.2 Induktion der aktiven EAE

Für die aktive EAE wurde 50 µl MOG-Peptid in CFA subcutan in die Flanken der vier Extremitäten als Depot gespritzt. Dazu wurden 200 µg MOG<sub>p35-55</sub>-Peptid in Emulsion mit 200 µl *Complete Freund's Adjuvant* (CFA; SIGMA) gebracht und 800 µg hitzegetötete *Mycobacterium tuberculosis* (SIGMA) beigemischt. Zusätzlich wurden zur Verstärkung der Immunantwort bei der aktiven EAE 200 ng Pertussis Toxin, das in 200 µl PBS gelöst war, intraperitoneal am Tag 0 und am Tag 2 injiziert (siehe Abbildung 6).

Die klinischen Symptome wurden täglich, wie in Tabelle 8 beschrieben, beurteilt.

Tabelle 8 Einteilung der klinischen Symptome der EAE

0	Ohne klinische Symptome
0,5	Teilweiser Tonusverlust des Schwanzes
1	Kompletter Tonusverlust des Schwanzes
1,5	Kompletter Tonusverlust des Schwanzes und verlangsamtes Umdrehen
2	Teilweise Parese einer der Hinterläufe
2,5	Hinterherziehen der Hinterläufe ohne komplette Parese
3	Plegie der Hinterläufe
3,5	Teilweise Parese der Vorderläufe
4	Schwere Parese der Vorderläufe
5	Moribund oder tot

Aus tierschutzrechtlichen Gründen wurden Tiere mit einem klinischen Score von  $> 3$  getötet.

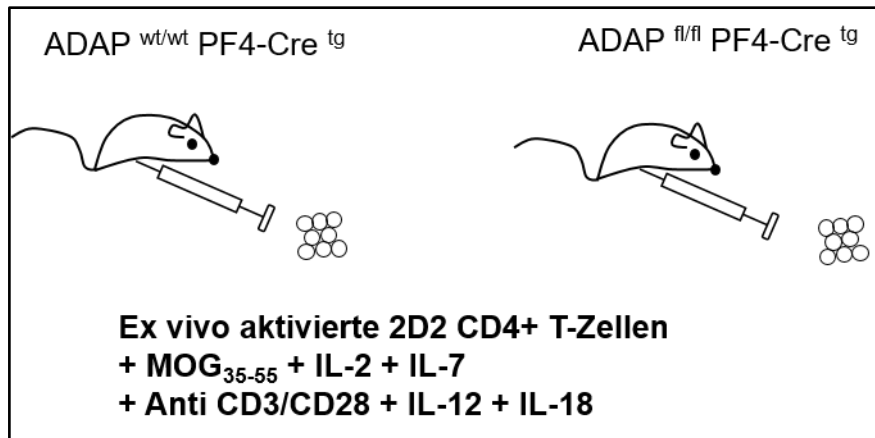


Abbildung 5 Dargestellt ist die Induktion der passiven EAE durch adoptiven Transfer von ex vivo aktivierten TZR-transgenen MOG-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen

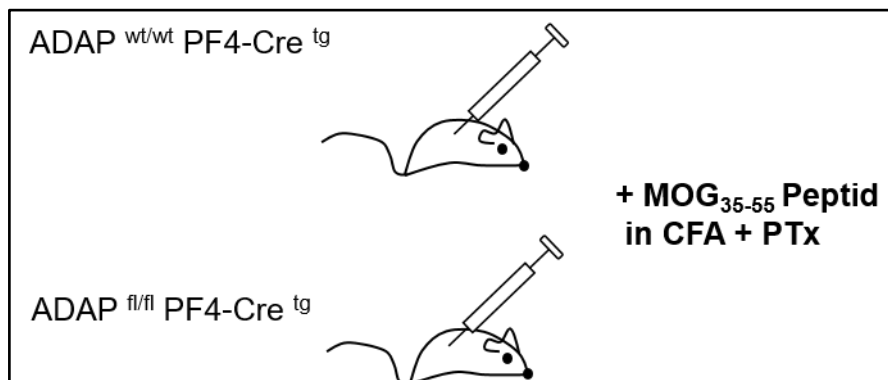


Abbildung 6 Dargestellt ist die Induktion der aktiven EAE durch Immunisierung mit MOG-Peptid in CFA

### 2.11. Präparation für die histologische Aufbereitung

Nach Beendigung der EAE wurden die Mäuse am Tag 35, wie in 2.5.1. beschrieben, getötet. Die Mäuse wurden in Bauchlage fixiert, die Haut durchtrennt und bis auf die Columna vertebralis freipräpariert. Dann wurde diese cervical und caudal mit einer Präparationsschere durchtrennt. Entlang der Linia paravertebralis wurde die Columna vertebralis aus dem Torso herausgetrennt. Die so skelettierte Columna vertebralis wurde dann mit einem weiteren Schnitt cervical für die Ausspülung der Medulla spinales erweitert. Dann wurde mit einer PBS gefüllten Spritze von caudal die Medulla spinales herausgespült und in einem 50 ml Falcon-Röhrchen aufgefangen. Zur Fixierung mit Formaldehyd wurde die Medulla spinales dann in ein weiteres 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die fixierten Präparate wurden im Institut für Pathologie (ehemalige Leitung Herr Prof. Johannes Haybäck) durch Frau Kirsten Herrmanns zu histologischen Präparaten mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung weiterverarbeitet.

## 2.12 Statistik

Für die Datensammlung wurde das handelsübliche Softwareprogramm Microsoft™ Excel benutzt. Für die statistische Auswertung und Erstellung der Graphiken wurde das Programm GraphPad Prism 6 verwendet. Falls nicht anders vermerkt, wurden die Mittelwerte und die Standardfehler (SEM; *standard error of the mean*) ermittelt und dargestellt.

Als statistischer Test wurde der ungepaarte Student's T-Test zum Vergleich der verschiedenen Mauslinien gewählt. Für die statistische Analyse des klinischen Scores der EAE-Experimente wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Test gewählt (Fleming et al., 2005). Das Signifikanzniveau wurde jeweils mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  angegeben.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Genetischer Nachweis der konditionalen ADAP-Knock-out-Konstrukte in Versuchstieren

Die verwendeten transgenen Mäuse wurden vom *European Conditional Mouse Mutagenesis Program* (EUCOMM) Projekt hergestellt, vom *European Mouse Mutant Archive* (EMMA) erworben und im Zentralen Tierlabor der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg gezüchtet. Die geeigneten Genotypen zu den nachfolgenden Experimenten wurden anhand der Genanalyse mittels PCR überprüft und ausgewählt. Dazu wurden von den Mäusen Schwanzbiopsien entnommen und wie oben beschrieben zunächst eine DNA-Isolierung, dann eine PCR mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Abbildung 7 zeigt beispielhaft die vier PCR-Ergebnisse.

Wurden Mäuse mit dem Genotyp  $ADAP^{wt/fl} PF4-Cre^{tg}$  miteinander verpaart, gingen aus dieser Verpaarung  $ADAP^{wt/wt} PF-Cre^{tg}$  und  $ADAP^{fl/fl} PF4-Cre^{tg}$ -Mäuse als Wurfgeschwister hervor. Diese wurden in den folgenden Experimenten eingesetzt (Kapitel 3.2. und fortlaufend).

In den  $ADAP^{fl/fl}$ -Mäusen wird das Exon 2 des *Fyb*-Gens (als 2 markiert in Abbildung 7 A) von loxP-Sequenzen umschlossen. Der Nachweis erfolgte anhand der LAR3-PCR, wobei das Vorhandensein der loxP2-Sequenz ein 1280 bp Fragment erzeugte und für das Vorliegen des geflochten Allels spricht. Bei der heterozygoten Ausprägung lag ein 1280 bp Fragment des geflochten Allels vor und ein 1100 bp Fragment des Wildtyp-Allels, in der Abbildung als „het“ gekennzeichnet. Bei dem Wildtyp mit zwei unveränderten Allelen konnte nur das 1100 bp Fragment amplifiziert werden.

Bei der ConADAP-PCR wurde das Vorhandensein von ADAP mit einem 740 bp Fragment nachgewiesen und mit WT ADAP gekennzeichnet. Trat zudem ein weiteres 290 bp langes Fragment auf, wies dies auf den Knock-out von ADAP hin und wurde mit ConADAP gekennzeichnet.

Die Flp-PCR wurde zum Nachweis der erfolgreichen Exzision der Neomycin- und LacZ-Kassette durchgeführt. Bei Vorhandensein der Neomycin- und LacZ-Kassette wurde kein PCR-Produkt erzeugt und mit „ntg“ gekennzeichnet. Bei Abwesenheit der Neomycin- und LacZ-Kassette wurde ein 640 bp Fragment erzeugt und mit „tg“ gekennzeichnet (siehe Abbildung 7 A).

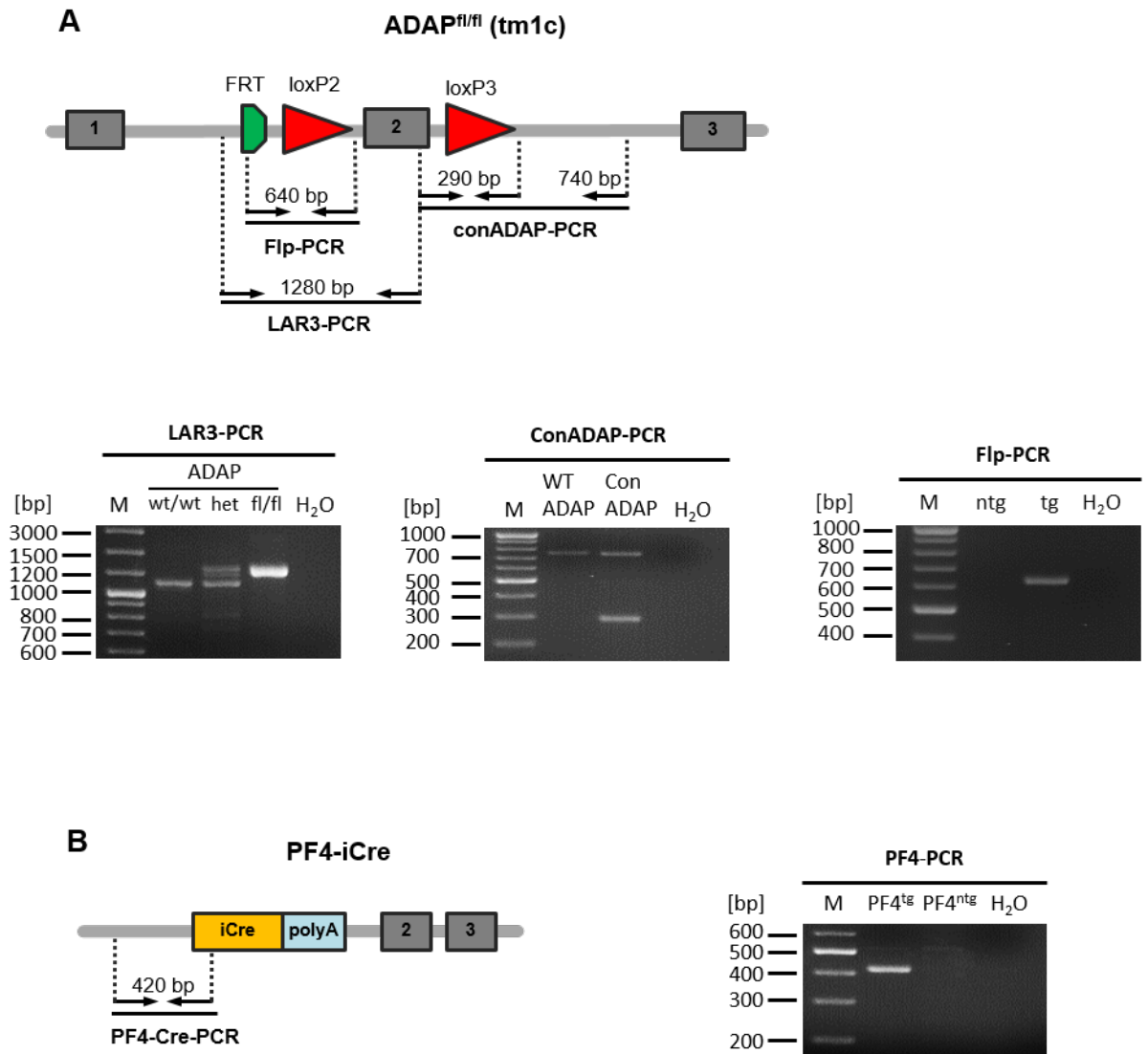


Abbildung 7 Bestimmung des Genotyps der transgenen Mäuse mittels PCR. Beispielhaft dargestellt sind die Ergebnisse der PCR zur Bestimmung der Genotypen. Zur Größenabschätzung wurde der DNA-Marker (M) Gene Ruler 100 bp Plus benutzt. Als Blindprobe wurde H<sub>2</sub>O verwendet. **A** zeigt das ADAP-Allel. Exon 2 (2) wird von den loxP-Sequenzen (loxP2, loxP3) flankiert. Die Pfeile geben die Ansatzstelle und Richtung der Primer an. Die Fragmentlänge ist in Basenpaaren [bp] angegeben. **LAR3-PCR:** Dargestellt sind der Marker (M), Wildtyp (wt/wt) mit 1100 bp, heterozygoter Genotyp (het) mit 1100 bp und 1280 bp, gefloxter Genotyp (fl/fl) mit 1280 bp und die Blindprobe (H<sub>2</sub>O). **conADAP-PCR:** Folgend ist Marker (M), Vorhandensein des Wildtyp-Allels von ADAP (WT ADAP) mit einem 740 bp Fragment, konditionales ADAP-Allel (Con ADAP) mit einem zusätzlichen 290 bp Fragment und Blindprobe (H<sub>2</sub>O) dargestellt. **Flp-PCR:** Folgend wurde Marker (M), nicht transgener Genotyp (ntg), transgener Genotyp (tg) mit 640 bp und die Blindprobe (H<sub>2</sub>O) dargestellt. **B** Dargestellt ist das PF4-iCre-Gen mit der Cre-Rekombinase (iCre). Die Pfeile geben die Ansatzstelle und die Richtung der Primer an. Die Fragmentlänge ist in Basenpaaren [bp] angegeben. **PF4-PCR:** folgend ist der Marker (M), Anwesenheit von Cre-Rekombinase (PF4<sup>tg</sup>) mit 420 bp, das Fehlen von Cre-Rekombinase (PF4<sup>ntg</sup>) und die Blindprobe (H<sub>2</sub>O) dargestellt.

Die PF4-PCR wurde zum Nachweis der Cre-Rekombinase durchgeführt. Bei Anwesenheit entstand ein 420 bp Fragment und wurde mit PF4<sup>tg</sup> gekennzeichnet (siehe Abbildung 7 B). Das unveränderte Allel zeigte kein PCR-Produkt und wurde mit PF4<sup>ntg</sup> gekennzeichnet.

Diese Kombination der PCR-Reaktionen erlaubte eine zuverlässige Genotypisierung der konditionalen Knock-out-Mäuse für die nachfolgenden Experimente.

### 3.2. Leukozytenzahl und Differentialblutbild

Im Rahmen der allgemeinen Charakterisierung des Immunsystems der konditionalen Knock-out-Mäuse (ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>-Mäuse) und der entsprechenden Kontrollmäuse (ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> –Mäuse) wurde die Leukozytenzahl ermittelt und das Differentialblutbild mittels Hämatologie-Automat erstellt. Zum Vergleich wurde das Blutbild der kompletten ADAP-Knock-out-Mäuse (ADAP KO) mitbestimmt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 8 dargestellt.

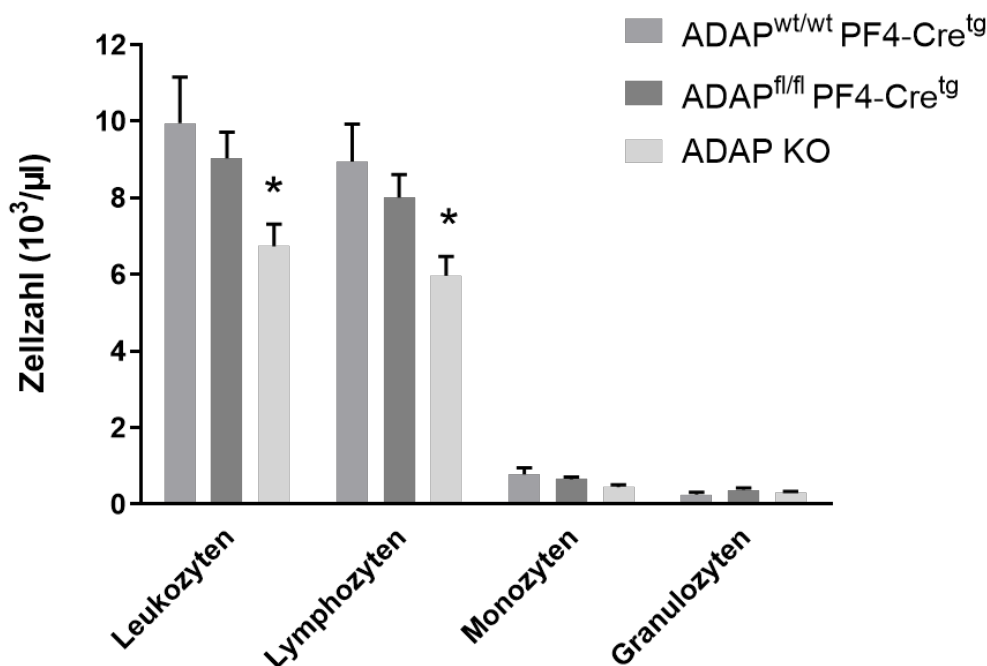


Abbildung 8 Dargestellt sind die verschiedenen Immunzellen des peripheren Bluts in den drei Mauslinien ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>, ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> und den kompletten Knock-out-Mäusen ADAP KO. Gemittelt wurden die Werte von 6 Mäusen. Gezeigt ist der Mittelwert +SEM. \*p<0,05



Wie in der Abbildung 8 sichtbar sind die Zellzahlen der Leukozyten und Lymphozyten in den zwei Mauslinien der Kontrollmäuse ( $ADAP^{wt/wt} PF4-Cre^{tg}$ ) und der konditionalen Knock-out-Mäuse ( $ADAP^{fl/fl} PF4-Cre^{tg}$ ) nicht signifikant unterschiedlich. (Mittelwerte für **ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>** Leukozyten  $9,95 \times 10^3/\mu l$ ; Lymphozyten  $8,95 \times 10^3/\mu l$ ; Monozyten  $0,78 \times 10^3/\mu l$ ; Granulozyten  $0,25 \times 10^3/\mu l$ ; für **ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>** Leukozyten  $9,03 \times 10^3/\mu l$ ; Lymphozyten  $8,01 \times 10^3/\mu l$ ; Monozyten  $0,65 \times 10^3/\mu l$ ; Granulozyten  $0,37 \times 10^3/\mu l$ ; für **ADAP KO** Leukozyten  $6,73 \times 10^3/\mu l$ ; Lymphozyten  $5,96 \times 10^3/\mu l$ ; Monozyten  $0,45 \times 10^3/\mu l$ ; Granulozyten  $0,29 \times 10^3/\mu l$ ).

