

**Analyse des Wirkmechanismus von Kortikosteroiden
bei der Therapie der
Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis,
einem Tiermodell für Multiple Sklerose**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität
Würzburg

vorgelegt von
Simone Wüst

aus
Aschaffenburg

Göttingen, 2008

Eingereicht am:

Mitglied der Promotionskommission

Vorsitzender:

1. Gutachter:

Professor Dr. Ralf Gold

2. Gutachter:

Professor Dr. Erich Buchner

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Ich habe in keinem früheren Verfahren einen akademischen Grad erworben oder zu erwerben versucht.

Göttingen, den _____

Simone Wüst

Meiner Mutter

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	6
1.1 Multiple Sklerose - Pathogenese und Therapie	6
1.2 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis - Das Tiermodell der Multiplen Sklerose	8
1.3 Glukokortikoide	10
1.3.1 Struktur-Wirkungs-Beziehungen	10
1.3.2 Molekulare Wirkmechanismen der Glukokortikoide	12
1.3.3 Glukokortikoide in der MS und der EAE.....	13
1.4 Apoptose.....	15
1.5 Adhäsionsmoleküle	17
1.6 Compound A – Glukokortikoid Rezeptor Modulator	18
1.7 Zielsetzung.....	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Geräte.....	20
2.2 Antikörper.....	20
2.3 Arzneimittel	20
2.4 Chemikalien	21
2.5 Medien	22
2.6 Reagenslösungen	22
2.7 Pufferlösungen.....	23
2.8 Tiere.....	24
2.8.1 Generierung und Zucht.....	24
2.8.2 Induktion der EAE	25
2.8.3 Präventive und therapeutische Behandlung	25
2.9 Histologie und Immunhistochemie.....	26
2.9.1 Perfusion, Gewebefixierung und Paraffin-Konservierung.....	26
2.9.2 Immunhistochemische Färbungen.....	27
2.9.3 Quantifizierung immunhistochemischer Färbungen	28
2.10 Zellbiologische Methoden.....	29
2.10.1 Herstellen von Einzelzellsuspensionen aus sekundären Lymphorganen ...	29
2.10.2 Bestimmung der Zellzahl	29
2.10.3 Isolierung von Lymphozyten aus dem Rückenmark.....	29

2.10.4 Isolierung und adoptiver Transfer markierter, enzephalitogener T-Zellen ..	30
2.10.5 Zellkultur.....	30
2.10.6 Durchflusszytometrie	31
2.10.7 Proliferationsassay	33
2.10.8 Zytokinbestimmung mittels ELISA	34
2.11 Molekularbiologische Methoden	35
2.11.1 DNS-Isolierung aus Gewebeproben	35
2.11.2 Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion.....	36
2.12 Spektrometrische und spektroskopische Analysemethoden	38
2.12.1 Massenspektrometrie (LC/MS)	38
2.12.2 Kernspinresonanzspektroskopie (¹ H-NMR-Spektroskopie)	38
2.13 Statistik	39
3 Ergebnisteil - Glukokortikoide	40
3.1 Dexamethason verbessert den Krankheitsverlauf der MOG-induzierten EAE in Mäusen	40
3.2 Glukokortikoide reduzieren die Leukozyteninfiltration in das ZNS und wirken protektiv auf die Blut-Hirn-Schranke	41
3.3 Vermittlung therapeutischer Effekte über zytosolischen Glukokortikoid-Rezeptor.	43
3.4 Die Vermittlung therapeutischer Effekte ist in hämatopoetischen Zellen abhängig von der Anwesenheit des Glukokortikoid-Rezeptors.....	45
3.5 Der Effekt von Glukokortikoiden ist abhängig von der Glukokortikoid-Rezeptor-Expression in T-Lymphozyten	47
3.6 Glukokortikoide induzieren T-Zell-Apoptose in sekundären Lymphorganen	49
3.7 Regulatorische T-Zellen tragen nicht zur antiinflammatorischen Wirkung von Glukokortikoiden bei.....	51
3.8 Glukokortikoide reduzieren die Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf T-Zellen	52
3.9 Dexamethason beeinflusst die T-Zell-Migration in das Zentralnervensystem.....	53
3.10 Therapeutisch appliziertes Methylprednisolon vermindert dosisabhängig die Krankheitsschwere in der MOG-induzierten EAE	54
3.11 Reduzierte Leukozyteninfiltration in das ZNS nach therapeutischer Gabe von Methylprednisolon	55
3.12 Die Präventivgabe von Methylprednisolon verschlechtert den EAE-Verlauf.....	56

3.13 Die Präventivgabe von Methylprednisolon und Dexamethason führt zu unterschiedlichen peripheren Effekten.....	56
3.14 Präventives Methylprednisolon führt in der MOG-EAE zu einer verstärkten T-Zell-Proliferation.....	58
4 Glukokortikoid-Rezeptor Modulator - Compound A	59
4.1 Compound A zeigt <i>in vivo</i> dosisabhängige Wirkungen sowie Nebenwirkungen....	60
4.2 In Phosphat-Puffer gelöstes Compound A verschlechtert die MOG-EAE	62
4.3 Compound A induziert <i>in vitro</i> Apoptose in doppelpositiven Thymozyten und peripheren T-Zellen	62
4.4 Compound A induziert <i>in vitro</i> GR-unabhängig Apoptose in doppelpositiven Thymozyten und peripheren T-Zellen.....	64
4.5 Compound A induziert <i>in vitro</i> Apoptose in SH-Sy5y- und HEK-Zellen.....	65
4.6 Kein verbesserter EAE-Verlauf in GR ^{LckCre} Mäusen nach Compound A-Therapie.	66
4.7 Physikochemische Untersuchungen von Compound A	67
4.7.1 Massenspektrometrische Analysen von Compound A.....	67
4.7.2 ¹ H-NMR-Spektroskopische Analysen von Compound A	68
4.8 Das $\beta_{1/2}$ -Sympathomimetikum Isoproterenol verbessert den EAE-Verlauf	70
4.9 $\beta_{1/2}$ -Sympathomimetika verbessern den EAE-Verlauf durch reduzierte T-Zellinfiltration und MHC-II-Expression	72
5 Diskussion	74
5.1 Glukokortikoide	74
5.1.1 Dexamethason vermittelt in der EAE dosisabhängige, antiinflammatorische Wirkungen über den zytosolischen Glukokortikoid-Rezeptor in T-Lymphozyten	74
5.1.2 Apoptose-Induktion in peripheren T-Zellen und Herabregulierung von Adhäsionsmolekülen auf peripheren T-Zellen führen zur Verbesserung der EAE	79
5.1.3 Therapeutisch appliziertes Methylprednisolon verbessert dosisabhängig die MOG-EAE und vermindert die Lymphozyten-Infiltration in das ZNS	83
5.1.4 Präventives Methylprednisolon beeinflusst periphere, hämatopoetische Immunzellen und führt in der MOG-EAE durch eine gesteigerte T-Zellproliferation zu einem verstärkten Krankheitsverlauf	85

5.2 Compound A.....	87
5.2.1 Compound A vermittelt in der chronischen MOG-EAE therapeutische Effekte	87
5.2.2 Compound A induziert GR-unabhängige Apoptose in primären Immunzellen und nicht-hämatopoetischen Zelllinien.....	90
5.2.3 Compound A vermittelt <i>in vivo</i> therapeutische Wirkungen über den zytosolischen Glukokortikoid-Rezeptor in T-Zellen	93
5.2.4 Compound A metabolisiert <i>in vitro</i> zu einem Aziridin, welches toxische Nebenwirkungen verursacht	94
5.2.5 Isoproterenol verbessert als sympathomimetisch wirksame Substanz MOG- induzierte EAE.....	96
5.2.6 Einflussfaktoren und Effekte der Compound A-Therapie	99
6 Zusammenfassung	101
7 Summary	103
8 Literaturverzeichnis	105
9 Danksagung	113
10 Lebenslauf	114

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> (engl.)
BHS	Blut-Hirn-Schranke
Bim	<i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i> (engl.)
BSA	Bovines Serumalbumin
CFA	Komplettes Freundsches Adjuvant
cGR	Zytosolischer Glukokortikoid-Rezeptor
CpdA	<i>Compound A</i> (engl.)
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
DAB	3,3-Diaminobenzidin
Dex	Dexamethason
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter
FCS	Fötale Kälberserum
GC	Glukokortikoid
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
GRE	<i>Glucocorticoid responsive element</i> (engl.)
Hsp	Hitzeschock-Protein
IFN γ	Interferon gamma
LFA-1	<i>Lymphocyte Functional Antigen-1</i> (engl.)
MOG	Myelinoligodendrozytenglykoprotein
MP	Methylprednisolon
MS	Multiple Sklerose
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
POD	Peroxidase
Puma	<i>p53-up regulated modulator of apoptosis</i> (engl.)
RT	Raumtemperatur
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VLA-4	<i>Very late antigen-4</i> (engl.)
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose - Pathogenese und Therapie

Multiple Sklerose (MS) wurde im Jahre 1868 von Jean Martin Charcot zum ersten Mal umfassend beschrieben. Dabei konnte er eine Akkumulation von Entzündungszellen in perivaskulären Bereichen der weißen Substanz im Gehirn und Rückenmark von Patienten mit neurologischen Ausfallerscheinungen feststellen. Diese Beobachtung führte zur Bezeichnung *sclérose en plaques disseminées* oder MS (Charcot, 1868).

In den letzten Jahrzehnten entwickelte sich die Hypothese, dass MS eine Autoimmunerkrankung ist, die sich gegen Strukturen des Zentralnervensystems (ZNS) richtet. Diese Hypothese wird durch das Vorkommen von Immunzellen und oligoklonalen Banden im ZNS und Liquor von MS-Patienten gestützt und durch die Tatsache, dass MS-Patienten teilweise auf die Behandlung mit immunsuppressiven beziehungsweise immunmodulatorischen Substanzen ansprechen (Pender und Wolfe, 2002). Ein weiterer Punkt, der für eine Immunpathogenese der MS spricht, ist die Morphologie der Läsionen. Diese sind unter anderem durch perivaskuläre Infiltrationen oligoklonaler T-Zellen, Monozyten und B-Zellen charakterisiert (Hafler *et al.*, 2005). Ferner wurde festgestellt, dass MS-Patienten auffällig häufig die beiden Allele HLA-DR*1501 und HLA-DQ*0601 des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) tragen, der vor allem für die Bindung von Peptidfragmenten und deren T-Zell-Präsentation verantwortlich ist. Das Vorhandensein dieser Allele wurde mit der Suszeptibilität an MS zu erkranken in Zusammenhang gebracht (Olerup und Hillert, 1991).

Es wird vermutet, dass bei der MS autoreaktive CD4⁺ T-Zellen (T_H1- und T_H17-Zellen) in der Peripherie durch einen (noch ungeklärten) Stimulus aktiviert werden und über die geöffnete Blut-Hirn-Schranke (BHS) in das ZNS migrieren. Dort werden die autoreaktiven T-Lymphozyten durch die Präsentation des Antigen reaktiviert und setzen proinflammatorische Zytokine und Mediatoren frei. Diese aktivieren lokale Immunzellen (Mikroglia) und locken weitere Effektorzellen wie Makrophagen, CD8⁺ T-Zellen und B-Zellen aus der Peripherie an, welche eine zerstörende Wirkung auf Myelinscheiden haben und zum axonalen Schaden führen (Abb. 1-1).

Histopathologisch werden MS-Läsionen in vier verschiedene Muster eingeteilt. Während immunologisch vermittelte, aktiv demyelinisierte Läsionen durch T-Lymphozyten und Makrophagen (Muster I) oder durch humorale Komponenten (Muster II) verursacht werden, können Läsionen auch durch primäre Oligodendrozytendegeneration (Muster III und IV) bedingt sein (Lucchinetti *et al.*, 2000).

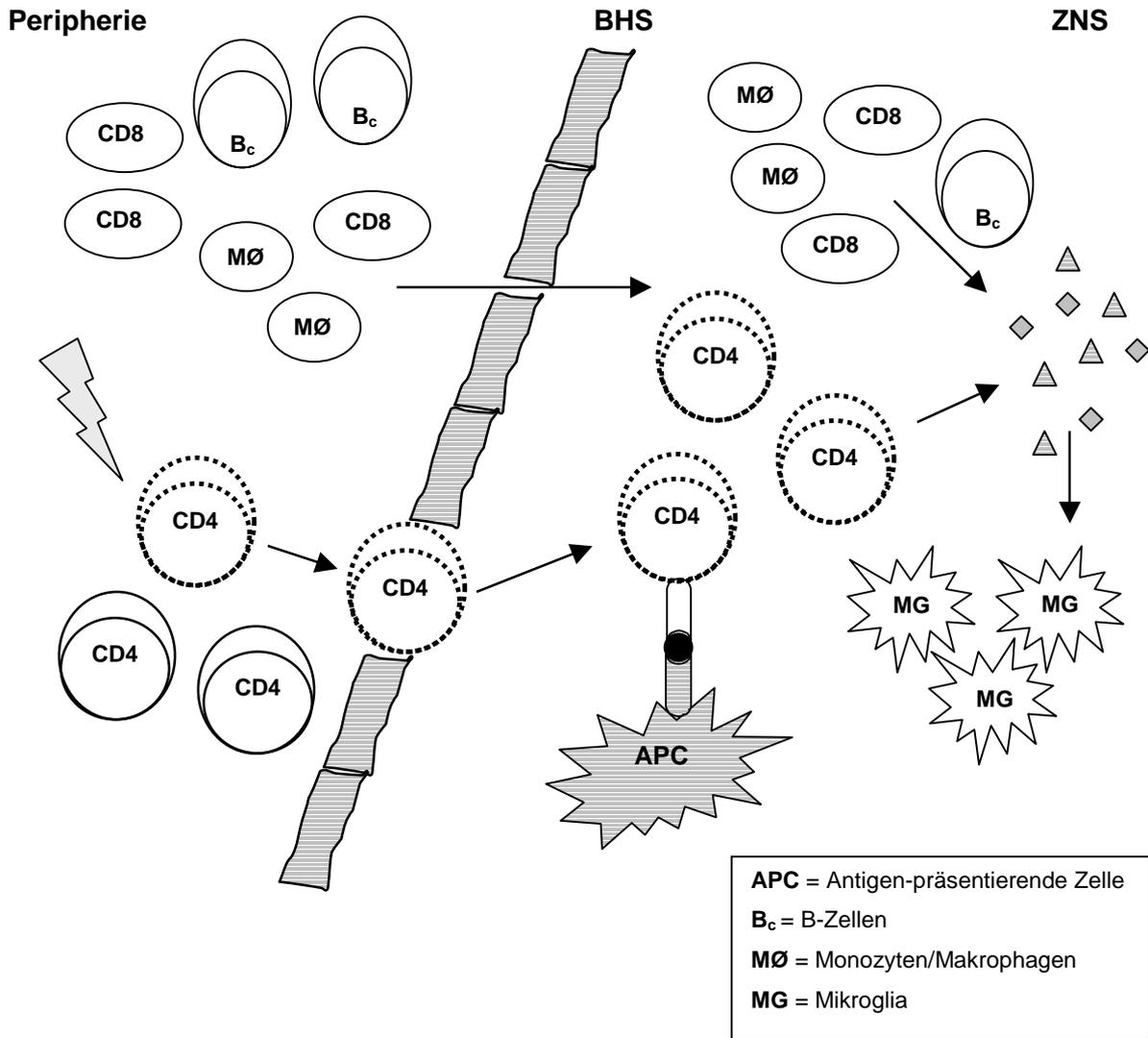


Abb. 1-1 Pathogenese der Multiplen Sklerose. In der Peripherie aktivierte T-Zellen erlangen Zutritt zum ZNS, wo es zu einer Reaktivierung der T-Zellen durch das Selbstantigen kommt. In folge dessen werden proinflammatorische Zytokine und Mediatoren freigesetzt, die sowohl lokale Immunzellen (Mikroglia) als auch periphere Leukozyten (Makrophagen, B-Zellen und CD8⁺ T-Zellen) rekrutieren. Das Zusammenspiel dieser Faktoren führt zu Entzündung, Demyelinisierung und axonaler Schädigung. Gepunktete Linie = aktivierte T-Zelle, ◇/△ = Zytokine/Mediatoren.

MS betrifft Frauen ca. zweimal häufiger als Männer und wird oftmals im jungen Erwachsenenalter diagnostiziert. Häufige Symptome der MS sind unter anderem Sehstörungen, Lähmungserscheinungen und Gangataxie. Klinisch äußert sich die MS in verschiedenen Verläufen, wobei ca. 85-90% der Patienten einen schubförmigen (RRMS) und 10-15% der Patienten einen primär progressiven Krankheitsverlauf (PPMS) entwickeln (Sospedra und Martin, 2005). Bei ca. 40% der RRMS-Patienten nimmt die Schubrate mit der Zeit ab und es entwickelt sich ein progressiver, neurodegenerativer Verlauf - die sekundär progressive MS (SPMS). Die PPMS dagegen zeichnet sich durch eine schnell zunehmende Ver-

schlechterung des Krankheitsverlaufes aus, die in relativ kurzer Zeit zu einer signifikanten Behinderung des Patienten führt.

Die MS stellt eine sehr heterogene Erkrankung mit bislang noch ungeklärter Ursache dar. Aufgrund dessen gibt es keine einheitliche Therapie, sondern Patienten müssen individuell behandelt werden. Da die Zerstörung der Myelinscheiden und Axone zu einer bleibenden Behinderung führt, gilt es so früh wie möglich eine Therapie einzuleiten, die den akuten Schaden reduziert und eine langfristige Zerstörung verhindert.

Zur Behandlung immunologisch vermittelter RRMS werden neben β -Interferonen auch das synthetische Oligopeptid Glatirameracetat oder Immunglobuline als Basistherapie der zweiten Wahl eingesetzt. Bei der SPMS ist neben β -Interferon auch das Zytostatikum Mitoxantron zugelassen. Zur Behandlung akuter Schübe stehen bis heute lediglich hochdosierte intravenös applizierte Glukokortikoide (GC) wie Methylprednisolon (MP) zur Verfügung (Noseworthy *et al.*, 2000). Diese bringen viele unerwünschte Nebenwirkungen mit sich, auf die im weiteren Verlauf dieser Arbeit noch näher eingegangen wird.

Obwohl hochdosiertes MP seit Jahrzehnten erfolgreich zur Behandlung akuter Schübe von MS-Patienten angewendet wird, sind die zugrunde liegenden Wirkmechanismen dieser Therapie bisher noch nicht völlig geklärt. Um die Beteiligung der GC-Mechanismen auf der molekularen und zellulären Ebene zu klären und um mit diesen Erkenntnissen eventuell die GC-Behandlung für den MS-Patienten optimieren zu können, wurde in dieser Arbeit der Wirkmechanismus der Hochdosis-Pulstherapie im Tiermodell der Maus am Beispiel von MP und Dexamethason (Dex) detailliert analysiert.

1.2 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis - Das Tiermodell der Multiplen Sklerose

Viele Erkenntnisse über die Pathogenese und Therapie der MS wurden anhand experimenteller Tiermodelle der Ratte und der Maus, aber auch von nicht humanen Primaten gewonnen. Die Ursprünge der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) gehen bis in die 1920er und 1930er zurück, als *Koritschoner* und *Schweinburg* durch die Injektion menschlichen Rückenmarkgewebes Entzündungen im ZNS von Kaninchen induzierten (Koritschoner und Schweinburg, 1925) und *River* versuchte, Lähmungsercheinungen im Kontext einer Tollwut-Impfung anhand von Tiermodellen zu untersuchen (Rivers, 1933). Beobachtungen aus derartigen Versuchen gaben Hinweise darauf, dass Autoimmunreaktionen gegen Bestandteile der Nervensubstanz Entzündungen im Gehirn auslösen können. Bis heute entwickelte sich die EAE zu einem etablierten und sehr gut charakterisierten Tiermodell humaner Autoimmunerkrankungen, das viele Erkenntnisse

über T-Zell-Immunologie, Autoimmunität und die Pathogenese autoimmun vermittelter Entzündungsreaktionen brachte (Baxter, 2007).

Die EAE wurde in unterschiedlichen Tierspezies wie Rhesusaffen, Kaninchen, Ratten und Mäusen etabliert (Baxter, 2007), wobei die Pathogenese vom jeweils verwendeten Tierstamm und Antigen abhängt. Untersuchungen im Zusammenhang mit der MS wurden hauptsächlich in Ratten, wie der Lewis oder DA Ratte, durchgeführt, die sich vor allem durch eine sehr einheitliche und hohe Suszeptibilität, einen homogenen Krankheitsbeginn und einer hochgradigen Paralyse nach Immunisierung auszeichnen (Swanborg, 2001).

Im Modell der Maus-EAE werden die Versuchstiere mit Peptiden von Myelinbestandteilen wie dem Myelinbasischen Protein (MBP), dem Myelinoligodendrozytenglykoprotein (MOG) oder dem Proteolipid-Protein (PLP) - emulgiert in Kompletten Freund'schen Adjuvant (CFA) - aktiv immunisiert. Je nach verwendetem Tierstamm und Antigen treten die ersten Symptome, beginnend mit Schwanzlähmung und Gangataxie, 9-12 Tage nach Immunisierung ein und führen zu unterschiedlichen Krankheitsverläufen. Zur Induktion der aktiven EAE in der C57Bl/6 Maus wird das MOG₃₅₋₅₅ Peptid verwendet, welches zu einem chronisch-progressiven Krankheitsverlauf führt. Ein schubförmig-remittierender Verlauf kann hingegen durch die aktive Immunisierung der SJL/J-Maus mit PLP₁₃₉₋₁₅₁ erzielt werden. Ferner erhalten Mäuse im Kontext mit der Immunisierung routinemäßig Pertussistoxin (PTX). PTX werden in diesem Zusammenhang mehrere Eigenschaften zugeschrieben. Neben der Öffnung der BHS soll PTX T_H1-vermittelte Autoimmunreaktionen stimulieren. Überdies wurde in der Peripherie die Induktion Antigen-spezifischer T_H17-Zellen (Hofstetter *et al.*, 2007) und die Reduktion regulatorischer T-Zellen beschrieben (Cassan *et al.*, 2006).

Neben der aktiven Immunisierung gibt es auch die Möglichkeit der passiven Induktion (Adoptiv-Transfer-EAE, AT-EAE), wobei enzephalitogene T-Zellen von Spendertieren beziehungsweise T-Zelllinien via adoptiven Transfers in Empfängertiere injiziert werden.

Experimentelle *in vivo*- oder *in vitro*- Modelle stellen artifizielle Systeme dar und können in der Regel lediglich einige Facetten der zu untersuchenden Aspekte widerspiegeln. Da die MS eine komplexe Erkrankung mit sehr unterschiedlichen klinischen, pathologischen und immunologischen Ausprägungen ist, ist es nicht möglich, all diese Aspekte zusammen in nur einem Tiermodell darzustellen (Gold *et al.*, 2006). Auch wenn das EAE-Modell kritisch betrachtet werden muss, sind mit Hilfe dieses Modells drei der heutigen MS-Medikamente Glatirameracetat, Natalizumab und Mitoxantron, entdeckt und etabliert worden (Steinman und Zamvil, 2006).

1.3 Glukokortikoide

1.3.1 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Der Wirkung eines Arzneimittels liegen mehrere Reaktionen zu Grunde, die in drei Phasen unterteilt werden können. Die erste Phase ist durch die Applikation der Arzneiform gekennzeichnet, die anschließend im Körper zerfällt und sich auflöst. Die darauf folgende Phase beschreibt, wie sich die Konzentrationen des Wirkstoffes im Organismus mit der Zeit verändern (Pharmakokinetik) und die dritte Phase umfasst den pharmakologischen Effekt, den die Substanz auf den Körper ausübt (Pharmakodynamik).

Wird beispielsweise in einem Molekül eine funktionelle Gruppe durch Veresterung einer OH-Funktion verändert, führt eine derartige Derivatisierung zu einer veränderten Pharmakokinetik, wie zum Beispiel eine verzögerte Resorption des Arzneistoffes. Wird stattdessen eine neue funktionelle Gruppe eingeführt, entsteht durch diesen irreversiblen Schritt ein völlig neues Molekül mit einer veränderten Pharmakodynamik. Dies äußert sich meist in einer veränderten Arzneimittelwirkung. Sowohl Pharmakokinetik als auch Pharmakodynamik stehen somit in unmittelbarem Zusammenhang mit der chemischen Struktur eines Wirkstoffes.

GC gehören zur Klasse der Steroidhormone und werden in der Nebennierenrinde aus Cholesterol (Abb. 1-2, B), einem komplexen Derivat des Sterans (Abb.1-2, A), gebildet. Als Referenzsubstanz im Vergleich mit anderen GC wird oftmals Cortisol (Hydrocortison) verwendet, da dies das physiologisch wichtigste GC darstellt (Abb. 1-3, A).

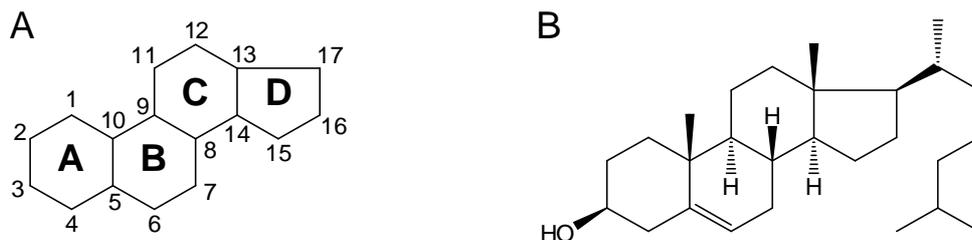


Abb. 1-2 Strukturformeln des Sterans (A) und des Cholesterols (B). Die Buchstaben A-D kennzeichnen die vier unterschiedlichen Ringe, die Ziffern 1-17 die einzelnen Kohlenstoffatome.

GC haben ein breites physiologisches Wirkungsspektrum. Für die Vermittlung glukokortikoider Wirkungen sind folgende chemische Merkmale essentiell:

1. α -Keto-Gruppe in Position 17 (in Ring D)
2. C=C Doppelbindung in Position 4 (in Ring A)
3. Ketogruppe in Position 3 (in Ring A)
4. Sauerstofffunktion in Position 11 (in Ring C)

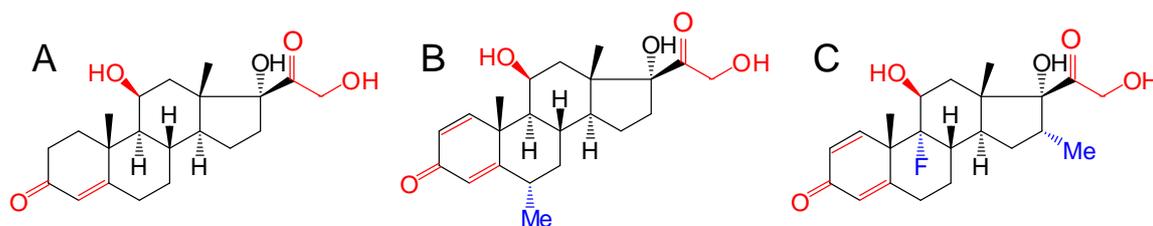


Abb. 1-3 Strukturformeln von Cortisol (A), Methylprednisolon (B) und Dexamethason (C). Die roten Markierungen kennzeichnen die für die GC-Wirkung wichtigen funktionellen Merkmale. Die blauen Markierungen heben die unterschiedlichen funktionellen Gruppen im Methylprednisolon und Dexamethason hervor.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden synthetischen GC Methylprednisolon (MP) (Abb. 1-3, B) und Dexamethason (Dex) (Abb. 1-3, C) verwendet, um den Wirkmechanismus von GC im Kontext mit der EAE zu analysieren.

Beiden Substanzen ist neben den „glukokortikoiden“ Merkmalen die α -ständige OH-Gruppe am C-Atom 17 gemeinsam. Die Einführung einer Methylgruppe in der Position 6 α führt bei MP zu einer verringerten mineralokortikoiden (MC) Wirkung und einer gleichzeitig erhöhten Affinität zum GR. Die antiinflammatorische Wirksamkeit gegenüber Cortisol ist um ein vierfaches gesteigert. Diese Eigenschaften potenzieren sich, wenn - wie bei Dex - in Position 9 α ein Fluoratom und in Position 16 α zusätzlich eine Methylgruppe eingebracht werden (Abb. 1-3, B, C). Ferner kommt es zu einer deutlich verlängerten biologischen Halbwertszeit. Beide GC zeigen keine mineralokortikoide Potenz und im Vergleich zu Cortisol deutlich verringerte Cushing-Schwellen-Dosen (Tab. 1-1).

Tab. 1-1 Die wichtigsten pharmakologischen Daten von Cortisol, Methylprednisolon und Dexamethason (Forth, Henschler, Rummel und Starke, 2002)

	Cortisol	Methylprednisolon	Dexamethason
Halbwertszeit (HWZ) [min.]	90	> 200	> 300
Biologische HWZ [Std.]	8-12	12-36	> 48
Relative GC-Potenz	1	5	30
Relative MC-Potenz	1	-	-
Antiinflammatorische Potenz	1	4	20
Cushing-Schwellen-Dosis [mg/d]	30	6	1,5

1.3.2 Molekulare Wirkmechanismen der Glukokortikoide

GC werden neben Mineralkortikoiden und Sexualhormonen in der Nebennierenrinde gebildet und sind lebenswichtig für die Anpassung an Belastungssituationen wie Krankheit oder Stress. Die GC-Sekretion unterliegt der negativen Rückkopplungsschleife der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) und folgt einem zirkadianen Rhythmus, wobei die GC-Sekretion in den frühen Morgenstunden am höchsten ist.

Im Organismus binden GC an ihren komplementären Rezeptor, den GR. Dieser gehört zur Familie der nukleären Rezeptoren und ist in der Regulation zahlreicher physiologischer Prozesse involviert. Im Immunsystem ist er unter anderem an der Apoptose von Lymphozyten, der T-Zell-Entwicklung und an entzündlichen Reaktionen beteiligt (Reichardt, 2004).

Die molekularen Mechanismen der GC-Wirkungen können in genomische und nicht-genomische Effekte differenziert werden, wobei die genomischen Effekte durch Transaktivierung bzw. Transrepression vermittelt werden (Song und Buttgerit, 2006).

Nach Applikation der GC diffundieren diese passiv durch die Zellmembran hindurch. Im Zytoplasma binden sie an den zytosolischen GR (cGR), der dort im inaktiven Zustand an einen Multiproteinkomplex assoziiert ist. Dieser besteht aus verschiedenen Hitzeschockproteinen (Hsp90, Hsp70, Hsp56 und Hsp40) und interagiert mit Immunophilinen sowie Kinasen des *Mitogen Activated Protein Kinase* Signalweges, wie der Src-Kinase (Reichardt, 2004; Buttgerit *et al.*, 2004).

Nach Dissoziation der gebundenen Hitzeschockproteine transloziert der aktivierte GC/cGR-Komplex in den Nukleus. Dort bindet er als Homodimer an spezielle DNS-Bindungsstellen, *Glucocorticoid responsive elements (GRE)*, die sowohl in der Promotor- als auch *Enhancer*-Region vieler GC-induzierter Gene zu finden sind. Abhängig vom Zielgen wird die Transkription entweder aktiviert (Transaktivierung über positive GRE) oder inhibiert (Transaktivierung über negative GRE).

Im Gegensatz zu den beschriebenen direkten genomischen Mechanismen kann der GC/cGR-Komplex auch als Monomer durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (*Nuklear factor κ B*), AP-1 (*Activator protein 1*) oder NF-AT (*Nuclear factor of activated T cells*) die Genexpression beeinflussen. Diese indirekten genomischen Mechanismen modulieren die Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren, was zur Hemmung der Expression immunregulatorischer und inflammatorischer Zytokine führen kann (Transrepression) (Buttgerit *et al.*, 2004).

Neben therapeutischen Effekten kommt es häufig unter der GC-Therapie dosisabhängig zur Entwicklung unerwünschter Nebenwirkungen, wie z.B. einer Hyperglykämie, einer Hypertonie oder einer Osteoporose. Es gibt Hinweise darauf, dass die Nebenwirkungen eine Folge vermehrter Transkription (Transaktivierung) sind, wohingegen die therapeu-

tisch erwünschten Wirkungen hauptsächlich durch Transrepression vermittelt werden (Rosen und Miner, 2005).

Im Gegensatz zu genomischen Mechanismen, deren GC-Wirkungen teilweise erst nach Minuten bis Stunden einsetzen können, werden auch Wirkungen innerhalb von Sekunden über spezifische beziehungsweise nicht-spezifische, nicht-genomische Mechanismen postuliert (Song und Buttgerit, 2006). Der Literatur zufolge werden spezifische nicht-genomische Mechanismen durch die Bindung der Steroidhormone an membranständige GR vermittelt, deren Existenz auf humanen peripheren Blutleukozyten nachgewiesen werden konnte (Bartholome *et al.*, 2004). Nicht-spezifische nicht-genomische Mechanismen werden über physikochemische Interaktionen der GC mit biologischen Membranen postuliert. Ferner gibt es noch Hinweise auf Interaktionen zwischen GC und den Hilfsmolekülen des Multiproteinkomplexes, wie der Src-Kinase. Es wird vermutet, dass diese als Signalkomponenten fungieren und unter anderem zu einer nicht-transkriptionellen Aktivierung verschiedener Kinasen wie der Phosphatidylinositol-3-Kinase (Buttgerit *et al.*, 2004) und letztendlich zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen (Horejsi *et al.*, 2004).

1.3.3 Glukokortikoide in der MS und der EAE

GC werden in der Therapie der MS beziehungsweise der EAE verschiedene Wirkungen zugeschrieben. Neben der Induktion von T-Zell-Apoptose wirken GC unter anderem protektiv auf die BHS, regulieren Adhäsionsmoleküle auf Zellen herab und führen durch immunsuppressive und immunmodulatorische Wirkungen zu einem veränderten Zytokinprofil (Reichardt *et al.*, 2006).

Im EAE-Modell der Ratte konnte gezeigt werden, dass in der Remissionsphase der EAE autoreaktive T-Zellen im Rückenmark in Apoptose gehen und somit die Entzündungsreaktion im ZNS beenden (Pender *et al.*, 1992; Tabi *et al.*, 1994; Gold *et al.*, 1997). Ähnliche Beobachtungen wurden auch nach der therapeutischen Gabe hochdosierten MP in der AT-EAE in Lewis Ratten (Schmidt *et al.*, 2000) und bei der Analyse humaner Leukozyten von MS-Patienten gemacht (Leussink *et al.*, 2001).

Neben der Induktion von T-Zell-Apoptose zeigen GC allerdings auch Effekte auf die BHS, wo sie sowohl direkt auf endotheliale Zellen als auch auf die Interaktionen zwischen vaskulärem Endothel und infiltrierenden T-Zellen wirken können. Die durch Entzündungsreaktionen auf Endothelzellen der BHS hochregulierten Adhäsionsmoleküle interagieren mit Integrinen enzephalitogener T-Zellen wie LFA-1 oder VLA-4 und ermöglichen somit deren Durchtritt durch die BHS (Paul und Bolton, 1995). Durch Studien konnte unter anderem auch im Serum und Liquor von MS-Patienten gezeigt werden, dass GC Integrine

und Selektine herabregulieren (Elovaara *et al.*, 2000) und die Leukozytenmigration entlang eines Chemokin-Gradienten beeinflussen können (Sorensen *et al.*, 2001).

Neben diesen Effekten zeigen GC auch modulierende beziehungsweise suppressive Wirkungen auf periphere Immunzellen, was sich unter anderem in einer Veränderung des Zytokinprofils äußert. Während die Produktion proinflammatorischer T_H1-Zytokine wie IFN- γ , TNF- α oder IL-2 reduziert wird (Almawi *et al.*, 1996), kommt es zu einer gesteigerten Produktion antiinflammatorischer T_H2-Zytokine wie IL-10 und TGF- β (Ossege *et al.*, 1998). Überdies induzieren hochdosierte GC auch die Bildung CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen (T_{reg}), was anhand tierexperimenteller sowie humaner Analysen nachgewiesen werden konnte (Chen *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2006).

Aktivierte Mikrogliazellen, die als lokale Antigen-präsentierende Zellen für die Restimulierung enzephalitogener T-Zellen eine sehr wichtige Rolle spielen, gelten ebenfalls als potentielle Ziele der GC (Reichardt *et al.*, 2006). Neben der Apoptose-Induktion von Mikrogliazellen im Ratten EAE-Modell durch hochdosiertes Dex (Nguyen *et al.*, 1997), konnte im Tiermodell eine reduzierte Expression von MHC II-Molekülen festgestellt werden (Kiefer und Kreuzberg, 1991). Ferner konnte in Zellexperimenten gezeigt werden, dass Dex in der Lage ist, sowohl die Transkription als auch die Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase und in folge dessen, die Produktion von Stickstoffmonoxid zu verhindern (Kleinert *et al.*, 1996), welches einen sehr wichtigen inflammatorischen Mediator im Zusammenhang mit der MS darstellt (Redford *et al.*, 1997).

Neben all diesen Effekten, weisen GC allerdings auch sehr viele Nebenwirkungen auf, die je nach Dauer, Dosierung und Kombination mit anderen Arzneimitteln auftreten können. Werden GC nur kurzfristig angewandt, haben sie keinen Einfluss auf die HPA-Achse (Leussink *et al.*, 2001). Nebenwirkungen treten bei der Puls-Therapie in der Regel nur vorübergehend auf, was sich in Form von psychischen Veränderungen, Beschwerden im Gastrointestinalbereich, Kopfschmerzen und diversen Myalgien äußert (Pozzilli *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu sind die unerwünschten Nebenwirkungen bei chronischer GC-Gabe schwerwiegender. Hier kann es mitunter zur Entwicklung eines Diabetes mellitus, einer Fettleber oder einer Osteoporose kommen (Pozzilli *et al.*, 2004). Neben den unerwünschten Arzneimittelwirkungen, wurden in diesem Zusammenhang im Tiermodell nach Hochdosis-Gabe von MP auch neurotoxische Wirkungen auf Neurone beobachtet (Diem *et al.*, 2003), welche allerdings durch die synergistische Gabe neuroprotektiver Substanzen wie zum Beispiel Erythropoetin verhindert werden konnten (Diem *et al.*, 2005).

1.4 Apoptose

Unter Apoptose versteht man einen programmierten, nach festen Regeln ablaufenden Zelltod (Aktas *et al.*, 2000). Dieser tritt physiologisch in vielen verschiedenen Prozessen des menschlichen und tierischen Organismus auf und ist unabdingbar für die normale Entwicklung und Funktion von Lymphozyten und deren Aktivierung (Strasser, 2005). Im Zusammenhang mit der EAE konnte im Rattenmodell gezeigt werden, dass T-Zell-Apoptose im ZNS natürlicherweise in der Remissionsphase auftritt (Pender *et al.*, 1992; Tabi *et al.*, 1994; Gold *et al.*, 1997), aber auch durch die therapeutische Applikation exogener GC induziert werden kann (Schmidt *et al.*, 2000), was letztendlich zur Terminierung der Entzündungen führt. Versagt der programmierte Zelltod, können entartete Zellen nicht mehr selektiv eliminiert werden. Es kann zu Autoimmunerkrankungen, Krebs oder auch zu neurodegenerativen Erkrankungen kommen (Opferman, 2008).

In Säugetieren kann Apoptose sowohl über den extrinsischen als auch den intrinsischen Signalweg ausgelöst werden, welche am Ende der Kaskaden wieder in einem Signalweg zusammenlaufen und durch die Aktivierung von Caspasen den Zelltod initiieren (Strasser, 2005).

Der extrinsische Signalweg wird durch die Stimulierung von Todesrezeptoren ausgelöst, die zur Familie der Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptoren (TNFR) gehören und eine intrazelluläre Todesdomäne besitzen. Werden diese Rezeptoren auf der Zelloberfläche vom passenden Liganden gebunden, kommt es innerhalb der Zelle zur Bildung eines sogenannten *Death-inducing signaling complexes* und zur Rekrutierung verschiedener Adaptormoleküle, die letztendlich Caspase-8 und anschließend die Kaskade der Effektor-Caspasen aktivieren (Hughes *et al.*, 2008) (Abb. 1-4).

Im Gegensatz dazu ist der intrinsische, mitochondriale Signalweg unabhängig von Todesrezeptoren und Caspase-8. Dieser wird durch bestimmte zytotoxische Stimuli wie Zytokin-Entzug oder GC-Behandlung aktiviert und durch die Interaktion anti-apoptotischer und pro-apoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie vermittelt. Durch die Aktivierung der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak wird Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt, welches durch die Wechselwirkung mit dem Adaptorprotein Apaf-1 (*Apoptosis-activating factor-1*) und der Pro-Caspase-9 zur Bildung eines apoptotischen Proteinkomplexes (Apoptosom) führt. Dieser bewirkt die Aktivierung der Caspase 9 und löst somit die Kaskade der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 und letztendlich den Tod der Zelle aus (Abb. 1-4) (Reed, 2001; Strasser, 2005).

Die Mitglieder der Bcl-2-Familie zählen zu den wichtigsten Regulatoren der Apoptose. Experimente zeigten, dass pro-apoptotische Proteine sowohl für die Initiierung des programmierten Zelltodes in der Entwicklung als auch der Stress-induzierten Apoptose von großer Bedeutung sind (Strasser, 2005). Von besonderem Interesse sind in diesem

Zusammenhang die pro-apoptotischen Moleküle Bim (*Bcl-2 interacting mediator of cell death*) und Puma (*p53 up-regulated modulator of apoptosis*). Anhand von Bim- und Puma- doppeldefizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass beide Proteine direkt miteinander agieren und Apoptose auf Stimuli hin induzieren, die abhängig und unabhängig vom Tumorsuppressorgen p53 sind (Erlacher *et al.*, 2006).