Ein signifikanter Unterschied besteht in der Mauslinie der ADAP-Knock-out-Mäuse (ADAP KO) bei den Leukozyten und den Lymphozyten im Vergleich zu den konditionalen Knock-out Mäusen und den entsprechenden Kontrolltieren. Die relative Verteilung der Monozyten und der Granulozyten ist in allen drei Mauslinien nicht signifikant unterschiedlich.

Es ist bekannt, dass die komplette ADAP Knock-out Maus eine Thrombozytopenie aufweist (Peterson et al., 2001). Da eine konditionale Knock-out Maus generiert wurde mit dem gezielten Verlust von ADAP in der Thrombozyten-Linie, wurde als nächstes die Thrombozytenzahl in diesen Tieren überprüft. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 9 dargestellt. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Mauslinien der Kontrollmäuse ( $ADAP^{wt/wt} PF4-Cre^{tg}$ ) und den beiden anderen Mauslinien, der konditionalen Knock-out-Mäuse ( $ADAP^{fl/fl} PF4-Cre^{tg}$ ) und ADAP-Knock-out-Mäuse (ADAP KO). Zwischen den konditionalen Knock-out-Mäusen ( $ADAP^{fl/fl} PF4-Cre^{tg}$ ) und den kompletten ADAP-Knock-out-Mäusen (ADAP KO) besteht dagegen kein signifikanter Unterschied in der Thrombozytenzahl. Der Verlust von ADAP in Thrombozyten führt zu einer Thrombozytopenie. Dieses Ergebnis bestätigt den bekannten Phänotyp der kompletten Knock-out Maus in der neu hergestellten konditionalen Mauslinie.

Parallel dazu wurde das Thrombozyten-spezifische Zytokin PF4 gemessen, das in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten gespeichert wird. Es besteht ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den Mauslinien der Kontrollmäuse ( $ADAP^{wt/wt} PF4-Cre^{tg}$ ) und den beiden anderen Mauslinien der konditionalen Knock-out-Mäuse ( $ADAP^{fl/fl} PF4-Cre^{tg}$ ) und ADAP-Knock-out-Mäuse (ADAP KO). Fehlt ADAP in Thrombozyten, so ist die PF4-Konzentration signifikant erniedrigt. Der Vergleich zwischen konditionalen Knock-out-Mäusen ( $ADAP^{fl/fl} PF4-Cre^{tg}$ ) und ADAP-Knock-out-Mäuse (ADAP KO) zeigt dagegen keinen signifikanten Unterschied in der PF4-Konzentration.

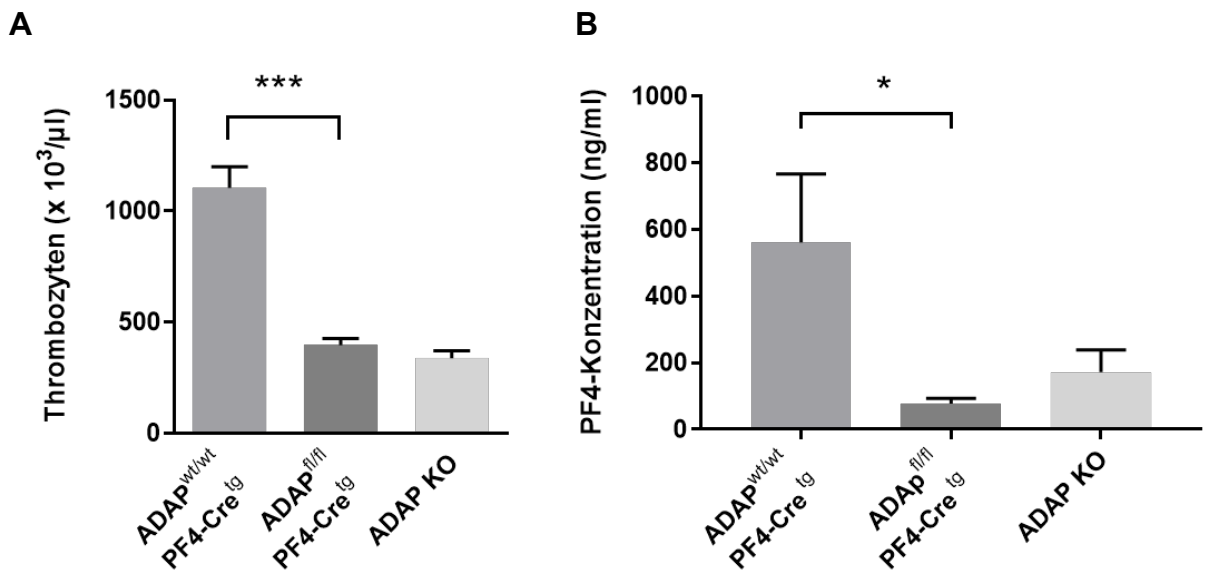


Abbildung 9 Dargestellt ist die Zellzahl der Thrombozyten **A** und die Konzentration des Thrombozyten-spezifischen Zytokins PF4 **B** in allen drei Mauslinien ADAP KO, ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> und ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>. Die Thrombozytenzahl wurde am Hämatologie-Automaten gemessen. Die Konzentration von PF4 wurde mittels ELISA bestimmt. (n=9; Mittelwert + SEM). \*p<0,05, \*\*\*p<0,001.

### 3.3. Thymus

Der Thymus stellt als primäres lymphatisches Organ den Ort der T-Zellreifung dar. Dabei verläuft die Entwicklung von doppelt negativen Thymozyten (DN) über doppelt positive Thymozyten (DP), die sowohl CD4 als auch CD8 besitzen, zu einfach positiven T-Zellen, die entweder das Oberflächenmolekül CD4 (SP CD4<sup>+</sup>) oder CD8 (SP CD8<sup>+</sup>) tragen. In der Abbildung 10 ist der Dot-Plot eines repräsentativen Experiments dargestellt. Dabei zeigt sich bei den ADAP Knock-out-Mäusen ein erhöhter Anteil der doppelt negativen und doppelt positiven T-Zellen, während einfach positive T-Zellen (SP CD4<sup>+</sup> und SP CD8<sup>+</sup>) geringer ausgebildet werden im Vergleich zu den beiden anderen Mauslinien. Dieses Ergebnis entspricht der bekannten thymischen Reifungsstörung der kompletten ADAP Knock-out Maus. Sowohl der Wildtyp (ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>) als auch der konditionale Knock-out (ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>) bilden gleichermaßen DN-Thymozyten, DP-Thymozyten und einfach positive T-Zellen (SP CD4<sup>+</sup> und SP CD8<sup>+</sup>) aus. So entspricht der konditionale Knock-out (ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>) in der T-Zellreifung dem Wildtyp (ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>).

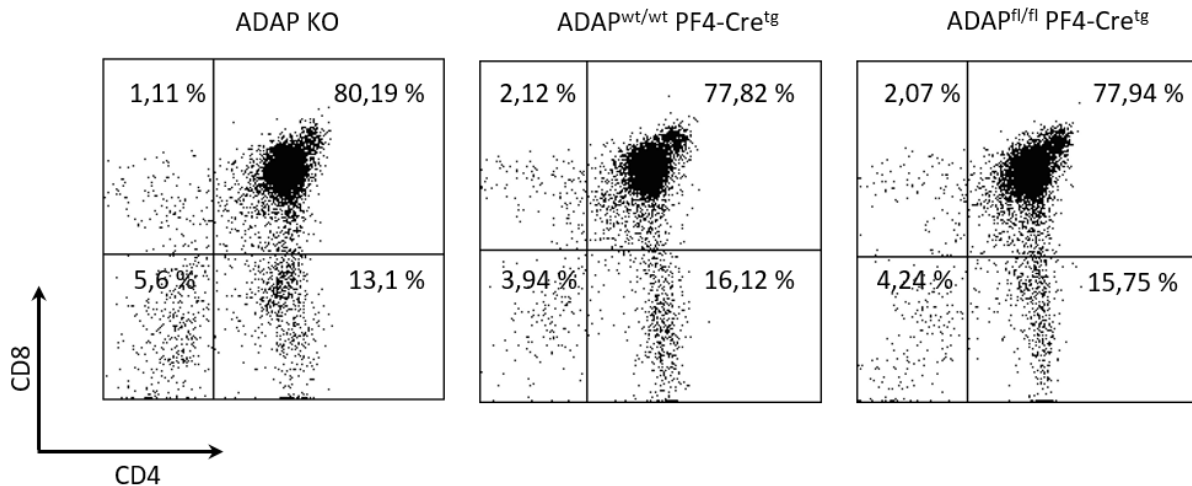


Abbildung 10 Dargestellt sind die verschiedenen Reifungsstufen der Thymozyten der drei Mauslinien ADAP KO, ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> und ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>. Oberer linker Quadrant: CD8<sup>+</sup> SP-Zellen, oberer rechter Quadrant: CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> DP-Zellen, unterer linker Quadrant: DN-Zellen, unterer rechter Quadrant: CD4<sup>+</sup> SP-Zellen. Angegeben sind die prozentualen Anteile der jeweiligen Zellpopulation. Es wurden Dotplots eines repräsentativen Experiments ausgewählt.

In Abbildung 11 zeigt sich im Säulendiagramm, dass es bei der absoluten Anzahl der Thymozyten keinen Unterschied zwischen dem Wildtyp (ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>) und dem konditionalen Knock-out (ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>) gibt. Die Thymozytenanzahl ist bei dem kompletten Knock-out ADAP KO gegenüber den beiden anderen Mauslinien signifikant geringer. Bei der Betrachtung der relativen Anzahl der einzelnen Thymozyten-Populationen zeigt sich, dass die doppelt negativen T-Zellen einen signifikant höheren Anteil bei den Knock-out Mäusen ADAP KO haben als bei den beiden anderen Mauslinien. Zudem liegt ein signifikant verminderter Anteil an einfach positiven CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bei den Knock-out Mäusen ADAP KO vor. Die beiden anderen Mauslinien (ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> und ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>) gleichen sich weitgehend in der Ausprägung der T-Zellreifung. Somit ist davon auszugehen, dass der konditionale Knock-out (ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>) keinen Einfluss auf die T-Zellreifung hat.

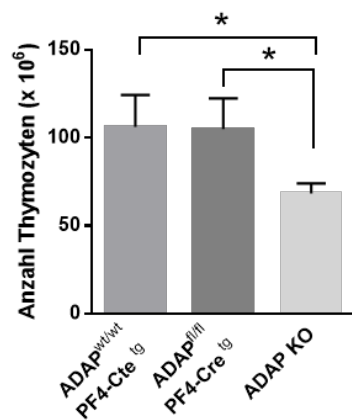
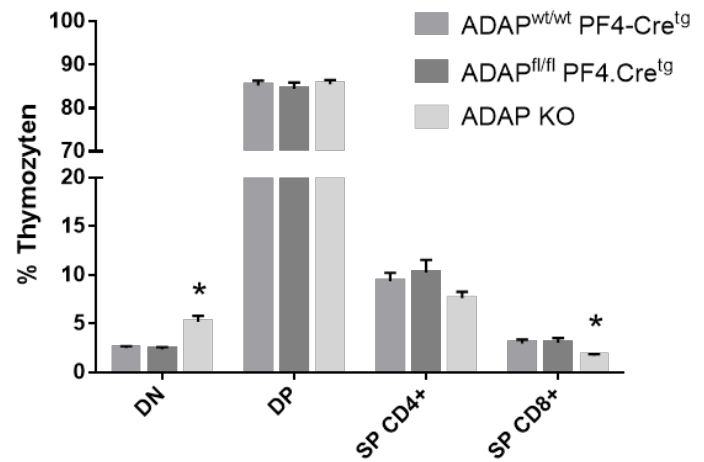
**A****B**

Abbildung 11 Dargestellt ist die Anzahl der Thymozyten absolut in den Mauslinien ADAP KO, ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> und ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> **A**. Die relative Anzahl der Thymozyten wird in den drei Mauslinien aufgeteilt in doppelt negative Zellen (DN), doppelt positive Zellen (DP), einfach positive CD4-Zellen (SP CD4<sup>+</sup>) und einfach positive CD8-Zellen (SP CD8<sup>+</sup>) **B**. Gemittelt wurden die Werte von jeweils 7 ADAP KO und ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Mäusen und 11 ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>-Mäusen (Mittelwert + SEM), \*p<0,05.

### 3.4. Medulla ossium flava

Die Medulla ossium flava stellt als primäres lymphatisches Organ den Ort der B-Zellreifung dar. Die Entwicklung beginnt bei der Pro-B-Zelle über die Prä-B-Zelle zur unreifen B-Zelle, um schließlich zur reifen B-Zelle zu werden. Pro-B-Zellen und Prä-B-Zellen wurden nicht gesondert getrennt und sind in den folgenden Abbildungen als Vorläufer-B-Zellen zusammengefasst. Es ist bekannt, dass die reifen B-Zellen kein ADAP-Molekül exprimieren (Dluzniewska et al., 2007). In der Abbildung 12 sind die Absolutzellzahlen im Knochenmark zusammengefasst worden, um mögliche Unterschiede in den drei Mauslinien ADAP KO, ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> und ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> zu betrachten. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Gesamt-Anzahl der Knochenmarkszellen zwischen den drei Mauslinien.

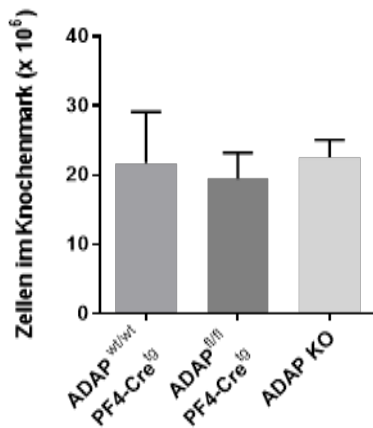


Abbildung 12 Dargestellt ist die Absolutzellzahl von Knochenmarkszellen in den drei Mauslinien ADAP KO, ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> und ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>. Gemittelt wurden die Werte von jeweils 8 ADAP KO-, ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4- und ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>-Mäusen (Mittelwert + SEM).

Als Nächstes wurden die einzelnen Reifungsstadien der B-Zellreifung im Knochenmark betrachtet. In der Abbildung 13 A ist ein repräsentativer Dotplot zu sehen, der die Gating-Strategie darstellt. Die größte Population der B-Zellen im Knochenmark wird von den Vorläufer-B-Zellen Prä/Pro B-Zellen (B220 low IgM<sup>-</sup>) gestellt. Die Anteile der Populationen der unreifen B-Zellen (B220 low IgM<sup>+</sup>) und der reifen B-Zellen (B220 high IgM<sup>+</sup>) fallen niedriger aus. Diese Verteilung entspricht der normalen B-Zellreifung. Im Vergleich der drei Mauslinien ADAP KO, ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> und ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> zeigt sich, dass sich im Knochenmark die Anteile der drei betrachteten Zellpopulationen der Vorläufer-B-Zelle, der unreifen B-Zelle und der reifen B-Zelle sich nicht signifikant unterscheiden (siehe Abbildung 13 B).

Daraus ist zu schließen, dass sowohl der konditionale Knock-out (ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>) als auch der komplette Knock-out ADAP KO keinen Einfluss auf die B-Zellreifung hat.