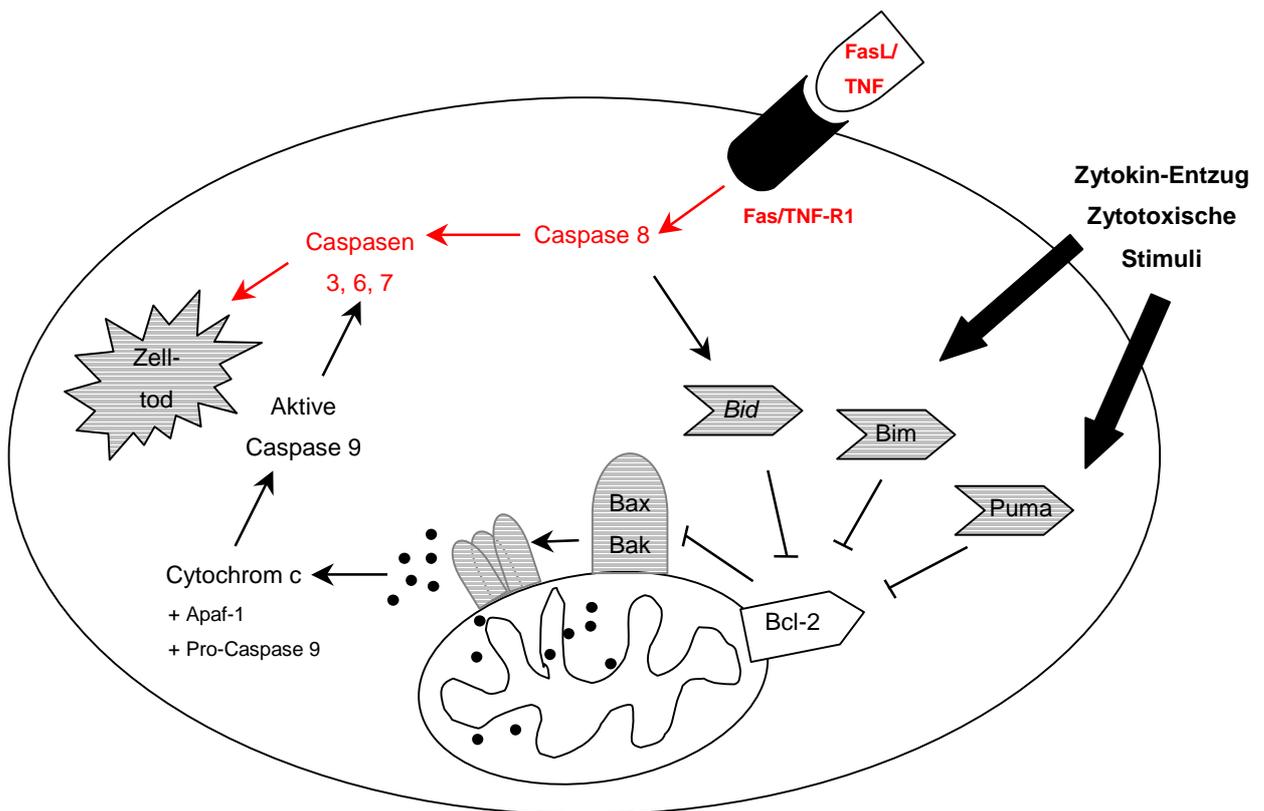


Abb. 1-4 Extrinsischer und intrinsischer Apoptose-Signalweg. Aktivierung des extrinsischen Signalweges (rot markiert) über Todesliganden/-rezeptoren und Apoptoseinduktion durch Initiation verschiedener Caspasen (8, 3, 6 und 7). Zytokin-Entzug oder die Stimulierung durch zytotoxische Substanzen (intrinsischer Signalweg), führt zur Aktivierung der pro-apoptotischen Moleküle Bim und Puma, die die anti-apoptotische Wirkung der Bcl-2 Mitglieder antagonisieren. Es kommt es zur Aktivierung der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak, die nach Oligomerisierung, die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien bewirken. Dieses bildet zusammen mit Apaf-1 und Pro-Caspase 9 einen Komplex, der zur Bildung der aktiven Caspase 9 und somit zur Aktivierung der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 führt. Bid stellt als pro-apoptotisches Molekül, das erst durch Caspase-8 gespalten und aktiviert wird, ein Bindeglied zwischen extrinsischem und intrinsischem Signalweg dar.

1.5 Adhäsionsmoleküle

Als Adhäsionsmoleküle werden Oberflächenmoleküle bezeichnet, deren Funktion die Vermittlung von Interaktionen zwischen Immunzellen bzw. zwischen Immunzellen und endothelialen Zellen ist (Laffon und Gonzalez-Amaro, 1995). Diese sind in verschiedene Prozesse involviert wie das *Homing* von Lymphozyten zu sekundären Lymphorganen oder der transendothelialen Migration (Brocke *et al.*, 1999).

Aufgrund struktureller Homologien werden Adhäsionsmoleküle in die drei großen Familien der Selektine, Integrine und Zelladhäsionsmoleküle der IgG-Superfamilie unterteilt. Die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Moleküle LFA-1 (*Leukocyte function associated antigen-1*) und VLA-4 (*Very late antigen-4*) werden den Integrinen zugeordnet und sind bei der Transmigration von Leukozyten hauptsächlich für die feste Bindung zwischen Immunzellen und Endothel verantwortlich. Aus der Familie zellulärer Oberflächen-Glykoproteine fungiert besonders CD44 als Zelladhäsionsmolekül bei der Leukozyten-Extravasation, dem Lymphozyten-*Homing* und der Bindung extrazellulärer Matrix (Brocke *et al.*, 1999).

Während LFA-1 nur auf Leukozyten und VLA-4 auf ruhenden Lymphozyten, Monozyten und Zellen der Neurralleiste exprimiert wird (Springer, 1990), wird CD44 vor allem auf Antigen-aktivierten T-Zellen hochreguliert (Brennan *et al.*, 1999). Geeignete Liganden für LFA-1 stellen die intrazellulären Zelladhäsionsmoleküle ICAM1-5 dar, wobei VLA-4 hauptsächlich an VCAM1 und CD44 an Glukosaminglykan-Hyaluronat bindet.

Die Entwicklung einer EAE ist mit der Hochregulierung vaskulärer Zelladhäsionsmoleküle (VCAM) auf Endothelzellen des ZNS assoziiert, welches die Extravasation aktivierter Leukozyten vereinfacht (Brennan *et al.*, 1999). Dies konnte unter anderem im EAE-Modell LFA-1-defizienter Mäuse bestätigt werden. Die Deletion des Adhäsionsmoleküls LFA-1 führte zu einem milderem Krankheitsverlauf und unterdrückte die Lymphozytenrekrutierung zu den Lymphknoten (Wang *et al.*, 2007). Ferner verhinderte die Blockade des Adhäsionsmoleküles VLA-4 im EAE-Modell die Krankheitssymptome und führte somit zur Etablierung des monoklonalen Antikörpers Natalizumab (anti-VLA-4, Tysabri®) in der Therapie der progressiven MS (Hemmer *et al.*, 2006).

Aufgrund dieser Daten sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob hochdosierte GC im chronischen EAE-Modell der C57Bl/6 Maus ebenfalls eine reduzierte Expression von Adhäsionsmolekülen zur Folge haben.

1.6 Compound A – Glukokortikoid Rezeptor Modulator

Die Tatsache, dass die durch GC vermittelten Wirkungen und Nebenwirkungen durch unterschiedliche molekulare Mechanismen hervorgerufen werden, führte zur Entwicklung neuartiger spezifischer GR-Liganden, bei denen Transaktivierung und Transrepression voneinander getrennt sind. Substanzen mit derartigen Eigenschaften werden als „dissoziiert“ bezeichnet.

Vayssiere *et al.* beschrieben eine neue Klasse von GC, die *in vivo* weder agonistische noch antagonistische Wirkungen am GR vermittelten, aber sehr effizient GR-abhängige AP-1 Repression induzierten (Vayssiere *et al.*, 1997). Daraufhin wurden verschiedene nicht-steroidale dissoziierte Substanzen entwickelt und Schering führte für diese neuartige Gruppe die Bezeichnung „Selektive Glukokortikoid Rezeptor Agonisten“ (SeGRA) ein (Schacke *et al.*, 2006).

Im Rahmen dieser Entwicklungen wurden auch natürlich vorkommende Substanzen auf oben genannte Eigenschaften hin untersucht. Compound A (CpdA, 2-(4-Acetoxyphenyl)-2-chloro-N-methyl-ethylammoniumchlorid) ist ein synthetisches Analogon des Phenyl-Aziridin-Precursors, der natürlicherweise in der afrikanischen Pflanze *Salsola tuberculatiformis* Botschantzev vorkommt. Neben antiinflammatorischen Wirkungen zeigt CpdA auch kontrazeptive (Louw *et al.*, 1997) sowie antiandrogene Eigenschaften (Tanner *et al.*, 2003). Im Plasma kommt es zu Wechselwirkungen zwischen CpdA und Steroid-bindenden Proteinen wie Cytochrom P450c11 und Steroid-bindenden Globulinen wie *Corticosteroid binding globuline* (CBG) oder *Sexhormone binding globuline* (SHBG) (Louw *et al.*, 1997; Louw und Swart, 1999; Louw *et al.*, 2000). *In vivo* konnte tierexperimentell sowohl im Zymosan- als auch Kollagen-induzierten Arthritismodell der Maus die antiinflammatorische Wirkung von CpdA nachgewiesen werden. Überdies konnte gezeigt werden, dass CpdA NF-kB-abhängige Gene herunterregulierte ohne GRE-abhängige Gene zu stimulieren (De Bosscher *et al.*, 2005) und dass die Reduktion von Entzündungen exklusiv auf der Aktivierung des monomeren GR beruhte (Dewint *et al.*, 2008). Ferner wurde kürzlich publiziert, dass CpdA *in vitro* Apoptose induzierte und auf Prostata-Tumorzellen einen zytostatischen Effekt ausübte (Yemelyanov *et al.*, 2008).

1.7 Zielsetzung

In dieser Arbeit standen grundlagenorientierte und klinisch relevante Analysen im Mittelpunkt, die zum einen dem besseren Verständnis sowie der Optimierung der Hochdosis-GC-Pulstherapie bei der schubförmigen MS dienen sollten und zum anderen sich mit einem neuartigen Therapieansatz beschäftigten.

Die der GC-Pulstherapie zugrunde liegenden Wirkmechanismen sind bis heute nur unvollständig geklärt und führen zu steten Diskussionen über die Vermittlung der antiinflammatorischen GC-Wirkungen. Bisher wurden in diesem Kontext Untersuchungen hauptsächlich im monophasischen EAE-Modell der Lewis Ratte durchgeführt. Da hier für mechanistische Analysen allerdings keine GR-defizienten Tiermodelle zur Verfügung stehen, sollten in der vorliegenden Arbeit die glukokortikoiden Wirkungen der Hochdosistherapie anhand der chronischen MOG₃₅₋₅₅-EAE in der C57Bl/6 Maus und in GR-defizienten Mäusen detailliert untersucht werden.

Dabei war es das Ziel, die Rolle des zytosolischen GR auf der molekularen Ebene anhand heterozygoter GR-defizienter Mäuse zu bestimmen. Für die Identifizierung der Ziel-Zellpopulation der Hochdosis-GC-Therapie auf der zellulären Ebene wurden hämatopoetische Stammzellchimären und Zelltyp-spezifische GR-defiziente Mäuse verwendet. Da bekannt ist, dass MP in der AT-EAE der Lewis Ratte im ZNS Apoptose induziert und Adhäsionsmoleküle in der Pathogenese der EAE beziehungsweise MS involviert sind, sollten analog im chronischen MOG₃₅₋₅₅-EAE-Modell der C57Bl/6 Maus die Einflüsse der GC auf die Apoptose-Induktion sowie auf die Regulierung von Adhäsionsmolekülen eingängig untersucht werden.

Die Standardtherapie akuter MS-Schübe besteht in der Applikation hochdosierten MP. Pharmakologisch betrachtet gibt es weitere GC wie Dex, die aufgrund ihrer chemischen Struktur ein gesteigertes Wirkprofil aufweisen, in diesem Kontext allerdings keine Verwendung finden. Zielsetzung war es deshalb, die beiden Steroidhormone MP und Dex in der chronischen MOG₃₅₋₅₅-EAE der C57Bl/6 Maus sowohl therapeutisch als auch präventiv einzusetzen und miteinander zu vergleichen. Ferner wurden neben der klinischen Wirksamkeit *ex vivo* und *in vitro* Effekte auf enzephalitogene sowie periphere T-Zellen analysiert.

GC zählen zu den potentesten antiinflammatorischen Substanzen, die bei chronischer Applikation allerdings ein sehr großes Spektrum an Nebenwirkungen aufweisen. Aufgrund dessen ist es von sehr großem Interesse, alternative, nebenwirkungsärmere Substanzen zu finden. In diesem Zusammenhang sollte die nicht-steroidale Substanz Compound A im chronischen Modell der MOG₃₅₋₅₅-EAE in der C57Bl/6 Maus als mögliche Alternative zu hochdosierten GC etabliert und dessen klinische Wirkungen, sowie chemische Eigenschaften *in vivo* als auch *in vitro* detailliert analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Entwässerer	Leica TP 1020
Einbetter	Leica EG 1160
Mikrotom	Leica SM 2000R
Cycler	Mastercycler egradient, Eppendorf
Photometer	Sunrise Tecan
FACS-Gerät	BD FACS Calibur, BD FACS Canto
MACS-Gerät	AutoMACS, Miltenyi
Counter	1450 LSC & Luminescence Counter Micro Beta Tri Lux, Perkin Elmer

2.2 Antikörper

AnnexinV (FJK-16s)	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
AnnexinV-Cy5	BD Pharmingen, Californien, USA
AnnexinV-FLUOS	Roche Diagnostics, Mannheim, BRD
Anti-active Caspase-3 (C92-605)	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
Anti-CD11a (2D7) / Anti-CD3ε (145-2C11)	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
Anti-CD4 (RM4-5) / Anti-CD44 (IM7)	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
Anti-CD49d (R1-2)	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
Anti-FoxP3 (FJK-16s)	eBioscience, Oregon, USA
Anti-GITR (DTA-1)	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
Anti-IL-17 (TC11-18H10.1)	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
Anti-mIL-17/ Anti-mIL-17-biotinyliert	R&D Systems, Wiesbaden, BRD
Mouse IFN-γ/IL-10 ELISA Set, BD OptEIA	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
Pan T Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Berg. Gladbach, BRD

2.3 Arzneimittel

Dexa-ratiopharm 100 mg Injektionslösung	Ratiopharm, Ulm, BRD
Fortecortin inject 100 mg Injektionslösung	Merck, Darmstadt, BRD
Glukokortikoid-Rezeptor-Modulator (CpdA)	Calbiochem, Darmstadt, BRD
Isoproterenol-Hydrochlorid	Sigma Aldrich, Steinheim, BRD
Ketamin Inresa 50 mg/ml	Inresa, Freiburg, BRD
Rompun 2%	Bayer, Leverkusen, BRD
Urbason soluble 16 mg/ 250 mg	Aventis, Frankfurt, BRD

2.4 Chemikalien

7-AAD	eBioscience, Oregon, USA
[³ H]-Thymidin	MP Biomedicals, Heidelberg, BRD
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, BRD
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, BRD
Calciumchlorid entwässert / · 2 H ₂ O	Roth, Karlsruhe, BRD
DAB Puffertabletten	Merck, Darmstadt, BRD
Dinatriumhydrogenphosphat wasserfr. / · 2 H ₂ O	Roth, Karlsruhe, BRD
DMEM (1,0 g bzw. 4,5 g/l Glucose)	PAN Biotech, Aidenbach, BRD
DNaseI	Roche Diagnostics, Mannheim, BRD
dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
EDTA Dinatriumsalz · 2 H ₂ O	Roth, Karlsruhe, BRD
Entellan / Eosin gelblich	Merck, Darmstadt, BRD
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, BRD
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe, BRD
General Caspase Inhibitor Q-VD-OPh	R&D Systems, Wiesbaden, BRD
Glucose wasserfrei / · H ₂ O	Merck, Darmstadt, BRD
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Roth, Karlsruhe, BRD
Incomplete Freund Adjuvant	Difco, Kansas, USA
Kaliumchlorid / Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, BRD
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe, BRD
Mass-Ruler Low Range	Fermentas, St. Leon-Rot, BRD
Methanol	Roth, Karlsruhe, BRD
MOG ₃₅₋₅₅ -Peptid	Charité, Berlin, BRD
Mycobacterium tuberculosis H37RA	Difco, Kansas, USA
Natriumazid / Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe, BRD
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, BRD
Natriumdihydrogenphosphat · H ₂ O	Roth, Karlsruhe, BRD
Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe, BRD
Natriumhydrogencarbonat / Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe, BRD
Natriumpyruvat	Gibco, Karlsruhe, BRD
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe, BRD
Nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco, Karlsruhe, BRD
Normal Rabbit Serum	Jackson Laboratories, Suffolk, UK
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, BRD
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, BRD

Chemikalien (Fortsetzung)

Percoll	GE Healthcare, Freiburg, BRD
Pertussistoxin	List Biological Laborat., California, USA
Proteinase K	Roth, Karlsruhe, BRD
Taq-Polymerase	Eppendorf, Hamburg, BRD
TMB Substrate Reagent Set, BD OptEIA	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
TRIS- HCl / Ultra Qualität > 99,9%	Roth, Karlsruhe, BRD
Trypsin-EDTA (0,05%)	Gibco, Karlsruhe, BRD
Tween 20 / Wasserstoffperoxid / Citronensäure	Roth, Karlsruhe, BRD

2.5 Medien

<i>EH-Medium</i>	<i>HEK-Zell-Medium</i>
DMEM	DMEM (4,5 g/l Glucose + Glutamin)
2,5 mmol/l HEPES Puffer	15% FCS
1% Penicillin/Streptomycin	1% Penicillin/Streptomycin
<i>ReMed</i>	<i>SH-SY5Y-Zell-Medium</i>
RPMI 1640	DMEM (1,0 g/l Glucose + Glutamin)
1% Penicillin/Streptomycin	10% FCS
1% L-Glutamin	1% Penicillin/Streptomycin
1% Nicht-essentielle Aminosäuren	
1% Natriumpyruvat	
5% FCS	
400 µl/100 ml β-Mercaptoethanol (0,2%)	

2.6 Reagenslösungen

<i>Eosin-Lösung</i>	<i>Ketamin-Xylazin-Narkose</i>
0,1% (m/V) Eosin gelblich	16% (V/V) Ketanest® [50 mg/ml]
0,15% (V/V) Essigsäure	4% (V/V) Rompun® 2%
Ethanol (70%)	80% (V/V) Natriumchlorid (0,9%)
<i>4% PFA (pH 7,3)</i>	<i>POD-Block</i>
4% (m/V) Paraformaldehyd	71,4% (V/V) Methanol
1x PBS	1,4% (m/V) Natriumazid
	17,9% (V/V) Wasserstoffperoxid (3%)

2.7 Pufferlösungen

10x AnnexinV-Bindungspuffer

5 mmol/l	Hepes (pH 7,2)
25 mmol/l	Calciumchlorid
1,4 mol/l	Natriumchlorid

10x PBS (pH 6,7)

1,369 mol/l	Natriumchlorid
100 mmol/l	Dinatriumhydrogenphosphat
100 mmol/l	Na-dihydrogenphosphat H ₂ O
27 mmol/l	Kaliumchlorid

1x TBS

50 mmol/l	TRIS
150 mmol/l	Natriumchlorid

Citratpuffer (pH 6,0)

1,8 mmol/l	Citronensäure
8,2 mmol/l	Natriumcitrat

FACS-Puffer

0,1 %	BSA
0,1 %	Natriumazid
1 x PBS	

Lysispuffer

100 mmol/l	TRIS (pH 8,5)
200 mmol/l	Natriumchlorid
5 mmol/l	EDTA (pH 8,0)
0,2%	Natriumdodecylsulfat

0,1 M Carbonat-Bicarbonat-Puffer (pH 9,5)

99,9 mmol/l	Na-hydrogencarbonat
33,6 mmol/l	Natriumcarbonat

0,15 M Phosphat-Puffer (pH 7,2-7,4)

137 mmol/l	Natriumchlorid
2,7 mmol/l	Kaliumchlorid
8,1 mmol/l	Dinatriumhydrogenphosphat
1,5 mmol/l	Kaliumdihydrogenphosphat

0,2 M Na-phosphat-Puffer (pH 6,5)

83 mmol/l	Dinatriumhydrogenphosphat
117 mmol/l	Na-dihydrogenphosphat H ₂ O

EDTA-Lösung (pH 8,0)

1,0 mmol/l	EDTA
0,8 mmol/l	Natriumhydroxid

Percoll-Verdünnungspuffer

0,1 %	BSA
1,0 %	Glucose
1 x PBS	

Resuspensionspuffer

0,1 %	BSA
1,0 %	Glucose
100 µg/ml	DNaseI
1 x PBS	

2.8 Tiere

2.8.1 Generierung und Zucht

Für die Durchführung der Experimente und die Induktion der EAE wurden 10-12 Wochen alte männliche und weibliche C57Bl/6 Mäuse verwendet, die entweder aus der Eigenzucht stammten oder von Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen wurden. Ferner wurden konventionelle sowie konditionale GR-defiziente Mäuse, Knochenmarks- und Hämatopoetische Stammzellchimären eingesetzt.

Heterozygote GR-defiziente Tiere wurden vom Deutschen Krebsforschungszentrum, Heidelberg, zur Verfügung gestellt. Diese Tiere enthalten eine Deletion des Exons 3 des GR-Gens, welches durch homologe Rekombination in embryonale Stammzellen eingeführt wurde. Dies hat zur Folge, dass kein funktionelles GR-Protein gebildet werden kann. Neugeborene wurden mittels geeigneter PCR-Analyse genotypisiert (siehe 2.11.2).

Hämatopoetische Stammzellchimären wurden vom Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt. Für die Generierung dieser Mäuse wurden sechs Wochen alte weibliche CD45.1 congenere C57Bl/6 Mäuse bestrahlt (11,5 Gy) und mit fötalen Leberzellen CD45.2 congenere GR^{+/+} sowie GR^{-/-} Embryonen rekonstituiert. Konditionale GR-defiziente Tiere mit einer gezielten Deletion des GR in T-Zellen beziehungsweise myeloiden Zellen wurden aus dem Leibniz Institut für Altersforschung - Fritz-Lipmann Institut aus Jena bezogen. Die Generierung dieser Tiere erfolgte mit Hilfe des Cre/loxP-Systems (Tuckermann *et al.*, 2007). Beide Mauslinien wurden für mehr als zehn Generationen auf den C57Bl/6-Hintergrund zurückgekreuzt. Neugeborene wurden mittels geeigneter PCR-Analyse genotypisiert (siehe 2.11.2).

Konventionelle Puma^{-/-}- und Bim^{-/-}-defiziente Mäuse sowie Puma/Bim^{-/-}-Knochenmarkschimären wurden von der Abteilung für Entwicklungsimmunologie des Biozentrums Innsbruck zur Verfügung gestellt. Für die Generierung der Knochenmarkschimären wurden 8-12 Wochen alte CD45.1 Mäuse bestrahlt (10 Gy) und mit Knochenmarkszellen CD45.2 positiver Donoren rekonstituiert.

2.8.2 Induktion der EAE

Zur aktiven Induktion der EAE wurden die Tiere unter Ketamin-Xylazin-Narkose mit einer Emulsion, bestehend aus 50 µg MOG₃₅₋₅₅-Peptid und 50 µg CFA, subcutan rechts und links des Schwanzansatzes immunisiert. Die Tiere erhielten zusätzlich zwei Dosen Pertussistoxin (PTX) zu je 200 ng (in 200 µl PBS) am Tag der Immunisierung selbst und zwei Tage nach der Immunisierung. Ab dem siebten Tag wurden die Mäuse täglich gewogen und deren Gesundheitszustand anhand eines festgelegten EAE-Scores kontrolliert:

0	normal
1	Reduzierter Schwanztonus
2	Schwanzlähmung
3	Fehlen reflektorischer Ausgleichsbewegungen beim Gehen
4	Gangataxie
5	Leichte Lähmung der Hinterbeine
6	Plegie eines Beines oder mittelgradige Lähmung beider Hinterbeine
7	Paraplegie mit kompletter Lähmung beider Hinterbeine
8	Tetraparese mit (leichter) Lähmung auch der vorderen Extremitäten
9	moribund
10	tot

Alle Versuche wurden nach den Vorschriften des Tierschutzgesetzes des Landes Niedersachsen durchgeführt und sind von der entsprechenden Behörde genehmigt worden.

2.8.3 Präventive und therapeutische Behandlung

Zur Analyse der immunmodulatorischen Wirksamkeit von GC (Dex und MP) im Tiermodell der EAE wurden zwei unterschiedliche Applikationsschemen etabliert. Für die therapeutische Behandlung (Abb. 2-1, B) wurden die GC an drei aufeinander folgenden Tagen appliziert, beginnend bei einem durchschnittlichen Krankheits-Score der Tiere von zwei bis drei. Im Gegensatz dazu wurden die GC im präventiven Ansatz (Abb. 2-1, A) bereits einen Tag vor der aktiven Immunisierung, am Tag der Immunisierung selbst und an dem darauf folgenden Tag appliziert. Dex und MP wurden mit PBS verdünnt und in unterschiedlichen Dosen von 0,8 mg/kg, 4,0 mg/kg, 20 mg/kg und 100 mg/kg Körpergewicht (KG) appliziert. Für klinische Untersuchungen mit CpdA und Isoproterenol wurde ein therapeutischer Ansatz gewählt, wobei beide Substanzen ebenfalls an drei aufeinander folgenden Tagen appliziert wurden. Therapiebeginn war bei einem durchschnittlichen Krankheits-Score von

zwei bis drei. CpdA wurde in verschiedenen Solventien gelöst (Wasser, PBS und Ethanol 20%) und in unterschiedlichen Dosen injiziert (300 µg, 100 µg und 33,3 µg / 20 g KG). Isoproterenol wurde in Wasser gelöst und in den Dosen 1000 µg, 300 µg und 100 µg (pro 20 g KG) appliziert. Alle Substanzen wurden intraperitoneal (i.p.) verabreicht.

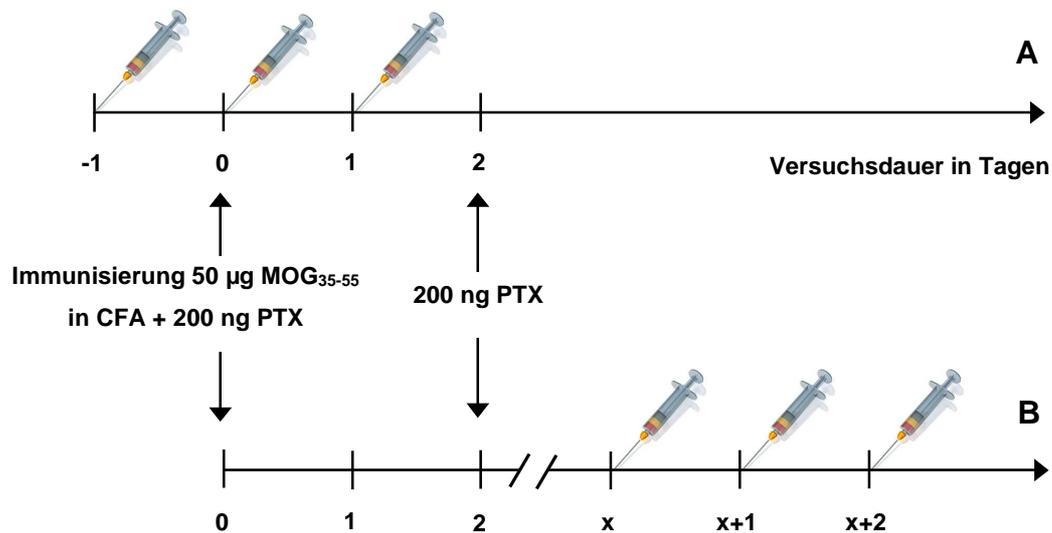


Abb. 2-1 Applikationsschemen für die präventive (A) und therapeutische Behandlung (B). Die Spritzen symbolisieren die dreimalige Injektion der zu verabreichenden Substanzen, wobei die Immunisierung an Tag 0 und die Pertussistoxin (PTX)-Applikation an den Tagen 0 und 2 durchgeführt wurden.

2.9 Histologie und Immunhistochemie

2.9.1 Perfusion, Gewebefixierung und Paraffin-Konservierung

Für histologische Zwecke wurden die Tiere mittels einer Ketamin-Xylazin-Mischung narkotisiert und anschließend zehn Minuten mit 0,9%iger NaCl-Lösung durch die linke Herzkammer perfundiert. Die Fixierung der Gewebe erfolgte durch Perfusion mit 4% PFA-Lösung. Milz und Rückenmark eines jeden Tieres wurden herauspräpariert und für zwei Stunden in 4%iger PFA-Lösung nachfixiert. Die fixierten Organe wurden mehrmals in PBS gewaschen, mittels Skalpell in ca. 5 mm große Stücke geschnitten (Rückenmark getrennt nach zervikal, thorakal und lumbal), in Einbettungskassetten in einer aufsteigenden Alkoholreihe (1x Ethanol 50%, 1x Ethanol 70%, 2x Ethanol 80%, 2x Ethanol 96%, 2x Ethanol 100%, 2x Xylol, 2x Paraffin) über Nacht entwässert und am nächsten Tag in Paraffin eingebettet.

2.9.2 Immunhistochemische Färbungen

Für immunhistochemische Färbungen wurden mit Hilfe des Mikrotoms 3 µm dünne Schnitte der Rückenmarksquerschnitte angefertigt, auf Objektträger (SuperFrost® plus, Menzel, Braunschweig) aufgezogen und über Nacht bei 50°C getrocknet.

Zur morphologischen Beurteilung der Gewebe wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Mayer durchgeführt. Die Schnitte wurden nach Entparaffinierung in der absteigenden Alkoholreihe (2x Xylol, 2x Ethanol 99%, 2x Ethanol 96%, 2x Ethanol 70%, 1x Aqua dest.) für zehn Minuten in Hämalaun-Lösung gefärbt (Kern-Färbung), kurz mit destilliertem Wasser gespült und anschließend für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert. Daraufhin wurden die Schnitte einmal mit destilliertem Wasser gespült und für fünf Minuten mit Eosin-Lösung inkubiert (Anfärben der Gewebe). Nach Spülen in destilliertem Wasser folgte die aufsteigende Alkoholreihe (2x Ethanol 70%, 2x Ethanol 96%, 2x Ethanol 99%, 2x Xylol) zur Entwässerung der Schnitte, gefolgt vom Eindeckeln mit Entellan.

Die immunhistochemischen Färbungen zum Nachweis von T-Zellen, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten sowie Amyloid-Precursor-Protein positiven Strukturen wurden alle nach einem ähnlichen Färbeprotokoll durchgeführt. Nach Entparaffinierung der Schnitte in der absteigenden Alkoholreihe folgte das Freilegen der durch PFA vernetzten Antigenbindungsstellen. Hierfür wurden die Schnitte 30 Minuten in EDTA- oder Citratpufferlösung gekocht. Nach 15-minütigem Abkühlen folgte das Blocken unspezifischer Bindungsstellen in den Geweben mit 10% BSA in PBS für 30 Minuten. Danach wurde der jeweilige Primärantikörper (Tab. 2-1) in 1% BSA in PBS auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die endogene Peroxidase wurde mittels POD-Block für 13 Minuten blockiert, gefolgt von der Inkubation der Schnitte mit dem entsprechenden biotinylierten Sekundärantikörper (Tab. 2-1) in 1% BSA in PBS für 45 Minuten. Die Detektion des Sekundärantikörpers erfolgte mit einem Peroxidase-gekoppelten (Strept)avidin-Biotin-Komplex (Dako, Hamburg, BRD) (1:100, in PBS) für 35 Minuten bei Raumtemperatur. Als Substrat für die Peroxidase wurde Diaminobenzidin verwendet und 10-13 Minuten inkubiert. Für eine Gegenfärbung der Schnitte wurden diese für 20-30 Sekunden in Hämalaun-Lösung und anschließend für zehn Minuten in fließendes Leitungswasser getaucht. Hiernach wurden die Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe (2x Ethanol 70%, 2x Ethanol 96%, 2x Ethanol 99%, 2x Xylol) entwässert und mit Entellan dauerhaft eingedeckelt.

Die Beurteilung der Blut-Hirn-Schranken-Integrität erfolgte über die Färbung des Serumalbumins im ZNS. Die Schnitte wurden wie oben beschrieben entparaffiniert und dem Proto-

koll entsprechend gefärbt. Eine Vorbehandlung mit Puffer war nicht erforderlich. Zur Reduktion unspezifischer Hintergrundfärbung wurde der Sekundärantikörper für 20 Minuten (RT) zu gleichen Anteilen mit Kaninchen- und Maus-Serum vorinkubiert (Tab. 2-1).

Immunhistochemische Färbungen zum Nachweis von Mikrogliazellen/Makrophagen (Iba1), FcγII/III-Rezeptor (CD16/CD32), induzierbarer Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) und MHC-II-Molekülen (Abb. 4-13) wurden freundlicherweise vom Institut für Neuropathologie der Universität Göttingen (Prof. Dr. Uwe-Karsten Hanisch) durchgeführt.

Tab. 2-1 Auflistung der verwendeten Primär- und Sekundär-Antikörper für immunhistochemische Färbungen

Primär-Antikörper	Verd.	Sekundär-Antikörper	Verd.
Mouse anti Alzheimer Precursor Protein A4 mAb, Chemicon	1:1000	Goat anti mouse/rabbit IgG (H+L) biot., Dako	1:200
Sheep polyclonal to albumin, Abcam	1:300	Rabbit anti sheep IgG (H+L), biot., Southern Biotech	1:300
Rat anti human CD3, Serotec	1:200	Anti rat IgG (H+L) biot., Vector	1:200
Rat anti mouse Mac-3 mAb, BD	1:200	Anti rat IgG (H+L) biot., Vector	1:200
Rat anti mouse neutrophils, Serotec	1:300	Anti rat IgG (H+L) biot., Vector	1:200

2.9.3 Quantifizierung immunhistochemischer Färbungen

Alle immunhistochemischen Färbungen wurden geblindet quantifiziert. Von jedem Tier wurden jeweils zwei Infiltrate in je drei zervikalen, thorakalen sowie lumbalen Rückenmarksquerschnitten bei einer 400-fachen Vergrößerung am Lichtmikroskop mit Hilfe eines Zähllokulars ausgewertet. Die Darstellung der mittleren Infiltratdichte erfolgte als Zellen/mm² ± SEM.

Die Auswertung der Albuminfärbung wurde anhand einer Grauskalenanalyse am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Hierfür wurden jeweils vier bis sechs Photos vergleichbarer histologischer Areale nach stets gleichem Muster von je drei zervikalen, thorakalen sowie lumbalen Querschnitten pro Tier bei einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe der *Scion Image* Software ausgewertet und die Ergebnisse als *Arbitrary units* ± SEM dargestellt.

2.10 Zellbiologische Methoden

2.10.1 Herstellen von Einzelzellsuspensionen aus sekundären Lymphorganen

Lymphknoten und Milzen wurden nicht perfundierten Tieren entnommen und in 15 ml-Falcons mit EH-Medium überführt. Zur Herstellung der Einzelzellsuspensionen wurden die Organe mit Medium in je ein Zellsieb gegeben und mit Hilfe eines 1 ml- beziehungsweise 5 ml-Spritzenstempels durch das Sieb in eine Petrischale passiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde nach Resuspension wieder in ein Falcon überführt und zentrifugiert (8 min., 300 g, 4°C). Die Überstände wurden abgesaugt, die Pellets mit Medium gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach diesem Schritt wurden die Lymphknotenpellets in je 2 ml, die Milzpellets in je 10 ml EH-Medium resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe der Zählkammer bestimmt.

2.10.2 Bestimmung der Zellzahl

10 µl der jeweiligen Zellsuspension wurden mit 10 µl (oder einem größeren Volumen) Trypanblaulösung versetzt (Verdünnungsfaktor). 10 µl dieser Mischung wurden auf die *Neubauer improved* Kammer aufgetragen. 16 Kleinquadrate wurden mikroskopisch ausgezählt. Die Zellzahl/ml wurde folgendermaßen berechnet:

Zellzahl/ml = gezählte Zellen x Verdünnungsfaktor x 10⁴ (Multiplikationsfaktor)

2.10.3 Isolierung von Lymphozyten aus dem Rückenmark

Für die Isolierung der Lymphozyten aus dem Rückenmark mittels Dichtezentrifugation, wurden die Tiere mit 0,9% NaCl-Lösung perfundiert. Daraufhin wurde das Rückenmark herauspräpariert, welches anschließend mit einem 10 ml-Spritzenstempel in einer Petrischale zerkleinert und in 20 ml Resuspensionspuffer aufgenommen wurde. Nach Resuspendieren wurde die Zellsuspension in ein 50 ml-Falcon überführt. Nach zehn Minuten Zentrifugation (530 g, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 6 ml 30% Percoll-Lösung resuspendiert. In der Zwischenzeit wurden die Percollgradienten hergestellt. Hierfür wurden 4 ml einer 45% Percoll-Lösung in ein 15 ml-Falcon vorgelegt und vorsichtig mit 2 ml einer 70% Percoll-Lösung unterschichtet. Zuletzt wurden die Zellsuspensionen auf die Percoll-Gradienten aufgetragen. Nach einer 20 minütigen Zentrifugation (1100 g, 4°C, ohne Bremse) wurde das überflüssige Myelin, das sich auf den Gradienten abgesetzt hatte, abgesaugt. Die Lymphozyten, die sich in den beiden Interphasen der verschiedenen konzentrierten Percoll-Lösungen anreicherten, wurden

vorsichtig mit einer Spritze abgenommen, in ein neues 50 ml-Falcon überführt und zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (10 min., 530 g, 4°C). Daraufhin wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt.

2.10.4 Isolierung und adoptiver Transfer markierter, enzephalitogener T-Zellen

Für den Transfer markierter, enzephalitogener T-Zellen wurden Einzelzellsuspensionen aus Milzen an EAE erkrankter Tiere hergestellt. T-Zellen wurden mit Hilfe eines AUTO Macs-Gerät (Miltenyi) durch magnetische Zellseparation (Pan T Cell Isolation Kit) getrennt. Die erhaltenen Zellen wurden in PBS suspendiert und mit 50 nmol/l CFSE inkubiert (10 min., 37°C, im Wasserbad). Nach Abbruch der Reaktion durch Zugabe von 2% FCS folgten zwei Waschschriffe mit 2% FCS/PBS. Jede Empfängermaus (mit einem durchschnittlichen Krankheitsscore von drei bis vier) erhielt 5×10^6 der markierten Zellen. Eine Stunde nach intravenöser Gabe der Zellen in die Schwanzvene wurde den Tieren entweder PBS (als Kontrolle) oder 100 mg/kg Dex i.p. verabreicht und die Behandlung an den zwei darauffolgenden Tagen wiederholt. Zehn Stunden nach der letzten Applikation wurden T-Zellen aus Milzen und Rückenmark der Empfängertiere isoliert und die Häufigkeit CFSE-positiver Zellen unter den $CD3^+CD4^+$ T-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Als spezifische Migration wurde das Verhältnis der relativen Häufigkeit CFSE-positiver Zellen im Rückenmark zu der relativen Häufigkeit CFSE-positiver Zellen in den Milzen definiert.

Für den Transfer markierter, naiver T-Zellen in präventiv behandelte Tiere wurden Einzelzellsuspensionen aus Milzen gesunder Tiere wie beschrieben hergestellt und mit CFSE markiert. 1 bis 5×10^6 CFSE positive T-Zellen wurden immunisierten oder nicht immunisierten Empfängermausen, die drei Tage lang präventiv mit 100 mg/kg MP, Dex oder PBS behandelt wurden, unter Narkose intravenös verabreicht. Nach zehn Tagen wurden den Tieren die Milzen entnommen und Einzelzellsuspensionen wie beschrieben hergestellt. Nach einer CD4- und CD8-Färbung wurde die Proliferation der transferierten, markierten T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

2.10.5 Zellkultur

Für Zellkultur-Experimente wurden HEK-Zellen (engl. *Human Embryonic Kidney cells*, Nierenkarzinom-Zelllinie) und SH-Sy5y-Zellen (Neuroblastom-Zelllinie) verwendet. Alle Versuche wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt und die Zellen in wassergesättigter Atmosphäre unter 5% CO₂ bei 37°C kultiviert.

Pro Zellkulturflasche (250 ml) wurden ca. 1 bis 3×10^6 Zellen in 10 ml des jeweiligen Mediums ausgesät. Zur Erhaltung der jeweiligen Zelllinien wurde ein- bis zweimal wöchentlich ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen je nach Konfluenz des Zellrasens ein- bis zweimal wöchentlich geteilt.

Für die Teilung (Passage) der adhärenenten Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 10 ml 1x PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurden die Zellen etwa drei Minuten mit 2 ml Trypsin-EDTA bei 37°C bis zur Abrundung der Zellen (mikroskopische Kontrolle) inkubiert. Diese Reaktion wurde durch die Zugabe von 8 ml des jeweiligen serumhaltigen Mediums gestoppt. Nach Vereinzeln der Zellen durch mehrmaliges Aufsaugen mit der Pipette wurde die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen in der gewünschten Dichte ausgesät oder für Zellkulturexperimente auf Zellkulturplatten ausplattiert.

2.10.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit, Zellen anhand ihrer Größe und Struktur, sowie ihrer extra- und intrazellulärer Antigene voneinander zu unterscheiden. Hierfür werden die zu untersuchenden Zellen mit Farbstoffen oder Antikörpern versetzt, die gegen spezielle Proteine der Zellen gerichtet und ihrerseits direkt oder indirekt mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind. Die markierten Zellen werden im Durchflusszytometer einzeln an einem Laser vorbeigeleitet. Dabei ermöglicht die gestreute und reflektierte Strahlung des Lasers und das von den fluoreszenzmarkierten Antikörpern und Proteinen emittierte Licht Aussagen über Granularität und Größe und somit über Subpopulationen der Zellen. Sollen Zellen nicht nur extra-, sondern auch intrazellulär charakterisiert werden, können diese in einem zweiten Schritt direkt nach erfolgter Oberflächenfärbung intrazellulär markiert werden.

Für extra- und intrazelluläre Färbungen wurden 250.000 beziehungsweise 500.000 Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen (5 min., 300 g, 4°C). Anschließend wurde eine Mischung der entsprechenden (Oberflächen-)Antikörper zu den Proben hinzu pipettiert. Die Proben wurden kurz gemischt und bei 4°C für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert.

Für darauf folgende intrazelluläre Färbungen (wie z.B. FoxP3 und IL-17) wurden die Proben zur Fixierung der Zellen und Permeabilisierung der Zellmembranen mit je 250 µl Fix/Perm-Lösung (1:4) für 30 Minuten im Dunkeln (RT) versetzt. Es folgten drei Waschschrte – einmal mit 3 ml FACS- und zweimal mit 1 ml 1x Permeabilisierungspuffer

(1x Perm-Puffer). Daraufhin wurde 15 Minuten lang im Dunkeln (RT) mit je 100 µl 2% Rattenserum/1x Perm-Puffer blockiert. Anschließend wurde eine Mischung hinzu pipettiert, welche pro Probe 100 µl des 1x Perm-Puffers und die jeweilige Menge des Antikörpers enthielt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten im Dunkeln (RT) folgten zwei Waschschriffe mit je 1 ml 1x Perm-Puffer. Die Proben wurden in 250 µl FACS-Puffer aufgenommen und mit den Geräten FACS *Calibur* beziehungsweise FACS *Canto* gemessen und mit dem Programm *Cell Quest™* ausgewertet.

Für durchflusszytometrische Apoptose-Untersuchungen in immortalisierten Zelllinien wurden HEK-Zellen sowie SH-SY5Y-Zellen eingesetzt. Um eine Aussage über das Ausmaß von Apoptose unter der Zugabe von CpdA im Vergleich zu Dex machen zu können, wurden diese Zellen mit 7-AAD und AnnexinV-FLUOS beziehungsweise mit AnnexinV-Cy5 markiert und anschließend durchflusszytometrisch bestimmt. Durch die Doppelfärbung mit 7-AAD, einem DNS-interkalierenden Farbstoff, und AnnexinV, einem Calcium-abhängigen Phospholipid-bindenden Protein, kann man lebende Zellen (7-AAD und AnnexinV negativ) von Zellen unterscheiden, die sich im frühen (7-AAD negativ, AnnexinV positiv) beziehungsweise späten Apoptose-/Nekrose-Stadium (7-AAD und AnnexinV positiv) befinden.

Für die Experimente wurden 100.000 beziehungsweise 200.000 Zellen/ml/Vertiefung auf einer 24-Well-Platte ausplattiert und über Nacht inkubiert (37°C, 5% CO₂). Die Apoptose-Färbung wurde zu den Zeitpunkten 0 Std., 6 Std., 24 Std. und 48 Std. durchgeführt, wobei der 0 Std.-Wert der Zeitpunkt der Substanzzugabe war. Für die Färbung wurden die Überstände der Zellen abgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Zum Lösen der Zellen vom Plattenboden wurden die Zellen für 2 Minuten mit 100 µl Trypsin/Vertiefung inkubiert (37°C). Nach Abstoppen dieser Reaktion durch die Zugabe von 600 µl des entsprechenden Mediums, wurden die Zellsuspensionen in die jeweiligen FACS-Röhrchen überführt, mit FACS-Puffer auf 2 ml aufgefüllt und abzentrifugiert (5 min., 300 g, 4°C). In der Zwischenzeit wurde für die Doppelfärbung eine Mischung pipettiert, die pro Probe 100 µl 1x AnnexinV-Bindungspuffer, 2,5 µl AnnexinV-FLUOS beziehungsweise 1,0 µl AnnexinV-Cy5 und 0,1 µl einer 7-AAD-Stocklösung [4mg/ml] enthielt. Nach Abschütten der Überstände wurden je 100 µl dieser Mischung auf die FACS-Röhrchen verteilt und die Zellen im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach 15 Minuten wurden die Proben direkt vermessen.

Das Apoptoseverhalten der Zellen wurde unter Dex und CpdA untersucht, wobei die Substanzen in Konzentrationsbereichen von 10⁻³ mol/l bis 10⁻⁷ mol/l eingesetzt wurden. Der Pan-Caspase Inhibitor Q-VD-OPh wurde in einer Endkonzentration von 20 µmol/l eingesetzt.

Um eine Aussage über das Ausmaß von Apoptose in Thymozyten und peripheren T-Zellen unter Zugabe von CpdA im Vergleich zu Dex machen zu können, wurden doppel-positive Thymozyten ($CD4^+CD8^+$) und periphere $CD4^+$ T-Zellen aus der Ratte isoliert und *in vitro* mit Dex (10^{-6} mol/l) beziehungsweise CpdA (10^{-5} mol/l) versetzt. Nach zwei, vier, sechs, acht, zehn und 24 Stunden Inkubation wurde die relative Überlebensrate nach Färbung mit 7-AAD und AnnexinV-Cy5 durchflusszytometrisch bestimmt (FACS *Canto*, Diva Software).

Diese Versuche wurden in Kooperation mit Frau Dr. Denise Tischner, Zelluläre und Molekulare Immunologie der Universität Göttingen, durchgeführt.

Um eine Aussage über die Apoptose-Induktion in Abhängigkeit des GR machen zu können, wurden murine GR-defiziente ($GR^{-/-}$) sowie GR positive ($GR^{+/+}$) Thymozyten aus 18,5 Tage alten Embryonen heterozygoter $GRN^{+/-}$ Mäuse isoliert und *in vitro* mit unterschiedlichen Konzentrationen Dex (10^{-6} mol/l bis 10^{-9} mol/l) beziehungsweise CpdA (10^{-5} mol/l und 10^{-6} mol/l) inkubiert. Nach 24 Stunden Inkubation wurde die relative Überlebensrate nach Färbung mit 7-AAD und AnnexinV-Cy5 durchflusszytometrisch bestimmt (FACS *Canto*, Diva Software).

Diese Versuche wurden in Kooperation mit Frau Dr. Denise Tischner, Zelluläre und Molekulare Immunologie der Universität Göttingen, durchgeführt.

2.10.7 Proliferationsassay

Um eine Aussage über die Teilungsfähigkeit von Zellen treffen zu können, wurden Proliferationsassays unter Zugabe von tritiiertem Thymidin ($[^3H]$ Thymidin) durchgeführt. $[^3H]$ Thymidin wird als radioaktiv markiertes Nukleotid bei der Neusynthese in die DNS eingebaut und kann nach einer mehrstündigen Inkubationszeit mittels eines *Counters* gemessen werden. Ein vermehrter Einbau von $[^3H]$ Thymidin in die DNS lässt auf eine gesteigerte Proliferation der Zellen schließen.

Als Ausgangsmaterial für Proliferationsassays dienen Lymphknoten- beziehungsweise Milzzellsuspensionen erkrankter Tiere. Je 100 μ l Zellsuspension mit 300.000 Lymphknoten- beziehungsweise 600.000 Milzzellen wurden in eine 96-Well-Rundbodenplatte pipettiert und mit verschiedenen Stimuli versetzt (MOG-Peptid₃₅₋₅₅ [20 μ g/ml] und ConA [1,25 μ g/ml] beziehungsweise Medium). Nach einer Inkubation von 48 Stunden (37°C, 5% CO_2) wurden die Zellen mit je 25 μ l/Vertiefung $[^3H]$ -Thymidin versetzt und für weitere 16 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden mit Hilfe eines *Harvesters* (FilterMate, Perkin Elmer) auf Filtern geerntet. Nach Trocknen der Filter wurden diese bei 70°C im Trockenschrank mit einer Folie MeltiLexA, welche den Szintillator enthielt, verschmolzen und für die

Messung in den *Counter* gegeben. Für die Auswertung der Proliferationsassays wurde der sogenannte Stimulationsindex (SI) gebildet, welcher das Verhältnis zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen darstellt.

2.10.8 Zytokinbestimmung mittels ELISA

Der ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) wird zu den quantitativen Immunoassays gezählt, mit denen die Konzentration von Antigenen, hier zum Beispiel Zytokinen, anhand des Substratumsatzes kolorimetrisch bestimmt werden kann.

Als Ausgangsmaterial für die Zytokinbestimmung aus Zellüberständen wurden Lymphknoten- beziehungsweise Milzzellsuspensionen (Gewinnung siehe unter 2.10.1) der Tiere verwendet. Von den Einzelzellsuspensionen wurden 3×10^6 Lymphknoten- beziehungsweise 6×10^6 Milzzellen in eine 24-Well-Platte pipettiert, mit MOG₃₅₋₅₅-Peptid [20 µg/ml], ConA [1,25 µg/ml] als unspezifisches Stimulans oder Medium versetzt und für 72 Stunden (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min., 830 g, 4°C), Überstände abgenommen und zur quantitativen Bestimmung der Zytokine IFN γ und IL-10 nach folgendem Protokoll verarbeitet.

96-Well-Flachboden (Maxisorp) Platten wurden mit je 50 µl/Vertiefung des jeweiligen *Capture*-Antikörpers im entsprechenden Puffer und Verdünnung über Nacht bei 4°C inkubiert (Tab. 2-2). Nach dreimaligem Waschen mit 0,05% Tween 20 in PBS wurden unspezifische Bindungsstellen mit 200 µl/Vertiefung 10% FCS in PBS (beziehungsweise 1% BSA in PBS) blockiert (bei RT). Nach 60 Minuten wurde dreimal mit 0,05% Tween 20 in PBS gewaschen und die Platten mit Standardlösungen und Proben (bei RT) versetzt. Die Standardlösungen wurden nach Angaben des Herstellers gefertigt, so dass eine entsprechende Verdünnungsreihe entstand. Nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten wurden die Platten sechsmal mit 0,05% Tween 20 in PBS gewaschen und mit dem Detektions-Antikörper und HRP-Entwicklungsreagenz inkubiert. Für den IL-10 und IFN- γ ELISA wurden je 50 µl/Vertiefung Detektions-Antikörper (siehe Tab. 2-2) und je 50 µl/Vertiefung HRP-Entwicklungsreagenz (1:250) in 10% FCS in PBS gleichzeitig zugegeben. Nach 60 Minuten (bei RT) wurde sechsmal mit 0,05% Tween 20 in PBS gewaschen und pro Vertiefung 100 µl Substanzlösung (TMB) zugegeben. Nach einer 30-minütigen Farbentwicklung im Dunkeln wurde die Reaktion mit einmolarer Schwefelsäure je (50 µl/Vertiefung) abgestoppt und die optische Dichte mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte anhand der ermittelten Standardkurve (*Graph Pad Prism version 4*).

Zum Nachweis von IL-17 wurde zur Verdünnung der Reagenzien und zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen 1% BSA in PBS verwendet. Der Detektions-Antikörper

und das HRP-Entwicklungsreagenz wurden in zwei getrennten Schritten zugegeben. Nach 60-minütiger Inkubation (RT) mit dem Detektions-Antikörper (1:250) in 1% BSA in PBS wurde sechsmal mit 0,05% Tween 20 in PBS gewaschen. Anschließend wurde das HRP-Entwicklungsreagenz (1:3000) in 1% BSA in PBS für 60 Minuten (RT) zugegeben. Alle weiteren Schritte wurden analog zum oben beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Tab. 2-2 Auflistung der unterschiedlichen Antikörper und Pufferlösungen des INF γ , IL-10 und IL-17 ELISA

ELISA	Capture-AK	Puffer	Detektions-AK
INF γ	Anti-mouse IFN- γ mAb (1:250), BD	0,1 mol/l Carbonat- Bicarbonat-Puffer pH 9,5	Biotinyl. Anti-mouse IFN- γ mAb (1:250), BD
IL-10	Anti-mouse IL-10 mAb (1:250), BD	0,2 mol/l Natriumphosphat- Puffer pH 6,5	Biotinyl. Anti-mouse IL-10 mAb (1:250), BD
IL-17	Anti-mouse IL-17 (1:250), R&D	0,15 mol/l Phosphat-Puffer pH 7,3	Biotinyl. Anti-Mouse IL-17 (1:250), R&D

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 DNS-Isolierung aus Gewebeproben

Im Alter von drei Wochen wurden den zu genotypisierenden Mäusen ca. 5 mm der Schwanzspitze gekappt und zusammen mit 500 μ l Lysispuffer und 25 μ l Proteinase K (10 mg/ml) über Nacht bei 56°C auf dem Wärmeblock verdaut. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben fünf Minuten bei 90°C aufgeköcht, um die Proteinase K zu stoppen. Daraufhin wurden die Proben fünf Minuten lang zentrifugiert (14000 g, 4°C) und der Überstand mit der DNS in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Um die DNS zu fällen, wurden 500 μ l Isopropanol hinzugegeben und durchmischt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min., 14000 g, 4°C) wurde der Isopropanol-Überstand abgenommen und das Pellet mit Ethanol 70% gewaschen. Nach fünfminütigem Zentrifugieren (14000 g, 4°C) wurde das überschüssige Ethanol abgenommen und die Probe an der Luft getrocknet. Nach Zugabe von 100-200 μ l Wasser löste sich die DNS innerhalb von ca. 30 Minuten auf dem Wärmeblock bei 40°C.

2.11.2 Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist es möglich, spezifische DNS-Fragmente enzymatisch *in vitro* zu amplifizieren. Im ersten Schritt der PCR wird die doppelsträngige DNS durch Erhitzen in einzelsträngige DNS überführt (Denaturierung). Durch die Temperatursenkung kommt es im zweiten Schritt zur Anlagerung der Oligonukleotid-*Primer* an die Matrizen-DNS (Anlagerung/*Annealing*) und somit zur Flankierung der zu amplifizierenden komplementären Zielregionen. Im dritten Schritt werden die *Primer* bei erhöhter Temperatur mit Hilfe der Polymerase komplementär an die ursprüngliche doppelsträngige DNS-Matrize verlängert (Elongation). Je nach PCR wird eine bestimmte Anzahl von Amplifikationszyklen durchgeführt, wodurch es zur Akkumulation der durch die *Primer* flankierten DNS-Region kommt.

Zur Genotypisierung heterozyoter GRN^{+/-} Mäuse, wurden die erhaltenen DNS-Proben dieser Tiere (siehe unter 2.11.1) mittels einer PCR amplifiziert (PCR-Programm siehe unten) und diese anhand eines Agarosegels in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Für die PCR wurde pro 1 µl der gewonnenen DNS folgender Ansatz pipettiert:

2,5 µl 10x Puffer (15 mM MgCl₂)
 1,0 µl dNTPs (5mM)
 0,5 µl *Primermix* (10 µM)
 1,0 µl Taq-Polymerase (1U/µl)
 19 µl Wasser

Der *Primermix* bestand aus folgenden *Primern*, wobei GR30R und GR12 zur Erkennung und Amplifikation des GR-Gens eingesetzt wurden:

GT5´	gtg tct tga tga tag tct gct c
GT3´	cca tta cct tcc agg ttc att c
GR30R	gaa tga gaa tgg cca tgt act ac
GR12	cat gct gct agg caa atg atc tta ac

PCR-Programm

5,0 min.	94°C	} 35 Amplifikationszyklen
1,0 min.	94°C	
1,0 min.	60°C	
1,0 min.	72°C	
10,0 min.	72°C	

Nach der PCR wurden 10 µl der erhaltenen Proben mit 2 µl eines sechsmal Ladepuffers gemischt und auf ein ethidiumbromidhaltiges Agarosegel (1,5%) aufgetragen, wobei in die erste Tasche des Gels ein Molekulargewichts-Standard (*Mass Ruler-Low Range*) gefüllt wurde. Nach einer Laufzeit von 60 Minuten bei 80 Volt konnten die Banden mittels einer UV-Lampe detektiert und somit dem jeweiligen Genotyp zugeordnet werden. Die DNS GRN-positiver Mäuse wies eine für den GR spezifische Bande bei ca. 225 Basenpaaren (bp) auf. Bei heterozygoten GRN^{+/-} Mäusen konnte eine zusätzliche Bande bei 520 bp detektiert werden, welche als Nachweis für die spezifische Deletion des GR diente.

Zur Genotypisierung Cre-exprimierender Mäuse wurde die DNS dieser Tiere isoliert (siehe 2.11.1) und mittels einer PCR amplifiziert (PCR-Programm siehe unten). Für die PCR wurde pro 2 µl der gewonnenen DNS folgender Ansatz pipettiert:

3,0 µl dNTPs (2 mM)
 1,0 µl *Primer* 1084 (25 pM)
 1,0 µl *Primer* 1085 (25 pM)
 3,0 µl 10x Puffer
 1,5 µl MgCl₂
 0,3 µl Taq-Polymerase (5U/µl)
 18,2 µl Wasser

Zur Erkennung und Amplifizierung des Cre-Rekombinase-Gens dienten folgende *Primer*:

Primer 1084 5' gcg gtc tgg cag taa aaa cta tc 3'

Primer 1085 5' gtg aaa cag cat tgc tgt cac tt 3'

PCR-Programm

5,0 min.	94°C	} 40 Amplifikationszyklen
0,5 min.	94°C	
0,5 min.	56°C	
0,5 min.	72°C	
10,0 min.	72°C	

Nach Auftragen und Auftrennung der Proben auf einem 1,5%igen ethidiumbromidhaltigen Agarosegel (80 Volt, 60 min.) konnten die GR-defizienten Tiere von Wildtyp-Mäusen durch das Auftreten einer Bande bei ca. 100 bp unterschieden werden, welche als Nachweis für das Vorhandensein der Cre-Rekombinase diente.

2.12 Spektrometrische und spektroskopische Analysemethoden

2.12.1 Massenspektrometrie (LC/MS)

Diese Experimente wurden in Kooperation mit Herrn Dr. Holm Frauendorf am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Universität Göttingen durchgeführt.

Die Massenspektrometrie ist eine Methode zur Messung des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses von Teilchen. Ist die Ladung eines Teilchen bekannt, kann somit direkt auf seine Masse geschlossen werden.

Ein Massenspektrometer besteht aus der Ionenquelle, dem Analysator und dem Detektor. In der Ionenquelle wird die zu untersuchende Substanz ionisiert. Für die Ionisation stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, wobei hier nur die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) beschrieben wird.

Bei der ESI wird der Analyt in Lösung durch eine Kapillare gefördert, an deren Spitze eine Spannung angelegt ist. Dabei entstehen gleichgeladene Ionen, die sich gegenseitig abstoßen und ein Aerosol bilden. Durch Verdampfung des Lösungsmittels kommt es aufgrund der wachsenden Ladungsdichte und somit steigender elektrostatischer Abstoßung an der Oberfläche der Tröpfchen zu einer Verkleinerung dieser. Schließlich bleibt nur noch der Analyt in geladener Form übrig. Die Ladung der Ionen ist von der Art der an der Kapillare angelegten Spannung abhängig.

Die Trennung der erzeugten Ionen wird im Analysator nach Masse-zu-Ladungs-Verhältnis durch elektrostatische Felder durchgeführt. Die in den Analysator kommenden, geladenen Teilchen entladen sich am Detektor und ergeben ein messbares Signal.

Zur Trennung der beim Lösen von CpdA entstehenden Produkte wurde im Rahmen dieser Arbeit vor den massenspektrometrischen Analysen eine Trennung mittels *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) vorgenommen.

Alle Messungen wurden mit dem *ESI-Ion Trap* Massenspektrometer (Firma Finnigan) durchgeführt, dem eine *Rheos 4000* HPLC (Flux Instruments) vorgeschaltet war. CpdA wurde in Wasser (1 mg/ml), Ethanol 20% (1 mg/ml) und 1x PBS (0,5 mg/ml) gelöst und halbstündlich gemessen.

2.12.2 Kernspinresonanzspektroskopie (¹H-NMR-Spektroskopie)

Diese Experimente wurden in Kooperation mit Herrn Dr. John vom Institut für Anorganische Chemie der Universität Göttingen durchgeführt.

Die ¹H-NMR-Spektroskopie ist in der Analytik eine der wichtigsten, nicht destruktiven Methoden zur Aufklärung von Strukturen. Zugänglich sind fast alle Festkörper und Flüssigkeiten, die Atome mit ungerader Nukleonenzahl enthalten, wie das natürlich vorkom-

mende Wasserstoffisotop ^1H . Diese Atome besitzen einen von Null verschiedenen Kernspin und damit ein kernmagnetisches Moment. Diese Momente können als drehende Magneten aufgefasst werden, die sich um eine mikroskopische Achse bewegen. Ohne Einwirkung eines äußeren Magnetfeldes ist die Drehung der Kernspins im Raum völlig ungeordnet, sodass das gesamte magnetische Moment im zeitlichen Mittel Null ist. Wird ein äußeres Magnetfeld angelegt, richten sich die Kernspins entlang diesem aus.

Durch das Magnetfeld kommt es zu einer Aufspaltung der quantenmechanischen Energiezustände. Die Einstrahlung von Radiowellen kann verschiedene Übergänge in höhere Energiezustände induzieren. Die bei der Rückkehr in den energieärmeren Zustand freiwerdende Energie wird in Form einer elektromagnetischen Welle bestimmter Frequenz abgegeben, die durch den Empfänger detektiert wird. Die Wechselwirkung mit der elektromagnetischen Strahlung ist abhängig von der Elektronenhülle des jeweiligen Kerns und gibt somit Aufschluss über die Bindungsverhältnisse des jeweiligen Atoms und dessen chemische Umgebung.

Alle Messungen wurden an einem *Bruker Avance 500* durchgeführt, wobei D_2O beziehungsweise $\text{PBS/D}_2\text{O}$ als Lösungsmittel verwendet wurden. Als externer Standard wurde Tetramethylsilan eingesetzt, als interner Standard dienten die Restprotonen des jeweiligen Lösungsmittels.

2.13 Statistik

Alle statistischen Analysen wurden mittels *Graph Pad Prism Version 4* durchgeführt. Beim Vergleich zweier nicht normalverteilter, ungepaarter Gruppen mit kleinen Stichprobenumfängen wurde der Mann-Whitney Test angewendet. Alle Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler angegeben. p-Werte $> 0,05$ wurden als nicht signifikant betrachtet (n.s.); $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$. Um den Unterschied des Krankheitsverlaufes zwischen einzelnen Therapiegruppen zu bestimmen, wurden die gesamten Verlaufskurven miteinander verglichen. Bei der Präventivgabe wurden statistische Analysen ab Beginn der Erkrankung durchgeführt, bei therapeutischer Gabe einen Tag nach Therapiebeginn bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes.

3 Ergebnisteil - Glukokortikoide

3.1 Dexamethason verbessert den Krankheitsverlauf der MOG-induzierten EAE in Mäusen

Die antiinflammatorische Wirkung von GC wird seit Jahrzehnten zur Behandlung akuter Schübe der MS genutzt, ohne allerdings den zugrunde liegenden Wirkmechanismus zu kennen. In bisher verwendeten Rattenmodellen konnten aufgrund fehlender genetisch veränderter Modelle kaum mechanistische Untersuchungen zur GC-Hochdosis-Pulstherapie durchgeführt werden. Um dies detailliert zu analysieren, wurde im Folgenden ein geeignetes Applikationsschema für die GC-Hochdosis-Therapie in der MOG₃₅₋₅₅-EAE in der C57Bl/6 Maus eingeführt.

In dieser Arbeit wurde ein präventives und therapeutisches Behandlungsschema im MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE-Modell der C57Bl/6 Maus etabliert. Die dreimalige präventive Gabe von 20 beziehungsweise 100 mg/kg Dex zum Zeitpunkt der aktiven Immunisierung (an den Tagen -1, 0 und 1) zeigte, dass der Beginn des Krankheitsverlaufes im Vergleich zur Kontrollgruppe verzögert war. Während die Kontrollgruppe bereits am sechsten Tag nach der aktiven Immunisierung erste Krankheitszeichen zeigte, erkrankten die Dex-behandelten Tiere ca. vier Tage später. Ferner kam es durch die präventive Dex-Applikation scheinbar dosisunabhängig zu einer signifikanten Reduktion der Krankheitschwere ($p \leq 0,001$), die sogar bis zum Ende der Beobachtungszeit (Tag 24) anhielt (Abb. 3-1).

Beim therapeutischen Ansatz wurde Dex an den Tagen 10, 11 und 12 appliziert, nachdem die Tiere einen durchschnittlichen Krankheits-Score von ca. zwei bis drei zeigten. Die Verabreichung von 100 mg/kg Dex führte zu einer sofortigen Verbesserung des Krankheitsverlaufes, welcher sich zwei Tage nach der letzten Dex-Injektion wieder verschlechterte. Der Schweregrad der Erkrankung blieb allerdings signifikant ($p \leq 0,001$) unter dem der Kontrollgruppe (Abb. 3-2).

Um eine Beziehung zwischen der applizierten Dosis und der Wirksamkeit des GC herzustellen, wurden im therapeutischen Ansatz unterschiedlichen Dosen Dex (0,8 mg/kg, 4,0 mg/kg und 20 mg/kg) verabreicht. Klinische Beobachtungen zeigten, dass der therapeutische Effekt parallel zu jeder weiteren Dosisreduktion abnahm, trotzdem aber noch bei der niedrigsten Dosis von 0,8 mg/kg vorhanden war (Abb. 3-3). Zusammenfassend lässt sich daher feststellen, dass GC dosisabhängig wirken und sowohl im präventiven als auch therapeutischen Ansatz eine effektive Option zur Behandlung der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE in der C57Bl/6 Maus darstellen.

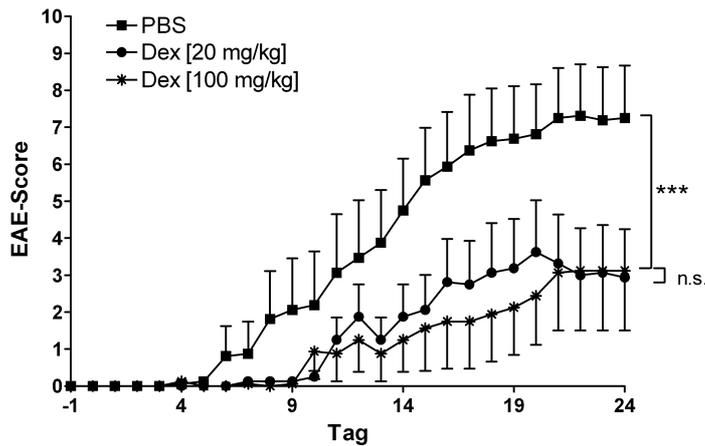


Abb. 3-1 Verzögerter und milderer EAE-Verlauf nach präventiver Dex-Gabe. Die präventive Applikation von Dex führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem verzögerten und milderen Krankheitsverlauf der MOG₃₅₋₅₅-EAE. Applikation von Dex bzw. PBS an den Tagen -1/0/1; n = 8.

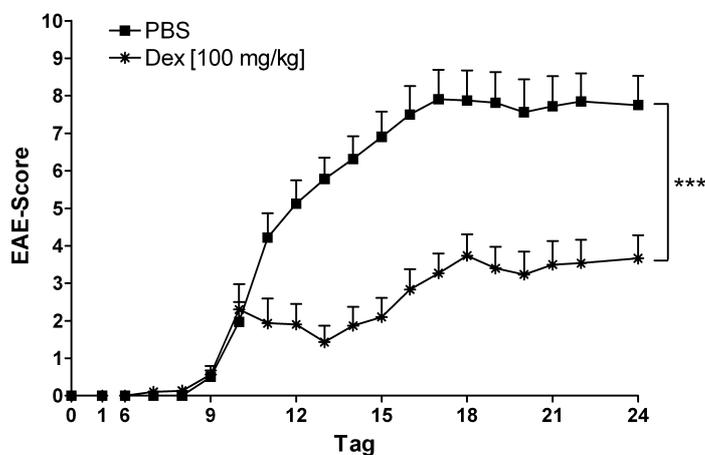


Abb. 3-2 Klinisch verbesserter EAE-Verlauf nach therapeutischer Dex-Gabe. Die therapeutische Gabe von Dex zeigte im Gegensatz zur Kontrollgruppe einen milderen Krankheitsverlauf der MOG₃₅₋₅₅-EAE. Injektion von Dex bzw. PBS an den Tagen 10/11/12; n = 11.

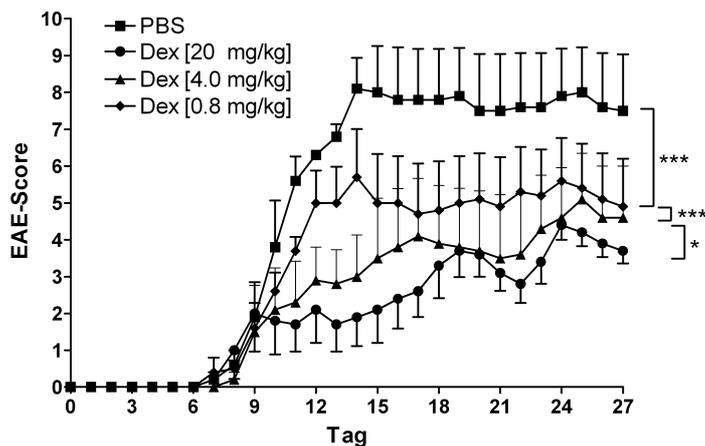


Abb. 3-3 Klinisch verbesserter EAE-Verlauf nach therapeutischer Gabe unterschiedlicher Dex-Dosen. Dosisabhängige Verbesserung des EAE-Verlaufes bei therapeutischer Gabe verschiedener Dex-Dosen. Injektion von Dex bzw. PBS an den Tagen 9/10/11; n = 5.

3.2 Glukokortikoide reduzieren die Leukozyteninfiltration in das ZNS und wirken protektiv auf die Blut-Hirn-Schranke

Um zu untersuchen, ob die klinischen Effekte der GC in der Therapie der EAE durch eine Reduktion der Leukozyteninfiltration widergespiegelt werden, wurden immunhistochemi-

sche Färbungen von Rückenmarksquerschnitten angefertigt. Dabei wurden sowohl therapeutisch als auch präventiv mit Dex behandelte Tiere analysiert.

T-Zellen und Makrophagen, die den größten Teil der ZNS-infiltrierenden Zellen bilden, konnten in Querschnitten präventiv behandelter Tiere (Tag -1, 0 und 1) kaum detektiert werden. Therapeutisch behandelte Tiere (Tag 9, 10 und 11) zeigten einige wenige Infiltrate, die aber im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant reduziert waren ($p \leq 0,05$) (Abb. 3-4, A, B).

Als weiteres Untersuchungsmerkmal der EAE dient die Integrität der BHS, die immunhistochemisch durch eine Albuminfärbung nachgewiesen werden kann. Ist die BHS gestört, kann es zum Aus- beziehungsweise Durchtritt von Albumin aus dem Blut in das ZNS kommen. Sowohl im therapeutischen wie auch im präventiven Ansatz wurde im Gegensatz zu den Kontrolltieren eine signifikant reduzierte Albumin-Färbung detektiert (Dex therapeutisch $p \leq 0,01$, Dex präventiv $p \leq 0,05$) (Abb. 3-4, C).

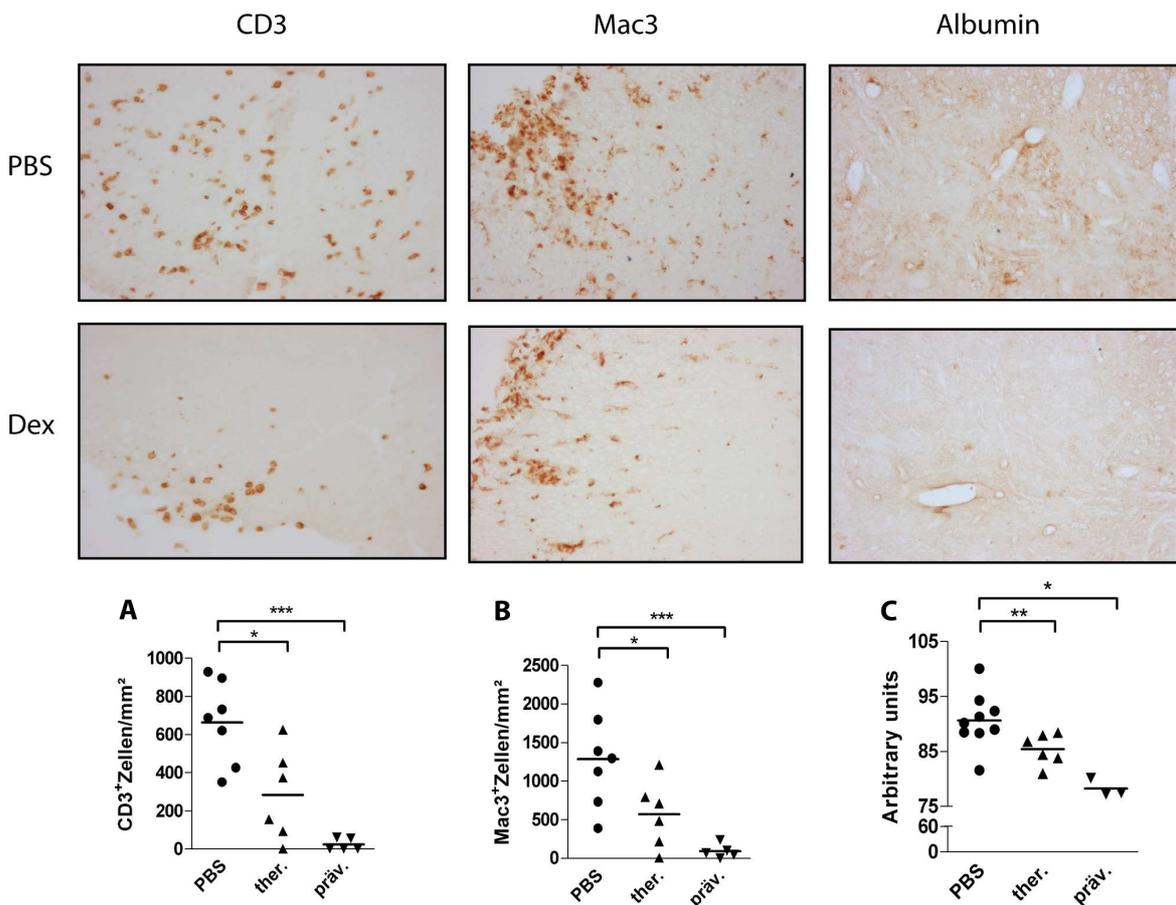


Abb. 3-4 Leukozyteninfiltration und BHS-Integrität in Kontroll- und Dex-behandelten Tieren. (Oben) Immunhistochemischer Nachweis von T-Zellen (CD3), Makrophagen/Mikroglia (Mac3) und der BHS-Integrität (Albumin) im zervikalen Rückenmark einer Kontroll- und einer therapeutisch mit Dex behandelten Maus; 200fache Vergrößerung. **(Unten)** Immunhistochemische Quantifizierung von T-Zellen **(A)**, Makrophagen/Mikroglia **(B)** und der BHS-Integrität **(C)** im Rückenmark von Kontrolltieren sowie therapeutisch und präventiv behandelten Mäusen (100 mg/kg Dex); jedes Symbol steht für ein Tier.

Nachdem beobachtet werden konnte, dass Dex zu einer reduzierten Leukozyteninfiltration in das ZNS führte, wurden nach Dex-Therapie sowohl Qualität als auch Quantität der Rückenmarks-Infiltrate untersucht. Dabei wurde die Wirkung auf T_H17 positive wie negative Zellen analysiert, da T_H17-Zellen neben T_H1-Zellen auch eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der EAE zukommt (Langrish *et al.*, 2005). Hierfür wurden Leukozyten mittels Dichtezentrifugation aus dem Rückenmark behandelter und unbehandelter C57Bl/6 Mäuse isoliert und zehn Stunden nach der dritten Injektion durchflusszytometrisch analysiert.

Wie in Abb. 3-5, A, B dargestellt, führte die dreimalige therapeutische Gabe hochdosierten Dex im Vergleich zu Kontrollmäusen zu einer signifikanten Reduktion der absoluten Zellzahl IL-17 positiver sowie IL-17 negativer Zellen. Prozentual betrachtet kam es in IL-17 positiven T-Zellen nach Dex zu einer geringen, aber dennoch signifikanten Erhöhung der Zellzahl, während die relative Häufigkeit LFA-1- und CD44- positiver T-Zellen nach Dex-Therapie unverändert blieb (Abb. 3-5, C). Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass hochdosierte GC unabhängig von der T-Helfer-Subpopulation zu einer reduzierten Lymphozyteninfiltration in das Rückenmark führen.

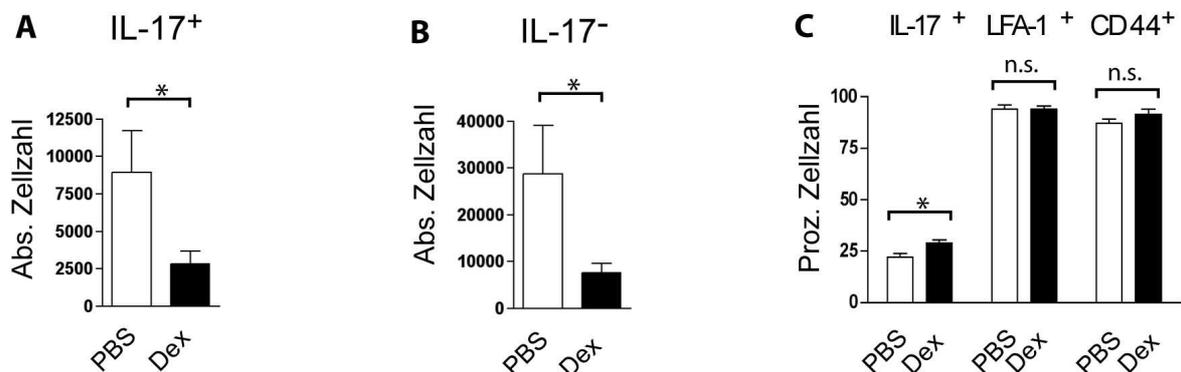


Abb. 3-5 Absolute und prozentuale Zellzahlen IL-17 positiver und negativer T-Zellen. (A, B) Quantifizierung von T-Zell-Subpopulationen im Rückenmark PBS- beziehungsweise therapeutisch mit Dex behandelter C57Bl/6 Mäuse mittels Durchflusszytometrie. (C) Bestimmung der IL-17-, LFA-1- und CD44-Expression CD3⁺CD4⁺ T-Zellen. Die totale Zellzahl bezieht sich auf alle aus dem Rückenmark isolierten, lebenden Zellen; die prozentuale Angabe bezieht sich auf die relative Häufigkeit der Zellpopulationen von CD4⁺ T-Zellen; n = 8.

3.3 Vermittlung therapeutischer Effekte über zytosolischen Glukokortikoid-Rezeptor

Obwohl hochdosierte GC seit Jahrzehnten zur Behandlung akuter Schübe der MS erfolgreich eingesetzt werden, sind die zugrunde liegenden Mechanismen dieser Therapie bis heute noch nicht vollständig geklärt. Dabei besteht die Diskussion, ob GC-Wirkungen mit Hilfe des cGR über genomische Mechanismen vermittelt werden oder ob diese durch

nicht-genomische Mechanismen, wie zum Beispiel Interaktionen mit Lipidmembranen, bedingt sind (Buttgereit *et al.*, 1998).

Um in diesem Kontext die Rolle des cGR auf molekularer Ebene zu analysieren, wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit heterozygote GR-defiziente Mäuse ($GRN^{+/-}$) mit einer bis zu 75%igen Reduktion der GR-Expression auf Proteinebene eingesetzt (Wang *et al.*, 2006).

Die Beobachtung des klinischen Krankheitsverlaufes PBS-behandelter $GRN^{+/-}$ Mäuse und der vergleichenden Kontrollgruppe ($GRN^{+/+}$) zeigte einen geringen Unterschied (Abb. 3-6). Nach dem Auftreten der ersten Krankheitszeichen wurden beide Tiergruppen an den Tagen 13, 14 und 15 mit einer Dosis von 4 mg/kg Dex behandelt, die, wie in Abb. 3-3 gezeigt wurde, in Wildtypen noch wirksam war. Während die GC-Applikation in den $GRN^{+/+}$ Tieren zu einer Verbesserung des Krankheitsverlaufes führte, konnte dieser Effekt in den GR-defizienten Tieren nicht bestätigt werden (Abb. 3-6).

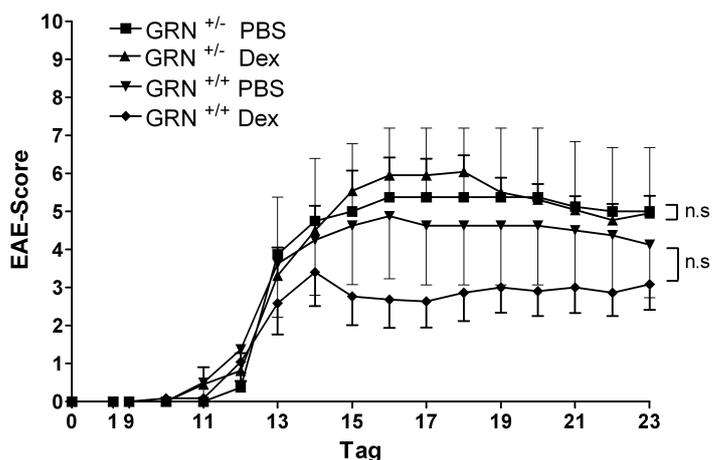


Abb. 3-6 Klinischer EAE-Verlauf heterozygoter, GR-defizienter Mäuse nach therapeutischer Dex-Applikation. Therapeutische Behandlung von $GRN^{+/+}$ und $GRN^{+/-}$ Mäusen mit 4 mg/kg Dex bzw. PBS an den Tagen 13/14/15; n = 4-11.

Um die Frage zu klären, ob die Therapieresistenz in den heterozygoten GR-defizienten Tieren auch histopathologisch widergespiegelt wurde, wurden sechs Stunden nach der letzten Injektion Rückenmarksquerschnitte angefertigt und immunhistochemisch analysiert. T-Zell- und Makrophagen/Mikroglia-Färbungen untermauerten die klinischen Beobachtungen der Dex-behandelten $GRN^{+/-}$ Tiere insofern, als keine Reduktion der Leukozyten im Vergleich zu den therapierten $GRN^{+/+}$ festgestellt werden konnte (Abb. 3-7, A, B). Auch die BHS zeigte in den $GRN^{+/-}$ Tieren nach Behandlung eine signifikant reduzierte Integrität ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu den $GRN^{+/+}$ Tieren (Abb. 3-7, C). Diese Ergebnisse bestätigen, dass der cGR im Kontext mit der EAE für die therapeutische Behandlung mit hochdosierten GC von essentieller Bedeutung ist.