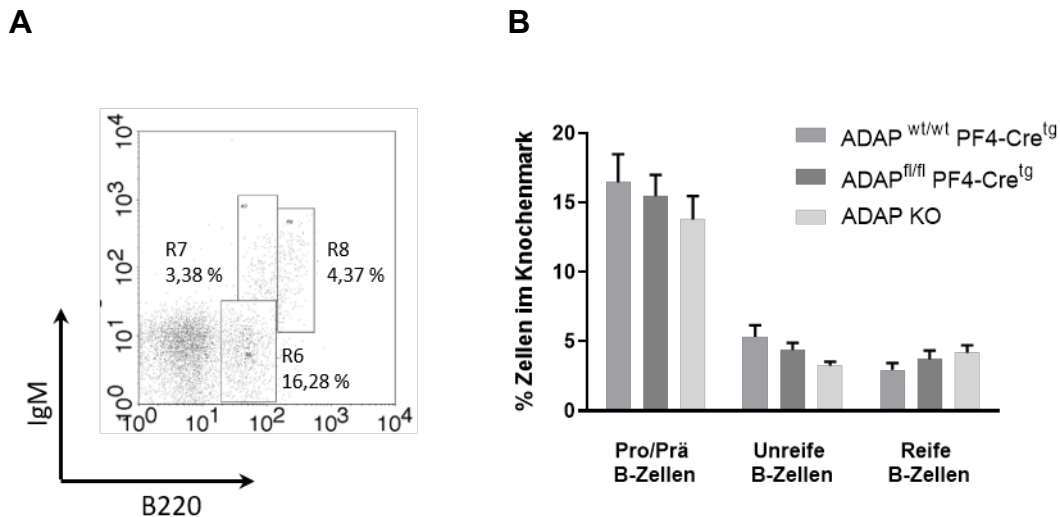


Abbildung 13 Dargestellt ist die B-Zellreifung im Knochenmark. **A** zeigt auf der Abzisse die Expression des B-Zell-spezifischen Oberflächenmoleküls B220 und auf der Ordinate die Ausprägung von IgM. Dabei entspricht die Region R6 den Pro/Prä B-Zellen, R7 den unreifen B-Zellen und R8 den reifen B-Zellen. **B** zeigt die relative Anzahl der 3 Populationen der Pro/Prä-B-Zellen, der unreifen B-Zellen und der reifen B-Zellen. Gemittelt wurden die Werte von jeweils 8 ADAP KO-, ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4- und ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>-Mäusen (Mittelwert + SEM).

### 3.5. Spleen

Der Spleen ist ein sekundäres lymphatisches Organ und es werden rote und weiße Pulpa unterschieden. Allgemein ist die Aufgabe des Spleen das Blut zu filtern. In der roten Pulpa werden beschädigte Erythrozyten abgebaut. In der weißen Pulpa findet die Antigenpräsentation statt, die zu einer Immunreaktion führt. Die weiße Pulpa wird noch einmal in periarterielle Lymphscheide (PALS), Lymphfollikel und Marginalzone unterteilt. In der PALS findet die T-Zell-vermittelte Reaktion statt und in den Lymphfollikeln und der Marginalzone die B-Zell-Reaktion. Für die genaue Charakterisierung der konditionalen Knock-out Maus wurde in dem Spleen die Anzahl der B- und T-Zellen betrachtet, um die Auswirkungen der An- oder Abwesenheit von ADAP in den drei Mauslinien ADAP KO, ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> und ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> zu vergleichen.

In Abbildung 14 A wurden die absoluten Zellzahlen der Splenozyten, in der Abbildung als Milzzellen bezeichnet, ohne Unterteilung in Subpopulationen, von allen drei Mauslinien aufgetragen. Hierbei zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Gesamtzellzahl der Milzzellen der drei Mauslinien. In Abbildung 14 B sind die Subpopulationen der Splenozyten dargestellt. Dabei markieren die CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> sowie CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> die T-Zellpopulationen. Die Population der Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) wird als

NK1.1<sup>+</sup>/NKp46<sup>+</sup> gekennzeichnet. Die B-Zellpopulation wird durch die Marker B220<sup>+</sup>/IgM<sup>+</sup> charakterisiert.

Wie in der Abbildung 14 B ersichtlich, liegt ein signifikant verringerter Anteil der T-Zellpopulation CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> in der Knock-out Mauslinie ADAP KO gegenüber den anderen beiden Mauslinien vor. Bei der B-Zellpopulation zeigt sich, dass es einen signifikant höheren Anteil der B-Zellen in der Knock-out Maus ADAP KO gegenüber den anderen beiden Mauslinien gibt. Dies lässt darauf schließen, dass der T-Zell-Anteil in der Knock-out Mauslinie eingeschränkt und in Richtung der B-Zellen verschoben ist. Bei den Mauslinien ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> und ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> sind demnach die Verteilungen der T-Zellpopulation als auch der B-Zellpopulation in der Milz nicht verändert. Es ist eine regelrechte Zellmigration aus den primären lymphatischen Organen anzunehmen.

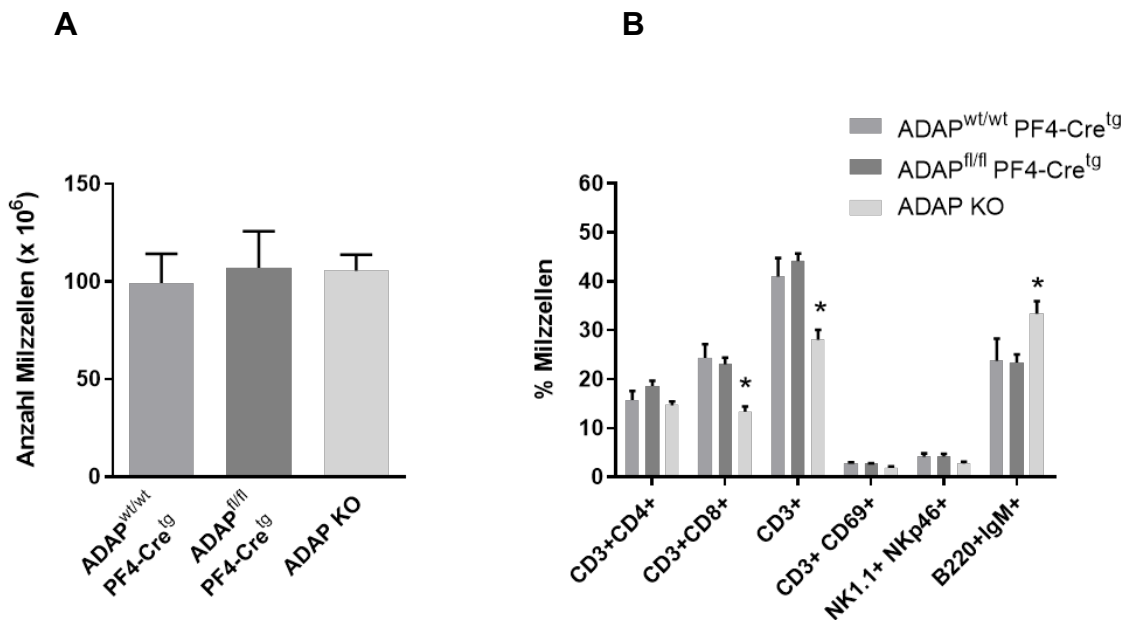


Abbildung 14 Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen und relativen Anteile der Splenozyten (Milzzellen). **A** zeigt die Anzahl der Splenozyten in den drei Mauslinien ADAP KO, ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> und ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>. **B** zeigt die Subpopulationen der Splenozyten als prozentuale Anteile der T-Zellen (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>), NK-Zellen (NK1.1<sup>+</sup>/NKp46) und B-Zellen (B220<sup>+</sup>/IgM<sup>+</sup>). Gemittelt wurden die Werte von jeweils 5 ADAP KO, 8 ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Mäusen und 8 ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>-Mäusen (Mittelwert + SEM), \*p<0,05.

In der Abbildung 15 sind die Anteile der Subpopulation der CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen in den drei Mauslinien ADAP KO, ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> und ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> beispielhaft als Dotplot gezeigt. Bei der ADAP KO Maus ist eine Verringerung des Anteils der CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> doppelt positiven zytotoxischen T-Zellen zu erkennen. Die Verminderung dieser Zellpopulation war bereits im Thymus festgestellt worden (siehe Abbildung 11). Das bestätigt, dass der komplette Knock-out des ADAP-Moleküls einen funktionellen Einfluss auf die T-Zellentwicklung, insbesondere der zytotoxischen T-Zellen hat. In den anderen beiden Mauslinien ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> und ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> ergibt sich ein ausgeglichenes Bild der CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> doppelt positiven zytotoxischen T-Zellen. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> und dem konditionalen Knock-out ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>.

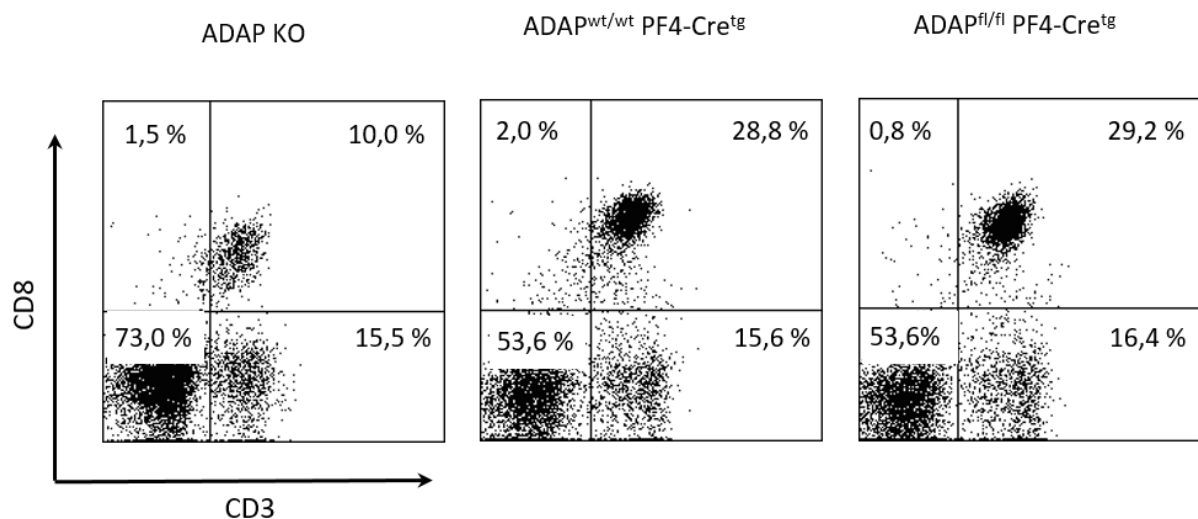


Abbildung 15 Dargestellt sind die Anteile der zytotoxischen T-Zellpopulation in der Milz der drei Mauslinien ADAP KO, ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> und ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>. Die CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Zellen befinden sich im oberen rechten Quadranten. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Dotplot.



### 3.6. Peripheres Blut

Die Blutbahn des Körpers dient als Transportweg. Dabei werden verschiedene Komponenten transportiert wie Nährstoffe, Gase, Abfallprodukte, Botenstoffe und verschiedene Zellarten. Die Zellpopulationen unterteilen sich in Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten. Die Leukozyten werden noch einmal in neutrophile, eosinophile, basophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten unterteilt. Die Lymphozyten werden erneut in die bereits oben beschriebenen Zellpopulationen der B- und T-Zellen und der NK-Zellen unterteilt. Diese drei Zellpopulationen sind nach ihrer Entwicklung in den primären lymphatischen Organen und ihrer Einwanderung in die sekundären lymphatischen Organe in der Zirkulation im peripheren Blut betrachtet worden. Es ist bekannt, dass die komplette ADAP-Knock-out Maus einen T-Zellreifungsdefekt im Thymus aufweist. Deshalb wurde die Verteilung der Zellpopulationen der B- und T-Zellen und der NK-Zellen im peripheren Blut der ADAP-Knock-out Maus sowie der Thrombozyten-spezifischen konditionalen Knock-out Maus und der entsprechenden Kontrollmaus untersucht.

In Abbildung 16 ist beispielhaft die Typisierung der zytotoxischen T-Zellen anhand der Expression der Oberflächenproteine CD3 und CD8 dargestellt. Dabei zeigt sich, dass es bei der Knock-out Maus ADAP KO einen verringerten Anteil von doppelt positiven CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen gibt. Die Mauslinien ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> und ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> bilden im Gegensatz zu der Knock-out Maus ADAP KO mehr doppelt positive zytotoxische T-Zellen aus. Der Unterschied zwischen ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> und ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> ist nicht signifikant und demnach entspricht der konditionale Knock-out ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> der Kontrolle ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>.

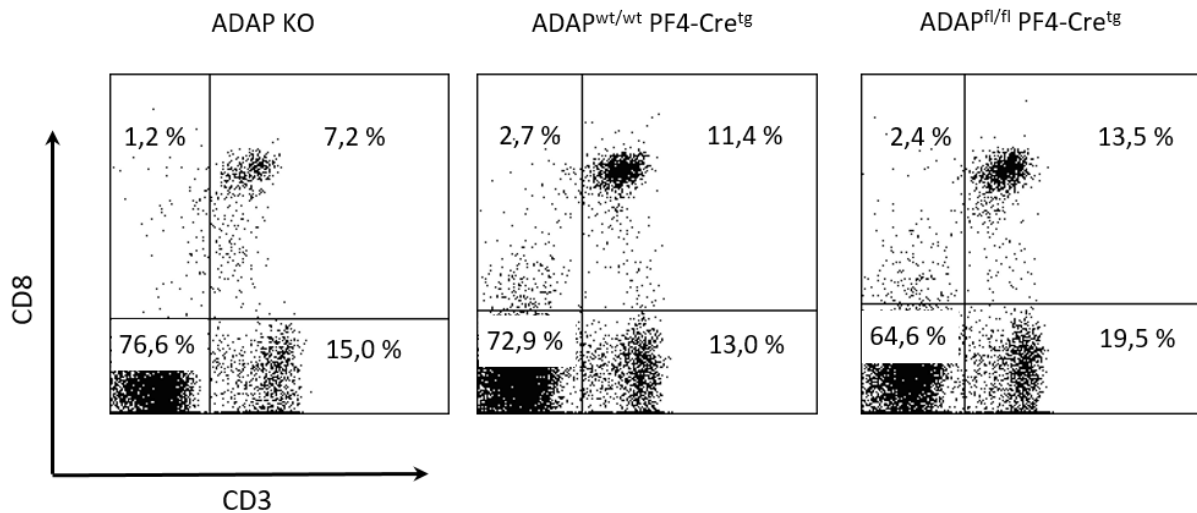


Abbildung 16 Dargestellt ist die Verteilung der CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen im peripheren Blut der drei Mauslinien ADAP KO, ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> und ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>. Die CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Zellen sind im oberen rechten Quadranten sichtbar. Für die Dotplots wurde ein repräsentatives Experiment ausgewählt.

Die Abbildung 17 zeigt die Quantifizierung der relativen Verteilung der Zellpopulationen der B- und T-Zellen und der NK-Zellen im peripheren Blut in den drei Mauslinien ADAP KO, ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> und ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>. Die T-Zellpopulation wird mit ihren Markern CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> dargestellt. Die NK-Zellpopulation ist durch die Marker NK1.1<sup>+</sup>/NKp46<sup>+</sup> charakterisiert. Die reife B-Zellpopulation ist mit B220<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup> markiert. In der Mauslinie ADAP KO zeigt sich eine signifikante Verringerung bei den T-Zellpopulationen CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> und bei CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>. Bei den beiden anderen Mauslinien zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der verschiedenen Zellpopulationen. Demnach entspricht der konditionale Knock-out ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> dem Wildtyp ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>.

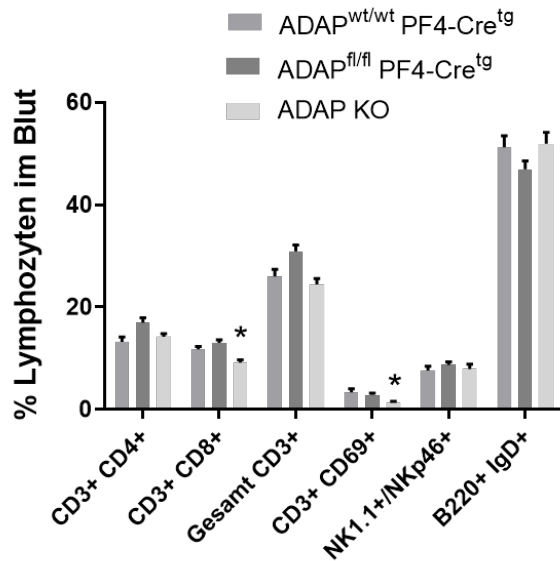


Abbildung 17 Dargestellt ist die relative Verteilung der T-, NK- und B-Zellpopulation im Blut. Dabei sind die T-Zellpopulationen mit CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, Gesamt CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, die NK-Zellpopulation mit NK1.1<sup>+</sup>/NKp46<sup>+</sup> und die B-Zellpopulation mit B220<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup> bezeichnet. Gemittelt wurden die Werte von jeweils 19 ADAP KO, 8 ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Mäusen und 6 ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>-Mäusen (Mittelwert + SEM), \*p<0,05.

### 3.7. Stimulation der Thrombozyten in vitro

Es war bekannt, dass murine Thrombozyten der kompletten ADAP Knock-out Maus eine verminderte Aktivierung der Integrine und eine reduzierte Fibrinogenbindung aufweisen (Jarvis et al., 2012; Kasirer-Friede et al., 2014). Um die allgemeine Aktivierbarkeit der Thrombozyten der konditionalen ADAP Knock-out Maus zu prüfen, wurde die Phosphorylierung der Aminosäure Tyrosin betrachtet. Die Tyrosinphosphorylierung durch verschiedene Tyrosinkinasen stellt einen wesentlichen Mechanismus der Signaltransduktion dar. Hierfür wurde der Antikörper 4G10 verwendet, der sich gegen phosphoryliertes Tyrosin richtet und somit die allgemeine Tyrosinphosphorylierung der thrombozytären Proteine im Westernblot sichtbar macht. Zur Aktivierung der Thrombozyten wurde Thrombin verwendet. Thrombin ist als Faktor II ein wichtiger Aktivator der Gerinnungsstrecke und zeigt somit auch die Funktion der Thrombozyten an. Es wurde eine Kinetik der Stimulation der Thrombozyten mit Thrombin (2 U/ml) durchgeführt. Dazu wurden die Zeitpunkte 30 Sekunden, 60 Sekunden, 120 Sekunden und eine unstimulierte Kontrollprobe zum Zeitpunkt 0 Sekunden ausgewählt. Der konditionale Knock-out ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> wurde dem Wildtyp ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> gegenübergestellt, um die Auswirkungen des Knock-outs auf die Stimulierbarkeit der Thrombozyten mit Thrombin zu zeigen. Das ADAP-Molekül wurde zudem nachgewiesen, um die Genotypen auf Proteinebene zu verifizieren. Zum Schluss wurde  $\beta$ -Aktin bestimmt, um

sicherzugehen, dass gleiche Mengen an Protein auf das Gel geladen wurden und ein Proteintransfer einheitlich erfolgt ist.

In der Abbildung 18 A ist die beschriebene Kinetik der Stimulation der Thrombozyten mit Thrombin zu sehen. Dabei ist zu erkennen, dass stärkere Signale der Tyrosinphosphorylierung bei der Kontrolle ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> im Vergleich zum konditionalen Knock-out ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> vorliegen. Die Tyrosinphosphorylierung erreicht nach 30 Sekunden Stimulation ihr Maximum. Die Signalstärke nimmt bis 120 Sekunden ab. Bei dem konditionalen Knock-out ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> ist eine deutlich verminderte Stimulation zu sehen. Ein Maximum der Tyrosinphosphorylierung der Proteine ist im Zeitraum von 30 bis 120 Sekunden nicht erkennbar. Um die Stimulation der Proteine im Molekulargewichtsbereich von 35 bis 40 kDa besser zu verdeutlichen, wurde in der Abbildung 18 B die Tyrosinphosphorylierung nach einer verlängerten Belichtungszeit von 3 min dargestellt. Hier zeigt sich erneut, dass die Stimulation bei der Kontrolle ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> am stärksten nach 30 Sekunden ist und bis zu 120 Sekunden die Signalstärke abnimmt. Bei dem konditionalen Knock-out ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> ist nun auch ein deutliches positives Signal bei 30 Sekunden zu erkennen. Allerdings ist kein Unterschied zwischen der unstimulierten Kontrolle zum Zeitpunkt 0 Sekunden und den Zeitpunkten 60 Sekunden, 120 Sekunden nach Stimulation sichtbar. Insgesamt ist die Signalstärke bei dem konditionalen Knock-out ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> wesentlich schwächer ausgeprägt im Vergleich zu den stimulierten Thrombozyten der Kontrolltiere. In der Abbildung 18 C zeigt sich ein positiver Nachweis des ADAP-Moleküls bei 130 kDa bei der Kontrolle ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> und ein negativer Nachweis bei dem konditionalen Knock-out ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>. Dies bestätigt die Genotypen. In der Abbildung 18 D wird mit dem positiven Nachweis von  $\beta$ -Aktin bei 42 kDa in beiden Mauslinien sicher gestellt, dass die gleichmäßige Beladung des Gels und der Proteintransfer tatsächlich erfolgt sind.

Aus diesem Versuch ist zu schließen, dass das intakte ADAP-Gen bei der Kontroll-Maus ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> ein funktionstüchtiges Protein herstellt. Bei dem konditionalen Knock-out ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> zeigt sich eine verringerte allgemeine Aktivierbarkeit der Thrombozyten nach Stimulation mit Thrombin. Demnach führt der Verlust von ADAP in den Thrombozyten der konditionalen Knock-out Maus zu einer Funktionsstörung der Thrombozyten.

In einem weiteren Versuch wurden die Thrombozyten mit Podoplanin stimuliert (Abbildung 19). Podoplanin bindet an den CLEC-2-Rezeptor, der natürlicherweise auf den Thrombozyten vorhanden ist. Zur Stimulation *in vitro* wurde ein rekombinantes chimäres Protein verwendet, bestehend aus Maus Podoplanin gekoppelt an den Fc-Teil von Immunglobulin G. Durch die

Kreuzvernetzung mit einem Ziege-anti Maus F(ab')<sub>2</sub> Fragment wurde die Aktivierung der Thrombozyten ausgelöst. Für die Kinetik wurde eine unstimulierte Blindprobe und eine Stimulation mit Podoplanin, die nach einer und zwei Minuten gestoppt wurde, durchgeführt. Mit dem 4G10-Antikörper wurde auch hier eine Übersicht über die allgemeine Tyrosinphosphorylierung erstellt. Für ausgewählte Molekulargewichtsbereiche wurden wieder zwei Belichtungszeiten von 1 Minute und 3 Minuten vorgenommen (Abbildung 19 A, B). Anschließend wurde das ADAP-Molekül nachgewiesen (Abbildung 19 C), um den Genotyp sicher zuzuordnen und mit der Detektion von  $\beta$ -Aktin die gleichmäßige Beladung und der Proteintransfer bestätigt (Abbildung 19 D).

Wie in dem Experiment mit Thrombin zeigt sich, dass in der Abbildung 19 A und B ein stärkeres Signal bei den Thrombozyten der Wildtyp-Maus ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> vorliegt. Dabei nimmt die Signalstärke von 1 Minute zu 2 Minuten zu. In Abbildung 19 B ist bei etwa 40 kDa ein Stimulationssignal zu sehen, das bei dem konditionalen Knock-out ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> nur sehr schwach ausgeprägt ist. Alle anderen Signale in der Übersicht sind bei dem konditionalen Knock-out ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> ebenfalls vorhanden, zeigen aber auch hier eine deutliche Abschwächung der Signalstärke. Demnach zeigt sich auch in dem Versuch der Stimulation mit Podoplanin eine Thrombozytenfunktionstörung, die das Ergebnis aus der Thrombinstimulation unterstützt.

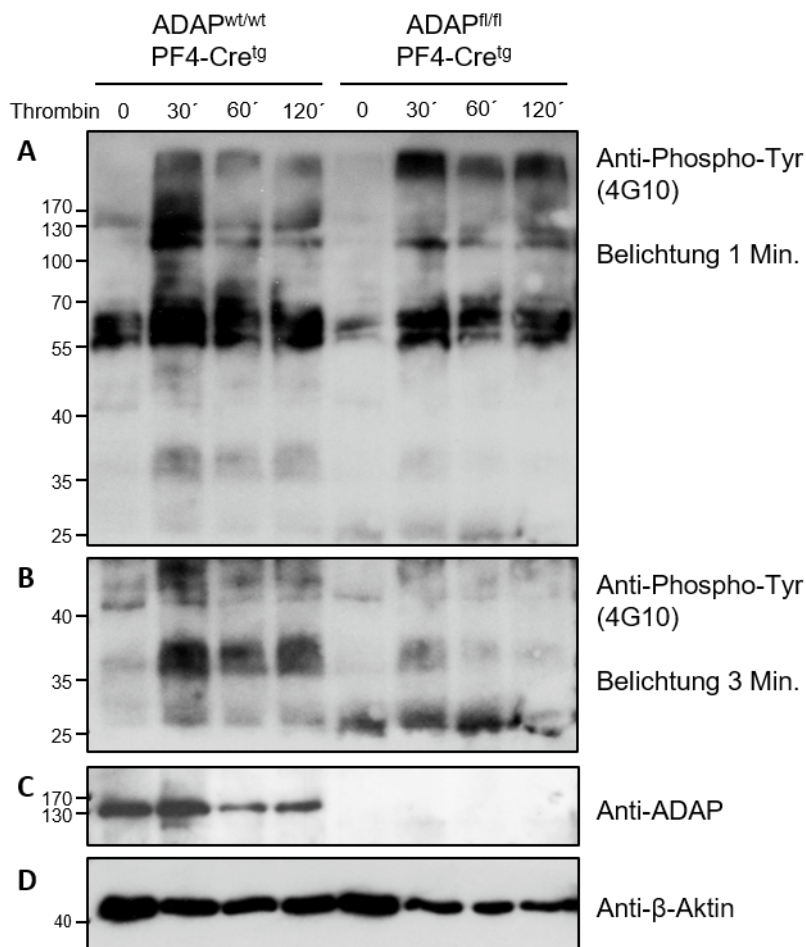


Abbildung 18 Dargestellt ist die Kinetik der Thrombozytenstimulation mit Thrombin (2 U/ml). Das Molekulargewicht ist in kDa und die Zeiteinheit in Sekunden angegeben. Es wurden Thrombozyten der beiden Mauslinien ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> und ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> untersucht. **A** zeigt die Reaktivität des Anti-Phospho-Tyrosin-Antikörpers 4G10 bei einer Belichtungszeit von 1 min und **B** die Reaktivität des Anti-Phospho-Tyrosin-Antikörpers im ausgewählten Molekulargewichtsbereich von 25–40 kDa nach einer Belichtungszeit von 3 min. **C** Nachweis des ADAP-Moleküls bei 130 kDa. **D** Bestätigung der Beladung des Gels und des Proteintransfers durch Anti-β-Aktin bei 42 kDa. Der Western Blot zeigt ein repräsentatives Beispiel einer Maus für den jeweiligen Genotyp.

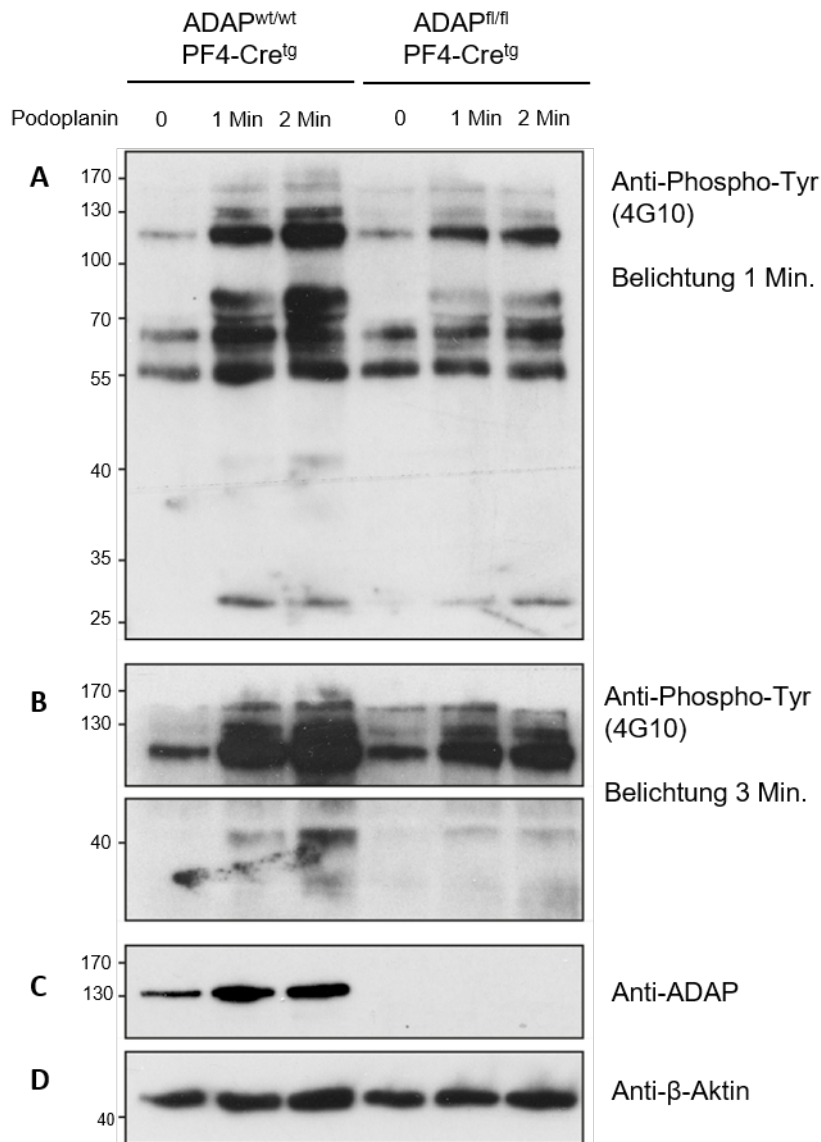


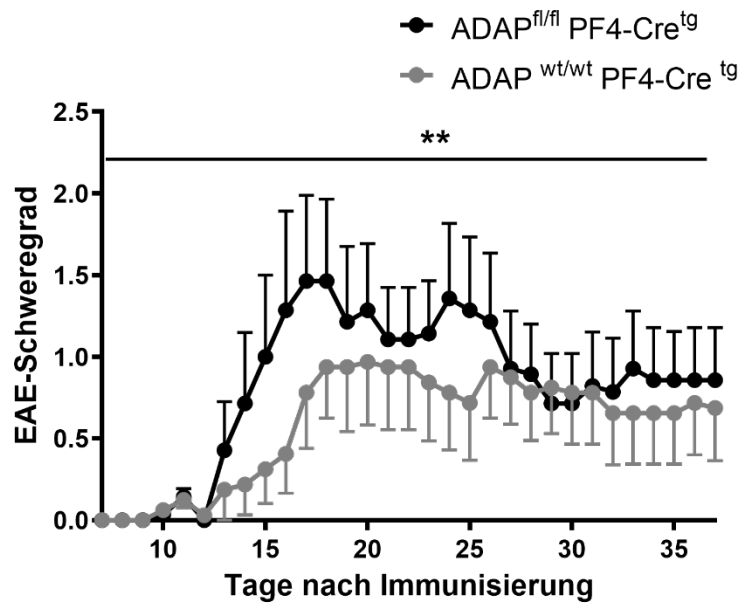
Abbildung 19 Dargestellt ist die Kinetik der Podoplaninstimulation der Thrombozyten. Das Molekulargewicht ist in kDa und die Zeit in Minuten angegeben. Es wurden Thrombozyten der beiden Mauslinien ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> und ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> gegenübergestellt. **A** zeigt die Reaktivität des Anti-Phospho-Tyrosin-Antikörpers 4G10 bei einer Belichtungszeit von 1 min und **B** die Reaktivität des Anti-Phospho-Tyrosin-Antikörpers im ausgewählten Molekulargewichtsbereich von 170–130 kDa und im Bereich von 40 kDa nach einer Belichtungszeit von 3 min. **C** Nachweis des ADAP-Moleküls bei 130 kDa. **D** Bestätigung der Beladung des Gels und des Proteintransfers durch Anti-β-Aktin bei 42 kDa. Der Western Blot zeigt ein repräsentatives Beispiel einer Maus für den jeweiligen Genotyp.

### 3.8. Verhalten der konditionalen ADAP Knock-out Maus in der aktiven und passiven EAE

Das Mausmodell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis ist mit der Entzündung des zentralen Nervensystems eine Entsprechung der Multiplen Sklerose beim Menschen. Diese Erkrankung wurde wie in 2.10 beschrieben induziert. Die Entzündung der EAE beginnt dabei von caudal und setzt sich über die Zeit nach cranial fort. Der Krankheitsverlauf wurde mit den Kriterien in Tabelle 8 kontrolliert.

Es wurden sowohl eine aktive (Abbildung 20) als auch eine passive Induktion der EAE (Abbildung 21) vorgenommen und der Krankheitsverlauf der beiden Mauslinien  $ADAP^{fl/fl} PF4-Cre^{tg}$  und  $ADAP^{wt/wt} PF4-Cre^{tg}$  verglichen. Bei der aktiven EAE zeigt sich, dass bei der konditionalen Knock-out Maus  $ADAP^{fl/fl} PF4-Cre^{tg}$  eine deutliche Zunahme des Schweregrades der Erkrankung beginnend am Tag 10 nach der Immunisierung stattfindet. Diese findet ihren Höhepunkt am Tag 16, bei dem über die Hälfte der Tiere erkrankt ist. Die Symptome mildern sich nach diesem Tag etwas, bleiben aber bis zum Ende des Experiments bestehen. Dies entspricht einem chronischen Verlauf der Erkrankung. Bei den Kontrolltieren in der Mauslinie  $ADAP^{wt/wt} PF4-Cre^{tg}$  zeigt sich dagegen ein milderer Krankheitsverlauf. Am Tag 16 sind ebenfalls über die Hälfte der Tiere erkrankt, dabei ist der Schweregrad der Symptome nicht so stark ausgeprägt wie bei dem konditionalen Knock-out. Dementsprechend zeigt die statistische Auswertung, dass die EAE in den konditionalen Knock-out Tieren mit dem spezifischen Verlust von ADAP in Thrombozyten verstärkt ist und zu dem abgeschwächten Verlauf in den entsprechenden Kontrolltieren ein signifikanter Unterschied besteht.

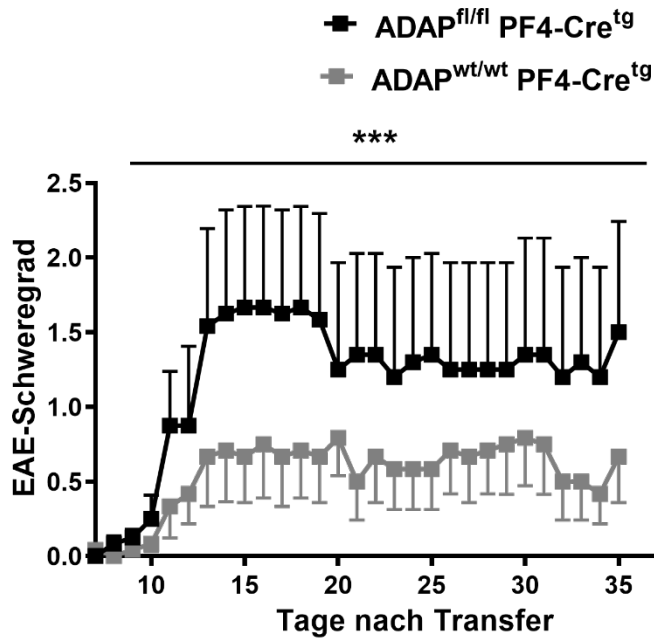




Tag	10	14	16	18	25
●	6 %	56 %	56 %	67 %	72 %
●	7 %	33 %	67 %	67 %	53 %

Abbildung 20 Dargestellt ist der Verlauf der aktiven EAE bei den beiden Mauslinien ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> und ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>. Auf der Abzisse ist die Zeit in Tagen nach der Immunisierung aufgetragen. Auf der Ordinate ist der Schweregrad der Symptome gezeigt. Es wurden 8 Mäuse der Mauslinie ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> (grau) und 7 Mäuse der Mauslinie ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> (schwarz) und eingesetzt. Die Darstellung zeigt den Mittelwert  $\pm$  SEM. In der Tabelle der Prozentsatz der erkrankten Tiere dargestellt.