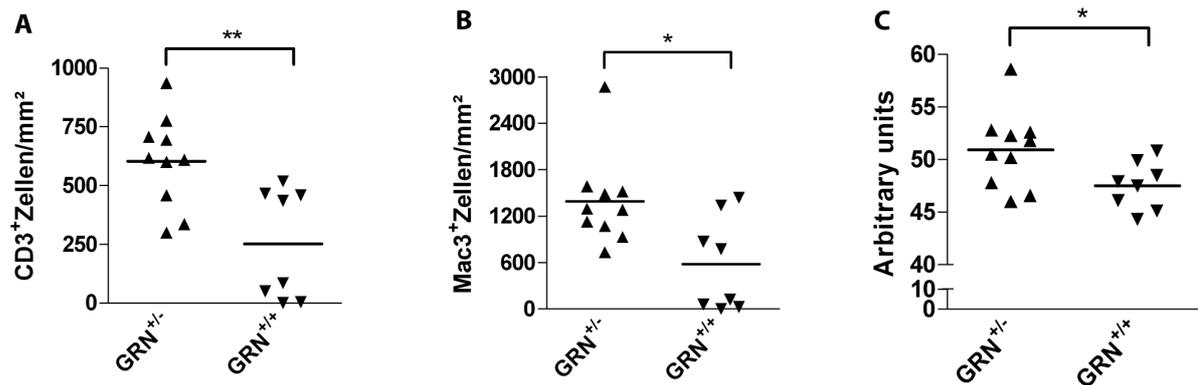


Abb. 3-7 Leukozyteninfiltration und BHS-Integrität in Dex-behandelten GR-defizienten Mäusen (GRN^{+/-}) und deren Vergleichsgruppe (GRN^{+/+}). Immunhistochemische Quantifizierung von T-Zellen (A), Makrophagen/Mikroglia (B) und der BHS-Integrität (C) im Rückenmark von GRN^{+/+} und GRN^{+/-} Mäusen nach therapeutischer Applikation von 4 mg/kg Dex.

3.4 Die Vermittlung therapeutischer Effekte ist in hämatopoetischen Zellen abhängig von der Anwesenheit des Glukokortikoid-Rezeptors

Im Zusammenhang mit der GC-Therapie gibt es eine Vielzahl von Zellen, die in der EAE als mögliche Zielzellen in Frage kommen. Darunter fallen hämatopoetische Zellen wie T-Zellen und Makrophagen, und nicht-hämatopoetische Zellen wie neuronale und endotheliale Zellen. Um diese beiden Gruppen auseinanderzuidividieren, wurden im folgenden Experiment hämatopoetische Stammzellchimären (GRN^{HSC-/-}) eingesetzt, bei welchen alle hämatopoetischen Zellen für den GR defizient waren, nicht jedoch die übrigen Körperzellen.

Nach Immunisierung konnte bei den GRN^{HSC-/-} Chimären im Gegensatz zur Vergleichsgruppe (GRN^{HSC+/+}) ein schwerwiegenderer Krankheitsverlauf beobachtet werden, der sich in einem ein bis zwei Tage früheren Krankheitsbeginn und einer rapiden Sterblichkeit manifestierte (Abb. 3-8). Während GRN^{HSC+/+} Tiere effektiv mit Dex behandelt werden konnten, was sich in einer schnellen und langanhaltenden Besserung des EAE-Scores zeigte, reagierten GRN^{HSC-/-} Tiere kaum auf die Dex-Therapie. Obwohl bei den GRN^{HSC-/-} Chimären nach der ersten Dex-Injektion ein kurzfristiger therapeutischer Effekt erkennbar war, verschlechterte sich der Zustand der Chimären rapide und führte zum Tod aller Tiere (Abb. 3-8).

Der verfrühte EAE-Beginn in der Gruppe der chimären Mäusen konnte in zwei voneinander unabhängigen Experimenten bestätigt und statistisch untermauert werden ($p \leq 0,05$). GRN^{HSC-/-} Chimären zeigten durchschnittlich vier Tage früher Krankheitssymptome als ihre Vergleichsgruppe (Abb. 3-9).

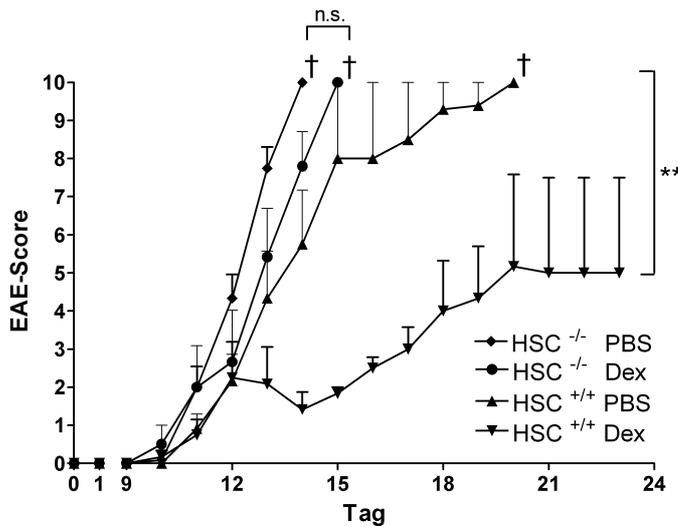


Abb. 3-8 Klinischer Verlauf hämatopoetischer Stammzellchimären und deren Vergleichsgruppe nach therapeutischer Dex-Applikation. Kein verbesserter Krankheitsverlauf von GRN^{HSC^{-/-}} Chimären durch therapeutische Dex-Gabe im Vergleich zu GRN^{HSC^{+/+}} Mäusen. Injektion von 100 mg/kg Dex bzw. PBS an den Tagen 11/12/13 (GRN^{HSC^{-/-}}) und 12/13/14 (GRN^{HSC^{+/+}}); n = 6; † = Tiere aus Tierschutz-rechtlichen Gründen getötet

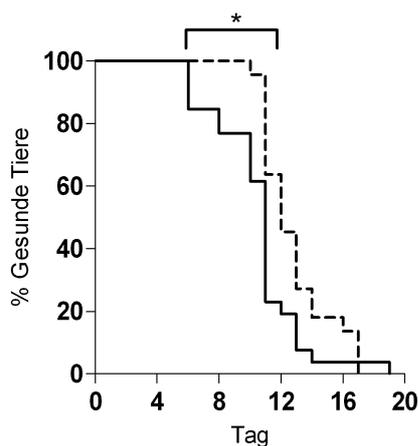


Abb. 3-9 Verfrühter Krankheitsbeginn un behandelter hämatopoetischer Stammzellchimären im Gegensatz zu deren Vergleichsgruppe. GRN^{HSC^{-/-}} Chimären (durchgezogene Linie) zeigen durchschnittlich vier Tage früher Krankheitssymptome als GRN^{HSC^{+/+}} Chimären (gestrichelte Linie); n = 26 (GRN^{HSC^{-/-}}) und n = 22 (GRN^{HSC^{+/+}}).

Immunhistochemische Untersuchungen der Rückenmarksquerschnitte bestätigten die klinischen Beobachtungen. Während die Anzahl der infiltrierten Leukozyten bei den GRN^{HSC^{-/-}} Tieren durch die GC-Therapie nicht vermindert war, konnte bei den GRN^{HSC^{+/+}} Tieren zum wiederholten Male die Reduktion der infiltrierten Leukozyten (T-Zellen und Makrophagen/Mikroglia) nachgewiesen werden (Abb. 3-10, A, B). Auch der Nachweis der BHS-Integrität zeigte in den chimären Mäusen nach Dex-Gabe im Gegensatz zu den Kontrollen keine Verbesserung (Abb. 3-10, C). Diese Ergebnisse deuten bei der Hochdosis-Pulstherapie auf eine bedeutende Rolle des cGR in hämatopoetischen Zellpopulationen hin.

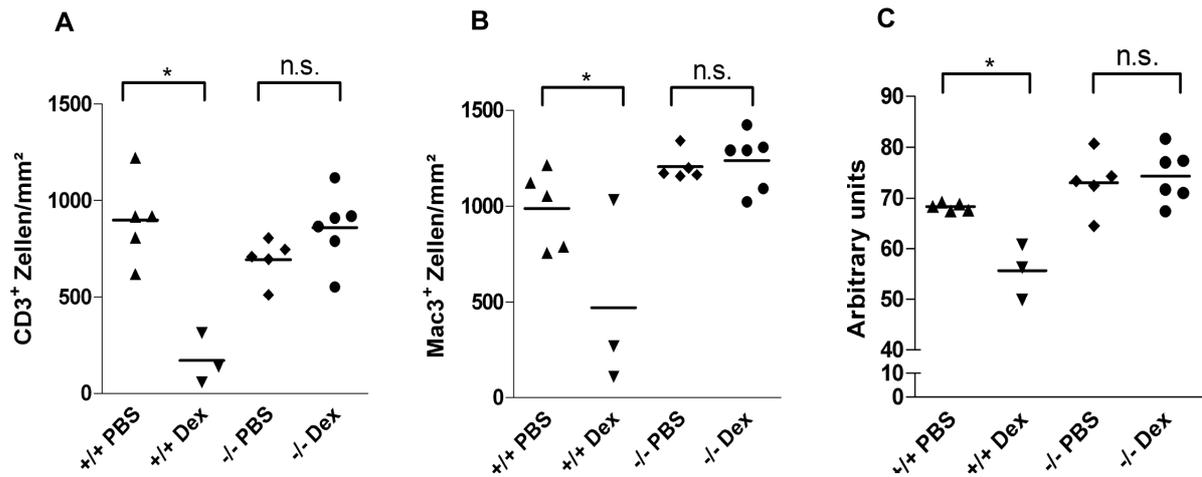


Abb. 3-10 Leukozyteninfiltration und BHS-Integrität in hämatopoetischen Stammzellchimären und deren vergleichenden Gruppe nach Dex-Therapie. Immunohistochemische Quantifizierung von T-Zellen (A), Makrophagen/Mikroglia (B) und der BHS-Integrität (C) im Rückenmark von hämatopoetischen Stammzellchimären (-/-) und deren Kontrollen (+/+), behandelt mit 100 mg/kg Dex beziehungsweise PBS.

3.5 Der Effekt von Glukokortikoiden ist abhängig von der Glukokortikoid-Rezeptor-Expression in T-Lymphozyten

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit stellte sich die Frage, welche Zellpopulation innerhalb des hämatopoetischen Kompartiments ein mögliches Ziel für GC darstellt. Da T-Zellen und Makrophagen den größten Teil der infiltrierenden Zellen in EAE-Läsionen ausmachen, wurden Zelltyp-spezifische GR-defiziente Tiere eingesetzt, denen der GR gezielt in myeloiden Zellen ($GR^{lysMCre}$) beziehungsweise in T-Zellen (GR^{lckCre}) fehlte.

Zuerst wurden $GR^{lysMCre}$ Mäuse analysiert. Sowohl die GR-defizienten Mäuse als auch deren Vergleichsgruppe (GR^{fllox}) zeigten einen vergleichbaren Krankheitsbeginn (Tag 11) und konnten an den Tagen 12, 13 und 14 erfolgreich mit hochdosiertem Dex behandelt werden. In beiden therapierten Gruppen kam es im Vergleich zu den mit PBS-behandelten Tieren zu einer signifikanten Verbesserung der Krankheitssymptome ($p \leq 0,05$), die bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes (Tag 17) anhielt (Abb. 3-11). Diese Beobachtungen zeigten in diesem Kontext keine Beeinflussung myeloider Zellen durch hochdosierte GC.

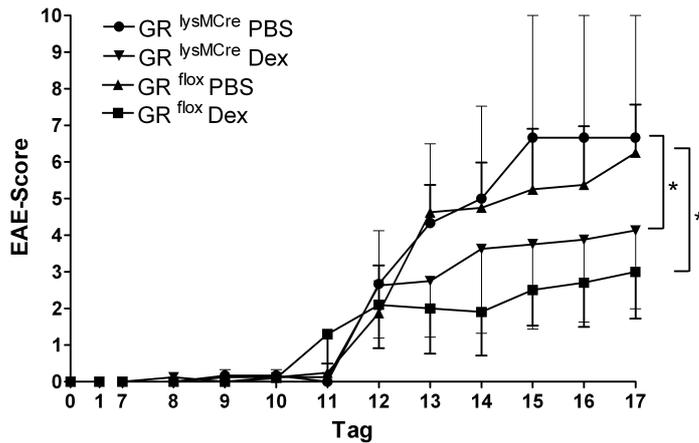


Abb. 3-11 Klinischer EAE-Verlauf von Mäusen, denen der GR speziell in myeloiden Zellen fehlt. Therapeutischer Dex-Effekt in GR^{lysMCre} Knock-out Mäusen und deren Vergleichsgruppe (GR^{flox}). Applikation von 100 mg/kg Dex bzw. PBS an den Tagen 12/13/14, n = 5. Abbildung eines von zwei repräsentativen Tierexperimenten.

Um die Rolle des zytosolischen GR in T-Lymphozyten zu analysieren, wurden in einem weiteren Experiment GR^{lckCre} Mäuse eingesetzt. Nach Immunisierung dieser Tiere fiel auf, dass die EAE-Symptome in der Gruppe der GR-defizienten Tiere zwei bis drei Tage früher auftraten als in der entsprechenden Vergleichsgruppe (GR^{flox}) (Abb. 3-12). Nach Dex-Therapie an den Tagen 12, 13 und 14 konnte in den GR^{flox} Tieren eine sofortige Verbesserung des Krankheitsverlaufes und eine langanhaltende Reduktion des Krankheitsgrades festgestellt werden. Dieser Effekt wurde in GR^{lckCre} Tieren, die bereits an den Tagen 8, 9 und 10 mit Dex behandelt wurden, nicht beobachtet. Hier kam es zwar nach der ersten Dex-Injektion zu einer sehr kurzfristigen Verbesserung der EAE-Symptome, die allerdings am zweiten Behandlungstag nicht mehr zu erkennen war und im weiteren Verlauf der EAE keinen Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten GR-defizienten Tieren zuließ (Abb. 3-12). Aus diesen Beobachtungen konnte gefolgert werden, dass T-Zellen die Ziel-Zellpopulation der hochdosierten GC darstellen.

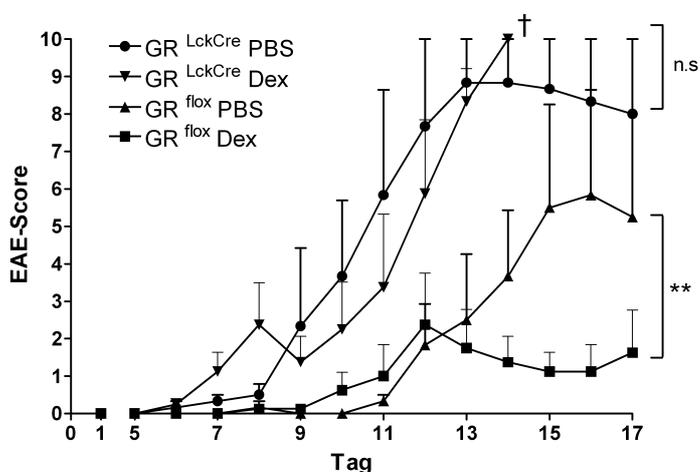


Abb. 3-12 Klinischer EAE-Verlauf von Mäusen, denen der GR speziell in T-Zellen fehlt. Kein verbesserter EAE-Verlauf in GR^{LckCre} Knock-out-Tieren im Gegensatz zur Vergleichsgruppe nach therapeutischer Gabe von 100 mg/kg Dex bzw. PBS an den Tagen 8/9/10 (GR^{LckCre}) und 12/13/14 (GR^{flox}), n = 5; † = Tiere aus Tierschutzrechtlichen Gründen getötet.

3.6 Glukokortikoide induzieren T-Zell-Apoptose in sekundären Lymphorganen

Unter 3.2 wurde beschrieben, dass die therapeutische Applikation hochdosierter GC im chronischen Modell der MOG₃₅₋₅₅-EAE in der C57Bl/6 Maus zu einer Verbesserung der klinischen Symptome führte, was unter anderem auf eine reduzierte Leukozyteninfiltration in das ZNS zurückgeführt werden konnte. Nachdem ferner gezeigt wurde, dass für die Vermittlung dieser Wirkungen der cGR in T-Zellen unabdingbar ist, sollten im weiteren Verlauf dieser Arbeit die molekularen Prozesse analysiert werden, die für diese Effekte verantwortlich sind. Da in diesem Zusammenhang Hinweise auf die Induktion von T-Zellapoptose (Schmidt *et al.*, 2000), die Hochregulierung regulatorischer T-Zellen (Chen *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2006) und die Herunterregulierung von Zelladhäsionsmolekülen auf peripheren T-Zellen existieren (Elovaara *et al.*, 1998), wurden diese Mechanismen detailliert untersucht.

Im folgenden Experiment wurde zuerst die Apoptoseinduktion von T-Zellen im Rückenmark von C57Bl/6 Mäusen analysiert, die dreimal mit hochdosiertem Dex beziehungsweise PBS behandelt wurden. Die hierfür mittels Dichtezentrifugation isolierten T-Lymphozyten wurden mit AnnexinV, einem Apoptosemarker, gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt.

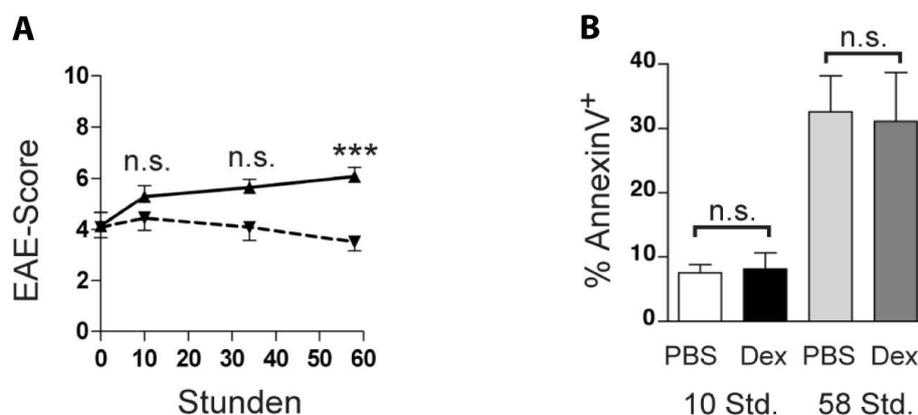


Abb. 3-13 Klinischer Verlauf von C57Bl/6 Mäusen nach Dex- und PBS-Applikation und gleichzeitig beobachtete T-Zell-Apoptose im Rückenmark. (A) Beobachtung des klinischen Verlaufes von Mäusen, die mit 100 mg/kg Dex (gestrichelte Linie) beziehungsweise PBS (durchgezogene Linie) behandelt wurden - zum Zeitpunkt der ersten Injektion (0h) und jeweils 10 Stunden nach der ersten (10h), zweiten (34h) und dritten Injektion (58h); n = 14. **(B)** Prozentuale Darstellung AnnexinV⁺ T-Zellen aus dem Rückenmark von C57Bl/6 Mäusen, 10 Std. und 58 Std. nach Behandlung mit 100 mg/kg Dex beziehungsweise PBS; n = 6-13.

Während die detaillierte Analyse des Krankheitsverlaufes eine graduelle Reduktion der klinischen Symptome unter Dex-Therapie zeigte (Abb. 3-13, A), erhöhte sich gleichzeitig die Anzahl apoptotischer T-Zellen im ZNS in beiden experimentellen Gruppen zwischen

zehn und 58 Stunden nach Behandlungsbeginn. Zehn Stunden nach der ersten Dex- beziehungsweise PBS-Injektion konnten in beiden Gruppen ca. neun bis zehn Prozent apoptotische T-Zellen detektiert werden. Zehn Stunden nach der dritten Injektion (58 Std.) erhöhte sich der Prozentsatz in beiden Gruppen auf ca. 30 Prozent (Abb. 3-13, B).

Da im Rückenmark Dex- und PBS-behandelter Mäuse in Bezug auf Apoptose-Induktion kein Unterschied beobachtet werden konnte, wurden in einem weiteren Experiment periphere T-Zellen von GR^{LckCre} und GR^{flox} Mäusen isoliert und durchflusszytometrisch auf Apoptose untersucht.

58 Stunden nach der ersten Dex- beziehungsweise PBS-Injektion konnte in GR^{flox} Tieren eine signifikant erhöhte Anzahl apoptotischer $CD4^+$ T-Zellen festgestellt werden ($p \leq 0,001$) (Abb. 3-14, A). Diese Beobachtung traf auch für $LFA-1^+$ T-Lymphozyten zu (Abb. 3-14, B) und für T-Zellen, die den Aktivierungsmarker/das Zelladhäsionsmolekül $CD44$ exprimierten. Um die Anzahl apoptotischer T_H17 Zellen quantifizieren zu können, wurde *ex vivo* die Caspase-3-Aktivierung dieser Zellen analysiert. Nach Dex-Behandlung konnte in GR^{flox} Tieren im Vergleich zu PBS-behandelten GR^{flox} Tieren ebenfalls eine signifikant erhöhte Zahl apoptotischer $IL-17^+$ Zellen detektiert werden ($p \leq 0,001$) (Abb. 3-14, C). Die Anzahl apoptotischer Zellen nach Dex-Behandlung in GR^{LckCre} Mäusen war weder in $CD4^+$ - noch in $LFA-1^+$ oder $IL17^+$ T-Zellen signifikant erhöht (Abb. 3-14). Diese Beobachtungen zeigten, dass die therapeutische Wirksamkeit hochdosierter GC in der chronischen MOG_{35-55} EAE keine Folge erhöhter T-Zellapoptose im ZNS sein konnte.

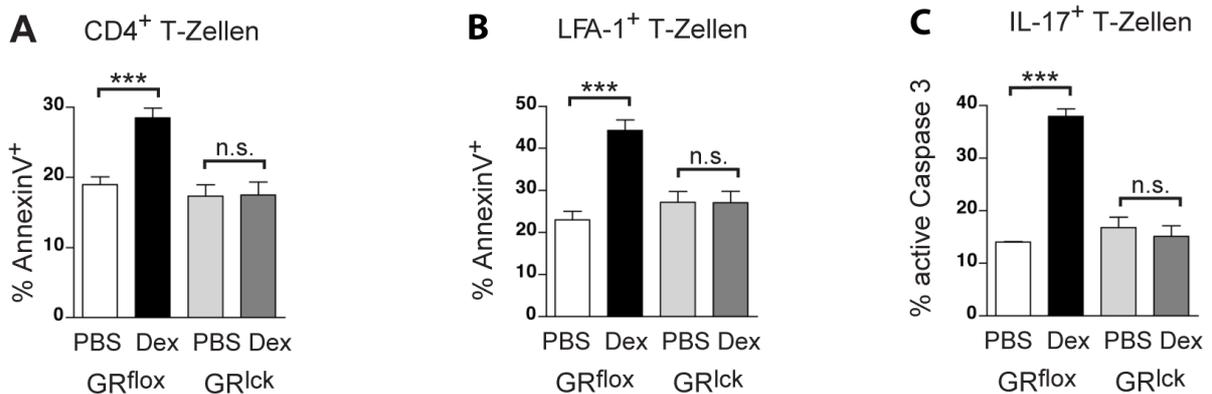


Abb. 3-14 Apoptose-Verhalten $CD4^+$, $LFA-1^+$ und $IL-17^+$ peripherer T-Zellen nach PBS- und Dex-Therapie. (A) Prozentuale Darstellung AnnexinV⁺ $CD4^+$ Splenozyten aus GR^{flox} und GR^{LckCre} Mäusen, 10 Stunden nach der dritten Dex- beziehungsweise PBS-Behandlung (58h); $n = 5$. **(B)** Prozentuale Darstellung AnnexinV⁺ $CD3^+CD4^+LFA-1^+$ Splenozyten, 10 Stunden nach der dritten Dex- beziehungsweise PBS-Behandlung (58h); $n = 5$. **(C)** Darstellung Caspase-3⁺ $IL-17^+$ Splenozyten aus GR^{flox} und GR^{LckCre} Mäusen. Milzzellen PBS-behandelter Tiere wurden isoliert und 20 Std. *ex vivo* ohne beziehungsweise mit 10^{-7} mol/l Dex kultiviert. Anschließend wurde die Anzahl apoptotischer Zellen mittels intrazellulärer Färbung für Caspase-3 und IL-17 bestimmt; $n = 2$.

3.7 Regulatorische T-Zellen tragen nicht zur antiinflammatorischen Wirkung von Glukokortikoiden bei

In der Literatur wird beschrieben, dass die Applikation hochdosierter GC sowohl im Tier als auch im Menschen zu einem Anstieg regulatorischer T-Zellen (T_{reg}) führt (Chen *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2006). Aufgrund dessen stellte sich die Frage, ob die Applikation von Dex auch im MOG₃₅₋₅₅-EAE-Modell der C57Bl/6 Maus einen derartigen Effekt auf T_{reg} ausübt und diese somit einen weiteren Beitrag zu antiinflammatorischen Wirkungen leisten. Um dies zu analysieren, wurden in der vorliegenden Arbeit GR^{lckCre} Mäuse und deren Vergleichsgruppe (GR^{flox}) immunisiert und bei einem klinischen Score von zwei bis drei dreimal therapeutisch mit hochdosiertem Dex behandelt. Zehn Stunden nach der letzten Injektion wurden Lymphozyten aus der Milz der Tiere isoliert und die Anzahl der T_{reg} anhand der gleichzeitigen Expression von FoxP3 (Transkriptionsfaktor) und GTR (Aktivierungsmarker) durchflusszytometrisch quantifiziert.

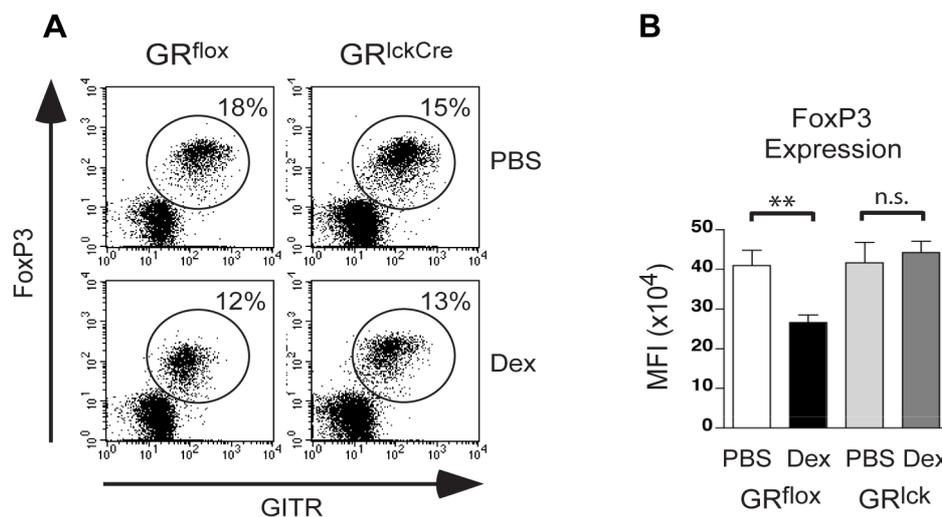


Abb. 3-15 Durchflusszytometrische Darstellung regulatorischer T-Zellen nach Dex- und PBS-Therapie. (A) Darstellung $CD3^+CD4^+FoxP3^+GTR^+$ Splenozyten aus GR^{flox} und GR^{lckCre} Mäusen; Isolierung und durchflusszytometrische Messung 10 Stunden nach der dritten Dex- beziehungsweise PBS-Injektion (58h); $n = 3-11$. (B) Darstellung der relativen Expressionsmenge (MFI) von FoxP3 in T_{reg} . Für dieses Experiment wurden die Tiere aus dem vorherigen Versuch verwendet.

In GR -defizienten wie auch GR^{flox} Mäusen kam es unter Dex-Therapie zu einer geringfügigen prozentualen Reduktion peripherer T_{reg} (Abb. 3-15, A), wobei dieser Effekt in den GR^{lckCre} Tieren weniger stark ausgeprägt war (Reduktion von 15% auf 13%) als in den GR^{flox} Mäusen (Reduktion von 18% auf 12%). Überdies führte die dreimalige Dex-Applikation in peripheren T_{reg} von GR^{flox} Mäusen zu einer signifikant verminderten FoxP3-Expression ($p \leq 0,01$), während diese in GR^{lckCre} Mäusen unverändert blieb (Abb. 3-15, B). Aus

diesen Daten kann gefolgert werden, dass T_{reg} im MOG_{35-55} -induzierten EAE-Modell der C57Bl/6 Maus keinen Beitrag zur antiinflammatorischen Wirkung der GC leisten.

3.8 Glukokortikoide reduzieren die Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf T-Zellen

Wie aus den bereits beschriebenen Experimenten hervorgeht, führt die Dex-Behandlung zu einer reduzierten T-Zellinfiltration in das Rückenmark. Während die Apoptoseinduktion in peripheren T-Zellen einen möglichen Mechanismus für die T-Zellreduktion darstellt, könnte die verminderte Expression von Zelladhäsionsmolekülen, wie bereits in der Literatur beschrieben (Elovaara *et al.*, 1998), ein weiterer Mechanismus sein.

Um diese Hypothese zu testen, wurde die Expression der Oberflächenmoleküle CD44, LFA-1 und VLA-4 auf $CD3^+CD4^+$ Splenozyten und T-Lymphozyten aus dem Rückenmark bestimmt. Nach dreitägiger Dex-Therapie konnte in den Milzzellen der GR^{flox} Mäuse eine verminderte Expression der genannten Zelladhäsionsmoleküle beobachtet werden, wohingegen deren Expression in GR^{lckCre} Tieren unverändert blieb (Abb. 3-16). Ferner konnte festgestellt werden, dass die Expression von CD44, LFA-1 und VLA-4 nur auf peripheren T-Zellen reduziert war, während kein Einfluss auf ZNS-residente Lymphozyten zu erkennen war.

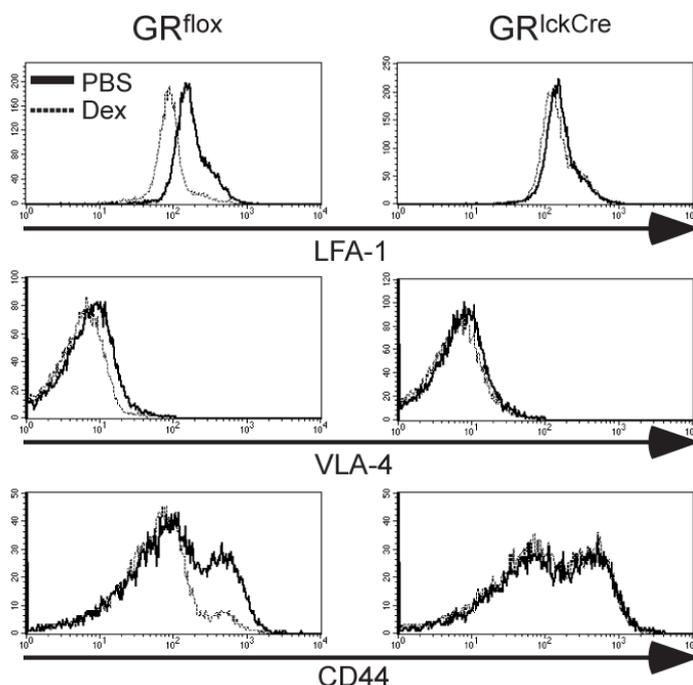


Abb. 3-16 Expression von Zelladhäsionsmolekülen nach Dex- und PBS-Applikation. Die therapeutische Gabe von 100 mg/kg Dex führte in GR^{flox} Mäusen zu einer verringerten Oberflächenexpression von LFA-1, VLA-4 und CD44 auf $CD3^+CD4^+$ Splenozyten während sie in GR^{lckCre} Mäusen unverändert blieb. Durchflusszytometrische Analyse 10 Stunden nach der dritten Dex- beziehungsweise PBS-Injektion (58h); n = 3-11.

3.9 Dexamethason beeinflusst die T-Zell-Migration in das Zentralnervensystem

Die vorangegangenen Experimente zeigten, dass hochdosierte GC die T-Zellinfiltration in das Rückenmark beeinträchtigen. Um diese Hypothese *in vivo* beziehungsweise *ex vivo* zu bestätigen, wurde ein *Tracking*-Experiment durchgeführt.

Hierfür wurden T-Zellen aus Milzen von C57Bl/6 Mäusen (Donoren) mit einem durchschnittlichen EAE-Score von 6,4 isoliert, mit dem Farbstoff Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) markiert und anschließend in erkrankte C57Bl/6 Mäuse (Rezipienten) injiziert. Dabei zeigten die Rezipienten, die anschließend mit Dex behandelt wurden, einen durchschnittlichen EAE-Score von 3,7 und diejenigen, die PBS erhalten sollten einen durchschnittlichen EAE-Score von 3,3.

Eine Stunde nach Transfer dieser Zellen wurden die Rezipienten nach dem etablierten Behandlungsschema dreimal mit Dex beziehungsweise PBS therapiert. Zehn Stunden nach der letzten Injektion wurden T-Zellen aus Rückenmark und Milz dieser Tiere isoliert und durchflusszytometrisch auf das Vorhandensein der transferierten, CFSE⁺ Zellen analysiert. Als Maß für die spezifische Migration der T-Zellen wurde der Quotient aus CFSE⁺ Zellen im Rückenmark und CFSE⁺ Zellen in der Milz gebildet.

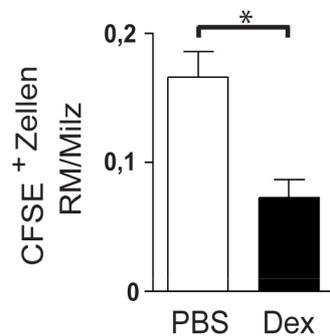


Abb. 3-17 Spezifische Migration aktivierter T-Zellen nach Dex- und PBS-Applikation. Die dreimalige Gabe von 100 mg/kg Dex führte im Vergleich zur PBS-Gabe zu einer verringerten spezifischen Migration aktivierter T-Zellen. Spezifische Migration = Quotient aus CFSE⁺ Zellen im Rückenmark (RM) zu CFSE⁺ Zellen in der Milz; n = 3.

Bei der durchflusszytometrischen Analyse konnte festgestellt werden, dass die spezifische Migration CFSE⁺ T-Zellen nach der dreitägigen GC-Therapie im Gegensatz zur PBS-Behandlung signifikant reduziert war ($p \leq 0,05$) (Abb. 3-17) und ließ den Schluss zu, dass hochdosiertes Dex die T-Zellmigration in das ZNS beeinflusst und somit zu einem verminderten Nachstrom peripherer T-Zellen führt.

3.10 Therapeutisch appliziertes Methylprednisolon vermindert dosisabhängig die Krankheitsschwere in der MOG-induzierten EAE

Viele tierexperimentelle Analysen, die im Kontext mit MP durchgeführt wurden, basieren auf dem monophasischen Modell der MPB-induzierten AT-EAE in der Lewis Ratte. Da anhand dieses Modells kaum Aussagen über Langzeiteffekte auf den Krankheitsverlauf möglich sind, wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl therapeutische als auch präventive Effekte von MP im chronischen MOG₃₅₋₅₅-EAE-Modell der C57Bl/6 Maus untersucht und mit denen der Dex-Therapie verglichen.

In einem Pilotexperiment wurden C57Bl/6 Mäuse bei einem durchschnittlichen Score von zwei bis drei dreimal mit hochdosiertem MP und Dex behandelt und 15 Tage lang beobachtet. Hierbei konnte eindeutig ein signifikanter Unterschied in der therapeutischen Wirksamkeit beider GC erkannt werden ($p \leq 0,001$). Während MP über den Beobachtungszeitraum mittellang-wirksame Effekte vermittelte (durchschnittlicher EAE-Score ca. fünf), konnten unter Dex-Therapie lang-wirksame Effekte mit einem durchschnittlichen EAE-Score von ca. drei erzielt werden (Abb. 3-18).

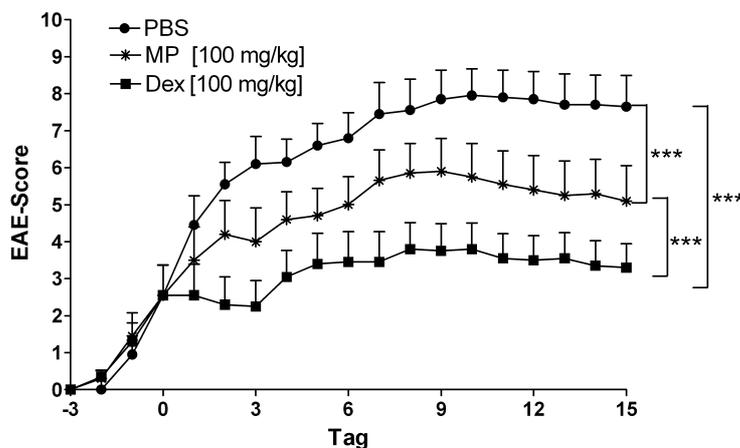


Abb. 3-18 Therapeutischer Effekt von hochdosiertem Dex und MP auf den klinischen EAE-Verlauf. Dreimalige Applikation von MP und Dex bzw. PBS in C57Bl/6 Mäusen an den Tagen 0/1/2; $n = 10$. Einheitliche Darstellung zweier klinischer Versuche mit unterschiedlichen Therapie-Zeitpunkten.

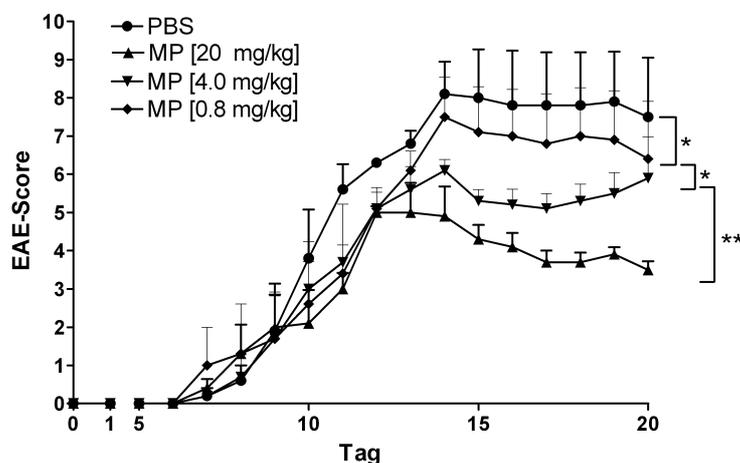


Abb. 3-19 Dosisabhängige Verbesserung des EAE-Verlaufes bei therapeutischer Gabe verschiedener MP-Dosen. Injektion von MP und PBS an den Tagen 9/10/11; $n = 5$.

In weiteren Verlauf wurde getestet, ob MP ebenso dosisabhängige Therapieeffekte ausübt, wie sie bereits in der AT-EAE der Lewis Ratte (Schmidt *et al.*, 2000) und unter 3.1 beschrieben wurden. Hierfür wurden Mäuse mit den gleichen Dosierungen wie unter der Dex-Therapie behandelt (0,8 mg/kg, 4,0 mg/kg und 20 mg/kg). Wie Abb. 3-19 zeigt, konnte auch unter MP-Gabe eine dosisabhängige Reduktion der Krankheitssymptome beobachtet werden, wobei selbst noch die niedrigste Dosis von 0,8 mg/kg MP zu signifikanten Verbesserungen des EAE-Verlaufes führte ($p \leq 0,05$).

3.11 Reduzierte Leukozyteninfiltration in das ZNS nach therapeutischer Gabe von Methylprednisolon

Um zu analysieren, ob die klinischen Effekte des therapeutisch applizierten MP auf eine reduzierte Leukozyteninfiltration in das ZNS zurückzuführen sind, wurden ein Tag nach der letzten Injektion Rückenmarksquerschnitte dieser Tiere angefertigt und immunhistochemisch analysiert.

Wie den Graphiken aus Abb. 3-20 entnommen werden kann, kam es im Rückenmark der Tiere nach dreitägiger MP-Therapie im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer signifikanten Reduktion von CD3⁺ T-Zellen ($p \leq 0,05$) (Abb. 3-20, B) und Makrophagen/Mikroglia ($p \leq 0,01$) (Abb. 3-20, C), was direkt mit dem EAE-Score der Tiere korrelierte (Abb. 3-20, A).

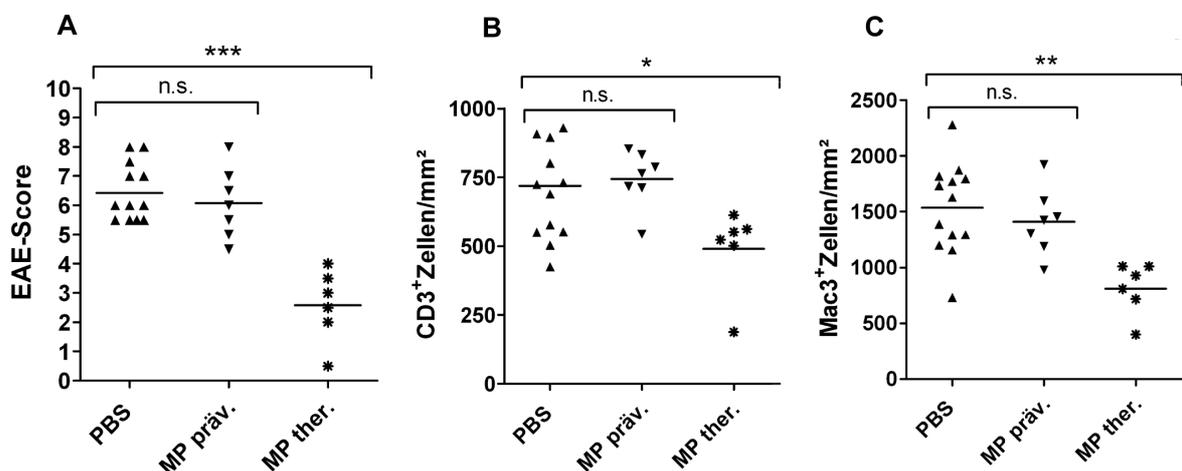


Abb. 3-20 EAE-Score und Leukozyteninfiltration von C57Bl/6 Mäusen nach präventiver und therapeutischer MP-Gabe. (A) EAE-Scores der jeweils behandelten Tiere. Während histologisch kaum Unterschiede zwischen der Präventivgabe und der Kontrollgruppe beobachtet werden konnten, führte die therapeutische Gabe von MP zu einer reduzierten T-Zell- **(B)** und Makrophagen-/Mikroglia-dichte **(C)**. Jedes Symbol steht für ein Tier.

3.12 Die Präventivgabe von Methylprednisolon verschlechtert den EAE-Verlauf

Da die Präventivgabe von Dex zu einem verzögerten und milderen Krankheitsverlauf führte, wurde MP in diesem Kontext ebenfalls präventiv appliziert und dessen Wirkung auf den EAE-Verlauf analysiert.