Am Tag 10 nach der Induktion der passiven EAE erfolgte bei den Mäusen des konditionalen Knock-outs ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> ebenfalls ein steiler Anstieg der Symptomschwere. Es sind auch hier über die Hälfte der Tiere am Tag 16 erkrankt und der Schweregrad nimmt über die Zeit nur leicht ab. Bei den Kontrolltieren ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> erfolgte nur ein leichter Anstieg der Symptomschwere und zeigte über das ganze Experiment einen milden Verlauf. Zudem sind nur die Hälfte der Tiere bei der Gruppe der Kontrolltiere erkrankt. Auch hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Schwere der Erkrankung zwischen den beiden Mauslinien ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> und ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> (Abbildung 21).



Tag	10	14	16	18	25
■	17 %	50 %	67 %	50 %	60 %
■	0 %	50 %	50 %	50 %	50 %

Abbildung 21 Dargestellt ist der Verlauf der passiven EAE bei den beiden Mauslinien ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> und ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>. Die Tage wurden ab dem adoptiven Transfer gezählt. Es wurden 6 Mäuse der Mauslinie ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> (grau) und 7 Mäuse der Mauslinie ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> (schwarz) im Versuch eingesetzt. Die Darstellung zeigt den Schweregrad der EAE (Mittelwert ± SEM). In der Tabelle ist der Anteil der erkrankten Tiere in Prozent dargestellt.

Im Vergleich zwischen aktiver und passiver EAE zeigt sich, dass bei der aktiven EAE die Tiere der Kontrollgruppe ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> stärkere Symptome entwickeln als bei der passiven EAE (mittlerer Schweregrad 1,0 in der aktiven EAE versus 0,8 mittlerer Schweregrad in der passiven EAE am Tag 20). Der Verlauf der Erkrankung unterliegt bei der aktiven EAE in beiden Mauslinien stärkeren Schwankungen. Bei der passiven EAE hält sich die Schwere der Symptome mehr konstant auf einem Niveau. Der Unterschied im klinischen Schweregrad zwischen den beiden Mauslinien ist bei der passiven EAE stärker ausgeprägt als bei der aktiven EAE (Signifikanzniveau \*\*\*p < 0,001 versus \*\*p < 0,01). Insgesamt ist aus diesen Experimenten zu schließen, dass der konditionale Knock-out mit spezifischem Verlust von ADAP in den Thrombozyten sowohl in der aktiven als auch in der passiven EAE zu einer Zunahme der Symptomschwere führt im Vergleich zu den Kontrolltieren.

### 3.9. Histologische Überprüfung des Krankheitsverlauf der EAE

Für die ergänzende Betrachtung des symptomatischen Verlaufs wurde in den histologischen Präparaten die Inflammation der Medulla spinalis mikroskopisch nachgewiesen. Dazu wurden am Institut für Pathologie Hämatoxylin-Eosin gefärbte Schnitte angefertigt.

In Abbildung 22 sind exemplarisch jeweils Längsschnitte der Medulla spinalis einer Maus aus den Mauslinien  $ADAP^{fl/fl}$   $PF4-Cre^{tg}$  und  $ADAP^{wt/wt}$   $PF4-Cre^{tg}$  dargestellt. Die Infiltration bei der  $ADAP^{fl/fl}$   $PF4-Cre^{tg}$  Mauslinie ist stärker ausgeprägt als bei der Wildtypmaus  $ADAP^{wt/wt}$   $PF4-Cre^{tg}$  (markiert durch die Pfeile). Dies entspricht den vorangegangenen Experimenten, die einen stärkeren klinischen Schweregrad der konditionalen Knock-out Maus aufwiesen, der hier als Inflammationsreaktion im histologischen Korrelat mit den vermehrten Lymphozyten deutlich wird. Die Inflammationsreaktion ist in der Wildtyp-Maus abgeschwächt zu sehen und es ist daraus zu schließen, dass die verminderte Infiltration der Lymphozyten mit einem geringeren Schweregrad in der EAE korreliert, wie es aus den vorherigen Experimenten hervorgeht.

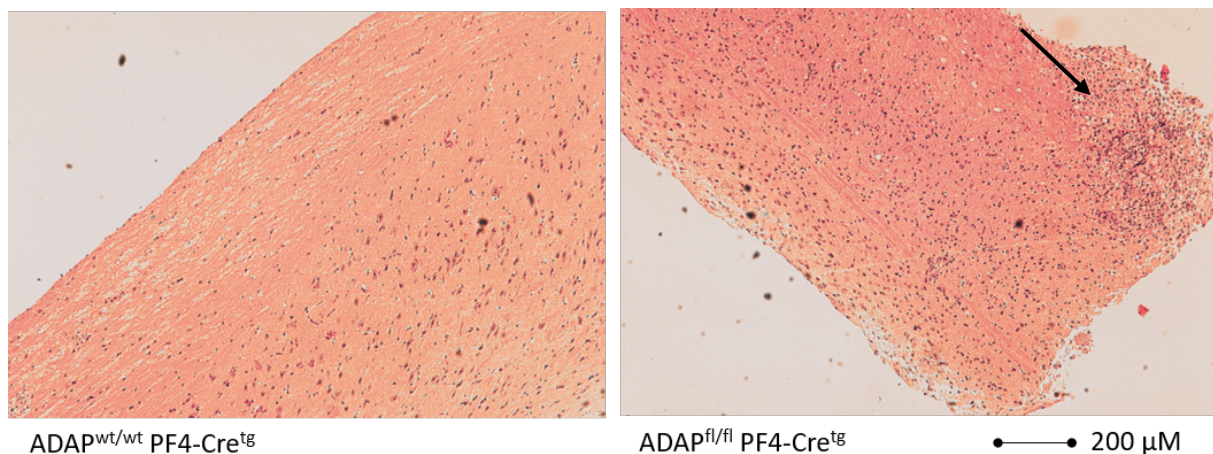


Abbildung 22 Dargestellt ist eine Detailaufnahme der Medulla spinalis aus den beiden Mauslinien  $ADAP^{fl/fl}$   $PF4-Cre^{tg}$  und  $ADAP^{wt/wt}$   $PF4-Cre^{tg}$  nach Induktion der passiven EAE. Der klinische Score betrug bei dem Tier mit dem Genotyp  $ADAP^{fl/fl}$   $PF4-Cre^{tg}$  3,0 und bei dem Tier mit dem Genotyp  $ADAP^{wt/wt}$   $PF4-Cre^{tg}$  0,25. Mit den Pfeilen gekennzeichnet ist die Infiltration der Lymphozyten.

## 4. Diskussion

### 4.1. Der genetische Nachweis des konditionalen ADAP Knock-outs in Thrombozyten

In der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Annegret Reinhold waren Mäuse generiert worden, bei denen das Exon 2 des ADAP-Gens von loxP-Sequenzen flankiert wird (tm1c-Genotyp siehe Abbildung 1). Diese Mäuse zeigten phänotypisch den Wildtyp. Die Tiere wurden dann verpaart mit Mäusen, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des PF4-Promotors exprimieren. Diese Mauslinie war 2007 generiert und bereits mehrfach erfolgreich verwendet worden, um Gene spezifisch in den Megakaryozyten und Thrombozyten zu deletieren (Pertuy et al., 2015; Tiedt et al., 2007).

Verschiedene Publikationen hatten auch eine Expression des PF4-Cre-Rekombinase Transgens in Zellen außerhalb der megakaryozytären Zellreihe beobachtet. So beschrieben Calaminus und Koautoren die Aktivierung von PF4-Cre in bis zu 30 % der T-Zellen und B-Zellen der Milz sowie in Granulozyten (Calaminus et al., 2012). Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten mittels Westernblot und intrazellulärer FACS-Färbung eindeutig, dass in den konditionalen ADAP Knock-out-Mäusen die Cre-Rekombinase nur in Thrombozyten aktiv ist (Rudolph et al., 2019). Auch die beschriebene PF4-Cre-vermittelte Rekombination in Milzzellen nach Stimulation mit dem Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) konnte für die konditionalen ADAP Knock-out-Mäuse nicht nachgewiesen werden (Pertuy et al., 2015; Rudolph et al., 2019). Allerdings können wir seltene Rekombinationsereignisse in kleinen Zellpopulationen nicht komplett ausschließen. So war mit Hilfe von Reporter-mäusen eine PF4-Cre vermittelte Rekombination in Peritonealmakrophagen und Monozyten des Bluts nachgewiesen worden (Abram et al., 2014). Diese Zellpopulationen gehörten nicht zum Umfang der immunologischen Charakterisierung der konditionalen ADAP Knock-out Maus. Außerdem spielen diese Zellen bei der Immunpathogenese des im Rahmen dieser Arbeit angewandten Tiermodells der EAE eine untergeordnete Rolle.

Zusammengefasst erwies sich die konditionale Knock-out Maus mit dem Verlust von ADAP in Thrombozyten als spezifisch. Zum Monitoring der Deletion von ADAP verwendeten wir eine Kombination von 4 verschiedenen PCR-Reaktionen. Dabei wurde routinemäßig die An- oder Abwesenheit der FRT-Sequenz, der loxP-Sequenzen, des Exons 2 vom *fyb*-Gen und des Gens für die PF4-vermittelte Cre-Rekombinase geprüft. Um in den Experimenten mögliche unerwünschte Nebeneffekte der Cre-Rekombinase weitgehend auszuschließen, verwendeten wir immer Cre-transgene Tiere. Verglichen wurden jeweils Tiere mit den Genotypen ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> mit ADAP<sup>wt/wt</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>. Somit ist die konditionale ADAP Knock-out Maus ein

geeignetes Modell, um die Auswirkungen des spezifischen Verlustes von ADAP in Thrombozyten auf das Immunsystem zu untersuchen.

#### 4.2. Die immunologische Charakterisierung der konditionalen ADAP Knock-out Maus

Die immunologische Charakterisierung der konditionalen ADAP Knock-out Maus umfasste die Untersuchung der primären und sekundären lymphatischen Organe. Im Differentialblutbild zeigte sich bei den Leukozyten und Lymphozyten kein Unterschied in der Zellzahl zwischen der Kontrolle und dem konditionalen ADAP Knock-out. Eine verringerte Zellzahl dieser beiden Zellpopulationen war bei dem kompletten ADAP Knock-out gegenüber den anderen Genotypen zu erkennen. Ein Unterschied bei den Monozyten und Granulozyten wurde nicht gezeigt. Dieses Ergebnis entspricht den Daten der Erstbeschreibung der kompletten ADAP Knock-out aus, bei der auch eine leicht verminderte Leukozytenzahl im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt worden war (Peterson et al., 2001).

Gleichzeitig wurde die Anzahl der Thrombozyten im peripheren Blut gemessen. Hier ist ein signifikanter Unterschied zwischen den konditionalen ADAP Knock-out-Mäusen und den Kontrolltieren in der Zellanzahl zu erkennen. Die konditionalen Knock-out-Mäuse zeigen eine deutlich signifikant verminderte Thrombozytenzahl vergleichbar mit den Thrombozytenzahlen der kompletten ADAP Knock-out-Mäuse. Dies bestätigt zunächst den bereits nachgewiesenen Genotyp mit dem bekannten Phänotyp. Parallel dazu wurde die Plasmakonzentration von PF4 bestimmt, ein von Thrombozyten gebildeter und in den Granula gespeicherter Mediator. Das Zytokin PF4 wurde auch in geringerer Konzentration bei dem konditionalen ADAP Knock-out und dem kompletten ADAP Knock-out gemessen im Vergleich zu den ADAP-suffizienten Kontrolltieren. Das unterstützt die Annahme, dass die verminderte Anzahl der Thrombozyten ursächlich verantwortlich ist für die verringerte PF4-Konzentration.

Demnach ist davon auszugehen, dass das ADAP-Protein eine entscheidende Rolle in der Zellreifung und der weiteren Entwicklung der Thrombozyten hat. Die Gründe für die Thrombozytopenie in ADAP-defizitären Mäusen sind bis jetzt nur teilweise geklärt. Bei einem Fehlen von ADAP zeigte sich eine Mikrothrombozytopenie im Blutbild (Spindler et al., 2018). Spindler et al. bewies, dass eine Zellzahlreduktion von Thrombozyten durch die ektopische Freisetzung von Prothrombozyten ins Knochenmarksegment und eine verkürzte Lebensdauer in der Peripherie verursacht wird. Die Arbeitsgruppe beschreibt, dass eine defekte F-Aktin-Organisation und eine beeinträchtigte Podosomenformation der Megakaryozyten zu einer reduzierten Integrinaktivität und verminderten Ausbreitung auf Kollagen I und Fibronectin führt. Dieser intrinsische Defekt der Megakaryozyten wurde im kompletten ADAP Knock-out

und in dem spezifischen konditionalen ADAP Knock-out für Megakaryozyten in der Arbeit von Spindler et al. nachgewiesen (Spindler et al., 2018).

Weiterhin verglichen wir das Maß der Reifung und Differenzierung der Immunozyten in primären und sekundären Lymphorganen. Die absoluten Zellzahlen und prozentualen Anteile der Zellen im Knochenmark, in der Milz, im Thymus und im Blut ergaben keinen Unterschied zwischen dem konditionalen ADAP Knock-out und der Kontrolle. Dies lässt darauf schließen, dass der Verlust von ADAP in Thrombozyten keinen Einfluss auf die Differenzierung der anderen Immunozyten hat.

Bekannt ist, dass bei der kompletten ADAP Knock-out Maus vor allem die T-Zell-Reifung und Differenzierung im Thymus gestört ist. Das wiederum führt zu einer Reduktion von T-Zellen in der Milz und im peripheren Blut (Griffiths et al., 2001; Peterson et al., 2001). Auch in dieser Arbeit zeigt sich im Thymus eine signifikante Verminderung der Gesamt-Zellzahl der Thymozyten in Mäusen mit dem kompletten ADAP Knock-out. Außerdem liegt eine Verhältnisverschiebung zugunsten der doppelt positiven Thymozyten vor. Die Anteile der einzeln positiven  $CD4^+$  und  $CD8^+$  Thymozyten sind vermindert. Diese Beobachtungen wurden ebenfalls mit der Erstbeschreibung der kompletten ADAP Knock-out Maus 2001 veröffentlicht (Griffiths et al., 2001; Peterson et al., 2001). Das Vorhandensein von ADAP ist entscheidend für die Ausreifung von einfach-positiven T-Zellen. Während der thymischen Reifung wurde eine verminderte Fähigkeit der doppelt positiven Thymozyten zur Bildung spezifischer Konjugate mit antigenpräsentierenden Zellen beobachtet. Auch die Proliferation der doppelt positiven Thymozyten war vermindert (Wu et al., 2006).

In der Medulla ossium flava zeigt sich in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied zwischen allen drei Mauslinien. Die B-Zellen sind bei einem ADAP-Defekt weder in ihrer Anzahl noch in ihrer Reifung beeinträchtigt. Demnach ist anzunehmen, dass ADAP keine essenzielle Funktion in B-Zellen übernimmt, da ADAP auch in reifen B-Zellen nicht mehr nachgewiesen werden kann (Dluzniewska et al., 2007).

In dem Splen zeigt sich bei den Zellzahlen der Splenozyten selbst kein signifikanter Unterschied in den drei Mauslinien. Der Splen als sekundäres Lymphorgan ist vor allem für die Blutreinigung zuständig und stellt einen Ort für die Antigenpräsentation dar. Bei der Betrachtung der Subpopulation der Immunozyten zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei dem kompletten ADAP Knock-out gegenüber der Kontrolle und dem konditionalen ADAP

Knock-out. Bei dem kompletten Knock-out ist der Anteil der T-Zellen signifikant reduziert, wodurch es zu einer Begünstigung des Anteils der B-Zellen in dem Spleen kommt. Dieses Ergebnis stellt ebenfalls eine Bestätigung früherer Daten dar und ist auf das Funktionsdefizit der T-Zellen zurückzuführen (Griffiths et al., 2001; Peterson et al., 2001). Insgesamt zeigen die Ergebnisse der immunologischen Charakterisierung der konditionalen Knock-out Maus, dass der spezifische Verlust von ADAP in thrombozytären Zellreihen andere Immunzellen nicht beeinflusst.

#### 4.3. Untersuchung der Thrombozytenaktivierung in vitro

Am Mausmodell der kompletten ADAP Knock-out Maus waren zahlreiche Untersuchungen zur Thrombozytenfunktion durchgeführt worden. Klinisch zeigten die Mäuse eine normale Blutungszeit, aber eine verlängerte Nachblutungszeit aus Schnittwunden am Schwanz (Kasirer-Friede et al., 2007). Außerdem wurde bei diesen Tieren eine instabile Thrombusbildung beobachtet nach Schädigung der Arteria carotis durch Eisen-III-Chlorid (Kasirer-Friede et al., 2010).

Es war bekannt, dass die Stimulation des CLEC-2-Rezeptors eine starke Thrombozytenaktivierung induziert (Eble et al., 2006). Über eine Beteiligung von ADAP an dem Signalweg des CLEC-2-Rezeptors waren keine Daten veröffentlicht. Erste Hinweise auf eine mögliche Rolle von ADAP am CLEC-2-Signalweg ergab eine ausführliche Proteomanalyse von Thrombozyten nach Stimulation des CLEC-2-Rezeptors mit dem natürlichen Liganden Rhodocytin. Dabei wurden über 100 differentiell regulierte Proteine nach CLEC-2-Stimulation identifiziert, darunter das Adapterprotein ADAP (Parguiña et al., 2012). Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit die globale Tyrosinphosphorylierung von Proteinen der ADAP-defizienten und ADAP-suffizienten Thrombozyten mittels Westernimmunoblot miteinander verglichen.

Für die Überprüfung der Thrombozytenaktivierung wurden in dieser Arbeit sowohl der Stimulus Podoplanin als Ligand des CLEC-2-Rezeptors als auch Thrombin benutzt. Die Kinetik bei der Thrombinstimulation zeigt in Thrombozyten der konditionalen ADAP Knock-out Mäuse eine verlangsamte Dynamik mit einem schwächeren Signal im Vergleich zu den Wildtyp-Thrombozyten. Daraus könnte man entnehmen, dass ADAP als Verstärkung des Signalweges von Thrombin und dessen Rezeptor agiert. Da es nur zu einem abgeschwächten Signal kommt und nicht zu einem Ausbleiben von diesem, kann ADAP eine unterstützende Rolle zugeschrieben werden.

Bei der Stimulation der Thrombozyten mit Podoplanin zeigt sich ein ähnliches Bild, da auch hier das Signal bei dem konditionalen ADAP-Knock-out gegenüber der Kontrolle abgeschwächt ist. Hier ist auch eine Beteiligung von ADAP bei der Interaktion von CLEC-2 und Podoplanin anzunehmen. Diese Ergebnisse einer verminderten Thrombozytenaktivierung bestätigen die klinische Ausprägung mit Nachblutungen bei Verletzung und längeren Blutungszeiten (Kasirer-Friede et al., 2007).

Zudem zeigten weiterführende Untersuchungen der Arbeit von Rudolph et al., dass bei dem konditionalen ADAP-Knock-out mit Podoplanin als Stimulus eine signifikante Reduktion der hochaffinen Form des  $\alpha$ IIB $\beta$ 3-Integrins, eine Runterregulation des Oberflächenmoleküls P-Selectin sowie eine verminderte Ausschüttung von TGF- $\beta$ 1 aus den Granula zu verzeichnen ist. Die Reduktion der hochaffinen Form des  $\alpha$ IIB $\beta$ 3-Integrins führte wiederum zu einer Verminderung der Bindung von Fibrinogen durch die Thrombozyten der konditionalen ADAP-Knock-out Maus (Rudolph et al., 2019). Durch die Bindung des Fibrinogens wird die Blutgerinnung und Thrombusformation eingeleitet. Allerdings war nur eine Reduktion der Aktivierung des  $\alpha$ IIB $\beta$ 3-Integrins und der Fibrinogenbindung beobachtet worden, kein kompletter Ausfall. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass weitere Moleküle an diesem CLEC-2-Signalweg beteiligt sind.

In einer weiteren Studie konnten Kasirer-Friede und Koautoren (Kasirer-Friede et al., 2014) nachweisen, dass in ADAP-defizienten Thrombozyten die Assoziation der Proteine Talin und Kindlin-3 mit der  $\beta$ -Kette des  $\alpha$ IIB $\beta$ 3-Integrins gestört ist. Normalerweise binden diese beiden zytoplasmatischen Regulatorproteine direkt an die  $\beta$ -Kette, induzieren eine Konformationsänderung und führen zu einer vollständigen Aktivierung der Integrine. Es scheint damit offensichtlich, dass dieser letzte Schritt in der Signalkaskade unabhängig vom auslösenden Rezeptor ist und auch an der CLEC-2-vermittelten Aktivierung von Integrin  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 beteiligt ist. Eines der ersten Signalereignisse nach CLEC-2-Aktivierung ist die Aktivierung von Syk, welches wiederum ITAMs phosphoryliert (Séverin et al., 2011). Die folgende Kaskade des Signalwegs beinhaltet verschiedene Adapterproteine wie LAT, SLP-76 und Grb2, die zu einer Aktivierung der Phospholipase  $C\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2), *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) und *mitogen-activated protein* (MAP) führen. Es wurde hier in der Arbeit von Rudolph et al. nachgewiesen, dass eine deutliche Reduktion bei der Aktivierung der Phospholipase  $C\gamma$ 2 und MAP Kinase ERK1/2 stattfindet (Rudolph et al., 2019). Dies zeigt erstmalig die Beteiligung von ADAP bei dem CLEC-2-vermittelten *inside-out* Signalweg, der zur Integrin  $\alpha$ IIB $\beta$ 3-Aktivierung führt.



#### 4.4. Verlauf der EAE bei der konditionalen ADAP Knock-out Maus

Die Ergebnisse dieser Arbeiten zeigen, dass der spezifische Verlust von ADAP in den Thrombozyten und deren Vorläuferzellen zu einer leichten Thrombozytopenie in den konditionalen Knock-out Mäusen und zu einer verminderten Konzentration der thrombozytären Granula-Inhaltsstoffe wie PF4 und TGF- $\beta$ 1 führt. Zusätzlich wurde durch den spezifischen Verlust von ADAP die Thrombozytenaktivierung in vitro beeinträchtigt. Um die Auswirkungen der Thrombozytopenie und der gestörten Thrombozytenaktivierung in vivo zu untersuchen, wurde bei den Tieren die EAE induziert. Wie in den Abschnitten 3.8 und 3.9 dargestellt, zeigt sich ein signifikanter Unterschied im Schweregrad zwischen dem konditionalen ADAP Knock-out und der Kontrollgruppe. Dahingehend ist der Schweregrad der EAE bei der konditionalen ADAP Knock-out stärker und es zeigt sich in den histologischen Schnitten eine deutliche Inflammation gegenüber den Kontrolltieren. Die aktive EAE zeigt ebenfalls einen stärkeren Schweregrad der Erkrankung und unterliegt mehr Schwankungen als die passive EAE, die ein konstanteres Niveau hält.

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Annegret Reinhold war der mildere Verlauf der EAE in der konventionellen, kompletten ADAP Knock-out Maus beschrieben worden und hauptsächlich einem T-Zell-unabhängigen Effekt zugeschrieben worden (Engelmann et al., 2013).

Daher ist es überraschend, dass die Thrombozyten-spezifische ADAP Knock-out Maus einen stärkeren Krankheitsverlauf als die Kontrollgruppe aufweist. Die Rolle von Thrombozyten in der EAE wurde ausgiebig untersucht und es zeigten sich unterschiedliche Einflüsse während der Frühphase und der späteren Progression bei dieser neurodegenerativen Erkrankung. Thrombozyten wurden einerseits im ZNS von Mäusen nach der Induktion der EAE gefunden und andererseits auch in Läsionen bei der chronisch-aktiven Multiplen Sklerose beim Menschen (Langer et al., 2012; Starossom et al., 2015). Langer et al. zeigten zusätzlich, dass eine Depletion von Thrombozyten während der Phase der Immunisierung der EAE keinen Effekt auf den Schweregrad hat. Im Gegensatz dazu mildert sowohl die Depletion der Thrombozyten als auch das Blockieren des Thrombozyten-spezifischen Integrins  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 während der Induktionsphase den Schweregrad der EAE ab (Langer et al., 2012). Werden die Thrombozyten noch später im Verlauf der EAE depletiert, nämlich bei dem Höhepunkt der Symptomschwere und später, dann zeigte sich im Verlauf danach keine Milderung der Symptome der EAE (Starossom et al., 2015). Genau der gleiche Krankheitsverlauf wurde beobachtet, wenn das Thrombozyten P-Selectin (CD62P) blockiert wurde. Starossom et al. zeigten, dass durch das Blockieren von CD62P eine Aggregation von Thrombozyten und CD4-

T-Zellen verhindert wird und somit keine Herunterregulation der T-Zellaktivität erfolgt (Starossom et al., 2015). Dieser Umstand könnte auch ein Grund für die stärker ausgeprägte EAE bei der konditionalen ADAP Knock-out Maus sein, da die Expressionsstärke von CD62P auf aktivierten Thrombozyten und die Häufigkeit von CD62P-positiven Thrombozyten in Abwesenheit von ADAP signifikant reduziert ist (Rudolph et al., 2019). Zudem könnte die beobachtete Thrombozytopenie zusammen mit der Verminderung der TGF- $\beta$ 1-Konzentration im Blut bei den Thrombozyten-spezifischen ADAP Knock-out Mäusen dazu beitragen, dass eine schwerere EAE induziert wird. Als mögliche Erklärungen für den Mechanismus könnte eine schwächere T-Zell-Inaktivierung durch weniger direkte Thrombozyten-T-Zell-Interaktionen als auch eine verminderte Funktion von regulatorischen T-Zellen genannt werden. Da die  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten viele immunmodulatorische Komponenten beinhalten, wurde in weiterführenden Experimenten von Rudolph et al. ein besonderes Augenmerk auf die Auswirkungen der Injektion von systemischem TGF- $\beta$ 1 auf den Schweregrad der passiven EAE gelegt. Tatsächlich zeigt sich eine teilweise Verbesserung der Symptome bei der systemischen Gabe von dem immunsuppressiven Zytokin TGF- $\beta$ 1 bei dem konditionalen ADAP Knock-out in Thrombozyten. Diese Verbesserung der Krankheitssymptome konnte allerdings nur bei TGF- $\beta$ 1-Applikation über einen Zeitraum von 7 Tagen nach dem adoptiven Transfer der aktivierten enzephalitogenen T-Zellen beobachtet werden. Eine spätere TGF- $\beta$ 1-Applikation zeigte keinen Effekt mehr (Rudolph et al., 2019). Das Ergebnis spiegelt die gleichen Resultate von vormals veröffentlichten Daten wider, dass *in vivo* die Verabreichung von TGF- $\beta$ 1 die Schwere der EAE reduzieren kann (Johns et al., 1991; Racke MK, 1991).

Weiterhin ist bekannt, dass Podoplanin bei einer Inflammation auf Makrophagen und Th17-Zellen hochreguliert wird (Kerrigan et al., 2012; Peters et al., 2011) und so eine direkte Interaktion mit dem Thrombozytenrezeptor CLEC-2 ermöglicht. Eine Thrombozyten-spezifische Deletion von CLEC-2 resultiert in einer verstärkten systemischen Entzündungsreaktion im Sepsis-Modell bei Mäusen. Der CLEC-2-Podoplanin-Signalweg scheint somit eine Rolle in der Anti-Inflammation zu spielen, die die Schwere der Sepsis in den Mäusen begrenzt (Rayes et al., 2017).

Die *in vitro* Experimente dieser Arbeit haben eine Beteiligung von ADAP an der CLEC-2-vermittelten Thrombozytenaktivierung zeigen können. Fehlt ADAP spezifisch in den Thrombozyten, ist die allgemeine Tyrosinphosphorylierung nach Stimulation mit Podoplanin vermindert. Diese reduzierte Thrombozytenaktivierung könnte dann in der Folge zu einer gestörten immunsuppressiven anti-inflammatorischen Wirkung der CLEC-2-vermittelten Signalübertragung in Thrombozyten führen. Im Tiermodell der EAE manifestiert sich diese

fehlende Immunsuppression bei den Thrombozyten-spezifischen ADAP-defizienten Mäusen  
dann als erhöhter Schweregrad der Erkrankung.

## 5. Zusammenfassung

Das *adhesion and degranulation-promoting adaptor protein* (ADAP) gehört zu den zytosolischen Adapterproteinen. ADAP wird in den Immunzellen der hämatopoetischen Linie wie T-Zellen, Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen), myeloischen Zellen und Thrombozyten exprimiert, während es in reifen B-Zellen nicht vorkommt. ADAP spielt eine wichtige Rolle bei der Integrinaktivierung und Adhäsion der Zellen. Voruntersuchungen ergaben, dass komplette ADAP-Knock-out-Mäuse einen deutlich verminderten Schweregrad der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) aufweisen. Der komplette ADAP-Knock-out lässt jedoch keine Unterscheidung zu, welche ADAP-exprimierenden Immunzellen inwieweit an dem Prozess beteiligt sind und somit den Schweregrad der EAE mitbestimmen. Durch die Etablierung von speziellen konditionalen Knock-outs für einzelne Zelllinien kann differenzierter untersucht werden, welchen Einfluss ADAP in den verschiedenen Immunzellen auf die Pathogenese der Autoimmunerkrankung EAE hat und inwieweit ADAP für deren Funktionalität mit verantwortlich ist.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Charakterisierung des Immunsystems einer konditionalen Knock-out Maus mit dem spezifischen Verlust von ADAP in den Thrombozyten (ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup>). Als Zielstellung wurden dabei drei Teilaspekte untersucht:

- Immunologische Charakterisierung der konditionalen ADAP-Knock-out Maus,
- Analyse der Thrombozytenfunktion der konditionalen ADAP-Knock-out Maus,
- Untersuchungen zum Verlauf der EAE der konditionalen ADAP-Knock-out Maus.

Im Ergebnis der immunologischen Charakterisierung zeigte sich eine deutliche Verringerung der Thrombozytenzahl im peripheren Blut der konditionalen ADAP Knock-out Maus und der kompletten ADAP-Knock-out Maus gegenüber den Kontrolltieren. Auf die Reifung und Verteilung der Immunzellen im Thymus, der Medulla ossium flava, der Splen und im peripheren Blut hatte der spezifische Verlust von ADAP in Thrombozyten keinen Einfluss.

Die Funktionsweise der Thrombozyten wurde nach Stimulation mit Thrombin und Podoplanin, dem Liganden des CLEC-2-Rezeptors im Westernblot untersucht. In beiden Versuchsansätzen wurde bei den Thrombozyten der konditionalen Knock-out Maus ADAP<sup>fl/fl</sup> PF4-Cre<sup>tg</sup> im Vergleich zu den Kontrollmäusen eine verringerte allgemeine Aktivierbarkeit der Thrombozyten beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen eine Beteiligung von ADAP an der Aktivierung der Thrombozyten.

Die EAE wurde sowohl durch aktive Immunisierung mit dem MOG<sub>35-55</sub>-Peptid unter Verwendung von Adjuvanz induziert als auch passiv durch Übertragung MOG-spezifischer

aktivierter T-Zellen. Dabei zeigte sich bei den Mäusen mit spezifischer Deletion von ADAP in den Thrombozyten ein verstärktes Krankheitsbild der EAE. Dieser klinische Befund war als Inflamationsreaktion im histologischen Korrelat mit den vermehrten Lymphozyten ebenfalls deutlich sichtbar. Demnach ist anzunehmen, dass durch die Thrombozytenfehlfunktion bei Abwesenheit von ADAP die anti-inflammatorische Wirkung vermindert ist und die Krankheitsschwere zunimmt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit tragen zur Aufklärung der Rolle des Adapterproteins ADAP in Thrombozyten bei der Immunpathogenese der EAE bei. Das Verständnis der molekularen Mechanismen von neuroinflammatorischen Erkrankungen stellt einen wichtigen Beitrag der Grundlagenforschung für die Entwicklung neuer Therapieoptionen dar.