Nach präventiver MP-Applikation konnte kein verzögerter oder abgeschwächter EAE-Verlauf verzeichnet werden. Vielmehr kam es bereits in der Frühphase der EAE (Tag 9-12) zu einer rascheren Verschlechterung präventiv behandelter Tiere, die über den gesamten Beobachtungszeitraum anhielt (Abb. 3-21).

Dies ließ vermuten, dass es unter präventiver MP-Gabe zu einer vermehrten Lymphozyteninfiltration in das ZNS gekommen sein musste. Aufgrund dessen wurden immunhistochemische Färbungen von Rückenmarksquerschnitten präventiv behandelter Tiere angefertigt (an Tag 12 bzw. 14). Die histologische Analyse zeigte, dass MP-behandelte Tiere in Korrelation zum EAE-Score (Abb. 3-20, A) eine ähnlich hohe T-Zell- (Abb. 3-20, B) und Makrophagen-/Mikroglia-dichte aufwiesen wie Kontrolltiere (Abb. 3-20, C).

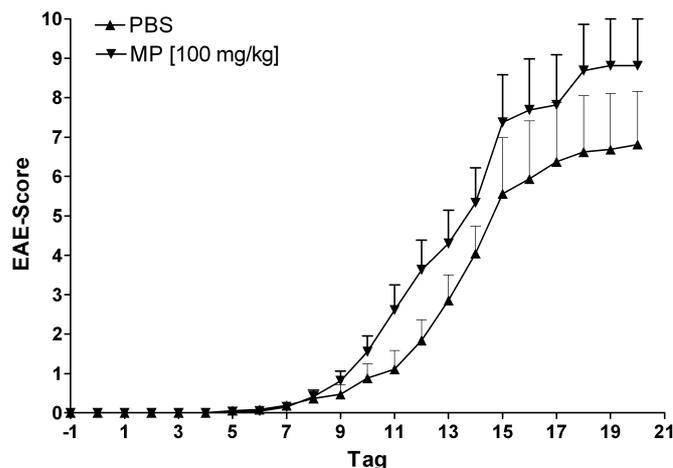


Abb. 3-21 Klinischer EAE-Verlauf nach präventiver Gabe von hochdosiertem MP. Injektion von MP bzw. PBS an den Tagen -1/0/1; n = 23 (MP), n = 27 (PBS).

3.13 Die Präventivgabe von Methylprednisolon und Dexamethason führt zu unterschiedlichen peripheren Effekten

Um eine Erklärung für die klinischen und histologischen Beobachtungen nach präventiver MP-Gabe zu finden, wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Wirkungen hochdosierten MP auf periphere Immunzellen untersucht. Für den direkten Bezug zur Dex-Therapie wurden C57Bl/6-Mäuse nach dem etablierten Schema mit beiden GC behandelt und Splenozyten dieser Tiere je 24 Stunden nach der ersten, zweiten und dritten Injektion isoliert, gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Bei Betrachtung des GC-Effektes auf die periphere T-Zellzahl, konnte bereits 24 Stunden nach der ersten Dex-Injektion eine Reduktion der Zellzahl auf ca. 20% festgestellt werden, die nach zwei weiteren Applikationen noch weiter bis auf ca. 5% abnahm. Im Vergleich dazu wurde unter MP-Behandlung nach 24 Stunden lediglich eine Verringerung der T-Zellzahl auf ca. 80% beobachtet, die zum Ende des Experiments noch bei ca. 40% und somit weit über der T-Zellzahl nach Dex-Therapie, lag (Abb. 3-22, A).

In den zuvor beschriebenen Versuchen wurde gezeigt, dass in erkrankten Tieren unter hochdosiertem Dex Adhäsionsmoleküle auf peripheren T-Zellen vermindert exprimiert werden. In diesem Experiment führte die dreimalige Applikation von Dex zu einer signifikant reduzierten Expression ($p \leq 0,01$) des Adhäsionsmoleküls LFA-1 auf ca. 60%, wobei unter MP-Behandlung kaum eine Abnahme der Expression zu verzeichnen war (Abb. 3-22, B).

Wie in Abb. 3-22, C dargestellt, führte weder die Behandlung mit Dex noch mit MP zu einer signifikanten Erhöhung der prozentual ermittelten $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T-Zellen. Vielmehr konnte nach Applikation beider GC eine geringe, aber nicht signifikante Reduktion der prozentualen Werte festgestellt werden, die unter Dex stärker ausgeprägt war als unter MP.

Diese Daten zeigen eindeutig, dass präventiv verabreichtes MP im Vergleich zu präventivem Dex eine weniger starke Wirkung auf periphere Zellen ausübt.

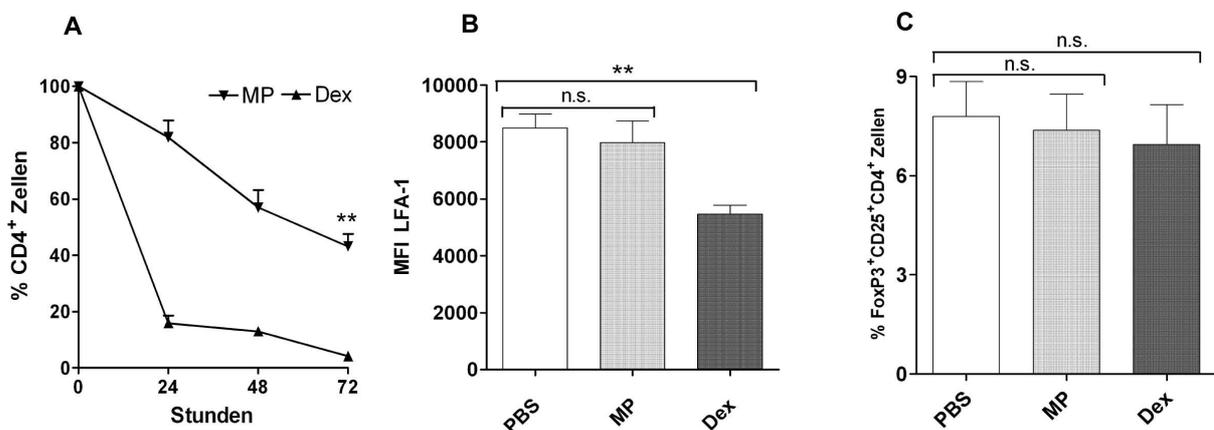


Abb. 3-22 Unterschiedliche Wirkungen auf periphere T-Zellen nach Dex- beziehungsweise MP-Applikation. (A) Reduktion der peripheren T-Zellzahl nach dreimaliger Präventivgabe von 100 mg/ kg MP beziehungsweise Dex; $n = 2$ (24/48 Std.), $n = 5$ (72 Std.) **(B)** Verminderte Expression des Adhäsionsmoleküls LFA-1. Darstellung der relativen Expression (MFI) von LFA-1 auf peripheren $CD4^+CD3^+$ T-Zellen 24 Stunden nach der dritten MP- beziehungsweise Dex-Injektion; $n = 5$ **(C)** Unterschiedlich starke Glukokortikoid-Effekte auf regulatorische T-Zellen. Prozentuale Darstellung $FoxP3^+CD25^+CD4^+$ peripherer T-Zellen 24 Stunden nach der dritten MP- beziehungsweise Dex-Injektion; $n = 5$.

3.14 Präventives Methylprednisolon führt in der MOG-EAE zu einer verstärkten T-Zell-Proliferation

Das im Organismus vorherrschende Gleichgewicht von Immunzellen wird durch die Applikation immunsuppressiver und zytostatischer Substanzen gestört. Um nach einer Therapie, die mit einer Reduktion von Immunzellen einhergeht, den Sollwert der Homöostase wieder zu erreichen, kommt es zu einer gesteigerten Proliferation der noch vorhandenen Immunzellen.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte analysiert werden, ob der nach präventiver MP-Gabe beobachtete EAE-Verlauf auf eine verstärkte T-Zellproliferation zurückzuführen ist. Wie in Abb. 3-22, A gezeigt, war die Anzahl peripherer CD4⁺ T-Zellen 72 Stunden nach der MP-Therapie auf ca. 50% überlebende Zellen reduziert. Um die Hypothese einer gesteigerten T-Zellproliferation zu prüfen, wurde ein *Tracking*-Experiment durchgeführt. Hierfür wurden nicht-immunisierten C57Bl/6 Mäusen (Rezipienten) einen Tag nach der dritten MP- beziehungsweise PBS-Injektion naive, CFSE (Carboxyfluoreszeinsuccinimidylester) markierte T-Zellen von C57Bl/6 Mäusen (Donoren) injiziert. CFSE ist ein lipophiler und fluoreszierender Farbstoff, der häufig für Proliferationsstudien eingesetzt wird und in Zellen an zytoplasmatische Proteine bindet. Bei jeder Zellteilung kommt es somit zu einer Halbierung der Farbstoff-Menge. Auf diese Weise ist es nach Transfer-Experimenten möglich, jede *in vivo* stattgefundene Zellteilung im Empfängertier durchflusszytometrisch nachzuvollziehen. Sieben Tage nach Injektion der CFSE markierten T-Zellen wurden diese aus den Milzen der Rezipienten isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Sowohl in der PBS- als auch MP-behandelten Gruppe konnte keine Proliferation der injizierten CFSE⁺ Zellen festgestellt werden.

Da dieses Experiment keine Erklärung für den unterschiedlichen Krankheitsverlauf der Tiere nach präventiver MP-Gabe lieferte, wurde dieser Versuch in immunisierten Tieren wiederholt. Zehn Tage nach i.v. Injektion der CFSE markierten T-Zellen wurden die Milzen der Rezipienten aufgearbeitet. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte nach dreitägiger Präventivgabe von MP eindeutig eine stärker ausgeprägte Proliferation der Zellen als in PBS behandelten Tieren, was im Histogramm eindeutig durch drei Signale CFSE⁺ T-Zellen zu erkennen war (Abb. 3-23).

Wurde im Vergleich dazu hochdosiertes Dex präventiv appliziert, führte dies zu einer noch stärkeren Proliferation der injizierten T-Zellen (drei Zellteilungen) als sie in MP-behandelten Tieren (zwei Zellteilungen) beobachtet werden konnte (Abb. 3-23).

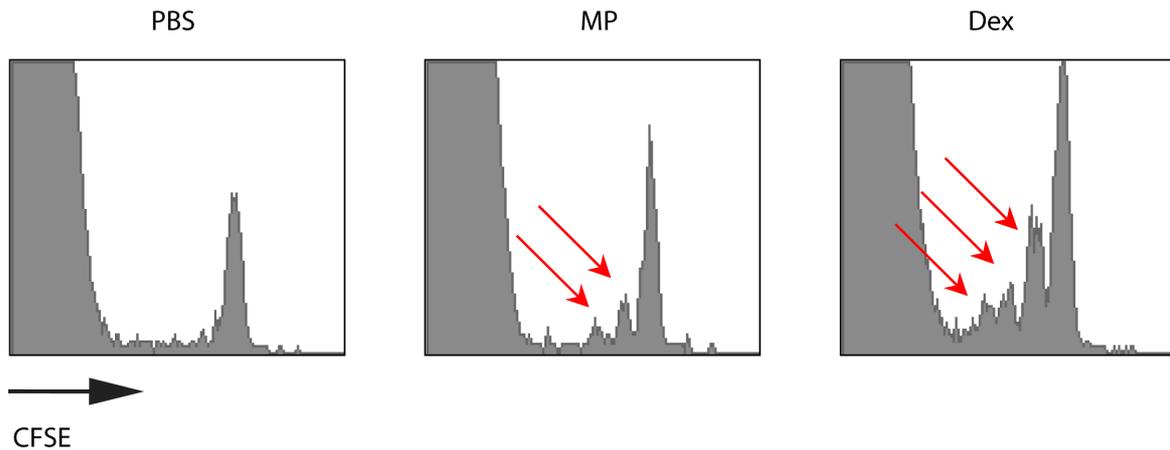


Abb. 3-23 Proliferation CFSE⁺ T-Zellen in immunisierten Mäusen. Durchflusszytometrische Analyse der CFSE⁺ T-Zellen nach dreitägiger Gabe von PBS (links), hochdosiertem MP (Mitte) und hochdosiertem Dex (rechts) in immunisierten Tieren. Die Pfeile markieren die mehrfach stattgefundenen Zellteilungen in MP und Dex behandelten Tieren.

4 Glukokortikoid-Rezeptor Modulator - Compound A

Wie in der Einleitung unter 1.6 beschrieben, werden Substanzen, die nach Applikation an den zytosolischen GR binden und dabei entweder Transaktivierung oder Transrepression induzieren, als „dissoziierte“ Substanzen bezeichnet. Compound A (CpdA) stellt einen derartigen dissoziierten GR-Liganden dar, der durch eine nicht-steroidale Struktur gekennzeichnet ist und über transreprimierende Mechanismen entzündungshemmende Wirkungen vermittelt.

Der Literatur zufolge konnten die antiinflammatorischen Eigenschaften des CpdA *in vivo* in zwei murinen Arthritis-Modellen gezeigt werden. Im akuten Zymosan-induzierten Arthritis-Modell in der C57Bl/6 Maus wurde CpdA präventiv verabreicht (De Bosscher *et al.*, 2005; Dewint *et al.*, 2008). Da aus diesem Experiment keine Aussage über die therapeutische Effektivität von CpdA in einer Antigen-vermittelten Erkrankung möglich war, wurde CpdA im Kollagen-induzierten Arthritis-Modell in der DBA/1 Maus eingesetzt (Dewint *et al.*, 2008). CpdA führte in diesem Modell erfolgreich zu einer Reduktion der Entzündungen, woraufhin es als mögliche Alternative zu hochdosierten GC im chronischen Modell der MOG₃₅₋₅₅-EAE eingeführt und analysiert wurde.

4.1 Compound A zeigt *in vivo* dosisabhängige Wirkungen sowie Nebenwirkungen

Für erste Tierexperimente wurde eine CpdA-Dosis von 300 µg in 150 µl Ethanol 20% gewählt (De Bosscher *et al.*, 2005; Dewint *et al.*, 2008). Die CpdA-Dosen wurden gewichtsbezogen (pro 20 g KG Maus) verabreicht. Um einen direkten Vergleich zur Dex-Therapie zu erhalten, wurde CpdA nach dem etablierten Behandlungsschema appliziert.

Im Gegensatz zu Mäusen, die dreimal hochdosiertes Dex erhielten, zeigten mit CpdA behandelte Mäuse keinen Therapieeffekt. Vielmehr kam es unter CpdA zu einer rapiden Verschlechterung des Krankheitszustandes, so dass einige Tiere aus tierschutzrechtlichen Gründen vorzeitig aus dem Experiment genommen wurden (Abb. 4-1).

Um herauszufinden, ob die fulminante Verschlechterung des Gesundheitszustandes durch die applizierte CpdA/Ethanol-Lösung oder durch das Zusammenspiel von Substanzlösung und EAE bedingt war, wurden nicht-immunisierte Tiere dieser Behandlung unterzogen. Die behandelten Tiere zeigten bereits nach einer beziehungsweise zwei CpdA-Injektionen neurologische Ausfallerscheinungen, die sich unter anderem in einem ataktischen, unkoordinierten Gang äußerten. Zudem konnte unter der Therapie eine immense Gewichtsabnahme der Tiere sowie struppiges und ungeputztes Fell beobachtet werden. Da sich auch in diesem Experiment der Gesundheitszustand aller Mäuse innerhalb sehr kurzer Zeit verschlechterte, wurde dieses vorzeitig beendet.

Da diese Versuche zeigten, dass die Verschlechterung des Krankheitszustandes unabhängig vom Immunstatus der Tiere auftrat, stellte sich die Frage, ob der beobachtete Effekt auf den verwendeten Ethanol zurückzuführen war. Aus diesem Grund wurde ein weiterer EAE-Versuch durchgeführt, bei dem verschiedene Dosen CpdA (300 µg, 100 µg und 33,3 µg) in Wasser gelöst und nach dem etablierten Schema appliziert wurden.

Wie aus Abb. 4-2 hervorgeht, führte hochdosiertes CpdA (300 µg) bereits nach zwei Injektionen erneut zu einer fulminanten Verschlechterung des Krankheitszustandes und zum Tod aller Tiere. Die mittlere und niedrige Dosis (100 µg und 33,3 µg) zeigten jedoch beide im Vergleich zu PBS-behandelten Tieren einen signifikanten therapeutischen Effekt ($p \leq 0,01$ bzw. $p \leq 0,001$), woraus gefolgert werden konnte, dass die Verschlechterung des Krankheitszustandes nicht Lösungsmittel-, sondern Dosis-abhängig war (Abb. 4-2).

In diesem Tierexperiment konnte eine deutliche Reduktion des durchschnittlichen Körpergewichts der mit 100 µg CpdA behandelten Mäuse beobachtet werden. Der durchschnittliche Gewichtsverlust von ca. vier Gramm war in der PBS- und 33,3 µg CpdA-Gruppe bis zum letzten Tag der Therapie (Tag 14) vergleichbar. Während sich das durchschnittliche Gewicht der PBS- und 100 µg CpdA-Gruppe ab dem 15. Tag wieder deutlich erholte, zeigte die 33,3 µg CpdA-Gruppe eine sehr geringe Gewichtszunahme bis zum Therapie-Ende (ca. ein Gramm) (Abb. 4-3).

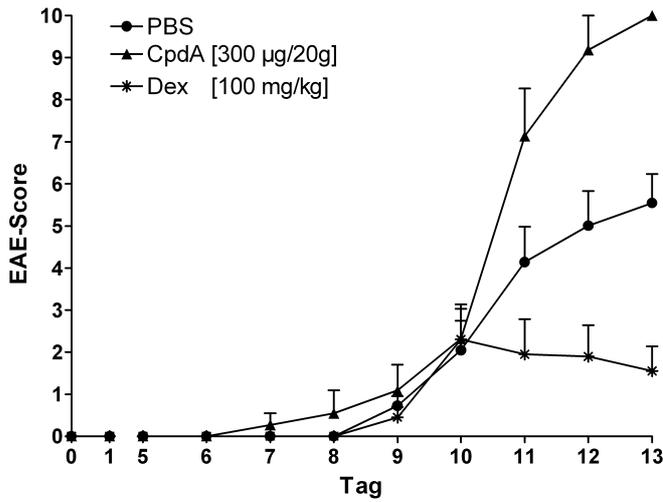


Abb. 4-1 Etablierung von CpdA im MOG₃₅₋₅₅-EAE-Modell der C57Bl/6 Maus. Therapeutische Gabe von PBS, CpdA in Ethanol 20% (300 µg/20 g) und Dex in Wasser (100 mg/kg) an den Tagen 10/11/12; n = 11 (PBS), n = 12 (CpdA), n = 10 (Dex).

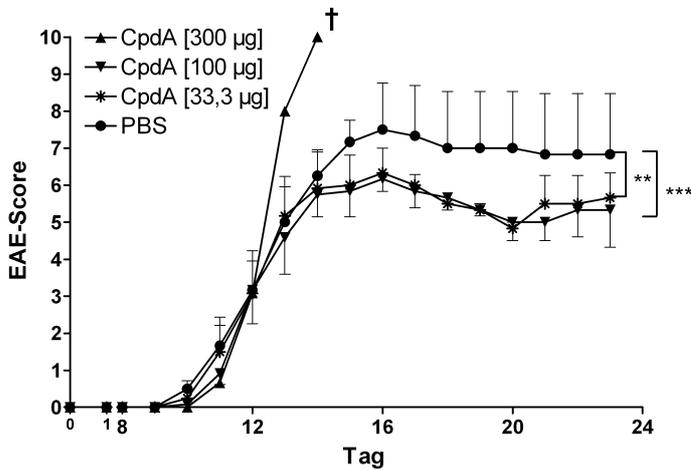


Abb. 4-2 Dosisfindung von CpdA im MOG₃₅₋₅₅-EAE-Modell der C57Bl/6 Maus. Therapeutische Gabe von PBS und unterschiedlichen Dosen CpdA in Wasser (300 µg, 100 µg, 33,3 µg /20 g KG) an den Tagen 12/13/14; n = 6.

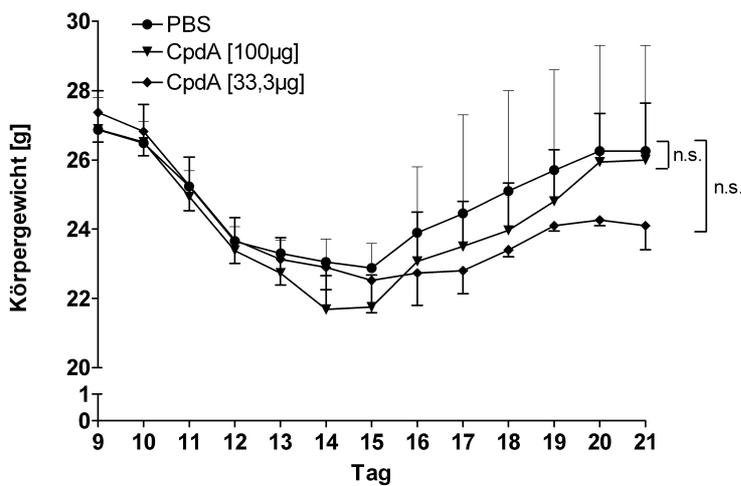


Abb. 4-3 Durchschnittliches Körpergewicht von C57Bl/6 Mäusen unter CpdA- bzw. PBS-Therapie. Applikation von PBS- und CpdA (100 µg bzw. 33,3 µg/ 20 g) an den Tagen 12/13/14; n = 6.

4.2 In Phosphat-Puffer gelöstes Compound A verschlechtert die MOG-EAE

In klinischen Experimenten werden Substanzen oftmals in physiologischen Pufferlösungen gelöst, um einen bestimmten pH-Wert zu erreichen und diesen nach Applikation im Organismus aufrechtzuerhalten.

Die Tatsache, dass ersten klinischen Versuchen zufolge CpdA-Wirkungen unabhängig vom Solvens vermittelt wurden und *Dewint et al.* CpdA in Phosphatpuffer (PBS) lösten (*Dewint et al.*, 2008), führte zu einem vergleichenden Tierexperiment, bei dem die therapeutischen Wirkungen von CpdA in Wasser beziehungsweise CpdA in PBS in der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE analysiert wurden.

Wie Abb. 4-4 zeigt, kam es unter dreitägiger Therapie mit CpdA/PBS im Vergleich zu CpdA/Wasser zu einer signifikanten Verschlechterung des EAE-Verlaufes ($p \leq 0,01$), die bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes (Tag 20) anhielt. Während CpdA/Wasser im Gegensatz zu den Kontrollen zu einer signifikanten Verbesserung der Krankheits-symptome ($p \leq 0,05$) führte, konnte statistisch kein Unterschied zwischen CpdA/PBS und PBS behandelten Kontrolltieren festgestellt werden.

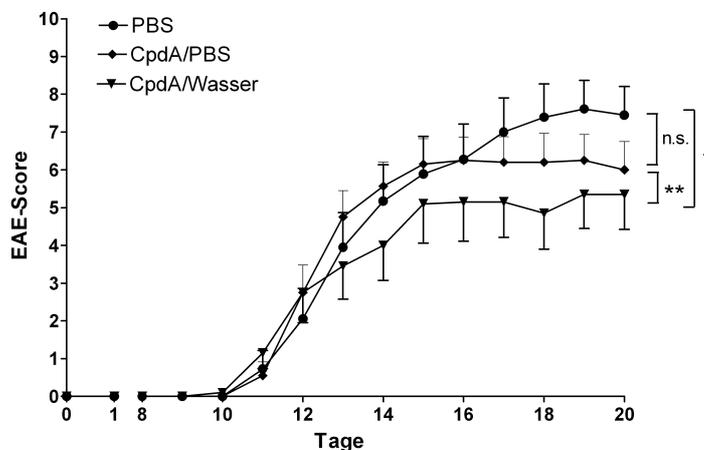


Abb. 4-4 Klinischer EAE-Verlauf in C57Bl/6 Mäusen nach CpdA in Wasser- bzw. CpdA in PBS-Therapie. Applikation von CpdA in PBS und Wasser (je 100 µg/ 20 g) an den Tagen 12/13/14; n = 10 bzw. n = 9 (für PBS).

4.3 Compound A induziert *in vitro* Apoptose in doppelpositiven Thymozyten und peripheren T-Zellen

Da unter 4.1 gezeigt werden konnte, dass CpdA-Wirkungen sowohl in Wasser als auch Ethanol vermittelt werden, stellte sich die Frage, worauf die Verschlechterung des EAE-Verlaufes zurückzuführen ist, die nach Applikation von CpdA/PBS beobachtet wurde. Da die Induktion von Apoptose eine mögliche Erklärung für diese Effekte darstellen könnte,

wurde in diesem Zusammenhang *in vitro* die Wirkung von CpdA auf Immunzellen untersucht.

Hierfür wurden sowohl doppelpositive Thymozyten ($CD4^+CD8^+$) wie auch $CD4^+$ T-Zellen mit Dex (10^{-6} mol/l) beziehungsweise CpdA (10^{-5} mol/l) versetzt und die relative Überlebensrate dieser Zellen nach zwei, vier, sechs, acht, zehn und 24 Stunden gemessen. In doppelpositiven Thymozyten konnte festgestellt werden, dass Dex im Vergleich zu CpdA innerhalb weniger Stunden Apoptose induzierte. Während zehn Stunden nach Dex-Zugabe nur noch ca. 20% doppelpositive Thymozyten lebten, waren es unter CpdA noch ca. 70%. 24 Stunden nach Inkubation zeigte sich allerdings unter Zugabe beider Substanzen eine reduzierte Überlebensrate der Zellen, die unter Dex bei ca. 10% und unter CpdA bei ca. 30% lag (Abb. 4-5, A).

Bei Betrachtung peripherer $CD4^+$ T-Zellen änderte sich dieses Verhältnis. Während acht Stunden nach Dex-Zugabe noch ca. 80% lebende Zellen vorhanden waren, kam es unter CpdA zu einer Überlebensrate von nur 40%. 24 Stunden nach Inkubation konnte unter beiden Substanzen eine Überlebensrate von nur ca. 20% festgestellt werden (Abb. 4-5, B). Aus diesen Beobachtungen kann gefolgert werden, dass nicht nur unter Dex, sondern auch unter CpdA Apoptose in Immunzellen induziert wird.

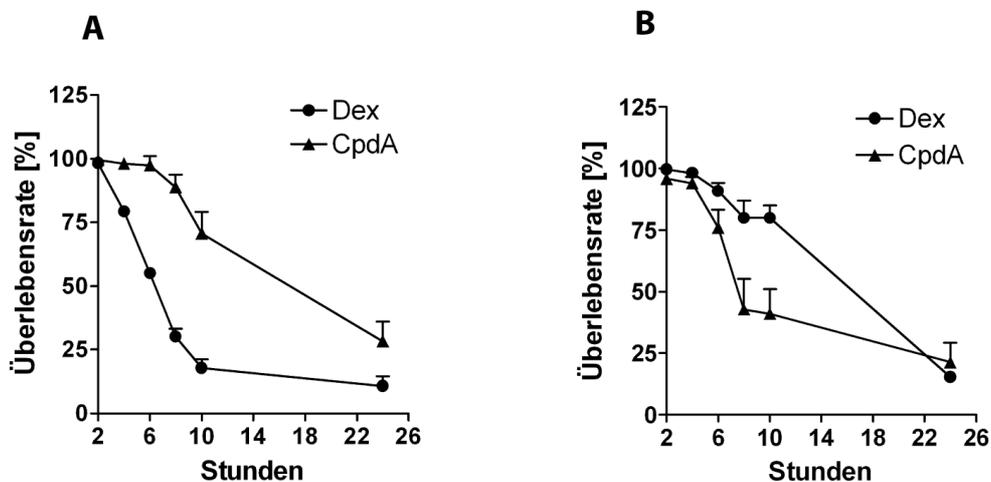


Abb. 4-5 Relative Überlebensrate doppelpositiver Thymozyten und peripherer T-Zellen nach CpdA- und Dex-Zugabe. (A) Abbildung der relativen Überlebensrate doppelpositiver $CD4^+CD8^+$ Thymozyten (isoliert aus Ratten) und (B) peripherer $CD4^+$ T-Zellen (isoliert aus Ratten) nach Zugabe von 10^{-6} mol/l Dex beziehungsweise 10^{-5} mol/l CpdA. Durchflusszytometrische Apoptose-Messung (7-AAD/AnnexinV) nach zwei, vier, sechs, acht, zehn und 24 Stunden Inkubation.

4.4 Compound A induziert *in vitro* GR-unabhängig Apoptose in doppelpositiven Thymozyten und peripheren T-Zellen

Unter 3.6 konnte gezeigt werden, dass der cGR für die Vermittlung GC-induzierter Apoptose in peripheren T-Zellen notwendig ist. Um eine Aussage über die GR-Abhängigkeit CpdA-induzierter Apoptose in doppelpositiven Thymozyten und peripheren T-Zellen machen zu können, wurden murine GR-defiziente ($GR^{-/-}$) sowie GR-positive ($GR^{+/+}$) Thymozyten aus 18,5 Tage alten Embryonen heterozygoter $GRN^{+/-}$ Mäuse isoliert und *in vitro* mit unterschiedlichen Konzentrationen Dex und CpdA inkubiert.

Wie Abb. 4-6, A zeigt, konnte in GR-defizienten Zellen nach Zugabe von Dex erwartungsgemäß keine Apoptose-Induktion beobachtet werden, wohingegen die relative Überlebensrate in $GR^{+/+}$ Zellen mit stets zunehmender Dex-Konzentration der Zellen abnahm (10^{-9} mol/l Dex-100% überlebende Zellen, 10^{-7} mol/l -100% tote Zellen).

Nach CpdA-Zugabe konnte kein Unterschied in der Überlebensrate $GR^{-/-}$ und $GR^{+/+}$ Zellen beobachtet werden (Abb. 4-7, B). Während die Zellen beider Zelltypen nach Zugabe von 10^{-6} mol/l CpdA noch zu 100% lebten, führte eine CpdA-Konzentration von 10^{-5} mol/l in beiden Zelltypen zum 100%igen Zelltod.

Aus diesen Daten konnte gefolgert werden, dass die durch CpdA induzierte Apoptose GR-unabhängig verläuft, wohingegen Dex-induzierte Apoptose auf die Anwesenheit des cGR angewiesen ist.

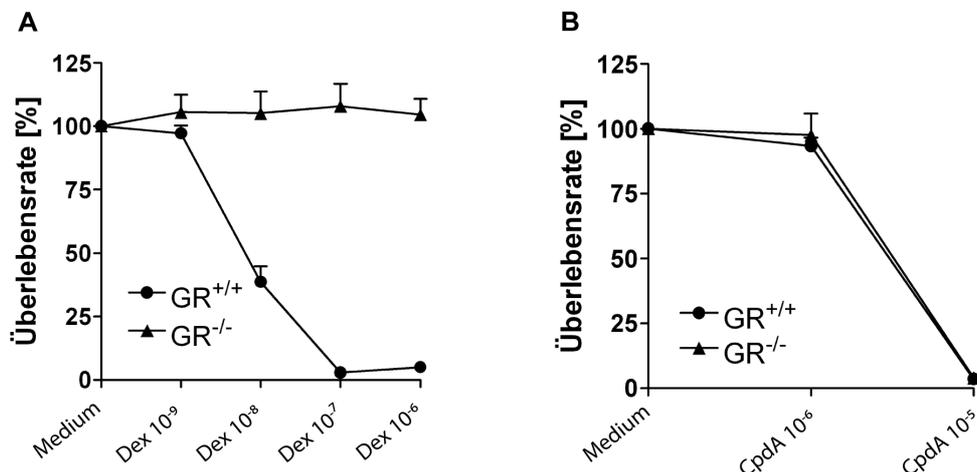


Abb. 4-6 Relative Überlebensrate muriner GR positiver sowie GR negativer T-Zellen nach CpdA- und Dex-Zugabe. (A) Abbildung der relativen Überlebensrate $GR^{+/+}$ und $GR^{-/-}$ Zellen 24 Stunden nach der Zugabe von Medium und unterschiedlichen Dex-Konzentrationen (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} und 10^{-6} mol/l). **(B)** Abbildung der relativen Überlebensrate $GR^{+/+}$ und $GR^{-/-}$ Zellen 24 Stunden nach Zugabe von Medium und 10^{-5} sowie 10^{-6} mol/l CpdA.

4.5 Compound A induziert *in vitro* Apoptose in SH-Sy5y- und HEK-Zellen

Die Feststellung, dass CpdA sowohl in Thymozyten als auch in peripheren Immunzellen GR-unabhängig Apoptose induzierte stellte noch keine Erklärung für die *in vivo* beobachteten neurologischen Ausfallerscheinungen dar. Um zu analysieren, ob diese Effekte eventuell auf die Beeinflussung neuronaler Zellen oder peripherer Zellen zurückzuführen ist, wurden Zellkulturexperimente an immortalisierten SH-Sy5y-Zellen (Neuroblastomzellen) beziehungsweise HEK-Zellen (Nierenzellkarzinom) durchgeführt.

Experimente in SH-Sy5y-Zellen zeigten eindeutig, dass 24 Stunden nach Zugabe von 10^{-5} mol/l CpdA nur noch ca. 50% der Zellen lebten, wohingegen die Zugabe von 10^{-6} mol/l CpdA beziehungsweise 10^{-5} und 10^{-6} mol/l Dex keinen Effekt auf die Viabilität der Zellen hatte. Die gleichzeitige Zugabe von 20 μ mol/l Pan-Caspase-Inhibitor und 10^{-5} mol/l CpdA zu den Zellen führte zu einem 100%igen Überleben der Zellen (Abb. 4-7), wodurch nochmals die Apoptose-Induktion durch CpdA bestätigt wurde.

Um zu analysieren, ob diese Effekte auch in peripheren, nicht-hämatopoetischen Zellen zu beobachten sind, wurde dieser Versuch mit HEK-Zellen durchgeführt. Nach Zugabe von 10^{-5} mol/l und 10^{-6} mol/l CpdA beziehungsweise Dex konnte kein Zellsterben festgestellt werden. Wurden allerdings Konzentrationen von 10^{-4} mol/l und 10^{-3} mol/l CpdA eingesetzt, konnte innerhalb weniger Stunden Apoptose detektiert werden.

Diese Ergebnisse zeigen eine eindeutig höhere Resistenz der HEK-Zellen gegenüber CpdA-induzierter Apoptose als SH-Sy5y-Zellen.

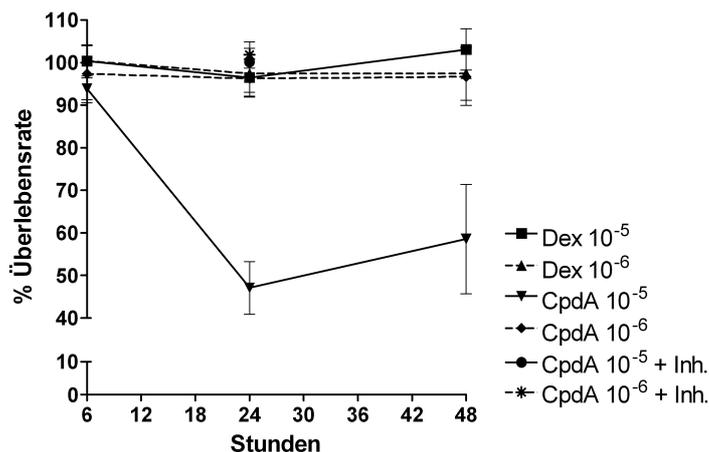


Abb. 4-7 Relative Überlebensrate von SH-Sy5y Zellen nach Dex- und CpdA-Zugabe. Durchflusszytometrische Analyse apoptotischer Zellen sechs, 24 und 48 Stunden nach Zugabe von Dex und CpdA in den Konzentrationen 10^{-5} mol/l bzw. 10^{-6} mol/l; Inh. = Pan-Caspase-Inhibitor (20 μ mol/l).

4.6 Kein verbesserter EAE-Verlauf in GR^{LckCre} Mäusen nach Compound A-Therapie

Unter 3.5 wurde beschrieben, dass der therapeutische Effekt hochdosierter GC durch den cGR in T-Zellen vermittelt wird. Dies wurde *in vivo* anhand T-Zell-spezifischer GR-defizienter Mäuse nachgewiesen.

Da *in vitro* Experimente zeigten, dass CpdA unabhängig vom GR Apoptose induzierte, wurde im weiteren Verlauf anhand konditionaler GR-defizienter Mäuse analysiert, ob der unter 4.1 beobachtete Therapie-Effekt in Abhängigkeit des cGR in T-Zellen vermittelt wird oder ob dieser in diesem Zusammenhang vernachlässigbar ist.

Für dieses Experiment wurden GR^{LckCre} Mäuse und deren Vergleichsgruppe (C57Bl/6) dreimal mit 100 µg CpdA in Wasser beziehungsweise PBS behandelt. In therapierten Wildtyp-Mäusen kam es im Gegensatz zu PBS behandelten Wildtyp-Mäusen zu einer sofortigen, signifikanten Verbesserung des Krankheitsverlaufes ($p \leq 0,01$), wobei der durchschnittliche EAE-Score in der CpdA-Gruppe ein Tag nach Therapie-Ende bei ca. zwei und in der PBS-Gruppe bei ca. vier lag (Abb. 4-8).

In CpdA behandelten GR-defizienten Mäusen konnte im Gegensatz zu den Kontrollen keine therapeutische Verbesserung, sondern eine signifikante Verschlechterung des Krankheitsverlaufes festgestellt werden ($p \leq 0,01$). Während Kontrolltiere vier Tage nach Therapie-Ende einen durchschnittlichen EAE-Score von ca. vier zeigten, wurde in GR^{LckCre} Mäusen ein EAE-Score von ca. 6 ermittelt (Abb. 4-8). Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass die Vermittlung therapeutischer CpdA-Wirkungen von der Anwesenheit des cGR in T-Lymphozyten abhing.

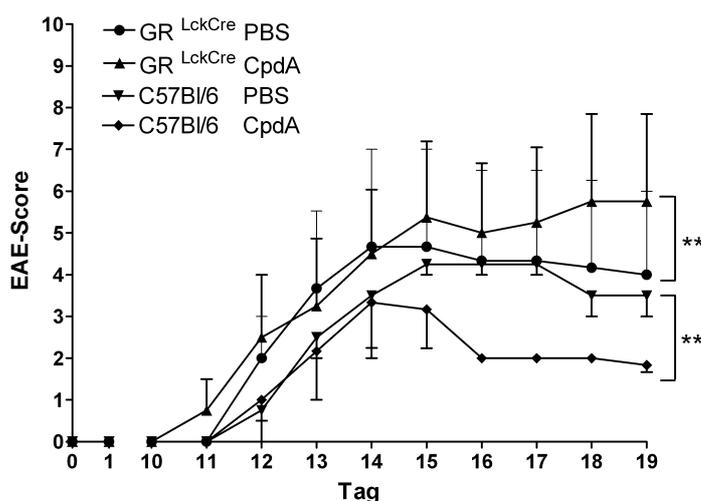


Abb. 4-8 Klinischer EAE-Verlauf nach CpdA-Therapie in T-Zell-spezifischen GR-defizienten Mäusen. Kein therapeutischer Effekt nach CpdA-Applikation (100 µg/20 g) in GR^{LckCre} Mäusen im Gegensatz zur Vergleichsgruppe (C57Bl/6); $n = 3$ bzw. 4 (GR^{LckCre}) und $n = 2$ bzw. 3 (C57Bl/6), Behandlung an den Tagen 13/14/15 (GR^{LckCre}) und 14/15/16 (C57Bl/6).

4.7 Physikochemische Untersuchungen von Compound A

Unter 4.1 und 4.2 konnte anhand von *in vivo*-Experimenten festgestellt werden, dass die Therapie mit CpdA je nach verwendetem Solvens entweder zu einem signifikant verbesserten oder verschlechterten Krankheitsverlauf führte. Diese unterschiedlichen Beobachtungen wurden bisher noch nicht beschrieben (Dewint *et al.*, 2008; De Bosscher *et al.*, 2005). Allerdings gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass CpdA *in vitro* nach Lösen in PBS chemisch instabil ist und in Lösung ein zyklischer Metabolit (Aziridin) gebildet wird (Louw *et al.*, 1997).

Aziridine sind hochreaktive, stickstoffhaltige Verbindungen, die als Grundelemente in zytostatisch wirksamen Substanzen wie Mitomycin oder Thiotepa enthalten sind. Der zugrunde liegende Wirkmechanismus dieser Zytostatika beruht unter anderem auf der Interkalation mit der DNS, welcher anschließend zur Apoptose-Induktion in Zellen führt.

Um die Hypothese zu testen, ob nach Lösen von CpdA in PBS *in vitro* Aziridin gebildet wird, welches eventuell für die beobachtete Apoptose-Induktion verantwortlich sein könnte, wurden massenspektrometrische sowie ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchungen von CpdA in Lösung durchgeführt.

4.7.1 Massenspektrometrische Analysen von Compound A

Vor massenspektrometrischen Analysen wurde das in Wasser und PBS gelöste CpdA mittels Flüssigchromatographie (HPLC) getrennt.

Die Chromatogramme zeigen deutlich, dass direkt nach Lösen von CpdA in Wasser mindestens ein Produkt mit einer Retentionszeit von ca. 4,1 Minuten in Lösung vorhanden war (Abb. 4-9, A). Dahingegen konnten zum gleichen Zeitpunkt in PBS mindestens zwei verschiedene Fraktionen mit den Retentionszeiten 2,3 und 4,5 Minuten beobachtet werden (Abb. 4-9, C). Nach zweistündiger Inkubation wurden in der CpdA/Wasser-Lösung ebenfalls mindestens zwei Produkte mit den Retentionszeiten 2,4 und 4,3 Minuten detektiert (Abb. 4-9, B). In PBS konnte bereits nach einer 30-minütigen Inkubationszeit nur noch mindestens ein Produkt mit einer Retentionszeit von ca. 2,2 Minuten nachgewiesen werden (Abb. 4-9, D).

Im Anschluss an die chromatographische Auftrennung wurden diese Lösungen massenspektrometrisch analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen ergaben, dass es sich in beiden Lösungsmitteln um unterschiedliche Proben handelte. Da mit der Massenspektrometrie allerdings keine Strukturaufklärung möglich ist, konnte lediglich vermutet werden, dass in PBS eine zyklische Verbindung gebildet wurde.