## Literaturverzeichnis

1. Abram, C. L., Roberge, G. L., Hu, Y., & Lowell, C. A. (2014). Comparative analysis of the efficiency and specificity of myeloid-Cre deleting strains using ROSA-EYFP reporter mice. *Journal of Immunological Methods*, 408. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.05.009>
2. Abtahian, F., Guerriero, A., Sebzda, E., Lu, M. M., Zhou, R., Mocsai, A., Myers, E. E., Huang, B., Jackson, D. G., Ferrari, V. A., Tybulewicz, V., Lowell, C. A., Lepore, J. J., Koretzky, G. A., & Kahn, M. L. (2003). Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk. *Science*, 299(5604). <https://doi.org/10.1126/science.1079477>
3. Alenghat, F. J., Baca, Q. J., Rubin, N. T., Pao, L. I., Matozaki, T., Lowell, C. A., Golan, D. E., Neel, B. G., & Swanson, K. D. (2012). Macrophages require Skap2 and Sirp $\alpha$  for integrin-stimulated cytoskeletal rearrangement. *Journal of Cell Science*, 125(22). <https://doi.org/10.1242/jcs.111260>
4. Batoulis, H., Addicks, K., & Kuerten, S. (2010). Emerging concepts in autoimmune encephalomyelitis beyond the CD4/TH1 paradigm. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 192(4). <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2010.06.006>
5. Bertozzi, C. C., Schmaier, A. A., Mericko, P., Hess, P. R., Zou, Z., Chen, M., Chen, C. Y., Xu, B., Lu, M. M., Zhou, D., Sebzda, E., Santore, M. T., Merianos, D. J., Stadtfeld, M., Flake, A. W., Graf, T., Skoda, R., Maltzman, J. S., Koretzky, G. A., & Kahn, M. L. (2010). Platelets regulate lymphatic vascular development through CLEC-2-SLP-76 signaling. *Blood*, 116(4). <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-270876>
6. Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L., & Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441(7090). <https://doi.org/10.1038/nature04753>
7. Bettelli, E., Pagany, M., Weiner, H. L., Linington, C., Sobel, R. A., & Kuchroo, V. K. (2003). Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *Journal of Experimental Medicine*, 197(9). <https://doi.org/10.1084/jem.20021603>
8. Block, H., Herter, J. M., Rossaint, J., Stadtmann, A., Kliche, S., Lowell, C. A., & Zarbock, A. (2012). Crucial role of SLP-76 and ADAP for neutrophil recruitment in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. *Journal of Experimental Medicine*, 209(2). <https://doi.org/10.1084/jem.20111493>
9. Böning, M. A. L., Trittel, S., Riese, P., van Ham, M., Heyner, M., Voss, M., Parzmair, G. P., Klawonn, F., Jeron, A., Guzman, C. A., Jänsch, L., Schraven, B., Reinhold, A., & Bruder, D. (2020). ADAP Promotes Degranulation and Migration of NK Cells Primed During in vivo *Listeria monocytogenes* Infection in Mice. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03144>
10. Calaminus, S. D. J., Guitart, A., Sinclair, A., Schachtner, H., Watson, S. P., Holyoake, T. L., Kranc, K. R., & Machesky, L. M. (2012). Lineage Tracing of Pf4-Cre Marks Hematopoietic Stem Cells and Their Progeny. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051361>
11. Coppelino, M. G., Krause, M., Hagendorff, P., Monner, D. A., Trimble, W., Grinstein, S., Wehland, J., & Sechi, A. S. (2001). Evidence for a molecular complex consisting of Fyb/SLAP, SLP-76, Nck, VASP and WASP that links the actin cytoskeleton to Fc $\gamma$  receptor signalling during phagocytosis. *Journal of Cell Science*, 114(23). <https://doi.org/10.1242/jcs.114.23.4307>

12. da Silva, A. J., Li, Z., de Vera, C., Canto, E., Findell, P., & Rudd, C. E. (1997). Cloning of a novel T-cell protein FYB that binds FYN and SH2-domain-containing leukocyte protein 76 and modulates interleukin 2 production. In *Immunology* (Vol. 94). [www.pnas.org](http://www.pnas.org).
13. da Silva, A. J., Yamamoto, M., Zalvan, C. H., & Rudd, C. E. (1992). Engagement of the TcR/CD3 complex stimulates p59fyn(T) activity: Detection of associated proteins at 72 and 120-130 kD. *Molecular Immunology*, 29(12). [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(92\)90215-J](https://doi.org/10.1016/0161-5890(92)90215-J)
14. Dlugniewska, J., Zou, L., Harmon, I. R., Ellingson, M. T., & Peterson, E. J. (2007). Immature hematopoietic cells display selective requirements for adhesion- and degranulation-promoting adaptor protein in development and homeostasis. *European Journal of Immunology*, 37(11), 3208–3219. <https://doi.org/10.1002/eji.200737094>
15. Eble, J. A., Po, S., Inoue, O., Gartner, T. K., Hugan, S. C., Pearce, A. C., Laing, G. D., Theakston, R. D. G., Schweighoffer, E., Zitzmann, N., Morita, T., Tybulewicz, V. L. J., Ozaki, Y., Watson, S. P., Suzuki-Inoue, K., Fuller, G. L., Garcia, A., & Pohlmann, S. (2006). A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2. *Blood*, 107(2).
16. Engelmann, S., Togni, M., Kliche, S., Reinhold, D., Schraven, B., & Reinhold, A. (2015). The adhesion- and degranulation-promoting adaptor protein and its role in the modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Critical Reviews in Immunology*, 35(1). <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2014012162>
17. Engelmann, S., Togni, M., Thielitz, A., Reichardt, P., Kliche, S., Reinhold, D., Schraven, B., & Reinhold, A. (2013). T Cell–Independent Modulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in ADAP-Deficient Mice. *The Journal of Immunology*, 191(10). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203340>
18. Estevez, B., & Du, X. (2017). New concepts and mechanisms of platelet activation signaling. In *Physiology* (Vol. 32, Issue 2). <https://doi.org/10.1152/physiol.00020.2016>
19. Fiege, J. K., Beura, L. K., Burbach, B. J., & Shimizu, Y. (2016). Adhesion- and Degranulation-Promoting Adapter Protein Promotes CD8 T Cell Differentiation and Resident Memory Formation and Function during an Acute Infection. *The Journal of Immunology*, 197(6). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501805>
20. Fiege, J. K., Burbach, B. J., & Shimizu, Y. (2015). Negative Regulation of Memory Phenotype CD8 T Cell Conversion by Adhesion and Degranulation–Promoting Adapter Protein. *The Journal of Immunology*, 195(7). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402670>
21. Fleming, K. K., Bovaird, J. A., Mosier, M. C., Emerson, M. R., LeVine, S. M., & Marquis, J. G. (2005). Statistical analysis of data from studies on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, 170(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.08.020>
22. Fostel, L. v., Dlugniewska, J., Shimizu, Y., Burbach, B. J., & Peterson, E. J. (2006). ADAP is dispensable for NK cell development and function. *International Immunology*, 18(8). <https://doi.org/10.1093/intimm/dxl063>
23. Geng, L., Pfister, S., Kraeft, S. K., & Rudd, C. E. (2001). Adaptor FYB (Fyn-binding protein) regulates integrin-mediated adhesion and mediator release: Differential involvement of the FYB SH3 domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20). <https://doi.org/10.1073/pnas.191378198>

24. Geng, L., Raab, M., & Rudd, C. E. (1999). Cutting edge: SLP-76 cooperativity with FYB/FYN-T in the up-regulation of TCR-driven IL-2 transcription requires SLP-76 binding to FYB at Tyr595 and Tyr651. *The Journal of Immunology*, 163(11).
25. Griffiths, E. K., Krawczyk, C., Kong, Y. Y., Raab, M., Hyduk, S. J., Bouchard, D., Chan, V. S., Koziaradzki, I., Oliveira-dos-Santos, A. J., Wakeham, A., Ohashi, P. S., Cybulsky, M. I., Rudd, C. E., & Penninger, J. M. (2001). Positive regulation of T cell activation and integrin adhesion by the adapter Fyb/Slap. *Science*, 293(5538). <https://doi.org/10.1126/science.1063397>
26. Hamamy, H., Makrythanasis, P., Al-Allawi, N., Muhsin, A. A., & Antonarakis, S. E. (2014). Recessive thrombocytopenia likely due to a homozygous pathogenic variant in the FYB gene: Case report. *BMC Medical Genetics*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12881-014-0135-0>
27. Hemmer, B. (2021). *Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen und MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen Entwicklungsstufe: S2k Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. [www.awmf.org](http://www.awmf.org)
28. Herzog, B. H., Fu, J., Wilson, S. J., Hess, P. R., Sen, A., McDaniel, J. M., Pan, Y., Sheng, M., Yago, T., Silasi-Mansat, R., McGee, S., May, F., Nieswandt, B., Morris, A. J., Lupu, F., Coughlin, S. R., McEver, R. P., Chen, H., Kahn, M. L., & Xia, L. (2013). Podoplanin maintains high endothelial venule integrity by interacting with platelet CLEC-2. *Nature*, 502(7469). <https://doi.org/10.1038/nature12501>
29. Heuer, K., Arbuzova, A., Strauss, H., Kofler, M., & Freund, C. (2005). The helically extended SH3 domain of the T cell adaptor protein ADAP is a novel lipid interaction domain. *Journal of Molecular Biology*, 348(4). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.02.069>
30. Heuer, K., Sylvester, M., Kliche, S., Pusch, R., Thiemke, K., Schraven, B., & Freund, C. (2006). Lipid-binding hSH3 Domains in Immune Cell Adapter Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 361(1). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.06.004>
31. Ichise, H., Ichise, T., Ohtani, O., & Yoshida, N. (2009). Phospholipase C $\gamma$ 2 is necessary for separation of blood and lymphatic vasculature in mice. *Development*, 136(2). <https://doi.org/10.1242/dev.025353>
32. Jarvis, G. E., Bihan, D., Hamaia, S., Pugh, N., Ghevaert, C. J. G., Pearce, A. C., Hughes, C. E., Watson, S. P., Ware, J., RUDD, C. E., & FARNDAL, R. W. (2012). A role for adhesion and degranulation-promoting adapter protein in collagen-induced platelet activation mediated via integrin  $\alpha$ 2 $\beta$ 1. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 10(2). <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04567.x>
33. Johns, L. D., Flanders, K. C., Ranges, G. E., & Sriram, S. (1991). Successful treatment of experimental allergic encephalomyelitis with transforming growth factor-beta 1. *J Immunol*, 147(6).
34. Kasirer-Friede, A., Kahn, M. L., & Shattil, S. J. (2007). Platelet integrins and immunoreceptors. In *Immunological Reviews* (Vol. 218, Issue 1). <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00532.x>
35. Kasirer-Friede, A., Kang, J., Kahner, B., Ye, F., Ginsberg, M. H., & Shattil, S. J. (2014). ADAP interactions with talin and kindlin promote platelet integrin  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 activation and stable fibrinogen binding. *Blood*, 123(20). <https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-520627>
36. Kasirer-Friede, A., Ruggeri, Z. M., & Shattil, S. J. (2010). Role for ADAP in shear flow-induced platelet mechanotransduction. *Blood*, 115(11). <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-238238>



37. Kerrigan, A. M., Navarro-Nuñez, L., Pyz, E., Finney, B. A., Willment, J. A., Watson, S. P., & Brown, G. D. (2012). Podoplanin-expressing inflammatory macrophages activate murine platelets via CLEC-2. In *Journal of Thrombosis and Haemostasis* (Vol. 10, Issue 3). <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04614.x>
38. Langer, H. F., Choi, E. Y., Zhou, H., Schleicher, R., Chung, K. J., Tang, Z., Göbel, K., Bdeir, K., Chatzigeorgiou, A., Wong, C., Bhatia, S., Kruhlak, M. J., Rose, J. W., Burns, J. B., Hill, K. E., Qu, H., Zhang, Y., Lehrmann, E., Becker, K. G., Wang, Y., Simon, D.I., Nieswandt, B., Lambris, J. D., Li, X., Meuth, S. G., Kubes, P., Chavakis, T. (2012). Platelets contribute to the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Circulation Research*, *110*(9). <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.256370>
39. Levin, C., Koren, A., Pretorius, E., Rosenberg, N., Shenkman, B., Hauschner, H., Zalman, L., Khayat, M., Salama, I., Elpeleg, O., & Shalev, S. (2015). Deleterious mutation in the FYB gene is associated with congenital autosomal recessive small-platelet thrombocytopenia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *13*(7). <https://doi.org/10.1111/jth.12966>
40. Linker, R. A., Lee, D. H., Ryan, S., van Dam, A. M., Conrad, R., Bista, P., Zeng, W., Hronowsky, X., Buko, A., Chollate, S., Ellrichmann, G., Brück, W., Dawson, K., Goelz, S., Wiese, S., Scannevin, R. H., Lukashev, M., & Gold, R. (2011). Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain*, *134*(3). <https://doi.org/10.1093/brain/awq386>
41. Lowe, K. L., Finney, B. A., Deppermann, C., Hägerling, R., Gazit, S. L., Frampton, J., Buckley, C., Camerer, E., Nieswandt, B., Kiefer, F., & Watson, S. P. (2015). Podoplanin and CLEC-2 drive cerebrovascular patterning and integrity during development. *Blood*, *125*(24). <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-603803>
42. Matloubian, M., Lo, C. G., Cinamon, G., Lesneski, M. J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M. L., Proia, R. L., & Cyster, J. G. (2004). Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*, *427*(6972). <https://doi.org/10.1038/nature02284>
43. May, R. M., Okumura, M., Hsu, C. J., Bassiri, H., Yang, E., Rak, G., Mace, E. M., Philip, N. H., Zhang, W., Baumgart, T., Orange, J. S., Nichols, K. E., & Kambayashi, T. (2013). Murine natural killer immunoreceptors use distinct proximal signaling complexes to direct cell function. *Blood*, *121*(16). <https://doi.org/10.1182/blood-2012-12-474361>
44. Medeiros, R. B., Burbach, B. J., Mueller, K. L., Srivastava, R., Moon, J. J., Highfill, S., Peterson, E. J., & Shimizu, Y. (2007). Regulation of NF- B Activation in T Cells via Association of the Adapter Proteins ADAP and CARMA1. *Science*, *316*(5825). <https://doi.org/10.1126/science.1137895>
45. Miller, S. D., Karpus, W. J., & Davidson, T. S. (2010). Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. In *Current Protocols in Immunology* (Issue SUPPL. 88). <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1501s77>
46. Mueller, K. L., Thomas, M. S., Burbach, B. J., Peterson, E. J., & Shimizu, Y. (2007). Adhesion and Degranulation-Promoting Adapter Protein (ADAP) Positively Regulates T Cell Sensitivity to Antigen and T Cell Survival. *The Journal of Immunology*, *179*(6). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.3559>
47. Musci, M. A., Hendricks-Taylor, L. R., Motto, D. G., Paskind, M., Kamens, J., Turck, C. W., & Koretzky, G. A. (1997). Molecular cloning of SLAP-130, an SLP-76-associated substrate of the T cell antigen receptor-stimulated protein tyrosine kinases. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(18), 11674–11677. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.18.11674>

48. Parguiña, A. F., Alonso, J., Rosa, I., Vélez, P., González-López, M. J., Guitián, E., Ebbble, J. A., Loza, M. I., & García, Á. (2012). A detailed proteomic analysis of rhodocytin-activated platelets reveals novel clues on the CLEC-2 signalosome: Implications for CLEC-2 signaling regulation. *Blood*, *120*(26). <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-456004>
49. Parzmair, G. P., Gereke, M., Haberkorn, O., Annemann, M., Podlasly, L., Kliche, S., Reinhold, A., Schraven, B., & Bruder, D. (2017). ADAP plays a pivotal role in CD4+ T cell activation but is only marginally involved in CD8+ T cell activation, differentiation, and immunity to pathogens. *Journal of Leukocyte Biology*, *101*(2). <https://doi.org/10.1189/jlb.1A0216-090RR>
50. Pauker, M. H., Reicher, B., Fried, S., Perl, O., & Barda-Saad, M. (2011). Functional Cooperation between the Proteins Nck and ADAP Is Fundamental for Actin Reorganization. *Molecular and Cellular Biology*, *31*(13). <https://doi.org/10.1128/mcb.01358-10>
51. Pertuy, F., Aguilar, A., Strassel, C., Eckly, A., Freund, J. N., Duluc, I., Gachet, C., Lanza, F., & Léon, C. (2015). Broader expression of the mouse platelet factor 4-cre transgene beyond the megakaryocyte lineage. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *13*(1). <https://doi.org/10.1111/jth.12784>
52. Peters, A., Pitcher, L. A., Sullivan, J. M., Mitsdoerffer, M., Acton, S. E., Franz, B., Wucherpennig, K., Turley, S., Carroll, M. C., Sobel, R. A., Bettelli, E., & Kuchroo, V. K. (2011). Th17 Cells Induce Ectopic Lymphoid Follicles in Central Nervous System Tissue Inflammation. *Immunity*, *35*(6). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.10.015>
53. Peterson, E. J., Woods, M. L., Dmowski, S. A., Derimanov, G., Jordan, M. S., Wu, J. N., Myung, P. S., Liu, Q.-H., Pribila, J. T., Freedman, B. D., Shimizu, Y., & Koretzky, G. A. (2001). Coupling of the TCR to Integrin Activation by SLAP-130/Fyb. *Science*, *293*(5538), 2263–2265. <https://doi.org/10.1126/science.1063486>
54. Pollitt, A. Y., Grygielska, B., Leblond, B., Désiré, L., Eble, J. A., & Watson, S. P. (2010). Phosphorylation of CLEC-2 is dependent on lipid rafts, actin polymerization, secondary mediators, and Rac. *Blood*, *115*(14). <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-257212>
55. Raab, M., Kang, H., da Silva, A., Zhu, X., & Rudd, C. E. (1999). FYN-T-FYB-SLP-76 interactions define a T-cell receptor ζ/CD3-mediated tyrosine phosphorylation pathway that up-regulates interleukin 2 transcription in T-cells. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(30), 21170–21179. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.30.21170>
56. Racke MK. (1991). Prevention and treatment of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis by transforming growth factor-beta 1. *J Immunol*, *146*(9).
57. Rajasekaran, K., Kumar, P., Schuldt, K. M., Peterson, E. J., Vanhaesebroeck, B., Dixit, V., Thakar, M. S., & Malarkannan, S. (2013). Signaling by Fyn-ADAP via the Carma1-Bcl-10-MAP3K7 signalosome exclusively regulates inflammatory cytokine production in NK cells. *Nature Immunology*, *14*(11). <https://doi.org/10.1038/ni.2708>
58. Rayes, J., Lax, S., Wichaiyo, S., Watson, S. K., Di, Y., Lombard, S., Grygielska, B., Smith, S. W., Skordilis, K., & Watson, S. P. (2017). The podoplanin-CLEC-2 axis inhibits inflammation in sepsis. *Nature Communications*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02402-6>
59. Reinhold, A. (2015). *Untersuchungen zur Funktion der Adapterproteine SKAP-HOM und ADAP in antigenpräsentierenden Zellen der Maus. Magdeburg: Otto-von-Guericke Universität.*