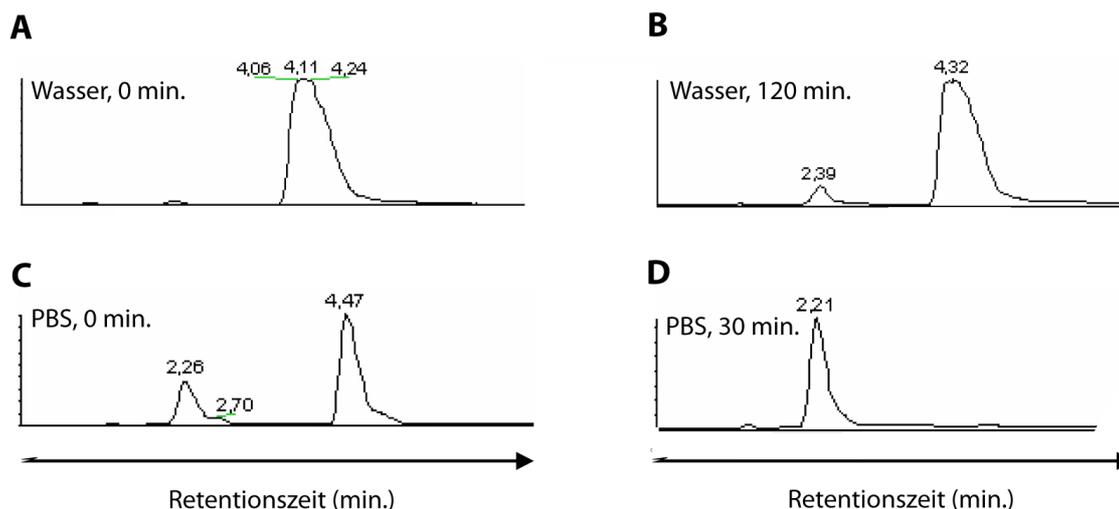


Abb. 4-9 Flüssigchromatographische Analysen von CpdA gelöst in Wasser und PBS. HPLC-Analyse von CpdA gelöst in Wasser (1 mg/ml) und PBS (0,5 mg/ml). Messung direkt nach Lösen der Substanz in Wasser (**A**) und PBS (**C**) nach 120 Minuten in Wasser (**B**) und nach 30 Minuten in PBS (**D**).

4.7.2 ¹H-NMR-Spektroskopische Analysen von Compound A

Zur Klärung und genauen Zuordnung der massenspektrometrischen Fragmente wurden beide CpdA-Lösungen zusätzlich ¹H-NMR-spektroskopisch untersucht.

Die Analysen von CpdA in D₂O ergaben, dass nach mehrstündigem Messen noch ausreichend CpdA in Lösung vorhanden war und kaum Metabolisierungen stattgefunden hatten. Wurde CpdA allerdings in 0,15 mol/l PBS/D₂O gelöst, konnte bereits nach wenigen Minuten die Bildung des zyklischen Aziridins beobachtet werden.

In Abb. 4-10 sind die Metabolisierungen von CpdA in Wasser und Pufferlösung schematisch zusammengefasst, die durch ¹H-NMR-spektroskopische Analysen nachgewiesen wurden. Während es in wässriger ungepufferter Lösung erst nach einigen Tagen zur Hydrolyse des Chloratoms und - abhängig von der CpdA-Menge - nach Tagen bis Monaten zur Bildung des α -Sympathomimetikums Synephrin kam, führte das Lösen von CpdA in Pufferlösung innerhalb weniger Minuten zur Bildung des zyklischen Aziridins. Dieses wurde nach einer Halbwertszeit von einigen Tagen ebenfalls hydrolysiert und innerhalb einiger Wochen zu Synephrin umgesetzt.

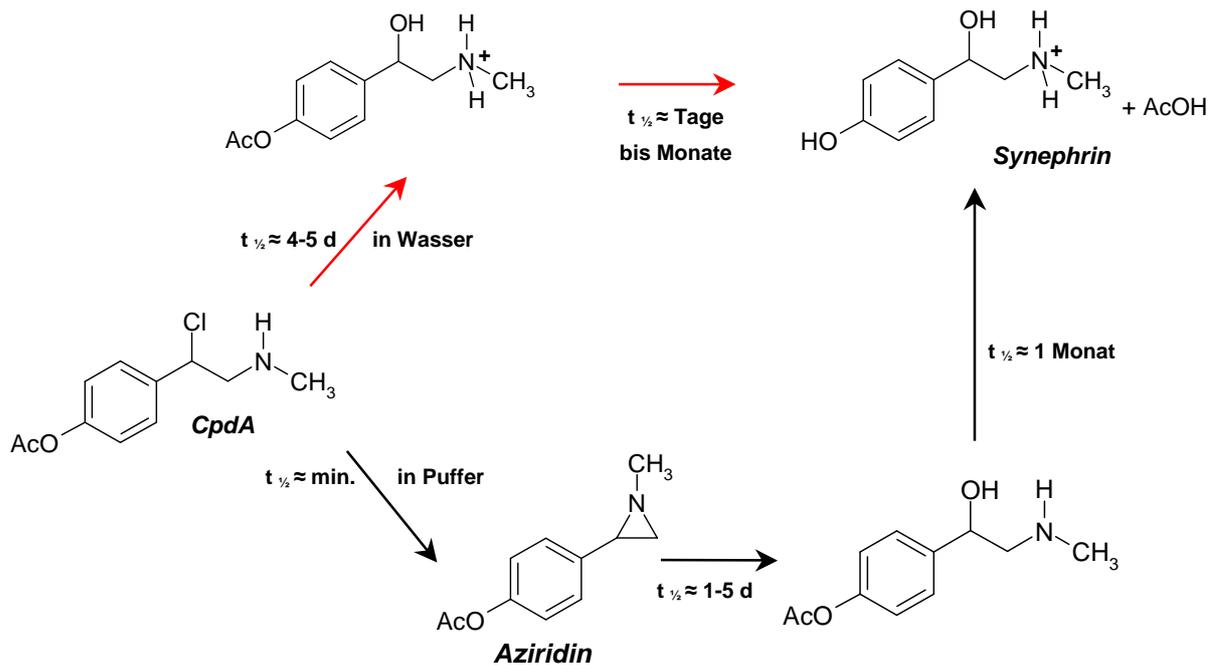


Abb. 4-10 Schematische Darstellung der *in vitro* Reaktionen von CpdA in Wasser (rote Pfeile) und CpdA in PBS (schwarze Pfeile) nach $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischer Analyse. In wässriger, ungepufferter Lösung wird mit einer Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von 4-5 Tagen die Chloridgruppe aus dem CpdA-Molekül abgespalten und durch eine alkoholische Gruppe ersetzt (-OH). Je nach Konzentration der Ausgangssubstanz kommt es innerhalb von Tagen bis Monaten zu einer Hydrolyse des phenolischen Esters (AcO-). Wird CpdA in PBS gelöst (pH=7,6), kommt es mit einer $t_{1/2}$ von wenigen Minuten zur Bildung des zyklischen Aziridins, welches mit einer $t_{1/2}$ von ca. 1-5 Tagen wiederum hydrolysiert wird. Nach ca. einem Monat liegt die Hälfte dieser Verbindung hydrolysiert als Synephrin vor, wie es bereits für CpdA in Wasser gezeigt wurde. AcOH = Essigsäure, AcO- = Essigsäureester. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ist die Fläche unter der Kurve (Integral) proportional zur Anzahl der Wasserstoff-Atome. Durch zeitaufgelöste Messung ergibt sich die Zusammensetzung des Stoffgemisches, woraus die Kinetik direkt abgeleitet und die Halbwertszeit $t_{1/2}$ bestimmt werden kann.

Aus diesen Beobachtungen ging nicht hervor, ob die Zyklisierung von CpdA in PBS auf die in Lösung enthaltenen Ionen oder den pH-Wert zurückzuführen war. Da PBS hauptsächlich aus Phosphatsalzen besteht, wurden diese als mögliche Katalysatoren der zugrunde liegenden Reaktion diskutiert und in einem nächsten Experiment durch eine gepufferte, phosphatfreie ein molare Tris-Lösung des gleichen pH-Wertes ersetzt.

$^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch konnte festgestellt werden, dass die Zyklisierung in dieser Lösung noch rascher ablief als in der bisher verwendeten PBS-Lösung. Die vermutete pH-Wert-Abhängigkeit konnte durch eine Versuchsreihe mit Pufferlösungen unterschiedlicher pH-Werte eindeutig nachgewiesen werden. Hierfür wurde jeweils ca. 0,1 mg in 100 mmol/l $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Pufferlösungen mit je unterschiedlichen pH-Werten gelöst und in bestimmten zeitlichen Abständen vermessen. Während die Aziridinbildung in einer Pufferlösung des pH-Wertes 7,1 innerhalb von ca. 30 Minuten abgeschlossen war, dauerte es lediglich ca. zwei Minuten in einer Pufferlösung des pH-Wertes 8,5.

Durch diese Messungen konnte gezeigt werden, dass die Aziridinbildung umso rascher stattfand, je alkalischer die Pufferlösung war. Abb. 4-11 stellt sehr deutlich die exponentielle Zersetzung von CpdA in Pufferlösung dar, wobei die Bildung des Aziridins zu erkennen ist. Neben der Hauptform des Aziridins (az1, rot) ist die Entstehung einer isomeren Verbindung (az2, grün) zu beobachten.

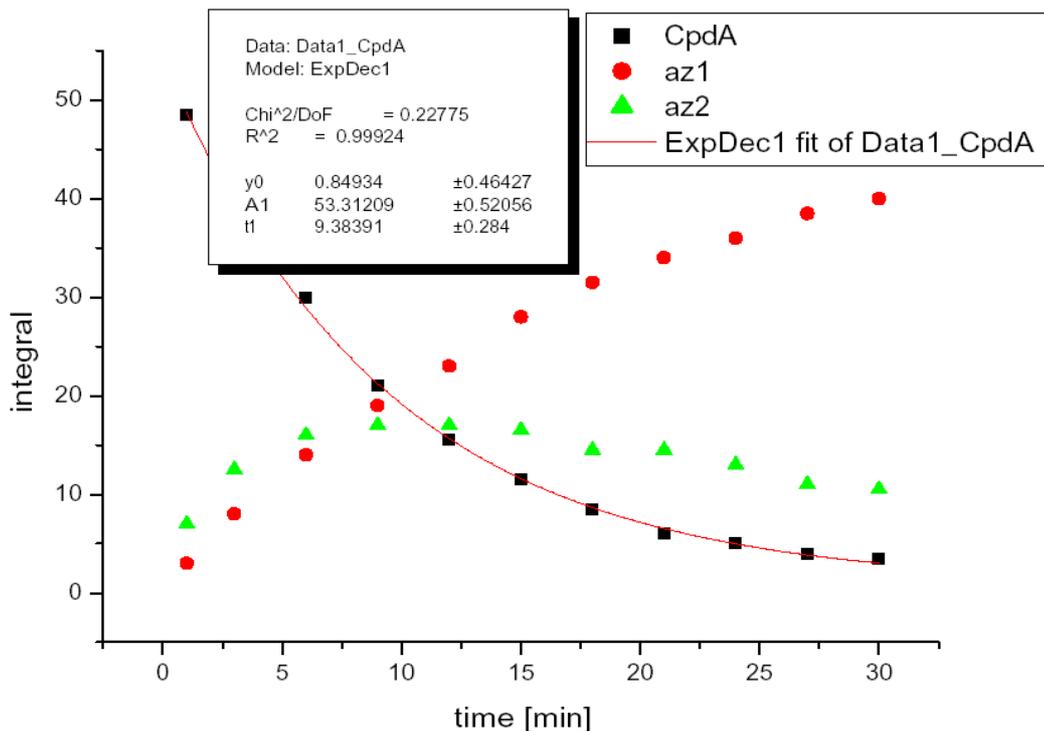


Abb. 4-11. Zeitliche Umsetzung von CpdA in das korrespondierende Aziridin in Pufferlösung. Während CpdA in Pufferlösung (pH 7,1) innerhalb von 30 Minuten abgebaut wird, entstehen zeitgleich zwei isomere Formen des Aziridins (az1 und az2).

4.8 Das $\beta_{1/2}$ -Sympathomimetikum Isoproterenol verbessert den EAE-Verlauf

Das Immunsystem und das sympathische Nervensystem stehen miteinander in Wechselwirkung. Durch Aktivierung des sympathischen Nervensystems (zum Beispiel vermittelt durch Stress) werden Adrenalin und Noradrenalin aus sympathischen Nervenendigungen sowie dem Nebennierenmark freigesetzt. Diese können Immunantworten über α - und β -adrenerge Rezeptoren auf Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems beeinflussen (Dowdell *et al.*, 1999).

Der Literatur zufolge gibt es Hinweise auf die Effektivität sympathomimetisch wirkender Substanzen in der Therapie der EAE. Im chronisch-schubförmigen EAE-Modell der Lewis-Ratte konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass das $\beta_{1/2}$ -Sympathomimetikum Isopro-

terenol sowohl erste akute EAE-Attacken als auch die Schubfrequenz in diesem Modell signifikant reduzierte (Wiegmann *et al.*, 1995).

In vitro Analysen von CpdA zeigten unter 4.7.2, dass unter bestimmten chemischen Bedingungen ein sympathomimetisch wirksamer Metabolit (Synephrin) entstand. Daraufhin stellte sich die Frage, ob Sympathomimetika im chronischen EAE-Modell der C57Bl/6 Maus therapeutische Wirkungen vermitteln können, wie es in der Literatur bereits für die chronisch-schubförmige EAE beschrieben wurde (Wiegmann *et al.*, 1995).

Da über den Einsatz von α -Sympathomimetika in der Therapie der EAE kaum Publikationen vorhanden sind, wurde anstelle dessen Isoproterenol eingesetzt. Dieses wirkt über β_1 - und β_2 -adrenerge Rezeptoren, die unter anderem auf T- und B-Lymphozyten exprimiert werden (Nance und Sanders, 2007).

Nach Auftreten der ersten Krankheitssymptome bei einem durchschnittlichen EAE-Score von ca. drei wurde Isoproterenol in Wasser gelöst und C57Bl/6 Mäusen in drei verschiedenen Dosierungen (1000 μ g, 300 μ g und 100 μ g/ 20 g KG) an den Tagen 14, 15 und 16 appliziert.

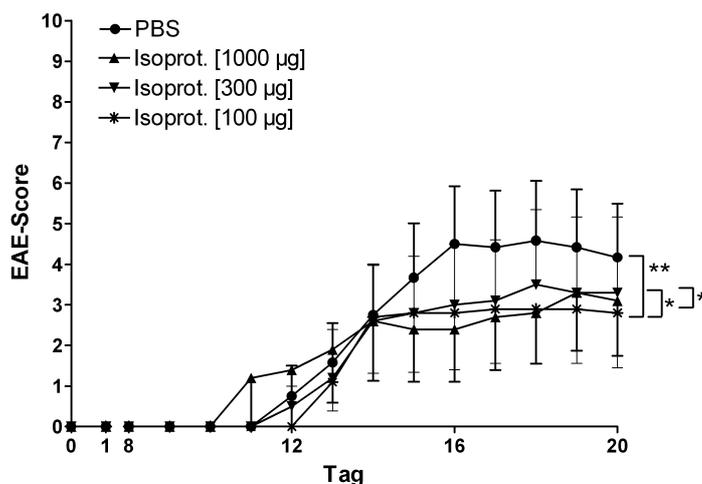


Abb. 4-12 Klinische Verbesserung des EAE-Verlaufes nach dreitägiger Isoproterenol-Therapie. Therapeutische Applikation von Isoproterenol (1000 μ g, 300 μ g und 100 μ g/20 g KG) an den Tagen 14/15/16. n = 6 bzw. n = 5; Darstellung eines von zwei repräsentativen Tierexperimenten.

Wie Abb. 4-12 zeigt, führte die dreimalige Gabe des Sympathomimetikums im Vergleich zur Kontrollgruppe scheinbar dosisunabhängig zu einem Anhalten der EAE-Symptomatik und somit zu einer signifikanten Verbesserung des EAE-Verlaufes ($p \leq 0,01$ beziehungsweise $p \leq 0,05$), die bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes (Tag 20) anhält.

4.9 $\beta_{1/2}$ -Sympathomimetika verbessern den EAE-Verlauf durch reduzierte T-Zellinfiltration und MHC-II-Expression

Nachdem eine Verbesserung des EAE-Verlaufes unter Isoproterenol-Therapie beobachtet werden konnte, stellte sich die Frage, ob dieser Effekt (wie bei hochdosierten GC) unter anderem auf eine reduzierte Leukozyteninfiltration in das ZNS zurückzuführen ist.

Um diese Frage zu klären, wurden histologische Analysen durchgeführt. Hierfür wurden C57Bl/6 Mäuse bei einem durchschnittlichen EAE-Score von ca. fünf dreimal mit 1000 μg Isoproterenol und PBS behandelt. Zehn Stunden nach der letzten Injektion wurden diese Mäuse perfundiert, wobei die behandelten Tiere einen durchschnittlichen EAE-Score von ca. 5,5 und die Kontrolltiere einen ungefähren Score von sieben aufwiesen. Die Rückenmarksquerschnitte wurden auf infiltrierte T-Zellen (CD3), Makrophagen/Mikroglia (Iba-1), Fc γ II/III-Rezeptor, auf die Expression der induzierten Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) und der MHC-II-Moleküle untersucht.

Die quantitative Auswertung infiltrierter T-Zellen im lumbalen Rückenmark gab erste Hinweise darauf, dass es durch die dreitägige Therapie mit Isoproterenol zu einer reduzierten Infiltration von CD3⁺ T-Lymphozyten kam. Während die PBS-behandelten Tiere eine durchschnittliche T-Zelldichte von ca. 760 Zellen/mm² aufwiesen, konnte nach Isoproterenol-Gabe lediglich eine Infiltratdichte von ca. 500 Zellen/mm² detektiert werden. Auch wenn zwischen Kontroll- und Therapie-Gruppe kein Unterschied in der Mikroglia/Makrophagendichte, der iNOS-Expression und der Expression des Fc γ II/III-Rezeptors festgestellt werden konnte, gab der Nachweis des Oberflächenantigens MHC-II in der Isoproterenol-Gruppe Hinweise auf eine verminderte Expression (Abb. 4-13).

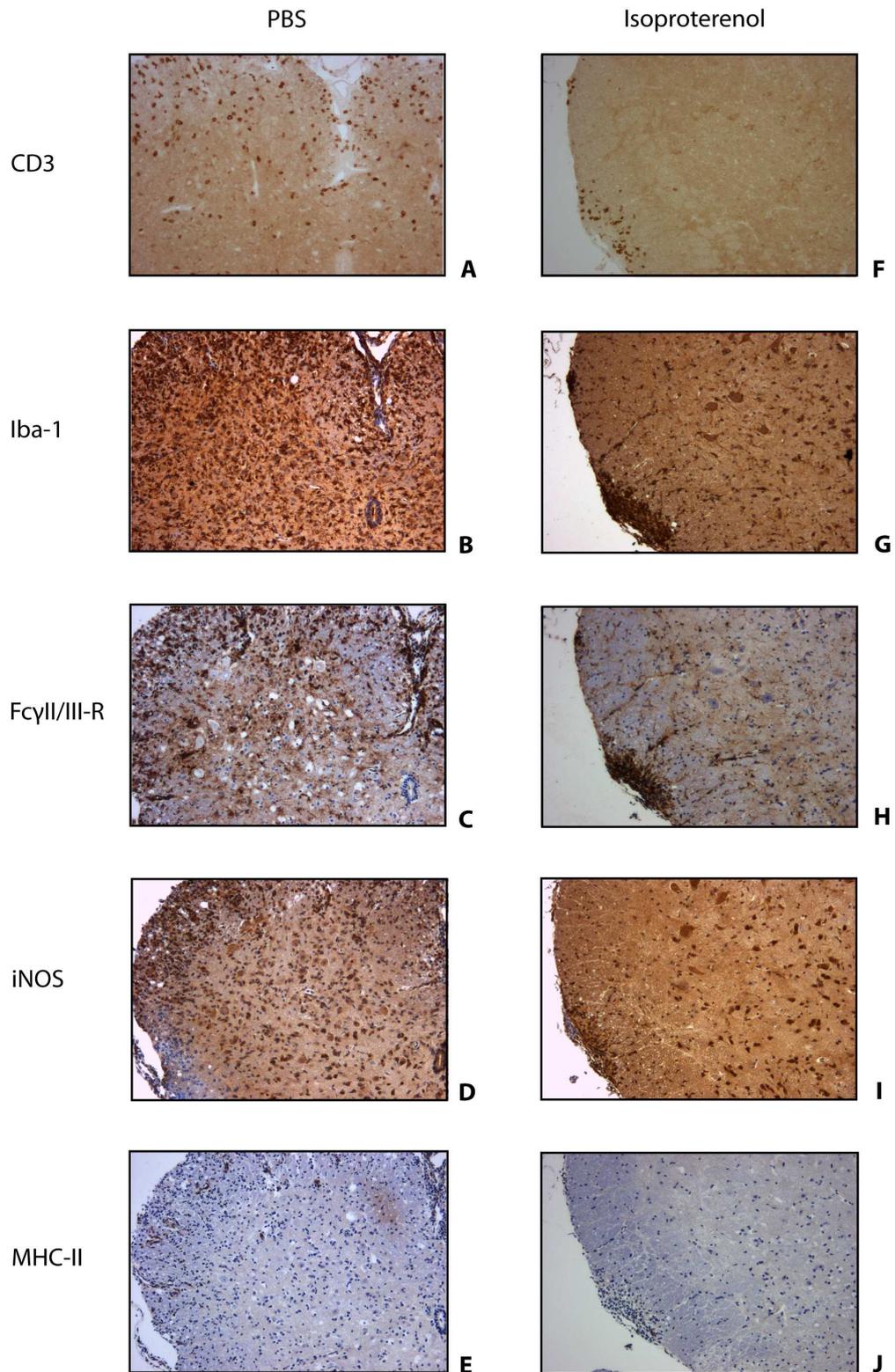


Abb. 4-13 Immunohistochemische Analysen PBS- und Isoproterenol-behandelter Mäuse. Nachweis von T-Zellen (**A, F**), Makrophagen/Mikroglia (**B, G**), des FcγII/III-Rezeptors (**C, H**), der iNOS (**D, I**) und der MHC-II-Expression (**E, J**) im lumbalen Rückenmark einer Kontrollmaus (EAE-Score 8) und einer therapeutisch behandelten Maus (EAE-Score 5); 100fache Vergrößerung.

5 Diskussion

5.1 Glukokortikoide

5.1.1 Dexamethason vermittelt in der EAE dosisabhängige, antiinflammatorische Wirkungen über den zytosolischen Glukokortikoid-Rezeptor in T-Lymphozyten

Hochdosierte GC stellen das Mittel der Wahl zur Behandlung akuter Schübe MS-Erkrankter dar. Der effektiven Wirkung der GC stehen allerdings viele Nebenwirkungen gegenüber, die oftmals eine vollkommene Genesung der Patienten behindern. Die Standardtherapie besteht in der intravenösen Gabe von 500-1000 mg MP über drei bis fünf Tage und einem anschließendem Ausschleichen mit oral verabreichten GC, wie Prednisolon (Beck *et al.*, 1992). Obwohl diese Therapie seit Jahrzehnten in der Praxis angewandt wird, sind die zugrunde liegenden Mechanismen dieser hochdosierten GC-Therapie der MS beziehungsweise der EAE bis heute nicht völlig bekannt.

Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass GC ihre Wirkungen über den zytosolischen GR (cGR) vermitteln. Vor einigen Jahren jedoch brachten Beobachtungen von sehr schnell vermittelten GC-Wirkungen das bekannte Modell ins Schwanken und stützten die Hypothese, dass neben genomischen auch sogenannte nicht-genomische Mechanismen existieren. Es wurde postuliert, dass diese Effekte entweder über physikochemische Interaktionen der Steroidhormone mit Zellmembranen oder sogar durch einen membranständigen GR, der vor kurzem auf peripheren Leukozyten im Blut von Patienten mit rheumatoider Arthritis nachgewiesen werden konnte (Bartholome *et al.*, 2004), vermittelt werden.

Daraus entwickelte sich im Rahmen dieser Arbeit die Fragestellung, welche Bedeutung der cGR für die Vermittlung therapeutischer GC-Effekte hat. Da die meisten experimentellen Untersuchungen in diesem Kontext bisher hauptsächlich im monophasischen Modell der Lewis-Ratte durchgeführt wurden, wurde vor Beginn dieser Analysen ein geeignetes Behandlungsschema im chronischen MOG₃₅₋₅₅-EAE-Modell der C57Bl/6 Maus etabliert.

Das Modell der MOG₃₅₋₅₅-EAE in der C57Bl/6 Maus stellt die chronische Facette der Erkrankung dar, die durch fulminante Entzündungsreaktionen, demyelinisierende Läsionen und axonalen Schaden gekennzeichnet ist. Auch wenn die Standardtherapie des akuten MS-Schubes in der Gabe hochdosierten MP besteht, wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Behandlung der Tiere zunächst Dex gewählt, da dieses bereits in der Therapie der EAE in Nagetieren etabliert ist und im Vergleich zu MP eine gesteigerte Wirkpotenz besitzt (Buttgereit *et al.*, 1999).

Erste Versuche zeigten, dass Dex in der chronischen MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE sowohl präventiv wirkte als auch therapeutisch zu einer dosisabhängigen Verbesserung der EAE-

Symptome führte. Diese klinischen Beobachtungen konnten histologisch durch eine verminderte Leukozyteninfiltration in das ZNS gestützt werden.

Der Literatur zufolge konnten ähnliche Feststellungen über die Wirksamkeit von therapeutischem Dex bereits im EAE-Modell der Lewis-Ratte gemacht werden. *Matous-Malbohan et al.* zeigten, dass die Gabe von 2 mg Dex/kg/Tag vom Tag der Immunisierung an bis Tag neun nach Immunisierung unter anderem zu einer Unterdrückung klinischer wie histopathologischer Zeichen der EAE führte. Dies äußerte sich in einer sehr geringen Anzahl perivaskulärer Infiltrate mit einer reduzierten Infiltratdichte (*Matous-Malbohan et al.*, 1976). Auch *Bolton* und *Flower* konnten nach einer Dex-Applikation an den Tagen 0-4 und 7-11 eine eindeutige Korrelation zwischen Dosierung und Therapieeffekt beobachten. Während die Ratten unter einer Dosis von 0,005 mg/kg noch EAE-Symptome zeigten, waren sie unter der Hochdosistherapie von 1,0 mg/kg Dex sogar vor EAE geschützt (*Bolton und Flower*, 1989).

Neben reduzierten Zellinfiltraten konnte in der vorliegenden Arbeit auch gezeigt werden, dass Dex protektiv auf die BHS-Integrität wirkte. Während nach therapeutischer Gabe zwar eine verbesserte Integrität im Vergleich zu Kontrolltieren detektiert werden konnte, schien die Präventivgabe einen noch stärkeren Effekt auf die BHS zu haben.

Ähnliche Beobachtungen über die therapeutische Wirksamkeit von Dex auf die BHS-Integrität werden in der Literatur beschrieben. Hier konnte im EAE-Modell der Lewis-Ratte gezeigt werden, dass die zweimalige tägliche Applikation für zwei Tage zu einer dosisabhängigen Verbesserung der EAE-Symptomatik führte und zugleich auch dosisabhängig einen Zusammenbruch der BHS verhinderte (*Paul und Bolton*, 1995). Dabei konnte festgestellt werden, dass die therapeutische Applikation von 0,01 mg Dex/kg weder einen signifikanten Effekt auf die BHS noch auf die klinischen EAE-Zeichen hatte. Während eine Dosis von 0,1 mg Dex/kg neben der Verbesserung des EAE-Verlaufes ausdrücklich nur im Rückenmark das Austreten von Albumin in das Gewebe unterdrückte, verhinderte die hochdosierte Gabe von 0,5 beziehungsweise 1,0 mg Dex/kg eine Dysfunktion der BHS in Geweben wie Kleinhirn und Rückenmark (*Paul und Bolton*, 1995). *Paul und Bolton* erklärten diese Beobachtungen mit einem eingeschränkten Influx immunkompetenter Zellen über die BHS in das ZNS. Dabei könnte einerseits das *Priming* enzephalitogener Lymphozyten beeinflusst sein oder andererseits die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine unterdrückt werden. Ferner könnten aber auch direkte Dex-Wirkungen auf die Gefäße möglich sein (*Paul und Bolton*, 1995).

IL-12 stellt ein sehr wichtiges Zytokin für die Differenzierung naiver CD4⁺ Zellen in IFN γ -produzierende T_H1-Zellen dar, die allgemein für die Vermittlung der EAE verantwortlich gemacht wurden. Diese Annahme änderte sich allerdings innerhalb der letzten Jahre, nachdem durch tierexperimentelle Studien anhand von IL-12- und IL-23-*Knock-out* Mäu-

sen sowie durch Zytokin-Analysen gezeigt werden konnte, dass weniger IL-12 als vielmehr IL-23 eine zentrale Rolle in der Entstehung organ-spezifischer Autoimmunerkrankungen spielt (Cua *et al.*, 2003). IL-23 ist für die Aufrechterhaltung CD4⁺ IL-17-produzierender T-Zellen (T_H17-Zellen) notwendig, die durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-17A, IL-17F, TNF α und IL-22 charakterisiert sind und ist hauptsächlich für die Erhaltung der Entzündungsreaktionen im Spätstadium verantwortlich. Dass neben T_H1- auch T_H17-Zellen an autoimmun bedingten Erkrankungen beteiligt sind, konnte unter anderem durch die gezielte Deletion des T_H1-Zytokins IFN- γ bestätigt werden, welches paradoxerweise zu einer Verschlechterung des EAE-Verlaufes führte (Ferber *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu hatte das gezielte Entfernen von IL-17 einen attenuierten Krankheitsverlauf zur Folge (Hofstetter *et al.*, 2005).

Es ist bekannt, dass die GC-Applikation unterschiedliche Effekte auf das T_H1- und T_H2-Zytokinprofil hat. Während die Produktion proinflammatorischer T_H1-Zytokine wie INF γ und TNF α unter GC-Gabe reduziert wird, kommt es zu einer verstärkten Bildung antiinflammatorischer T_H2-Zytokine wie IL-4, IL-10 und IL-13 (Momcilovic *et al.*, 2008). In diesem Zusammenhang sollte im weiteren Verlauf der Arbeit die Qualität und Quantität der Rückenmarks-Infiltrate nach Dex-Behandlung analysiert werden, wobei insbesondere die Wirkung auf IL-17 positive wie negative T-Zellen von Interesse war.

Durchflusszytometrische Analysen zeigten, dass ZNS-Infiltrate sowohl aus IL-17⁺ als auch IL-17⁻ Zellen bestanden. Nach dreimaliger Dex-Applikation konnte im Vergleich zu Kontrolltieren eine signifikante Reduktion der absoluten Zellzahlen IL-17⁺- wie auch IL-17⁻-Zellen beobachtet werden, was prozentual betrachtet allerdings kaum Unterschiede erkennen ließ. Dies zeigte eindeutig, dass hochdosierte GC in der Lage sind, unabhängig von der T-Helfer-Subpopulation Entzündungsreaktionen im ZNS zu vermindern.

Eine totale Deletion des GR führt in neugeborenen Mäusen innerhalb weniger Stunden nach Geburt aufgrund unzureichender Ausbildung/Reifung der Lungen zum Tod (Cole *et al.*, 1995). Um aber dennoch den Beitrag des cGR und die Wirkungen hochdosierter GC auf molekularer Ebene analysieren zu können, wurden in dieser Arbeit heterozygote GR-defiziente Mäuse (GRN^{+/-}) eingesetzt. Diese Tiere sind durch eine auf bis zu 75% reduzierte GR-Expression auf Proteinebene charakterisiert (Wang *et al.*, 2006).

Der klinische EAE-Verlauf dieser Mäuse zeigte nach Dex-Therapie eindeutig, dass der cGR für die Vermittlung therapeutisch applizierter GC unerlässlich ist. Dies konnte aus einem signifikant schlechteren Ansprechen der GRN^{+/-} Tiere auf die Dex-Therapie gefolgert und durch eine erhöhte Leukozyten-Infiltration in das ZNS bestätigt werden. Da die in diesem Experiment eingesetzten Tiere durch eine stark verminderte GR-Expression ge-

kennzeichnet waren, wurden diese und ihre Kontrollen nicht mit hochdosiertem Dex, sondern mit einer reduzierten, aber dennoch wirksamen Dosis von 4 mg/kg behandelt.

In der Rheumatologie wird unter der GC-Pulstherapie eine ein- oder mehrtägige Applikation von mehr als 250 mg Prednisolon-Äquivalent (PÄ) verstanden. Da allerdings bereits eine Dosierung von 100 mg PÄ, entsprechend 15 mg Dex, zu einer vollständigen Sättigung cGR führt, scheint bei sehr hohen Dosierungen keine Spezifität für den GR mehr vorhanden zu sein (Buttgereit *et al.*, 2004).

Da in dem vorliegenden Experiment lediglich ein fünfundzwanzigstel der normalerweise verwendeten Hochdosis (100 mg/kg Dex) appliziert wurde und diese Dosis selbst nach dreitägiger Gabe bei weitem unterhalb von 100 mg PÄ (15 mg Dex) lag, konnte die Vermittlung antiinflammatorischer GC-Wirkungen durch nicht spezifische nicht-genomische Effekte mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Es ist bekannt, dass GC auf verschiedene Zelltypen des adaptiven sowie angeborenen Immunsystems wirken (Reichardt *et al.*, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich nun die Frage, ob für den Therapie-Erfolg hochdosierter GC Wirkungen auf alle Zelltypen wichtig sind oder ob die Wirkung auf eine spezielle Zellpopulation ausreicht, um eine Verbesserung der EAE-Symptomatik zu erzielen.

Für die Klärung dieser Frage wurden in einem ersten Experiment hämatopoetische Stammzellchimären eingesetzt. Diese Mäuse sind durch ein Fehlen des cGR im gesamten hämatopoetischen Kompartiment gekennzeichnet, während die Zellen des nicht-hämatopoetischen Kompartiments einen völlig intakten GR exprimieren. Die Beobachtung, dass hämatopoetische Stammzellchimären im Vergleich zu Wildtyp-Tieren kaum auf die hochdosierte Dex-Therapie reagierten, konnte immunhistochemisch untermauert werden und führte zu dem Schluss, dass GC auf eine Zellpopulation innerhalb des hämatopoetischen Kompartiments wirken mussten.

In vorangegangenen Versuchen mit C57Bl/6 Mäusen konnte gezeigt werden, dass Dex nach dreimaliger Applikation zu einer verbesserten Integrität der BHS führte, wobei allerdings noch nicht geklärt war, ob dies durch direkte Effekte auf endotheliale Zellen oder vielmehr durch eine verminderte Produktion proinflammatorischer Zytokine ausgelöst wurde. Interessanterweise konnte nach dreitägiger Dex-Therapie in der Gruppe chimärer Mäuse im Vergleich zu Wildtypen histologisch keine Besserung der BHS-Integrität festgestellt werden, obwohl der GR in Endothelzellen intakt war. Dies sprach eindeutig gegen direkte Dex-Effekte auf die BHS und stützte die Annahme, dass hochdosiertes Dex in erster Linie zu einer reduzierten Leukozyteninfiltration in das ZNS und einer verminderten Produktion proinflammatorischer Zytokine führte.

Im weiteren Verlauf sollte unter den hämatopoetischen Zellpopulationen diejenige identifiziert werden, die als mögliches Ziel der Hochdosis-GC-Therapie in Frage kam. Da ZNS-Infiltrate in der EAE hauptsächlich aus Makrophagen und T-Zellen bestehen, wurden in den folgenden Versuchen myeloid- und T-Zell-spezifische GR-defiziente Mäuse eingesetzt, um deren Beteiligung in diesem Kontext bestimmen zu können.

Die Therapierbarkeit myeloid-spezifischer GR-defizienter Mäuse mit hochdosiertem Dex zeigte, dass der cGR in diesen Zellen für den Therapie-Effekt vernachlässigbar war.

Allerdings stehen diese Beobachtungen im Gegensatz zu Daten aus anderen entzündlichen Modellen wie der Kontakthypersensitivität (CHS). Die CHS stellt eine T-Zell vermittelte Immunreaktion dar und dient als klassisches Tiermodell für die humane allergisch bedingte Kontaktdermatitis. Anhand dieses Tiermodells konnte gezeigt werden, dass die Expression des cGR in Makrophagen und Neutrophilen von essentieller Bedeutung ist, um in diesem Kontext antiinflammatorische GC-Wirkungen vermitteln zu können. Während die GR-Inaktivierung speziell in Keratinozyten oder T-Zellen GC-Wirkungen nicht beeinflusste, verhinderte das Fehlen des GR in Makrophagen und Neutrophilen die Reduktion inflammatorischer Immunreaktionen (Tuckermann *et al.*, 2007). Diese Beobachtungen und die Feststellungen aus der vorliegenden Arbeit zeigen somit sehr deutlich, dass die Zielzellen der GC unter verschiedenen entzündlichen Bedingungen variabel sein können.

Da myeloide Zellen nach diesem Experiment als Ziel der Hochdosis-GC-Therapie ausgeschlossen werden konnten, wurden in einem weiteren Experiment Mäuse mit einer Deletion des cGR speziell in T-Zellen analysiert. Die *Knock-out* Tiere zeigten kaum eine Reaktion auf die Hochdosis-Dex-Therapie, woraus gefolgert werden konnte, dass die Mehrheit der GC-Wirkungen im EAE-Modell auf der Anwesenheit des cGR in T-Zellen beruhte.

In tierexperimentellen Versuchen mit hämatopoetischen Stammzellchimären und T-Zell-spezifischen *Knock-out* Mäusen konnten zwei Auffälligkeiten beobachtet werden: ein verfrühter Krankheitsbeginn und eine kurzfristige Therapierbarkeit nach Dex-Gabe. Der durchschnittlich zwei bis drei Tage früher einsetzende Krankheitsbeginn könnte auf die fehlende GR-Expression in sämtlichen hämatopoetischen Zellen beziehungsweise T-Zellen erklärt werden, die dadurch eine unzureichende Bindung und Wirkung endogener GC bedingt. Außerdem legt dies die Vermutung nahe, dass endogene GC bei intakter GR-Expression einen suppressiven Effekt auf hämatopoetische, und gezielter auf T-Zellen ausüben, wodurch die Suszeptibilität an EAE zu erkranken reduziert wird.

Ferner konnte in beiden Kohorten festgestellt werden, dass die einmalige Injektion hochdosierten Dex zu einer eintägigen Verbesserung der EAE-Symptomatik führte, die sich in ca. einem Score-Punkt äußerte. Diese Beobachtung könnte für glukokortikoide

Wirkungen auf nicht-hämatopoetische Zellen, wie Endothelzellen, sprechen. Andererseits könnte dieser kurzfristige Effekt allerdings auch auf der Vermittlung glukokortikoider Wirkungen über nicht-genomische, GR-unabhängige Mechanismen beruhen, die auf unspezifischen physikochemischen Interaktionen mit biologischen Membranen oder Hilfsmolekülen des Multiproteinkomplexes basieren (Buttgereit *et al.*, 2004). Da dieser beobachtete GC-Effekt allerdings stets nur sehr kurzfristig war, deutet dies darauf hin, dass für die langanhaltenden und therapeutischen Nutzen der cGR in T-Zellen notwendig sein muss.

Interessanterweise konnte in allen tierexperimentellen Versuchen mit GR-defizienten Mäusen (heterozygote GRN Mäuse, hämatopoetische Stammzellchimären, Myeloid- und T-Zell-spezifische GR-*Knock-out* Mäuse) ein zwar statistisch nicht signifikanter, aber dennoch tendenziell schlechterer EAE-Verlauf festgestellt werden als in den jeweils entsprechenden Wildtypen. Die Tatsache, dass diese Beobachtung in allen GR-defizienten Tiere gemacht wurde, lässt daraus schließen, dass endogene GC einen nicht unbeachtlichen Beitrag zur Unterdrückung von Immunerkrankungen leisten. Dies konnte auch im EAE-Modell der Ratte gezeigt werden. Während an EAE erkrankte Ratten zu Beginn der Rekonvaleszenz ein Maximum an endogenen GC hatten, erkrankten Tiere, denen drei Tage vor Immunisierung die Nebennieren entfernt wurden und die somit keine endogenen GC produzieren konnten, früher an EAE als Kontrollen. Ferner verlief der Krankheitsverlauf in adrenaletomierten Tieren viel rascher und führte zum Tod aller Tiere (MacPhee *et al.*, 1989).

5.1.2 Apoptose-Induktion in peripheren T-Zellen und Herabregulierung von Adhäsionsmolekülen auf peripheren T-Zellen führen zur Verbesserung der EAE

Es werden verschiedene Mechanismen diskutiert, wie GC-Wirkungen im Modell der EAE in T-Zellen vermittelt werden und eine Linderung der Symptome bewirken. Ein Mechanismus stellt die Eliminierung von T-Zellen durch Apoptoseinduktion dar. Im monophasischen EAE-Modell der Lewis-Ratte wurde bereits mehrfach gezeigt, dass sowohl endogene als auch therapeutisch applizierte GC *in situ* im ZNS Apoptose induzieren und somit Entzündungsreaktionen terminieren (Schmidt *et al.*, 2000; Tabi *et al.*, 1994; Gold *et al.*, 1997).

Der Literatur zufolge konnten immunhistochemisch sowohl in der aktiv als auch passiv induzierten MBP-EAE der Lewis Ratte T-Lymphozyten als Großteil der apoptotischen Zellen identifiziert werden. Während bei der aktiven EAE ca. 60% apoptotische Zellen detektiert werden konnten, waren es in der AT-EAE ca. 50%. Dabei war der Spiegel apoptotischer Zellen am höchsten nachdem sich die Tiere von der EAE erholt hatten

(Gold *et al.*, 1997). Ähnliche Beobachtungen konnten in der vorliegenden Arbeit gemacht werden. Hier kam es im ZNS nach dreimaliger Dex-Applikation zu einer Erhöhung des Apoptose-Spiegels von ca. 10 auf 30%. Allerdings konnte auch in PBS-behandelten Mäusen ein ähnlich starker Anstieg apoptotischer T-Zellen beobachtet werden. Die Tatsache, dass der detektierte Apoptose-Spiegel im ZNS der C57Bl/6 Maus nur die Hälfte des in der Lewis Ratte detektierten Niveaus betrug, ist sehr wahrscheinlich auf die unterschiedlichen EAE-Modelle und den Zeitpunkt der Datenerhebung zurückzuführen. Eine Erklärung dafür, dass im ZNS zwischen PBS- und Dex-behandelten Tieren kein unterschiedliches Apoptose-Niveau detektiert werden konnte, könnte möglicherweise im gesteigerten aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD) liegen. Während naive T-Zellen durch Stimulierung des T-Zell-Rezeptors aktiviert werden und Immunantworten auslösen, werden bereits aktivierte T-Zellen in Antwort auf das gleiche Signal in den AICD getrieben. Es ist möglich, dass in der chronischen Phase der EAE im ZNS AICD induziert wurde. Da GC allerdings dosisabhängig zu einer Hemmung des AICD führen (Baumann *et al.*, 2005), könnte dies eine Erklärung für die ähnlichen Apoptose-Spiegel im ZNS sein.

In peripheren T-Zellen wurde die Dex-induzierte Apoptose anhand von GR^{lckCre} und GR^{flox} Mäusen untersucht. Nach dreimaliger Dex-Therapie konnte ein signifikant erhöhter Apoptose-Spiegel von durchschnittlich 35-40% detektiert werden. Dies war nur in GR^{flox} Mäusen der Fall. In GR^{lckCre} Mäusen, denen der cGR speziell in T-Zellen fehlte, konnte nach dreimaliger PBS- beziehungsweise Dex-Applikation kein unterschiedlicher Apoptose-Spiegel nachgewiesen werden, was erneut bestätigte, dass Dex spezifisch auf T-Zellen wirkte.

Eine weitere Fragestellung befasste sich in diesem Kontext mit dem molekularen Mechanismus der Apoptose-Induktion in peripheren T-Zellen. Der Literatur zufolge sind unterschiedliche Mechanismen in der Apoptose-Induktion von Thymozyten und peripheren T-Zellen involviert. Während Caspasen und Cathepsin bei der Apoptose-Induktion in Thymozyten eine sehr bedeutende Rolle spielen, konnten die Mechanismen, die in peripheren T-Zellen zum programmierten Zelltod führen bisher nur vermutet werden. So gab es mitunter Hinweise auf die Aktivierung verschiedener Gene wie TDAG8, dig-2, Puma und Bim während GC-induzierter Apoptose (Wang *et al.*, 2006; Erlacher *et al.*, 2005; Tosa *et al.*, 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte der Einsatz Puma- beziehungsweise Bim-defizienter Mäuse erste Hinweise darauf geben, dass diese beiden pro-apoptotischen Moleküle im Kontext mit der Apoptose-Induktion in der EAE von essentieller Bedeutung sein müssen. Während erste Beobachtungen zeigten, dass das Fehlen der einzelnen Moleküle Puma oder Bim für den therapeutischen GC-Effekt kaum von Bedeutung ist, führte das zeitgleiche Fehlen beider Moleküle zu einem signifikant veränderten klinischen Krank-

heitsverlauf. Da die GC-Applikation in Puma- und Bim-doppeldefizienten Mäusen tendenziell keinen Therapieerfolg zeigte, verfestigte sich die Vermutung, dass das Zusammenspiel beider Moleküle in der GC-induzierten Apoptose eine sehr wichtige Rolle spielen muss. Für abschließende Bestätigungen dieser Vermutungen sind allerdings noch weitere tierexperimentelle Untersuchungen notwendig.

In den vergangenen Jahren haben regulatorische T-Zellen im Zusammenhang mit der Kontrolle von Autoimmunerkrankungen großes Interesse erlangt. Normalerweise werden T-Lymphozyten, die Selbstantigene erkennen und stark an diese binden, im Thymus der negativen Selektion unterworfen und eliminiert/inaktiviert. Versagt dieser Mechanismus und autoreaktive T-Zellen gelangen trotzdem in die Peripherie, werden diese durch regulatorische T-Zellen supprimiert, um die Selbsttoleranz des Immunsystems aufrechterhalten zu können (Kronenberg und Rudensky, 2005).

McGeachy et al. konnten anhand des MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE-Modells der C57Bl/6 Maus zeigen, welche bedeutende Rolle CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatorische Zellen für die Genesung der Tiere spielen. Dabei beobachteten sie einerseits, dass die Depletion CD25⁺ T-Zellen die Rekonvaleszenz der Tiere verhinderte. Andererseits führte der Transfer ZNS-spezifischer CD4⁺ CD25⁺ Zellen in Empfängermäusen zu einer Supprimierung der EAE (*McGeachy et al.*, 2005).

In humanen Studien konnte festgestellt werden, dass die Effektor-Funktionen CD4⁺ CD25^{high} T-Zellen (trotz gleicher Häufigkeit) in MS-Patienten im Gegensatz zu gesunden Kontrollen signifikant reduziert waren (*Viglietta et al.*, 2004). Ähnliche Beobachtungen wurden in Myasthenia Gravis-Patienten gemacht. Auch hier wurde im Patienten-Blut im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine signifikant erniedrigte Anzahl regulatorischer T-Zellen detektiert (*Fattorossi et al.*, 2005). Wurden in diesem Kontext GC therapeutisch appliziert, kam es sowohl im EAE-Modell (in Kombination mit IL-2) als auch in humanen Studien zu einer Steigerung der Häufigkeit und der Potenz natürlich vorkommender regulatorischer T-Zellen, was mit einer Verbesserung des jeweiligen klinischen Krankheitsverlaufes einherging (*Navarro et al.*, 2006; *Fattorossi et al.*, 2005; *Chen et al.*, 2004).

Im Gegensatz dazu zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass im Zusammenhang mit der EAE sowohl die relative Anzahl regulatorischer T-Zellen als auch das Expressionsniveau des charakteristischen Transkriptionsfaktors FoxP3 nach Dex-Behandlung nicht wie beschrieben erhöht, sondern leicht reduziert waren. Dies könnte bedeuten, dass eine erhöhte Funktion regulatorischer T-Zellen nicht unbedingt ein charakteristisches Zeichen für eine zugrunde liegende antiinflammatorische GC-Wirkung sein muss. Eine andere Erklärung für diese Diskrepanz könnte allerdings auch im Zeitpunkt der Datenerhebung

liegen. Die Analysen der in dieser Arbeit vorliegenden Werte wurden stets zehn Stunden nach der letzten Dex-Injektion durchgeführt. Die in der Literatur beschriebenen Werte wurden dagegen meist erst einige Tage nach Therapie ermittelt, so dass eine Erhöhung der Anzahl regulatorischer T-Zellen noch induziert werden konnte.

Das ZNS galt sehr lange Zeit als immunprivilegiertes Organ. Diese Meinung wurde mit dem Fehlen Antigen-präsentierender Zellen, lymphatischer Gefäße und der konstitutiven MHC-I-/II-Expression parenchymaler Zellen begründet und durch das Vorhandensein der BHS untermauert (Engelhardt und Ransohoff, 2005). Die BHS stellt dabei eine hochspezialisierte Barriere dar, die unter anderem durch enge *Tight-Junctions*, einer kontinuierlichen Basalmembran und eine geringe Pinozytose-Aktivität gekennzeichnet ist (de Boer und Gaillard, 2006). Die Ansicht, dass das immunprivilegierte ZNS durch diese strukturellen Besonderheiten keiner Kontrolle des Immunsystems unterlag, änderte sich allerdings nachdem offensichtlich wurde, dass T-Lymphozyten (hauptsächlich CD4+ Gedächtnis T-Zellen) in einer verminderten Anzahl und mit einer geringen Expression von Adhäsionsmolekülen im gesunden ZNS patrouillieren (Hickey, 2001).

Unter entzündlichen Bedingungen des ZNS wird die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen auf dem Endothel der BHS induziert, was die Voraussetzung für den Durchtritt zirkulierender T-Lymphozyten in das ZNS bildet (Engelhardt und Ransohoff, 2005). Im diesem Zusammenhang sind in der EAE beziehungsweise der MS vor allem die Adhäsionsmoleküle LFA-1, VLA-4 und CD44 von großem Interesse, deren Beteiligung an der selektiven Leukozyten-Extravasation in das entzündete ZNS sowie der Leukozyten-Rekrutierung bereits mehrfach gezeigt werden konnte (Brocke *et al.*, 1999; Brennan *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2007).

In dieser Arbeit konnte nach Applikation hochdosierter GC eine Verbesserung der EAE-Symptomatik beobachtet werden, welche auf Interaktionen mehrerer Mechanismen beruhen kann. Da die Apoptoseinduktion in peripheren T-Zellen bereits als Wirkmechanismus bestätigt wurde, sollte als nächstes analysiert werden, ob GC im chronischen EAE-Modell der C57Bl/6 Maus die Expression von Adhäsionsmolekülen auf T-Zellen beeinflussen und somit einen weiteren Wirkmechanismus darstellen.

Nach dreitägiger Dex-Therapie konnte eine reduzierte Expression von Adhäsionsmolekülen festgestellt werden. Im Vergleich zu T-Zellen, die aus dem Rückenmark isoliert wurden, war die verminderte Expression nur auf peripheren T-Zellen zu beobachten. Auffallend hierbei war eine stark ausgeprägte Reduktion der Oberflächenexpression von LFA-1 und CD44, während die VLA-4-Expression nur geringfügig herunterreguliert wurde. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit publizierten Daten. Während *Elovaara et al.* anhand humaner Studien an MS-Patienten zeigten, dass hochdosiertes MP auf Immun-

zellen des Blutes und Liquors zu einer verminderten LFA-1- und VLA-4-Expression führte (Elovaara *et al.*, 2000), beobachteten Pitzalis *et al.* auf Immunzellen gesunder Donoren eine verringerte LFA-1-Protein-Expression nach Dex-Applikation (Pitzalis *et al.*, 1997). Die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit nach dreitägiger Dex-Gabe die LFA-1- und CD44-Expression auf peripheren T-Zellen stärker reduziert war als die VLA-4-Expression, könnte möglicherweise am Aktivierungszustand der peripheren T-Zellen liegen.

All diese Beobachtungen deuten auf ein komplexes Zusammenspiel der analysierten Faktoren hin. Die nach dreitägiger Dex-Behandlung beobachtete reduzierte Infiltratdichte im Rückenmark erkrankter Tiere ist in erster Linie auf Apoptose-Induktion in peripheren T-Zellen zurückzuführen, die durch den cGR vermittelt wird. Auch wenn regulatorische T-Zellen (entgegen der Literatur) in diesem Modell keinen zusätzlichen Beitrag zu antiinflammatorischen Wirkungen der GC leisten, führen GC zur Reduktion bestimmter Adhäsionsmoleküle, die für das *Homing* zu entzündeten Geweben essentiell sind. Die Tatsache, dass hochdosiertes Dex auf peripheren enzephalitogenen sowie *Bystander* T-Zellen die Expression von Adhäsionsmolekülen herunterreguliert, verhindert deren Migration in das ZNS, wodurch der Nachschub neuer peripherer Lymphozyten vermindert wird und somit eine Besserung des Krankheitszustandes eintritt.

5.1.3 Therapeutisch appliziertes Methylprednisolon verbessert dosisabhängig die MOG-EAE und vermindert die Lymphozyten-Infiltration in das ZNS

Seit Jahrzehnten wird über die Effektivität der Hochdosis-Pulstherapie von MP in der Therapie der MS sowie der Optikusneuritis berichtet. Dabei wird unter anderem die fünftägige Behandlung des akuten MS-Schubes mit 500 mg MP beschrieben (Milligan *et al.*, 1987) oder die dreitägige i.v. Applikation von 1000 mg MP gefolgt von oralem Prednisolon (Beck *et al.*, 1992).

Aufgrund der hohen Suszeptibilität für EAE, des homogenen Krankheitsbeginns und der äußerst hochgradigen Paralyse nach Immunisierung mit relativ geringen Antigenmengen, wurden die meisten EAE-Experimente in Lewis- und DA-Ratten durchgeführt. Die MBP-induzierte EAE verläuft in der Lewis-Ratte monophasisch und ist durch entzündliche Infiltrate in Rückenmark, Hirnstamm und Kleinhirn gekennzeichnet, wobei keine Demyelinisierung beobachtet werden kann (Swanborg, 2001).

Auch die Analysen nach MP-Applikation und des Apoptoseverhalten enzephalitogener T-Zellen unter MP-Therapie wurden vorzüglich im MBP-induzierten EAE-Modell der Lewis-Ratte durchgeführt (Schmidt *et al.*, 2000; Tabi *et al.*, 1994; Gold *et al.*, 1997). Im Gegen-

satz dazu existieren allerdings kaum Daten über die Effektivität von MP im chronischen Modell der EAE beziehungsweise im Vergleich zu anderen GC.

Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit, hochdosiertes MP im chronischen EAE-Modell der C57Bl/6 Maus zu applizieren, die klinischen sowie immunologischen Parameter zu analysieren und mit denen der Hochdosis-Dex-Therapie zu vergleichen. Im chronischen EAE-Modell der C57Bl/6 Maus konnte bei gleicher Dosierung im Vergleich zu Kontrolltieren eindeutig die therapeutische Wirksamkeit beider GC, Dex und MP, nachgewiesen werden. Während Dex langwirksame Effekte vermittelte, konnten unter MP-Therapie mittellangwirksame Effekte beobachtet werden, die sich in einem ca. zwei Score-Punkte schlechteren EAE-Verlauf äußerten.

Wie in der Einleitung ausführlich beschrieben, können diese Beobachtungen in erster Linie auf die unterschiedlichen chemischen Strukturen der Substanzen und die daraus resultierenden unterschiedlichen pharmakologischen Wirkungen zurückgeführt werden. Zu Beginn dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der cGR in den T-Zellen notwendig ist, um GC-Wirkungen zu vermitteln und dass nicht-genomische Effekte in diesem Kontext eine eher untergeordnete Rolle spielen. *Buttgereit et al.* postulierten Ende der 1990er Jahre eine neue Hierarchie unterschiedlicher relativer Potenzen für unspezifische, nicht-genomische und genomische Effekte verschiedener halbsynthetischer GC. Demnach zeigt Dex bezogen auf klassische, genomische Effekte eine fünffach höhere Potenz als MP, wobei deren relative Potenzen bezüglich unspezifischer, nicht-genomischer Effekte nahezu gleich sind (*Buttgereit et al.*, 1999). Diese Tatsachen stehen in direkter Korrelation mit den beobachteten Wirksamkeiten von hochdosiertem Dex und MP und bestätigen zugleich nochmals die Wirkung der hochdosierten GC-Therapie durch den cGR.

Ferner konnte in dieser Arbeit die dosisabhängige Wirksamkeit von Dex im EAE-Modell der C57Bl/6 Maus nachgewiesen werden, wobei selbst noch die niedrigste Dosis von 0,8 mg/kg Körpergewicht zu einer signifikanten Reduktion der EAE-Symptome führte. MP zeigte wie Dex eine dosisabhängige Besserung der klinischen Zeichen, die histologisch mit einer verringerten Leukozyteninfiltration in das ZNS und einem verbesserten EAE-Score der Tiere korrelierten. *La Mantia et al.* beobachteten bereits 1994 in einer Doppelblindstudie mit MS-Patienten eine dosisabhängige Wirksamkeit von MP und Dex. Dabei zeigten sie, dass Dex und hochdosiertes MP gleichsam effektiv waren in der Förderung der Rekonvaleszenz. Im Gegensatz dazu schien niedrigdosiertes MP allerdings ineffektiv zu sein, was sich in erneuten Rückfällen der Patienten äußerte (*La Mantia et al.*, 1994).

5.1.4 Präventives Methylprednisolon beeinflusst periphere, hämatopoetische Immunzellen und führt in der MOG-EAE durch eine gesteigerte T-Zellproliferation zu einem verstärkten Krankheitsverlauf

Da in dieser Arbeit beobachtet werden konnte, dass die Präventivgabe von Dex zu einer verzögerten und milderen Erkrankung führte, sollte analysiert werden, ob dies nach der präventiven MP-Gabe ebenso der Fall ist. Unerwarteterweise konnte dieser Effekt mit MP nicht erzielt werden. Im Vergleich zu Kontrolltieren konnte sogar ein verstärkter Krankheitsverlauf über den gesamten Beobachtungsraum festgestellt werden.

Steiner et al. machten ähnliche Beobachtungen im Ratten-EAE-Modell. Sie stellten fest, dass hochdosiertes MP (40 mg/kg), welches drei Tage vor EAE-Induktion verabreicht wurde, eine Verschlechterung der Erkrankung verursachte, was sich unter anderem in einer verlängerten Krankheitsdauer äußerte (*Steiner et al.*, 1991). Der Publikation zufolge konnte histopathologisch allerdings kein Zusammenhang zwischen Krankheitsschwere und klinischem *Score* gefunden werden und so vermuteten sie, dass eine vorübergehende Nebenniereninsuffizienz nach Absetzen der präventiven MP-Behandlung für die Verschlechterung verantwortlich sein musste (*Steiner et al.*, 1991).

Hier konnte jedoch entgegen dieser Publikation in beiden Tiergruppen eine Korrelation zwischen Krankheitszustand und Histologie festgestellt werden. Diese Beobachtungen stehen allerdings im totalen Gegensatz zu den Ergebnissen der präventiven Dex-Applikation. Während unter präventivem Dex im ZNS kaum T-Zellen und Makrophagen detektiert werden konnten, zeigten histologische Analysen MP-behandelter Tiere eine gleich hohe Dichte infiltrierender Lymphozyten wie PBS-behandelte Kontrollen. Da histologisch kein Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen festgestellt werden konnte, MP Tiere allerdings einen tendenziell schlechteren EAE-Verlauf zeigten, wurden im Weiteren unterschiedliche immunologische Parameter peripherer T-Zellen nach GC-Behandlung analysiert, die Aufschluss über den Aktivierungszustand der Zellen geben sollten.

Nach dreimaliger Applikation beider GC konnte festgestellt werden, dass hochdosiertes Dex MP stets überlegen war. Dies äußerte sich in einer geringeren Anzahl peripherer T-Zellen, das heißt einer erhöhten Induktion von T-Zell-Apoptose, einer verringerten LFA-1-Expression und einer tendenziell stärkeren Reduktion regulatorischer T-Zellen. Da regulatorische T-Zellen eine bedeutende Rolle in der Unterdrückung von Autoimmunerkrankungen spielen, hätte eine stark verminderte Zahl nach präventiver MP-Gabe eine plausible Erklärung für den verschlechterten EAE-Verlauf darstellen können. Da die Expression FoxP3⁺ regulatorischer T-Zellen allerdings im Vergleich zu präventiver Dex-Gabe leicht erhöht war, musste diese Hypothese verworfen werden.

Die Applikation von Immunsuppressiva und zytostatisch wirkenden Medikamenten führt unter anderem zu einer drastischen Reduktion von Lymphozyten (Lymphopenie). Um al-

lerdings Immunantworten des adaptiven Immunsystems gewährleisten zu können, muss der T-Zell-Pool stets mit naiven und Gedächtnis-T-Zellen aufgefüllt sein, welches im Normalfall durch homöostatische Proliferation gewährleistet wird. Da aus den beschriebenen Experimenten hervorging, dass Dex und MP zu einer unterschiedlich starken Reduktion peripherer T-Zellen führten, wurde im Folgenden analysiert, ob der nach MP-Gabe beobachtete Krankheitsverlauf eventuell durch eine verstärkte Proliferation autoreaktiver T-Zellen ausgelöst wird.

Die Hypothese der verstärkten Proliferation autoreaktiver T-Zellen wurde exemplarisch anhand von Transferexperimenten in MP-behandelte Empfängermäuse getestet. Diese Versuche zeigten nach MP-Applikation eindeutig eine verstärkte T-Zell-Proliferation. Dabei wurde diese Beobachtung lediglich in immunisierten Tieren gemacht, während in nicht immunisierten Tieren kein Unterschied in PBS- und MP-behandelten Mäusen zu erkennen war.

Aus diesen Experimenten könnte Folgendes abgeleitet werden: Die präventive MP-Gabe führt zu einer Reduktion der peripheren T-Zellzahl auf ca. 40%, wobei es direkt nach Beenden der Applikation zum Wiederauffüllen des beeinträchtigten T-Zell-Pools kommt. Da allerdings noch während der MP-Behandlung die Immunisierung der Mäuse durchgeführt wird, wird den überlebenden autoreaktiven T-Zellen das Antigen präsentiert, was zur Aktivierung und verstärkten Proliferation dieser Zellen führt. Die aktivierten, LFA-1-exprimierenden T-Zellen überwinden die BHS und gelangen in das ZNS, wo sie die Entzündungsreaktion in Gang setzen.

Interessanterweise konnte nach präventiver Dex-Gabe eine noch stärkere T-Zellteilung beobachtet werden. Diese Tatsache könnte durch die höhere Potenz des Dex und die stärker reduzierte periphere T-Zellzahl erklärt werden. Durch die Dex-Therapie kommt es zur Reduktion der peripheren T-Zellzahl auf ca. 5%. Da der T-Zell-Pool dieser Tiere im Gegensatz zu MP-behandelten Mäusen nahezu leer ist, für die Gewährleistung der Immunabwehr allerdings wieder aufgefüllt werden muss, kommt es zu einer um ein Vielfaches gesteigerten T-Zell-Proliferation. Aufgrund der Tatsache, dass durch die präventive Dex-Gabe allerdings kaum mehr T-Zellen vorhanden sind, die zum Zeitpunkt der Immunisierung aktiviert werden können, kommt es somit im Vergleich zu MP nicht zu einem verstärkten, sondern eher zu einem verzögerten und mildereren EAE-Verlauf.

Die Hypothese der verstärkten T-Zellproliferation nach Beeinflussung peripherer, hämatopoetischer Immunzellen steht im Einklang mit der Literatur. Dort wird beschrieben, dass naive T-Zellen nach Transfer in bestrahlte, lymphopene Mäuse, nicht nur überlebten, sondern auch aktiv proliferierten, wobei gerade die Proliferation auf ein spezielles Antigen zu einer starken Immunantwort führte (Jameson, 2002).

Gerade diese Daten zeigen, wie entscheidend es im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen ist, den richtigen Zeitpunkt einer immunsuppressiven Therapie zu treffen und das geeignete Mittel zu applizieren, denn die Gabe eines an sich therapeutisch sehr effektiven Medikamentes - zum falschen Zeitpunkt - könnte zu unbeabsichtigten Nebenwirkungen führen.

5.2 Compound A

5.2.1 Compound A vermittelt in der chronischen MOG-EAE therapeutische Effekte

GC wurden seit ihrer Entdeckung durch Philip S. Hench (1948) auf viele verschiedene Arten modifiziert und zählen zu den potentesten antiinflammatorischen und immunsuppressiven Substanzen. Da mit antientzündlichen GC-Wirkungen allerdings auch viele Nebenwirkungen vermittelt werden, die den Einsatz dieser Substanzen limitieren, ist es von sehr großem medizinischen Interesse, Substanzen zu finden, die genauso effektiv sind wie GC, jedoch ein Spektrum mit reduzierten Nebenwirkungen aufweisen (Schacke *et al.*, 2006).

Die Einführung sogenannter GR^{dim/dim} Mäuse, die eine Punktmutation in der DNS-Bindungs- und Dimerisierungsregion des GR tragen und somit keine GC-Effekte via Transaktivierung vermitteln können (Heck *et al.*, 1994; Tuckermann *et al.*, 1999) zeigte, dass die molekularen GC-Mechanismen der Transaktivierung und -repression auseinander dividierbar sind. Diese Tatsache führte dazu, dass nach geeigneten GR-Liganden gesucht wurde, die speziell nur die gewünschten Wirkungen via Transrepression vermittelten (Schacke *et al.*, 2006). Die dabei untersuchten Substanzen reichten von zufällig ausgewählten Strukturen bis hin zu gezielten Veränderungen bekannter GR-Liganden. Neben synthetischen Verbindungen wurden auch natürlich vorkommende Produkte auf diese Eigenschaften hin analysiert, worunter auch die in dieser Arbeit verwendete Substanz CpdA fällt.

Der Literatur zufolge konnten die antiinflammatorischen Effekte des CpdA im Vergleich zu Dex in zwei unterschiedlichen tierexperimentellen Arthritis-Modellen nachgewiesen werden. Während *De Bosscher et al.* das Zymosan-induzierte Arthritis-Modell in der C57Bl/6 Maus wählten und CpdA präventiv applizierten, analysierten *Dewint et al.* den therapeutischen CpdA-Effekt im Kollagen-induzierten Arthritis-Modell der DBA/1-Maus (*De Bosscher et al.*, 2005; *Dewint et al.*, 2008). Da CpdA in beiden Modellen effektiv Entzündungen reduzierte, ohne den Insulinspiegel zu erhöhen, stellte sich die Frage, ob CpdA auch in der MOG₃₅₋₅₅-EAE der C57Bl/6 Maus die beschriebenen antientzündlichen Wirkungen vermitteln und somit eventuell eine Alternative zu hochdosierten GC in der Behandlung der EAE darstellen könnte.

Um CpdA als Therapeutikum in der MOG₃₅₋₅₅-EAE zu etablieren, wurde zu Beginn dieser Arbeit eine Dosierung von 300 µg getestet, die sich an publizierten Daten orientierte (De Bosscher *et al.*, 2005). In der MOG₃₅₋₅₅-EAE konnten nach Applikation dieser Dosis allerdings sehr eindeutig toxische Wirkungen beobachtet werden, die unter anderem mit dem plötzlichen Tod einiger Tiere einhergingen.

Interessanterweise schien die Dosis von 300 µg CpdA in beiden Arthritis-Modellen jedoch eine sehr gute Verträglichkeit und Effektivität zu zeigen und erst eine Hochdosis von 1000 µg CpdA führte hier zur Letalität (De Bosscher *et al.*, 2005; Dewint *et al.*, 2008).

Da aus diesem Versuch nicht hervorging, ob der schlechte Zustand der Tiere durch die verabreichte Wirkstofflösung allein bedingt war oder ob dies durch die zusätzlich induzierte EAE verursacht wurde, wurden nicht-immunisierte Tiere der CpdA-Behandlung unterzogen.

Bereits nach ein bis zwei Injektionen konnte in diesen Tieren ein auffälliges Verhalten beobachtet werden, welches sich in Gangunsicherheit, Apathie und vernachlässigter Fellpflege äußerte. Diese Beobachtungen ließen eindeutig den Schluss zu, dass CpdA-Wirkungen unabhängig vom Immunstatus der Tiere vermittelt wurden und eventuell vom Lösungsmittel beziehungsweise der applizierten Dosis abhingen.

Interessanterweise stehen diese Beobachtungen im totalen Gegensatz zu erst kürzlich publizierten Daten. Der Literatur zufolge wurde CpdA im Kollagen-induzierten Modell der DBA/1 Maus acht Tage lang in einer Dosierung von 300 µg intraperitoneal (i.p.) appliziert, wobei keine äußerlichen Auffälligkeiten wie struppiges, ungeputztes Fell oder ataktischer Gang beobachtet wurden (Dewint *et al.*, 2008). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanzen könnte eventuell in den verschiedenen Mausstämmen und deren unterschiedlichen genetischen Hintergrund liegen.

Nachdem gezeigt wurde, dass der Immunstatus der Tiere in diesem Kontext vernachlässigt werden konnte, musste die Frage geklärt werden, ob die beobachtete Verschlechterung des Gesundheitszustandes möglicherweise auf das verwendete Lösungsmittel (Ethanol 20%) zurückzuführen ist. Da die Applikation hochdosierten CpdA in Wasser allerdings ähnliche Wirkungen vermittelte wie nach der Gabe von CpdA in Ethanol 20%, konnte eine Lösungsmittelabhängigkeit ausgeschlossen werden.

In der Arzneimitteltherapie gibt es Substanzen, die eine nur geringe therapeutische Breite aufweisen. Dies bedeutet, dass die minimale Wirkkonzentration und die minimal toxische Konzentration eines Arzneistoffes sehr eng beieinander liegen. Um unerwünschte toxische Nebenwirkungen zu vermeiden ist deshalb eine strenge Einhaltung der verordneten Dosierung unabdingbar.

Um bei der CpdA-Therapie den Bereich zwischen Toxizität und Effektivität eingrenzen zu können, wurden *in vivo* drei unterschiedliche Dosen CpdA eingesetzt. Dabei grenzte die Dosis von 300 µg eindeutig den toxischen Bereich ab, während die mittlere und niedrige Dosis noch therapeutische Wirkungen erzielten. In diesem Zusammenhang konnte ferner in den mit 100 µg CpdA behandelten Tieren eine nicht signifikante, aber dennoch auffällige Gewichtsreduktion unter der dreitägigen Therapie beobachtet werden.

Der Literatur zufolge sind die klinischen Episoden der EAE mit einem Verhaltenssyndrom assoziiert, welchem Anorexie, Gewichtsverlust, verminderte Nahrungsaufnahme und auch ein beeinträchtigtes soziales Verhalten zugeschrieben werden (Pollak *et al.*, 2003). Diese Tatsache ist in Übereinstimmung mit eigenen Beobachtungen, denn es konnte in fast allen Tierexperimenten eine Korrelation zwischen Gewichtsverlust und den ersten Erkrankungssymptomen beobachtet werden. Wurden diese Tiere mit hochdosierten GC behandelt, kam es zu einer Verbesserung der klinischen Symptome und einer damit verbundenen Gewichtszunahme, was ebenfalls von Pollak *et al.* beobachtet werden konnte (Pollak *et al.*, 2003).

Die Tatsache, dass CpdA zu einem Gewichtsverlust führte, wurde bereits von Louw *et al.* bei der Analyse der kontrazeptiven Eigenschaften in Wistar Ratten beschrieben. Sie konnten während der gesamten Applikationszeit von CpdA über 15 Tage signifikante Gewichtsunterschiede (bis zu 10 g Gewichtsverlust) zwischen Kontrolltieren und CpdA-behandelten Tieren feststellen, wobei die therapierten Tiere nach Absetzen der Medikation annähernd wieder ihr Ausgangsgewicht erreichten. Neben der allgemeinen Gewichtsabnahme wurde gezielt in Nebennieren, Ovarien und Uteri der Ratten ein Gewichtsverlust beobachtet, wobei die Beobachtung in diesem Kontext mit erhöhten Spiegeln freien Corticosterons und dessen Effekte auf das luteinisierende Hormon in Verbindung gebracht wurde (Louw und Swart, 1999).

Möglicherweise ist der Gewichtsverlust der CpdA-behandelten Mäuse wie oben beschrieben auf hormonelle Veränderungen zurückzuführen. Es ist bekannt, dass CpdA endogene GC von ihren Transportproteinen (Kortikosteroid-bindende Globuline, CBG) verdrängen (Louw *et al.*, 1997; Louw und Swart, 1999; Louw *et al.*, 2000). Der dadurch erhöhte Spiegel freier endogener GC würde über den negativen Rückkopplungsmechanismus der HPA-Achse zu einer reduzierten GC-Bildung führen, was eventuell auch für eine Atrophie der Nebennieren verantwortlich sein könnte. Nach Absetzen der Therapie würde sich das hormonelle Gleichgewicht wieder einstellen und die GC-Bildung in den Nebennieren wieder normalisiert werden.

Parenteral zu applizierende Substanzen werden oftmals in gepufferten Lösungen hergestellt. Gründe hierfür können in der chemischen Struktur der zu lösenden Substan-

zen liegen oder in einem stark vom physiologischen Milieu abweichenden pH-Wert. PBS, eine phosphat-gepufferte Salzlösung, stellt mit einem pH-Wert von ca. 7,6 eine Pufferlösung dar, die dem physiologischen pH-Wert des Blutes sehr nahe kommt.

In Anlehnung an bereits publizierte Daten (Dewint *et al.*, 2008) und in Bezug zur klinischen Anwendung, wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit 100 µg CpdA in PBS gelöst und den Tieren verabreicht. Unerwarteterweise konnte unter dieser Therapie eine signifikante Verschlechterung des Krankheitsverlaufes festgestellt.

Diese Beobachtungen führten zur Frage, wie die Unterschiede zwischen den publizierten Daten und den eigenen *in vivo*-Experimenten zu erklären sind. Ein möglicher Ansatzpunkt für diese Diskrepanzen könnte in den unterschiedlichen Krankheitsmodellen, den dabei verwendeten Adjuvantien oder der Applikationsart liegen. Zymosan wurde im akuten Arthritis-Modell in PBS gelöst und einmalig subkutan in die Fußsohle injiziert. Im Gegensatz dazu wurde in der Kollagen-induzierten Arthritis das Antigen in CFA emulgiert und intradermal im Bereich des Schwanzansatzes injiziert, wobei 21 Tage später die Immunisierung mit Kollagen in inkompletten Freundschens Adjuvant (IFA) wiederholt wurde. Bei der MOG₃₅₋₅₅-EAE kommt es zusätzlich zur subkutanen Injektion des MOG₃₅₋₅₅-Peptids (emulgiert in CFA) zu einer zweimaligen Applikation von PTX, welches zu einer erhöhten Krankheitsinzidenz sowie zu einer Krankheitsverstärkung der EAE führen soll. Neben der Öffnung der BHS werden noch weitere Wirkmechanismen des PTX diskutiert. Unter anderem soll PTX T_H1-vermittelte Autoimmunreaktionen stimulieren, direkt Antigen-präsentierende Zellen aktivieren, die Anzahl peripherer T_{reg} Zellen reduzieren (Cassan *et al.*, 2006) und in der Peripherie Antigen-spezifische T_H17 Zellen induzieren (Hofstetter *et al.*, 2007). Die Tatsache, dass gerade am Höhepunkt der EAE die BHS geöffnet ist und zu diesem Zeitpunkt dreimal mit CpdA therapiert wurde, könnte eine mögliche Erklärung für die verstärkte und eventuell sogar neurotoxische Wirkung des CpdA in diesem Modell sein.

5.2.2 Compound A induziert GR-unabhängige Apoptose in primären Immunzellen und nicht-hämatopoetischen Zelllinien

Da noch immer unklar war, weshalb es unter der CpdA/PBS-Therapie zu einer Verschlechterung der EAE kam, sollte in weiteren Experimenten analysiert werden, ob Apoptose-Induktion in Immunzellen oder nicht-hämatopoetischen Zellen wie Neuronen und Nierenzellen eine mögliche Ursache sein könnte.

Zellkulturexperimente zeigten eindeutig anhand doppelpositiver Thymozyten und peripherer CD4⁺ T-Zellen, dass CpdA in beiden Populationen Apoptose induzierte. Dabei konnte allerdings festgestellt werden, dass Thymozyten gegenüber CpdA-induzierter

Apoptose resistenter waren als CD4⁺ T-Zellen. 24 Stunden nach CpdA-Zugabe konnten allerdings in beiden Zellpopulationen kaum mehr lebende Zellen detektiert werden. Ähnliche Beobachtungen wurden nach Dex-Zugabe gemacht, wobei hier Thymozyten empfindlicher reagierten als periphere T-Zellen.

Eine mögliche Erklärung für diese Feststellung könnte in unterschiedlichen Mechanismen der Signaltransduktion liegen. So werden für GC-induzierte Apoptose unterschiedliche Mechanismen wie biochemische Veränderungen und Effektormechanismen des intrinsischen Apoptose-Signalweges postuliert. Der Literatur zufolge konnte festgestellt werden, dass GC in murinen Thymozyten durch proteosomale Degradierung, Caspase-3-, 8- und 9- Aktivierung sowie Cathepsin B-Freisetzung Apoptose induzieren, wohingegen diese Mechanismen in peripheren T-Zellen überhaupt keine Rolle spielen (Wang *et al.*, 2006). Obwohl verschiedene Gene wie TDAG8, dig-2, Bim und Puma während GC-induzierter Apoptose in peripheren T-Zellen aktiviert und vermehrt exprimiert werden, konnte deren exakte Rolle in diesem Kontext bisher noch nicht eindeutig gezeigt werden (Wang *et al.*, 2006; Erlacher *et al.*, 2005).

Die Beobachtungen, dass CpdA Apoptose induziert, decken sich mit erst kürzlich publizierten Daten über CpdA-induzierte Apoptose in Prostatakarzinom-Zellen und dem daraus resultierenden zytostatischen Effekt (Yemelyanov *et al.*, 2008).

Die Überexpression von Androgenen kann zur Entwicklung eines Prostata-Karzinoms führen. Androgene zählen wie GC zu den Steroidhormonen. Sowohl der Androgen (AR)- als auch der GC-Rezeptor gehören zur *Nuclear Receptor Superfamily* und spielen im humanen Organismus bei metabolischen Vorgängen eine sehr bedeutende Rolle. In manchen Zelltypen werden beide Rezeptoren gleichzeitig exprimiert, wobei sie nach Aktivierung allerdings entgegengesetzte Effekte ausüben (Chen *et al.*, 1997). Im Zusammenhang mit Prostatakarzinom ist bekannt, dass der AR die Entwicklung des Karzinoms fördert, wohingegen der GR als Tumorsuppressor wirkt.

Yemelyanov *et al.* setzten für CpdA-Analysen Zellen mit unterschiedlichem AR/GR-Status ein. Anhand GR-positiver, aber AR-negativer Zellen konnten sie zeigen, dass diese vier bis acht Tage nach CpdA-Exposition apoptotisch wurden (Yemelyanov *et al.*, 2008). Die Tatsache, dass es in der vorliegenden Arbeit bei Verwendung der gleichen CpdA-Konzentrationen bereits nach fünf bis 25 Stunden zur Induktion des programmierten Zelltodes kam, könnte auf die unterschiedliche Physiologie der verwendeten Zellen zurückgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für Zellkulturexperimente primäre Zellen eingesetzt, während Yemelyanov *et al.* Tumor-Zelllinien verwendeten. Diese sind im Gegensatz zu primären Zellkulturen immortal, was ihnen unter anderem die Eigenschaft verleiht, gut kultivierbar und stabil zu sein. Ferner sind diese Zelllinien meist aufgrund hochregulierter anti-apoptotischer Gene gegenüber Apoptose geschützt. Diese

Tatsache könnte eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der primären und immortalisierten Zellen gegenüber CpdA-induzierter Apoptose sein.

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass CpdA Apoptose induziert, sollte analysiert werden, ob diese GR-abhängig oder -unabhängig verläuft. Durch die Verwendung muriner GR^{-/-} und GR^{+/+} Thymozyten konnte eindeutig gezeigt werden, dass CpdA bei einer Konzentration von 10⁻⁵ mol/l unabhängig vom GR Apoptose induzierte. Während in GR-defizienten Zellen nach Dex-Applikation erwartungsgemäß keine Apoptose-Induktion detektiert werden konnte, zeigte sich in GR^{+/+} Zellen nach 24 Stunden Apoptose unter 10⁻⁷ mol/l Dex.

Interessanterweise wurde vor kurzem genau Gegenteiliges publiziert. Demnach benötigt CpdA die Anwesenheit des GR, um zytostatische Effekte erzielen zu können (Yemelyanov *et al.*, 2008). Auch hier ist es möglich, dass die Diskrepanz sehr wahrscheinlich auf die verschiedenen Zelltypen (immortalisierte Zelllinien versus primäre Zellen) und deren unterschiedliche Physiologie beziehungsweise Ausstattung mit GR/AR zurückgeführt werden kann.

In nicht-immunisierten sowie immunisierten Mäusen konnten bereits nach ein beziehungsweise zwei Injektionen hochdosierten CpdA neurologische Ausfallerscheinungen beobachtet werden, die sich vor allem in schwerwiegenden Gangunsicherheiten äußerten. Da die Apoptose-Induktion in Immunzellen in diesem Zusammenhang keine Erklärung für die neurologischen Defizite bot, sollte in weiteren Zellkulturexperimenten analysiert werden, ob CpdA eventuell in nicht-hämatopoetischen Zellen Apoptose induzierte, wodurch die Ausfallerscheinungen erklärt werden könnten.

Die hierfür eingesetzten immortalisierten Neuroblastomzellen (SH-Sy5y-Zellen) zeigten 24 Stunden nach Zugabe von 10⁻⁵ mol/l CpdA eindeutig die Induktion von Apoptose. Interessanterweise führte dieser Versuchsansatz in Nierenkarzinom-Zellen (HEK-Zellen) nicht zur Apoptose-Induktion. Erst nach Inkubation mit 10⁻⁴ mol/l beziehungsweise 10⁻³ mol/l CpdA konnte hier Zelltod detektiert werden. Die Zugabe von 10⁻⁶ mol/l beziehungsweise 10⁻⁵ mol/l Dex zu beiden Zelllinien führte in keinem Experiment zum programmierten Zelltod.

Die Tatsache, dass SH-Sy5y- und HEK-Zellen unterschiedliches Apoptoseverhalten zeigen, konnte erst kürzlich im Zusammenhang mit pflanzlichen Stresshormonen (Jasmonaten) und deren Vermögen, Apoptose zu induzieren, beobachtet werden. Während natürliche Jasmonate das Wachstum von SH-Sy5y-Zellen unterdrückten, indem sie das Zellwachstum hemmten und Apoptose induzierten, blieb das Wachstum von HEK-Zellen *in vitro* unverändert. Es konnte nachgewiesen werden, dass Methyljasmonat in SH-Sy5y-Zellen die Apoptose-Inhibitoren XIAP (*X-Linked Inhibitor of Apoptosis*) und Survivin

herunterreguliert, welche normalerweise im Zytosol an aktivierte Caspasen gebunden sind (Tong *et al.*, 2008).

Dass nach Dex-Zugabe weder in SH-Sy5y- noch in HEK-Zellen Apoptose detektiert werden konnte, bestätigte erneut eine erhöhte Resistenz immortalisierter Zelllinien gegenüber GC-induzierter Apoptose, die eventuell auf der Hochregulierung anti-apoptotischer Gene basiert.

5.2.3 Compound A vermittelt *in vivo* therapeutische Wirkungen über den zytosolischen Glukokortikoid-Rezeptor in T-Zellen

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde anhand T-Zellspezifischer GR-defizienter Mäuse nachgewiesen, dass die therapeutischen Wirkungen hochdosierter GC über den cGR in T-Zellen vermittelt werden.

In vivo-Experimente zeigten, dass auch CpdA in einem bestimmten therapeutischen Fenster antiinflammatorisch wirksam ist und zur Besserung der EAE-Symptomatik beiträgt. Da anhand von Zellkulturexperimenten eindrücklich nachgewiesen werden konnte, dass CpdA in Thymozyten GR-unabhängig Apoptose induzierte, sollte im Folgenden anhand T-Zell-spezifischer GR-defizienter Mäuse analysiert werden, ob der beobachtete therapeutische Effekt ebenfalls unabhängig vom cGR in T-Zellen vermittelt wird oder auf dessen Anwesenheit angewiesen ist.