60. Rudolph, J. M., Guttek, K., Weitz, G., Meinke, C. A., Kliche, S., Reinhold, D., Schraven, B., & Reinhold, A. (2019). Characterization of Mice with a Platelet-Specific Deletion of the Adapter Molecule ADAP. *Molecular and Cellular Biology*, 39(9). <https://doi.org/10.1128/mcb.00365-18>
61. Séverin, S., Pollitt, A. Y., Navarro-Nuñez, L., Nash, C. A., Mourão-Sá, D., Eble, J. A., Senis, Y. A., & Watson, S. P. (2011). Syk-dependent phosphorylation of CLEC-2: A novel mechanism of hem-immunoreceptor tyrosine-based activation motif signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 286(6). <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.167502>
62. Skarnes, W. C., Rosen, B., West, A. P., Koutsourakis, M., Bushell, W., Iyer, V., Mujica, A. O., Thomas, M., Harrow, J., Cox, T., Jackson, D., Severin, J., Biggs, P., Fu, J., Nefedov, M., de Jong, P. J., Stewart, A. F., & Bradley, A. (2011). A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature*, 474(7351). <https://doi.org/10.1038/nature10163>
63. Sotnikov, I., Veremeyko, T., Starossom, S. C., Barteneva, N., Weiner, H. L., & Ponomarev, E. D. (2013). Platelets Recognize Brain-Specific Glycolipid Structures, Respond to Neurovascular Damage and Promote Neuroinflammation. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058979>
64. Spindler, M., van Eeuwijk, J. M. M., Schurr, Y., Nurden, P., Nieswandt, B., Stegner, D., Reinhold, A., & Bender, M. (2018). ADAP deficiency impairs megakaryocyte polarization with ectopic proplatelet release and causes microthrombocytopenia. *Blood*, 132(6). <https://doi.org/10.1182/blood-2018-01-829259>
65. Srivastava, R., Burbach, B. J., Mitchell, J. S., Pagán, A. J., & Shimizu, Y. (2012). ADAP Regulates Cell Cycle Progression of T Cells via Control of Cyclin E and Cdk2 Expression through Two Distinct CARMA1-Dependent Signaling Pathways. *Molecular and Cellular Biology*, 32(10). <https://doi.org/10.1128/mcb.06541-11>
66. Starossom, S. C., Veremeyko, T., Dukhinova, M., Yung, A. W. Y., & Ponomarev, E. D. (2014). Glatiramer acetate (Copaxone) modulates platelet activation and inhibits thrombin-induced calcium influx: Possible role of copaxone in targeting platelets during autoimmune neuroinflammation. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096256>
67. Starossom, S. C., Veremeyko, T., Yung, A. W. Y., Dukhinova, M., Au, C., Lau, A. Y., Weiner, H. L., & Ponomarev, E. D. (2015). Platelets play differential role during the initiation and progression of autoimmune neuroinflammation. *Circulation Research*, 117(9). <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306847>
68. Stromnes, I. M., & Goverman, J. M. (2006a). Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature Protocols*, 1(4). <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.285>
69. Stromnes, I. M., & Goverman, J. M. (2006b). Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature Protocols*, 1(4). <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.284>
70. Suzuki-Inoue, K., Kato, Y., Inoue, O., Mika, K. K., Mishima, K., Yatomi, Y., Yamazaki, Y., Narimatsu, H., & Ozaki, Y. (2007). Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282(36). <https://doi.org/10.1074/jbc.M702327200>
71. Tiedt, R., Schomber, T., Hao-Shen, H., & Skoda, R. C. (2007). Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo. *Blood*, 109(4). <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-020362>

72. Togni, M., Engelmann, S., Reinhold, D., Schraven, B., & Reinhold, A. (2012). The adapter protein ADAP is required for selected dendritic cell functions. *Cell Communication and Signaling*, *10*. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-10-14>
73. Veale, M., Raab, M., Li, Z., da Silva, A. J., Kraeft, S. K., Weremowicz, S., Morton, C. C., & Rudd, C. E. (1999). Novel isoform of lymphoid adaptor FYN-T-binding protein (FYB-130) interacts with SLP-76 and up-regulates interleukin 2 production. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(40), 28427–28435. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.40.28427>
74. Warnke, C., Stüve, O., & Kieseier, B. C. (2013). Teriflunomide for the treatment of multiple sclerosis. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, *115*(SUPPL.1). <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2013.09.030>
75. Weinstock-Guttman, B., Nair, K. v., Glajch, J. L., Ganguly, T. C., & Kantor, D. (2017). Two decades of glatiramer acetate: From initial discovery to the current development of generics. In *Journal of the Neurological Sciences* (Vol. 376). <https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.03.030>
76. Wilms, H., Sievers, J., Rickert, U., Rostami-Yazdi, M., Mrowietz, U., & Lucius, R. (2010). Dimethylfumarate inhibits microglial and astrocytic inflammation by suppressing the synthesis of nitric oxide, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 in an in-vitro model of brain inflammation. *Journal of Neuroinflammation*, *7*. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-30>
77. Witte, A., Degen, J., Baumgart, K., Waldt, N., Kuroпка, B., Freund, C., Schraven, B., & Kliche, S. (2013). Emerging Roles of ADAP, SKAP55, and SKAP-HOM for Integrin and NF- $\kappa$ B Signaling in T cells. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, *01*(S12). <https://doi.org/10.4172/2155-9899.S12-002>
78. Wu, J. N., Gheith, S., Bezman, N. A., Liu, Q.-H., Fostel, L. v., Swanson, A. M., Freedman, B. D., Koretzky, G. A., & Peterson, E. J. (2006). Adhesion- and Degranulation-Promoting Adapter Protein Is Required for Efficient Thymocyte Development and Selection. *The Journal of Immunology*, *176*(11). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.11.6681>
79. Wu, J. N., & Koretzky, G. A. (2004). The SLP-76 family of adapter proteins. *Seminars in Immunology*, *16*(6). <https://doi.org/10.1016/j.smim.2004.08.018>
80. Yang, K., Vega, J. L., Hadzipasic, M., Schatzmann Peron, J. P., Zhu, B., Carrier, Y., Masli, S., Rizzo, L. V., & Weiner, H. L. (2009). Deficiency of thrombospondin-1 reduces Th17 differentiation and attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Autoimmunity*, *32*(2). <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2008.12.004>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Dargestellt ist das Adapterprotein ADAP	2
Abbildung 2	Dargestellt ist die primäre Hämostase	8
Abbildung 3	Schematische Darstellung der Generierung der konditionalen Knock-out-Mäuse mit ausschließlicher Deletion des ADAP-Gens in der Megakaryozytenlinie	18
Abbildung 4	Dargestellt ist die Gatingstrategie zur Ermittlung der Absolutzellzahlen der Thrombozyten	29
Abbildung 5	Dargestellt ist die Induktion der passiven EAE	38
Abbildung 6	Dargestellt ist die Induktion der aktiven EAE	38
Abbildung 7	Bestimmung des Genotyps der transgenen Mäuse mittels PCR	41
Abbildung 8	Dargestellt sind die verschiedenen Immunzellen im Blut in den drei Mauslinien ADAP <sup>wt/wt</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup> , ADAP <sup>fl/fl</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup> ADAP <sup>fl/fl</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup> und dem kompletten ADAP KO	42
Abbildung 9	Dargestellt ist die Zellzahl der Thrombozyten und die Konzentration des Thrombozyten-spezifischen Zytokins PF4 in allen drei Mauslinien ADAP KO, ADAP <sup>wt/wt</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup> und ADAP <sup>fl/fl</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup>	44
Abbildung 10	Dargestellt sind die Reifungsstufen der Thymozyten in den drei Mauslinien ADAP <sup>wt/wt</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup> , ADAP <sup>fl/fl</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup> und ADAP KO	45
Abbildung 11	Dargestellt ist die Anzahl und die Verteilung der Thymozyten in den drei Mauslinien ADAP <sup>wt/wt</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup> , ADAP <sup>fl/fl</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup> und ADAP KO	46
Abbildung 12	Dargestellt ist die Absolutzellzahl von Knochenmarkszellen in den drei Mauslinien ADAP <sup>wt/wt</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup> , ADAP <sup>fl/fl</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup> und ADAP KO	47
Abbildung 13	Dargestellt ist die B-Zellreifung im Knochenmark in den drei Mauslinien ADAP <sup>wt/wt</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup> , ADAP <sup>fl/fl</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup> und ADAP KO	48
Abbildung 14	Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen und die und relativen Anteile der Splenozyten-Subpopulationen in den drei Mauslinien ADAP <sup>wt/wt</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup> , ADAP <sup>fl/fl</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup> und ADAP KO	49
Abbildung 15	Dargestellt ist die Verteilung der zytotoxischen T-Zellen in der Milz in den drei Mauslinien ADAP <sup>wt/wt</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup> , ADAP <sup>fl/fl</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup> und ADAP KO	50

Abbildung 16	Dargestellt ist die Verteilung der zytotoxischen T-Zellen im Blut in den drei Mauslinien ADAP <sup>wt/wt</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup> , ADAP <sup>fl/fl</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup> und ADAP KO	52
Abbildung 17	Dargestellt ist die relative Verteilung der T-, NK- und B-Zellpopulationen im Blut in den drei Mauslinien ADAP <sup>wt/wt</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup> , ADAP <sup>fl/fl</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup> und ADAP KO	53
Abbildung 18	Dargestellt ist die Kinetik der Thrombozytenstimulation mit Thrombin in den beiden Mauslinien ADAP <sup>wt/wt</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup> und ADAP <sup>fl/fl</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup>	56
Abbildung 19	Dargestellt ist die Kinetik der Thrombozytenstimulation mit Podoplanin in den beiden Mauslinien ADAP <sup>wt/wt</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup> und ADAP <sup>fl/fl</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup>	57
Abbildung 20	Dargestellt ist der Verlauf der aktiven EAE bei den beiden Mauslinien ADAP <sup>wt/wt</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup> und ADAP <sup>fl/fl</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup>	59
Abbildung 21	Dargestellt ist der Verlauf der passiven EAE bei den beiden Mauslinien ADAP <sup>wt/wt</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup> und ADAP <sup>fl/fl</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup>	60
Abbildung 22	Dargestellt ist ein histologisches Präparat der Medulla spinalis der beiden Mauslinien ADAP <sup>wt/wt</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup> und ADAP <sup>fl/fl</sup> PF4-Cre <sup>tg</sup> nach Induktion der passiven EAE.	61

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Zusammensetzung des Mastermixes für LAR3-, conADAP-, Flp- und PF4-iCre-PCR für 20 µl	20
Tabelle 2	Temperaturprofil der LAR3-, conADAP-, Flp- und PF4-iCre-PCR mit dem Thermocycler T3000 von Biometra®	20
Tabelle 3	PCR-Primer für die Genotypisierung	21
Tabelle 4	Master-Mix der verwendeten Antikörper	25
Tabelle 5	Verwendete Antikörper	26
Tabelle 6	Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE	31
Tabelle 7	Für den Westernblot verwendete Antikörper	34
Tabelle 8	Einteilung der klinischen Symptome der EAE	37

## Publikationen

1. Rudolph JM, Guttek K, Weitz G, **Meinke CA**, Kliche S, Reinhold D, Schraven B, Reinhold A. Characterization of Mice with a Platelet-Specific Deletion of the Adapter Molecule ADAP. *Molecular and Cellular Biology*. 2019 Apr 16;39(9). doi:10.1128/MCB.00365-18. PMID: 30833485; PMCID: PMC6469923.
2. Rudolph J, **Meinke C**, Voss M, Guttek K, Kliche S, Reinhold D, Schraven B, Reinhold A. Immune Cell-Type Specific Ablation of Adapter Protein ADAP Differentially Modulates EAE. *Frontiers in Immunology*. 2019 Oct 1;10:2343. doi:10.3389/fimmu.2019.02343. PMID: 31632410; PMCID: PMC6779796.



## **Danksagung**

Rückblickend war die Erstellung dieser Dissertation eine lange Reise, die ich nicht mehr missen möchte. In dieser langen Zeit habe ich viele neue Menschen kennen gelernt, die mir sehr ans Herz gewachsen sind und ohne diese die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Daher möchte ich hier allen denen die verdiente Dankbarkeit und Anerkennung entgegenbringen.

Den größten Dank gilt meiner Doktormutter Frau PD Dr. rer. nat. Annegret Reinhold. Von den kleinen Arbeiten wie Formatierungshilfen von Planung und Durchführung von Experimenten über die Handhabung des FACS-Geräts oder des Statistikprogramms sowie das wissenschaftliche Schreiben war sie stets ein zuverlässiger Ansprechpartner. Für meine Vorschläge und Anregungen hatte sie immer ein offenes Ohr. Vorallem bin ich für jeden kleinen und großen Stupser dankbar, der mich wieder zum Arbeiten gebracht hat und das geduldige Beistehen in den Tiefphasen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Dirk Reinhold möchte ich herzlich danken, da sein Seminar in meinem Studium mich dazu angeregt hat in der Immunologie zu promovieren. Zudem hat er maßgeblich dazu beigetragen den Kontakt zu Frau Dr. Reinhold herzustellen. Auch fachlich war er allzeit eine Stütze.

Herrn Prof. Dr. med. Burkhard Schraven möchte ich danken, dass ich die Möglichkeit bekommen habe am Institut für Molekulare und Klinische Immunologie zu promovieren. Ich fühlte mich sehr gut aufgehoben in der Zeit als ich dort am Institut gearbeitet habe. Dies gilt auch den hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern aus anderen Arbeitsgruppen, die mir immer wohlgesonnen waren.

Aus der Arbeitsgruppe von Annegret Reinhold möchte ich besonders Frau Gabriele Weitz danken. Unsere enge Zusammenarbeit und jede kleine oder auch große Ermahnung und Ermutigung haben mir sehr geholfen. Bei ihr habe ich insbesondere das methodische Arbeiten gelernt, was die Grundlage für diese Arbeit war. Zudem möchte ich auch Herrn Dr. rer. nat. Jochen Rudolph danken, der mir als Postdoc zur Seite stand und mich bei weiteren Experimenten unterstützt hat.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. med. univ. Dr. sc. nat. Johannes Häyback danken, der in Kooperation die histologischen Bilder beigesteuert hat. In diesen Zusammenhängen möchte ich auch Frau Kirsten Hermanns danken. Die Einführung in Anfertigungen eines histologischen Präparates werde ich nie vergessen, so wie unsere vielen Gespräche.

Für die tierexperimentelle Unterstützung möchte ich besonders Karina Guttek danken, bei der ich den Umgang mit den Mäusen lernte. Ihre Sicherheit und Präzision bei der Arbeit mit den Tieren habe ich zum Vorbild genommen. Ihr heiteres Wesen war eine immerwährende Bereicherung.

Für die Unterstützung beim Westernblot möchte ich Frau Dr. rer. nat. Stephanie Kliche danken, die viele Anregungen und Hilfestellung gegeben hat.

Für das Gegenlesen meiner Arbeit möchte ich meiner Schulfreundin Frau Sonja Meier danken, die auch als Fachfremde akribisch meine Arbeit untersucht und mir Unstimmigkeiten aufgezeigt hat.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mich sowohl bei meinem Studium unterstützt habe als auch mir ermöglicht haben, diese Arbeit anzugehen und mich weiter ermuntert haben diese fertigzustellen. Auch meinen Freunden möchte ich danken, die mir in schweren Zeiten ein Ohr geliehen und mich wieder aufgebaut haben.

## **Ehrenerklärung**

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Charakterisierung einer Maus mit spezifischer Deletion des Adapterproteins ADAP in Thrombozyten

im Institut für Molekulare und Klinische Immunologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

mit Unterstützung durch Frau PD Dr. rer. nat. Annegret Reinhold

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 31.01.2022

Unterschrift

## Darstellung des Bildungsweges

Name: Meinke

Vorname: Clara

Geburtsdatum: 22. August 1988

Geburtsort: Berlin

Schulische Laufbahn: Evangelische Schule Steglitz (1994-2001)  
Freiherr-vom-Stein-Gymnasium (2001- 2008)

Schulabschluss: Abitur 2008

Praktika: Pflegepraktikum in der Havellandklinik Nauen  
(August bis September 2008)

Pflegepraktikum im Deutschen Roten Kreuz  
Klinikum Berlin Westend (Juli bis September  
2013)

Famulatur im Harzkllinikum Dorothea Christiane  
Erxleben in der Allgemeinpsychiatrie (2 Wochen  
im Februar 2015)

Famulatur im Klinikum Magdeburg in der Kinder-  
und Jugendpsychiatrie (4 Wochen im August und  
September 2015)

Famulatur in der Kinderarztpraxis Dr. Lindner für  
Kinderheilkunde (4 Wochen im Februar und März  
2016)

Forschungsaustausch in Leuven, Belgien (4  
Wochen im August und September 2016)

Famulatur im Helios Klinikum Schwerin in der  
Neurochirurgie (2 Wochen im September 2016)

Beginn einer experimentellen Doktorarbeit am  
Institut für Molekularen und Klinischen  
Immunologie (Oktober 2016 bis September 2017)

Praktisches Jahr: Innere Medizin an dem Harzkllinikum Dorothea  
Christiane Erxleben (November 2018 bis März  
2019)

Psychiatrie an dem Agaplesion Diakonieklinikum  
Rotenburg (Wümme) (März 2019 bis Juni 2019)

Chirurgie an dem evangelischen  
Waldkrankenhaus Berlin-Spandau (Juli 2019 bis  
September 2019)

Bisheriger Studienverlauf:

Bachelor Biologie an der Friedrich-Schiller-  
Universität in Jena (WS 2008 bis SS 2009)

Zahnmedizin an der Medizinischen Hochschule  
Hannover (WS 2009 bis WS 2011)

Humanmedizin an der Georg-August- Universität  
Göttingen (WS 2012 bis SS 2014)

Humanmedizin an der Otto-von-Guericke-  
Universität Magdeburg (WS 2014 bis WS 2019)

Studienabschluss:

Humanmedizin an der Otto-von-Guericke-  
Universität Magdeburg November 2019

Promotionsstudium:

Doktorarbeit im Institut für Molekulare und  
Klinische Immunologie an der Otto-von-  
Guericke-Universität Magdeburg (WS 2019 bis SS  
2020)

Berufliche Tätigkeit:

Assistenzärztin für Kardiologie am Klinikum  
Magdeburg in Olvenstedt (Ende Oktober bis  
Dezember 2020)

Assistenzärztin für Psychiatrie und Psychotherapie  
an dem Universitätsklinikum Magdeburg (Februar  
2021 bis jetzt)