Die Resistenz konditionaler T-Zell-spezifischer *Knock-out* Mäuse gegenüber der CpdA-Therapie gab Hinweise darauf, dass der cGR für die Vermittlung antiinflammatorischer Wirkungen notwendig ist.

Interessanterweise konnte neben der Therapieresistenz in den *Knock-out* Mäusen allerdings noch eine zusätzliche, signifikante Verschlechterung der EAE-Symptomatik im Vergleich zu PBS-behandelten *Knock-out* Tieren beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Vermittlung ambivalenter Effekte durch CpdA. Einerseits kommt es in Abhängigkeit des cGR in T-Zellen zur Vermittlung therapeutischer Wirkungen, die unter anderem zu einem Aufhalten der EAE-Symptomatik führen. Andererseits induziert CpdA GR-unabhängig (neuro)toxische Wirkungen, die auf Apoptose zurückzuführen sind und bereits *in vitro* anhand diverser Zellkulturexperimente nachgewiesen werden konnten.

5.2.4 Compound A metabolisiert *in vitro* zu einem Aziridin, welches toxische Nebenwirkungen verursacht

In vivo-Experimente mit CpdA zeigten, dass in Abhängigkeit vom Lösungsmittel unterschiedliche Wirkungen vermittelt wurden. Während CpdA in Wasser zu einer signifikanten Verbesserung der EAE führte, konnte unter CpdA/PBS-Therapie mit der gleichen Dosierung eine signifikante Verschlechterung der Symptome beobachtet werden.

Auch wenn aus den bisherigen Experimenten ersichtlich wurde, dass CpdA Apoptose induziert, welche eventuell einen möglichen Mechanismus für die Verschlechterung der EAE-Symptomatik darstellte, war noch nicht klar, wodurch diese ausgelöst wurde.

Chemisch betrachtet stellt CpdA ein chlorhaltiges Phenylethylamin-Derivat dar, welches in einer nukleophilen Reaktion zur Abspaltung des Chloratoms und zur Bildung einer zyklischen, chemisch reaktiven Verbindung, einem Aziridin, führt.

Louw *et al.* konnten bereits in einem anderen Kontext anhand massenspektrometrischer Analysen von CpdA in PBS zeigen, dass diese Substanz *in vitro* innerhalb einer Stunde vollständig zum korrespondierenden zyklischen Aziridin umgesetzt wird, wohingegen es im Plasma durch Bindung an spezifische Proteine zur Stabilisierung dieser kommt. Chemische Spektralanalysen mit Cytochrom P450c11 (Steroid-11 β -hydroxylase) zeigten überdies, dass die zyklische Verbindung andere chemische Eigenschaften als die Ausgangsverbindung besaß, woraus sie folgerten, dass für therapeutische Effekte das offenkettige CpdA verantwortlich sein musste (Louw *et al.*, 1997).

Aziridine sind stickstoffhaltige zyklische Verbindungen, die chemisch sehr reaktiv sind und als Grundstruktur in Zytostatika, wie Mitomycin oder Thiotepa zu finden sind. Der den Aziridinen zugrunde liegende Wirkmechanismus ist unter anderem auf die Interkalation mit DNS zurückzuführen, wodurch diese nicht mehr repliziert werden kann und somit zum Zelltod führt. Rzeski *et al.* konnten durch *in vitro*- sowie *in vivo*- Experimente zeigen, dass Krebstherapeutika wie Thiotepa potentielle Neurotoxine darstellen und zu aktivem neuronalen Zelltod führen. Die Tatsache, dass die *in vitro* Applikation eines Pan-Caspase-Inhibitors zu einer Verbesserung der durch Chemotherapeutika ausgelösten Neurotoxizität führte, deutete auf eine aktive Beteiligung von Caspasen auf die Induktion von Apoptose hin (Rzeski *et al.*, 2004).

Louw *et al.* untersuchten die Stabilität von CpdA mit Hilfe der Elektronenspray-Massenspektrometrie (ES-MS). Um eine gewisse Vergleichbarkeit mit den publizierten Daten zu erhalten, wurden die Proben der vorliegenden Arbeit ebenfalls mit Hilfe der Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS) durchgeführt, der eine flüssigchromatographische Auftrennung (HPLC) vorangeschaltet war.

Bereits die flüssigchromatographischen Analysen zeigten, dass CpdA in den genannten Lösungsmitteln unterschiedlichen chemischen Reaktionen unterliegen musste, was anhand einer unterschiedlichen Anzahl detektierter Signale festgestellt werden konnte. Die folgenden massenspektrometrischen Analysen dieser chromatographisch getrennten Signale deuteten in PBS zunehmend auf die Entstehung einer zyklischen Verbindung hin, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von *Louw et al.* war (*Louw et al.*, 1997).

Da anhand der Massenspektrometrie allerdings keine Aussagen über die Struktur einer Substanz und die Beziehungen der einzelnen Atome zueinander gemacht werden kann, wurden in dieser Arbeit zur Bestätigung der bisherigen Ergebnisse zusätzlich ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchungen in Abhängigkeit von Zeit, Lösungsmittel, pH-Wert und Ionenzusammensetzung der Lösungsmittel durchgeführt.

In PBS konnte eindeutig die Bildung eines Aziridins beobachtet werden, welche pH-Wert-abhängig aber Ionen-unabhängig ablief. Ferner wurde festgestellt, dass die Umsetzung von der Ionenstärke der Pufferlösung und der darin gelösten CpdA-Menge abhing. Die spektroskopischen Analysen zeigten, dass die Aziridinbildung in einem Puffer mit einer zehnfach höheren Ionenstärke zwei bis dreimal rascher ablief als mit einem normal konzentrierten Puffer. Wurde zu viel CpdA in der Pufferlösung gelöst, konnte diese den durch die gebildete Salzsäure immer weiter fallenden pH-Wert nicht mehr stabilisieren und somit die Pufferkapazität nicht mehr gewährleisten. Die daraus resultierende Protonierung des Stickstoffatoms machte einen nukleophilen Angriff am Chlor-tragenden Kohlenstoffatom unmöglich und somit lief die Umsetzung zum Aziridin um ein Vielfaches langsamer ab als mit ca. einem Zehntel der Menge.

All diese Beobachtungen zeigen, wie wichtig es ist, die chemischen Eigenschaften einer neuartigen Substanz zu kennen, bevor diese für die *in vivo*-Therapie eingesetzt werden kann. Die im EAE-Modell der C57Bl/6 Maus beobachteten antiinflammatorischen Wirkungen des CpdA zeigten, dass diese Substanz prinzipiell als Alternative zu GC betrachtet werden könnte. Um die Substanz allerdings bedenkenlos ohne Nebenwirkungen einsetzen zu können, müssten chemische oder technologische Veränderungen beziehungsweise Stabilisierungen am Molekül vorgenommen werden.

Eine Möglichkeit wäre die Einführung eines zusätzlichen Substituenten am Chlor-tragenden Kohlenstoffatom, damit so der Angriffspunkt des freien Stickstoff-Elektronenpaares blockiert wäre („sterische Hinderung“). Die Blockierung des Stickstoffes selbst wäre weniger geeignet, da der Stickstoff neben den Sauerstoffatomen über Wasserstoff-Brückenbindungen an der Bindung des GR beteiligt ist (*Yemelyanov et al.*, 2008).

Eine weitere denkbare Möglichkeit wäre die Stabilisierung einer wässrigen, leicht sauren CpdA-Lösung in Liposomen. Diese neuartige Darreichungsform wird unter anderem bereits bei zytostatisch und antimykotisch wirkenden Substanzen zur Reduktion starker

Nebenwirkungen eingesetzt. Die Verkapselung in Liposomen führt zu einer reduzierten Kardiotoxizität von Anthrazyklin-haltigen Zytostatika (Rahman *et al.*, 2007) und zu einer verminderten Nephrotoxizität des Amphotericin B (Hachem *et al.*, 2008).

5.2.5 Isoproterenol verbessert als sympathomimetisch wirksame Substanz MOG-induzierte EAE

Beim Versuch, die aktiven, wirksamen Inhaltsstoffe von *Salsola tuberculatiformis* Botschantzev zu isolieren, fanden Swart und Kollegen in der aktiven Fraktion der Pflanze unter anderem Synephrin (Swart *et al.*, 2003).

Synephrin gehört zur Klasse der Sympathomimetika, die durch Bindung an die entsprechenden α - beziehungsweise β -Adrenorezeptoren der Erfolgsorgane zu einer physiologischen Erregung des sympathischen Nervensystems führen. Klassische Vertreter direkt wirkender Sympathomimetika sind die beiden Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin, welche überwiegend postsynaptische α_1 - und α_2 - sowie β_1 - und β_2 -Rezeptoren stimulieren und vielseitige Effekte auf die glatte Muskulatur, Hautgefäße, Eingeweide und Skelettmuskulatur auslösen. Diese Effekte werden dabei durch unterschiedliche Signaltransduktions-Kaskaden vermittelt, die durch direktes Binden der Sympathomimetika an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ausgelöst werden.

Nach Lösen von CpdA in Wasser beziehungsweise PBS konnte anhand physikochemischer Analysen unter anderem das Entstehen der sympathomimetisch wirksamen Substanz Synephrin festgestellt werden. Es ist allgemein bekannt, dass Immun-, Nerven- und endokrines System miteinander in Wechselwirkung stehen. Im Tierversuch konnte eine wechselseitige Kommunikation zwischen neuroendokrinem Stress- und Immunsystem über die HPA-Achse gezeigt werden (Besedovsky und Sorkin, 1977). Die Behandlung der chronisch-remittierenden EAE in der Lewis-Ratte mit den β -Sympathomimetika Terbutalin und Isoproterenol (Synonym für Isoprenalin) führte zur Unterdrückung beziehungsweise Besserung der Krankheitsaktivität (Wiegmann *et al.*, 1995). Ferner konnten auf Lymphozyten von MS-Patienten β_2 -adrenerge Rezeptoren nachgewiesen werden (Karaszewski *et al.*, 1990).

Während β_2 -Rezeptoren sowohl auf Zellen des angeborenen als auch adaptiven Immunsystems zu finden sind, werden α_1 - und α_2 -Rezeptoren hauptsächlich auf Makrophagen und Neutrophilen exprimiert (Nance und Sanders, 2007).

Die Beobachtungen aus eigenen Experimenten und die gerade beschriebenen Fakten führten zu der Frage, ob Sympathomimetika auch im chronischen EAE-Modell der C57Bl/6 Maus therapeutische Wirkungen vermitteln. Da der Einsatz α -sympathomimetischer Substanzen in der Therapie der EAE kaum publiziert worden ist, wurde anstelle

derer das $\beta_{1/2}$ -sympathomimetisch wirksame Isoproterenol verwendet (Nance und Sanders, 2007).

Die Effektivität dieser Substanz im chronischen Tiermodell der C57Bl/6 Maus konnte durch ein signifikantes Aufhalten der EAE-Symptomatik nachgewiesen werden. Dabei schien die Verbesserung der Krankheitssymptome unabhängig von der eingesetzten Dosierung einzutreten. Isoproterenol führte folglich nicht nur im chronisch-schubförmigen EAE-Modell der Lewis-Ratte zu einer signifikanten Suppression des ersten Schubes und der Schubhäufigkeit (Wiegmann *et al.*, 1995), sondern zeigte auch im chronischen EAE-Modell in der C57Bl/6 Maus einen therapeutischen und langanhaltenden Effekt.

Ob dieser Therapieeffekt auf eine reduzierte Leukozyteninfiltration in das ZNS zurückzuführen ist, sollte im weiteren Verlauf durch immunhistochemische Färbungen analysiert werden.

Ein Pilotexperiment deutete unter Isoproterenol-Therapie auf eine verminderte T-Zellinfiltration und MHC-II-Expression hin, wohingegen die Infiltratdichte von Mikroglia/Makrophagen, die Expression des Fc γ II (CD32)/Fc γ III (CD16)-Rezeptors auf Mikrogliazellen und Makrophagen und die Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) unbeeinflusst blieben.

Auch wenn die MHC-II-Expression in Isoproterenol-behandelten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren reduziert war, schien diese in den Kontrolltieren selbst allerdings nicht sehr stark ausgeprägt zu sein. Mikrogliazellen, die im ZNS als Antigen-präsentierende Zellen fungieren, exprimieren normalerweise geringe Mengen an MHC-II-Molekülen. Unter entzündlichen und neurodegenerativen Bedingungen wie in der EAE kommt es allerdings durch aktivierte Mikroglia zu einer Hochregulierung kostimulatorischer Moleküle und MHC-II-Moleküle. Die Tatsache, dass die MHC-II-Expression in Kontrolltieren nicht sehr stark ausgeprägt war, könnte eventuell an der histologischen Aufarbeitung der Tiere liegen. Beide Tiergruppen wurden erst an Tag 17, also bereits nach dem Höhepunkt der Erkrankung, perfundiert. Da die Entzündungsreaktion im ZNS zu diesem Zeitpunkt durch sinkende Spiegel proinflammatorischer Zytokine bereits wieder im Abklingen war, wäre es möglich, dass auch die Expression der MHC-II-Moleküle auf Mikroglia/Makrophagen bereits wieder reduziert wurde.

Fc γ -Rezeptoren auf myeloiden Zellen stellen wichtige Effektor- und Regulatormoleküle dar. Eine stark erhöhte Expression dieser Rezeptoren konnte auf perivaskulären und parenchymatischen Zellen innerhalb aktiver MS-Läsionen detektiert werden (Ulvestad *et al.*, 1994). Die Tatsache, dass der Fc γ II (CD32)/Fc γ III (CD16)-Rezeptor in erkrankten Mäusen hochreguliert war, könnte für eine Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen sprechen, die sehr gut mit der erhöhten Mikroglia/Makrophagendichte und auch der erhöhten iNOS-Expression korrelierte. Da der Nachweis des Fc γ II (CD32)/Fc γ III (CD16)-

Rezeptors allerdings hauptsächlich entlang der Meningen positiv ausfiel, könnte dies ein Hinweis auf aktivierte, infiltrierte Makrophagen sein.

Es stellte sich nun die Frage, wie diese immunhistochemischen Beobachtungen nach Isoproterenol-Behandlung im Gesamten zu erklären sind. Eine mögliche Hypothese wäre, dass Isoproterenol in der Effektorphase der EAE direkt auf MHC-II-Moleküle im ZNS wirkt. Deren reduzierte Expression hätte eine geringere Antigenpräsentation und somit auch eine verminderte Reaktivierung autoreaktiver T-Zellen zur Folge, was die reduzierten T-Zell-Infiltrate erklären würde.

Andererseits könnte Isoproterenol allerdings auch direkt auf T-Zellen wirken, da diese der Literatur zufolge β_2 -Rezeptoren exprimieren (Nance und Sanders, 2007). Durch die Stimulierung β -adrenerger Rezeptoren auf T-Zellen kommt es zur Aktivierung der Adenylatzyklase, die ihrerseits zu einem erhöhten cAMP-Spiegel und in folge dessen zur Inhibierung proinflammatorischer beziehungsweise Aktivierung antiinflammatorischer Zytokine führt. Durch reduzierte Spiegel proinflammatorischer Zytokine wie INF γ oder TNF α könnte es wiederum zu einer verminderten MHC-II-Expression im ZNS kommen.

Allerdings kann mit dieser Hypothese nicht erklärt werden, weshalb nach Isoproterenol-Behandlung weiterhin eine erhöhte Mikroglia/Makrophagendichte detektiert werden konnte, zumal diese Zellen ebenfalls β_2 -adrenerge Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren (Nance und Sanders, 2007). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine im Vergleich zu T- und B-Lymphozyten geringere Sensitivität gegenüber β -Sympathomimetika sein.

Um allerdings eine definitive Aussage treffen zu können, wie es zur Verbesserung der EAE-Symptomatik unter Isoproterenol-Therapie kam, müssten noch weitere immunhistochemische Analysen durchgeführt und quantitativ ausgewertet werden. Ferner wäre es sinnvoll, vor und nach Isoproterenol-Applikation das Zytokinprofil im ZNS zu analysieren und in diesem Kontext neben der MHC-II-Expression eventuell noch zusätzlich die Expression kostimulatorischer Moleküle zu analysieren. Überdies sollte in weiterführenden *in vivo*-Experimenten herausgearbeitet werden, ob das *in vitro* entstandene Synephrin eventuell für die therapeutische Wirksamkeit des CpdA mitverantwortlich ist und über welche adrenerge Rezeptoren diese Wirkungen vermittelt werden.

Interessanterweise konnten *Brosnan et al.* im aktiven und passiven EAE-Modell der Lewis Ratte zeigen, dass die Applikation des spezifischen α_1 -Antagonisten Prazosin und des unspezifischen α -Antagonisten Phenoxybenzamin zu einer Unterdrückung klinischer sowie histologischer EAE-Symptome führte (*Brosnan et al.*, 1985).

Im Falle, dass Synephrin als α -Agonist wirksam ist, würde dies (eventuell im Zusammenhang mit Aziridin) für eine Verschlimmerung der EAE sprechen. Da laut Literatur allerdings Effekte über β -Rezeptoren nicht völlig ausgeschlossen werden können, könnte

Synephrin eventuell auch (wie Isoproterenol) zu einer verbesserten EAE-Symptomatik führen. Um die Frage der Rezeptorspezifität und die daraus folgenden Wirkungen auf die EAE endgültig klären zu können, sollten in diesem Kontext deshalb zusätzliche *in vivo*-Experimente mit α_1 -, α_2 -, β_1 - und β_2 -spezifischen Antagonisten durchgeführt werden.

5.2.6 Einflussfaktoren und Effekte der Compound A-Therapie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die pharmakologische Wirksamkeit einer Substanz von mehreren Einflussfaktoren abhängig ist. Neben der richtigen Dosis sollte stets auf die verwendeten Lösungsmittel und deren pH-Wert geachtet werden, um mögliche chemische Interaktionen und Metabolisierungen *in vitro* zu vermeiden.

Nach i.p. Applikation von hochdosiertem CpdA konnte zum wiederholten Male in immunisierten wie auch nicht-immunisierten C57Bl/6 Mäusen ein toxischer beziehungsweise letaler Effekt beobachtet werden. Wurde CpdA in dieser Dosierung allerdings i.v. appliziert, zeigten Mäuse keinerlei Beeinträchtigungen ihrer Körperfunktionen. Interessanterweise konnte in Lewis Ratten genau das Gegenteil beobachtet werden. Während Lewis Ratten und C57Bl/6 Mäuse die mittlere Dosis CpdA i.v. ohne weiteres vertrugen, starben Ratten nach lediglich einer i.v. Gabe hochdosierten CpdA (D. Tischner, unpublizierte Daten). Diese Beobachtungen weisen auf zwei weitere wichtige Einflussfaktoren hin – die Applikationsart und die Tierspezies.

Normalerweise würde nach der i.v. Gabe einer potentiell toxischen Substanz ein direkter, eventuell sogar letaler Effekt erwartet werden, der auf die 100%ige Bioverfügbarkeit nach i.v. Applikation zurückzuführen ist. Der Literatur zufolge wurde allerdings beschrieben, dass CpdA in der Lage ist, GC im Blut von den entsprechenden Transporteiweißen (CBG) zu verdrängen und direkt an diese zu binden (Louw *et al.*, 1997; Louw und Swart, 1999; Louw *et al.*, 2000). Dies könnte eine Erklärung für das unterschiedliche Verhalten nach i.v. und i.p. Injektion sein. Während CpdA direkt nach i.v. Injektion im Blut an CBG bindet und dadurch stabilisiert wird, ist dies nach i.p. Injektion aufgrund fehlender Transportproteine nicht möglich und führt anstelle dessen zur Bildung des Aziridins und zu toxischen/letalen Effekten.

Ein möglicher Grund, der die geringere Resistenz der Ratten gegenüber CpdA erklärt, könnte eine unterschiedliche Zusammensetzung des Blutes und die darin enthaltenen Globuline sein. Bei einem geringeren Gehalt an CBG würde weniger CpdA gebunden werden. Das in freier Form vorliegende CpdA könnte somit durch den im Blut herrschenden gepufferten pH-Wert im Bereich 7,4 in das Aziridin überführt werden. Das Aziridin würde zu unspezifischer, GR-unabhängiger Apoptose führen und somit dosisabhängig für den Tod der Tiere verantwortlich sein.

Abb. 5-1 stellt die unterschiedlichen Faktoren, die die CpdA-Therapie *in vivo* beeinflussen, in einer Übersicht dar. Je nach Beteiligung der im Text beschriebenen Einflussfaktoren, werden unterschiedlichen Wirkungen vermittelt. Während die Aziridinbildung toxische, teilweise sogar letale Effekte zur Folge hat, werden therapeutische CpdA-Effekte wahrscheinlich durch mehrere Mechanismen hervorgerufen. Neben der Bindung des cGR in T-Zellen kommt es durch CpdA zu einer verstärkten Freisetzung endogener GC, was wiederum einen verstärkten antiinflammatorischen Effekt bewirkt. Auch die Bindung des *in vitro* entstehenden Synephrins über Adrenorezeptoren könnte zum Therapie-Erfolg des CpdA beitragen. Solange allerdings die Rezeptorspezifität des Metaboliten nicht geklärt ist, wäre auch denkbar, dass dieser entgegengesetzte Effekte auslöst und somit zur Verschlechterung der EAE beiträgt.

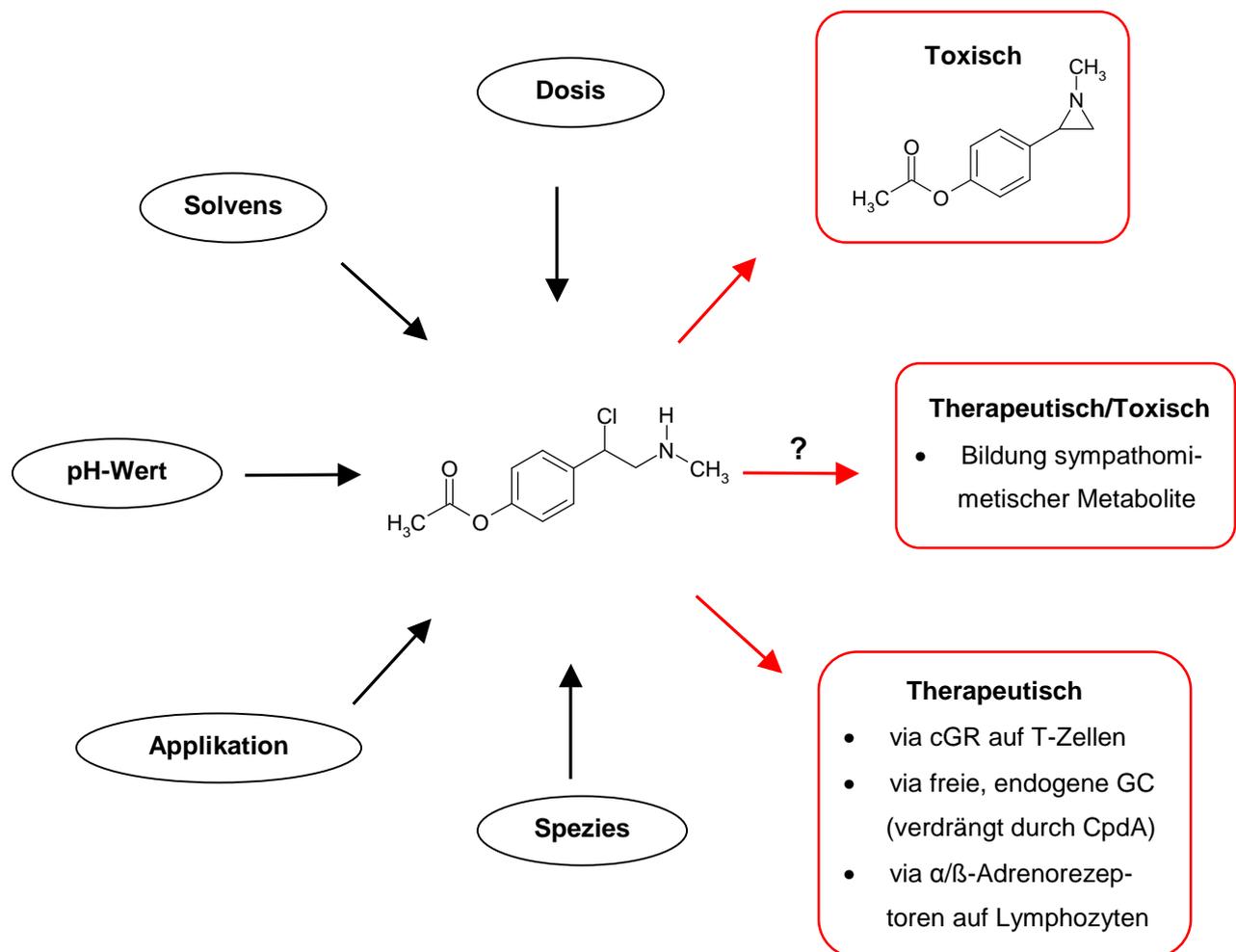


Abb. 5-1 Überblick über Einflussfaktoren und Effekte der CpdA-Therapie im chronischen EAE-Modell der C57Bl/6 Maus.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Mechanismen der Hochdosis-GC-Pulstherapie im Zusammenhang mit akuten Schüben von MS-Patienten anhand des Tiermodells der MS, der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), untersucht. Die EAE wurde in C57Bl/6 Mäusen und diversen GR-defizienten Mäusen durch Immunisierung mit Myelinoligodendrozytenglykoprotein (MOG₃₅₋₅₅) induziert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Dexamethason (Dex) den Krankheitsverlauf dosisabhängig verbessert. Die Untersuchung heterozygoter GR Knock-out Mäuse und hämatopoetischer Stammzellchimären verdeutlichte, dass der zytosolische GR (cGR) für die Vermittlung therapeutischer GC-Effekte von sehr großer Bedeutung ist. Der Einsatz zelltyp-spezifischer GR-defizienter Mäuse zeigte auf zellulärer Ebene, dass für die Vermittlung von GC-Wirkungen die Expression des GR vor allem in T-Zellen unabdingbar ist, wohingegen die GR-Expression in myeloiden Zellen in diesem Kontext keine Bedeutung hat. Durch die Analyse des molekularen Mechanismus konnte festgestellt werden, dass diese Effekte durch Apoptoseinduktion und Herunterregulieren von Adhäsionsmolekülen in peripheren, aber nicht ZNS-residenten T-Zellen erzielt wurden. Überdies wurde ersichtlich, dass Dex die T-Zellmigration in das ZNS verhinderte. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass Dex durch Apoptoseinduktion und Immunmodulation hauptsächlich auf periphere T-Zellen wirkt und somit den ständigen Influx neuer Immunzellen in das ZNS verhindert.

Ferner konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die therapeutische Gabe hochdosierten Methylprednisolons (MP) in diesem EAE-Modell ebenfalls zu einer dosisabhängigen Verbesserung der EAE führte. Diese beruhte auf einer reduzierten Lymphozyteninfiltration in das ZNS, war allerdings im Vergleich zur Dex-Therapie aufgrund geringerer Wirkpotenz weniger stark ausgeprägt. Im Gegensatz dazu führte die präventive MP-Applikation zu einem verstärkten EAE-Verlauf, der nach der Beeinflussung peripherer, hämatopoetischer Immunzellen auf eine verstärkte Proliferation autoreaktiver T-Zellen zurückzuführen ist.

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde als möglicher Ersatz für die Hochdosis-GC-Pulstherapie eine nicht-steroidale, antiinflammatorische Substanz im chronischen EAE-Modell der C57Bl/6 Maus etabliert. Erste tierexperimentelle Untersuchungen mit Compound A (CpdA) offenbarten eine lediglich geringe therapeutische Breite dieser Substanz, wobei innerhalb pharmakologischer Dosierungen dennoch therapeutische Wirkungen vermittelt werden konnten. Anhand von *in vitro* Experimenten konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass CpdA GR-unabhängig Apoptose induzierte, wobei Immunzellen und neuronale Zellen gegenüber CpdA besonders empfindlich reagierten. Der Einsatz T-Zell-spezifischer GR-defizienter Mäuse konnte zeigen, dass CpdA für die Ver-

mittlung therapeutischer Wirkungen den cGR benötigt. Ferner wurde offensichtlich, dass CpdA in Abwesenheit des cGR in T-Zellen eine signifikante Verschlechterung der EAE verursachte. Durch die Anwendung physikochemischer Analysemethoden, wie der Massenspektrometrie und $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, konnte festgestellt werden, dass CpdA *in vitro* in gepufferten Medien in eine zyklische, chemisch sehr reaktive Verbindung (Aziridin) metabolisiert wird. Diese kann sehr wahrscheinlich für die Apoptose-Induktion in Zellen und die in Mäusen beobachteten neurotoxischen Ausfallerscheinungen verantwortlich gemacht werden. Durch chemische Analysen konnte *in vitro* in wässriger CpdA-Lösung ein weiterer Metabolit, das sympathomimetisch wirksame Synephrin, identifiziert werden. Um die Wirksamkeit adrenerger Substanzen *in vivo* zu testen, wurde das $\beta_{1/2}$ -Sympathomimetikum Isoproterenol appliziert. Dieses verbesserte die EAE-Symptomatik, was sehr wahrscheinlich auf eine reduzierte Antigenpräsentation und einer damit verbundenen verminderten T-Zellinfiltration in das ZNS zurückzuführen ist.

7 Summary

High-dose glucocorticoids (GC) are used to treat acute relapses of multiple sclerosis (MS) patients. In this work the underlying mechanisms of this therapy have been investigated using the animal model of MS, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). EAE was induced in C57Bl/6 mice and several strains of glucocorticoid receptor (GR) deficient mice by immunization with myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG₃₅₋₅₅).

It was shown that the application of dexamethasone (Dex) leads to a dose-dependent amelioration of the disease course. Analysis of heterozygous GR-knock out mice and hematopoietic stem cell chimeras revealed, that the cytosolic GR (cGR) is a prerequisite for mediating therapeutic GC effects. Furthermore, the use of cell type-specific GR-deficient mice showed at the cellular level that GR-expression is particularly needed in T cells, while it is dispensable in myeloid cells in this context.

Analysis of molecular mechanisms determined that these effects are mainly achieved by apoptosis induction and down regulation of adhesion molecules in peripheral T cells, but not in CNS-residing T cells. In addition, it could be observed that Dex inhibited the T cell migration into the CNS. These findings confirm the hypothesis that Dex mainly acts on peripheral T cells by apoptosis induction and immunomodulation and thus inhibits the influx of new immune cells into the CNS.

Furthermore, this work shows that therapeutic application of methylprednisolone (MP) in this EAE-model leads to a dose-dependent amelioration of the disease course as well. This improvement is based on a reduced lymphocyte infiltration into the CNS, but is less pronounced than that after Dex treatment due to reduced potency.

In contrast to this, preventive MP-application induces an increased disease course. This aggravation is ascribed to interference with peripheral hematopoietic immune cells and an increased proliferation of autoreactive T cells.

In the search of alternatives to high-dose GC therapy a novel antiinflammatory compound was established in the chronic EAE-model of the C57Bl/6 mouse. First *in vivo* experiments revealed that this non-steroidal substance, compound A (CpdA), has only little therapeutic index, but is able to mediate therapeutic effects within pharmacological dosages.

On the basis of *in vitro* analysis CpdA induces apoptosis in a GR-independent manner, whereas immune cells and neuronal cells are most sensitive. Using T cell-specific GR-deficient mice it could be observed that CpdA requires the cGR for mediating therapeutic effects. Furthermore, the application of CpdA led to an aggravation of the EAE course in absence of the cGR in T cells.

Physicochemical analysis such as mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy revealed that CpdA metabolizes *in vitro* in buffered media into a cyclic,

highly reactive compound, aziridine. Presumably, this metabolite may be responsible for apoptosis induction in diverse cells and neurotoxic deficits observed in mice. Using the same methods, an α -adrenergic substance, synephrine, could be identified *in vitro* after resolving CpdA in water and PBS. In order to test the efficacy of adrenergic substances in EAE *in vivo*, the $\beta_{1/2}$ -adrenergic drug isoproterenol, was applied. Isoproterenol led to an amelioration of the disease course which may be ascribed to decreased antigen presentation and reduced T cell infiltration into CNS.

8 Literaturverzeichnis

Aktas O, Wendling U, Zschenderlein R, Zipp F (2000) [Apoptosis in multiple sclerosis. Etiopathogenetic relevance and prospects for new therapeutic strategies]. *Nervenarzt* 71: 767-773.

Almawi WY, Beyhum HN, Rahme AA, Rieder MJ (1996) Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. *J Leukoc Biol* 60: 563-572.

Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, Bienert M, Radbruch A, Burmester GR, Lauster R, Scheffold A, Buttgereit F (2004) Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J* 18: 70-80.

Baumann S, Dostert A, Novac N, Bauer A, Schmid W, Fas SC, Krueger A, Heinzel T, Kirchhoff S, Schutz G, Krammer PH (2005) Glucocorticoids inhibit activation-induced cell death (AICD) via direct DNA-dependent repression of the CD95 ligand gene by a glucocorticoid receptor dimer. *Blood* 106: 617-625.

Baxter AG (2007) The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol* 7: 904-912.

Beck RW, Cleary PA, Anderson MM, Jr., Keltner JL, Shults WT, Kaufman DI, Buckley EG, Corbett JJ, Kupersmith MJ, Miller NR, . (1992) A randomized, controlled trial of corticosteroids in the treatment of acute optic neuritis. The Optic Neuritis Study Group. *N Engl J Med* 326: 581-588.

Besedovsky H, Sorkin E (1977) Network of immune-neuroendocrine interactions. *Clin Exp Immunol* 27: 1-12.

Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK (2008) Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 453: 1051-1057.

Bolton C, Flower RJ (1989) The effects of the anti-glucocorticoid RU 38486 on steroid-mediated suppression of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in the Lewis rat. *Life Sci* 45: 97-104.

Brennan FR, O'Neill JK, Allen SJ, Butter C, Nuki G, Baker D (1999) CD44 is involved in selective leucocyte extravasation during inflammatory central nervous system disease. *Immunology* 98: 427-435.

Brocke S, Piercy C, Steinman L, Weissman IL, Veromaa T (1999) Antibodies to CD44 and integrin alpha4, but not L-selectin, prevent central nervous system inflammation and experimental encephalomyelitis by blocking secondary leukocyte recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6896-6901.

Brosnan CF, Goldmuntz EA, Cammer W, Factor SM, Bloom BR, Norton WT (1985) Prazosin, an alpha 1-adrenergic receptor antagonist, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 5915-5919.

Buttgereit F, Brand MD, Burmester GR (1999) Equivalent doses and relative drug potencies for non-genomic glucocorticoid effects: a novel glucocorticoid hierarchy. *Biochem Pharmacol* 58: 363-368.

Buttgereit F, Straub RH, Wehling M, Burmester GR (2004) Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis Rheum* 50: 3408-3417.

Buttgereit F, Wehling M, Burmester GR (1998) A new hypothesis of modular glucocorticoid actions: steroid treatment of rheumatic diseases revisited. *Arthritis Rheum* 41: 761-767.

Cassan C, Piaggio E, Zappulla JP, Mars LT, Couturier N, Bucciarelli F, Desbois S, Bauer J, Gonzalez-Dunia D, Liblau RS (2006) Pertussis toxin reduces the number of splenic Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 177: 1552-1560.

Charcot J (1868) Histologie de la sclérose en plaque. *Gazette des Hôpitaux*. 41 :554-566.

Chen S, Wang J, Yu G, Liu W, Pearce D (1997) Androgen and glucocorticoid receptor heterodimer formation. A possible mechanism for mutual inhibition of transcriptional activity. *J Biol Chem* 272: 14087-14092.

Chen X, Murakami T, Oppenheim JJ, Howard OM (2004) Differential response of murine CD4+CD25+ and CD4+. *Eur J Immunol* 34: 859-869.

Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Kriegstein K, Schmid W, Aguzzi A, Fantuzzi G, Hummler E, Unsicker K, Schutz G (1995) Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev* 9: 1608-1621.

Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD (2003) Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421: 744-748.

de Boer AG, Gaillard PJ (2006) Blood-brain barrier dysfunction and recovery. *J Neural Transm* 113: 455-462.

De Bosscher K, Vanden Berghe W, Beck IM, Van Molle W, Hennyer N, Hapgood J, Libert C, Staels B, Louw A, Haegeman G (2005) A fully dissociated compound of plant origin for inflammatory gene repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 15827-15832.

Dewint P, Gossye V, De Bosscher K, Vanden Berghe W, Van Beneden K, Deforce D, Van Calenbergh S, Muller-Ladner U, Vander CB, Verbruggen G, Haegeman G, Elewaut D (2008) A plant-derived ligand favoring monomeric glucocorticoid receptor conformation with impaired transactivation potential attenuates collagen-induced arthritis. *J Immunol* 180: 2608-2615.

Diem R, Hobom M, Maier K, Weissert R, Storch MK, Meyer R, Bahr M (2003) Methylprednisolone increases neuronal apoptosis during autoimmune CNS inflammation by inhibition of an endogenous neuroprotective pathway. *J Neurosci* 23: 6993-7000.

Diem R, Sattler MB, Merkler D, Demmer I, Maier K, Stadelmann C, Ehrenreich H, Bahr M (2005) Combined therapy with methylprednisolone and erythropoietin in a model of multiple sclerosis. *Brain* 128: 375-385.

Dowdell KC, Gienapp IE, Stuckman S, Wardrop RM, Whitacre CC (1999) Neuroendocrine modulation of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis: a critical role for the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neuroimmunol* 100: 243-251.

- Elovaara I, Lalla M, Spare E, Lehtimäki T, Dastidar P (1998) Methylprednisolone reduces adhesion molecules in blood and cerebrospinal fluid in patients with MS. *Neurology* 51: 1703-1708.
- Elovaara I, Ukkonen M, Leppäkynnas M, Lehtimäki T, Luomala M, Peltola J, Dastidar P (2000) Adhesion molecules in multiple sclerosis: relation to subtypes of disease and methylprednisolone therapy. *Arch Neurol* 57: 546-551.
- Engelhardt B, Ransohoff RM (2005) The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol* 26: 485-495.
- Erlacher M, Labi V, Manzl C, Bock G, Tzankov A, Hacker G, Michalak E, Strasser A, Villunger A (2006) Puma cooperates with Bim, the rate-limiting BH3-only protein in cell death during lymphocyte development, in apoptosis induction. *J Exp Med* 203: 2939-2951.
- Erlacher M, Michalak EM, Kelly PN, Labi V, Niederegger H, Coultas L, Adams JM, Strasser A, Villunger A (2005) BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood* 106: 4131-4138.
- Fattorossi A, Battaglia A, Buzzonetti A, Ciaraffa F, Scambia G, Evoli A (2005) Circulating and thymic CD4 CD25 T regulatory cells in myasthenia gravis: effect of immunosuppressive treatment. *Immunology* 116: 134-141.
- Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, Dalton D, Fathman CG (1996) Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol* 156: 5-7.
- Gold R, Hartung HP, Lassmann H (1997) T-cell apoptosis in autoimmune diseases: termination of inflammation in the nervous system and other sites with specialized immune-defense mechanisms. *Trends Neurosci* 20: 399-404.
- Gold R, Linington C, Lassmann H (2006) Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129: 1953-1971.
- Hachem RY, Boktour MR, Hanna HA, Husni RN, Torres HA, Afif C, Kontoyiannis DP, Raad II (2008) Amphotericin B lipid complex versus liposomal amphotericin B monotherapy for invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancy. *Cancer* 112: 1282-1287.
- Hafler DA, Slavik JM, Anderson DE, O'Connor KC, De Jager P, Baecher-Allan C (2005) Multiple sclerosis. *Immunol Rev* 204: 208-231.
- Heck S, Kullmann M, Gast A, Ponta H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P, Cato AC (1994) A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *EMBO J* 13: 4087-4095.
- Hemmer B, Nessler S, Zhou D, Kieseier B, Hartung HP (2006) Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol* 2: 201-211.
- Hickey WF (2001) Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia* 36: 118-124.
- Hofstetter HH, Ibrahim SM, Koczan D, Kruse N, Weishaupt A, Toyka KV, Gold R (2005) Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol* 237: 123-130.

Hofstetter HH, Grau C, Buttmann M, Forsthuber TG, Gaupp S, Toyka KV, Gold R (2007) The PLPP-specific T-cell population promoted by pertussis toxin is characterized by high frequencies of IL-17-producing cells. *Cytokine* 40: 35-43.

Horejsi V, Zhang W, Schraven B (2004) Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4: 603-616.

Hughes PD, Belz GT, Fortner KA, Budd RC, Strasser A, Bouillet P (2008) Apoptosis regulators Fas and Bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity. *Immunity* 28: 197-205.

Jameson SC (2002) Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2: 547-556.

Karaszewski JW, Reder AT, Maselli R, Brown M, Arnason BG (1990) Sympathetic skin responses are decreased and lymphocyte beta-adrenergic receptors are increased in progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol* 27: 366-372.

Kiefer R, Kreutzberg GW (1991) Effects of dexamethasone on microglial activation in vivo: selective downregulation of major histocompatibility complex class II expression in regenerating facial nucleus. *J Neuroimmunol* 34: 99-108.

Kleinert H, Euchenhofer C, Ihrig-Biedert I, Forstermann U (1996) Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Mol Pharmacol* 49: 15-21.

Koritschoner R und Schweinburg F (1925) Klinisch und experimentelle Beobachtungen über Lähmungen nach Wutschutzimpfung. *Z. Immunitats Forsh* 42, 217-283

Kronenberg M, Rudensky A (2005) Regulation of immunity by self-reactive T cells. *Nature* 435: 598-604.

La Mantia L, Eoli M, Milanese C, Salmaggi A, Dufour A, Torri V (1994) Double-blind trial of dexamethasone versus methylprednisolone in multiple sclerosis acute relapses. *Eur Neurol* 34: 199-203.

Laffon A, Gonzalez-Amaro R (1995) Cell adhesion molecules: an overview. *Br J Rheumatol* 34: 1101-1102.

Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201: 233-240.

Leussink VI, Jung S, Merschdorf U, Toyka KV, Gold R (2001) High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis induces apoptosis in peripheral blood leukocytes. *Arch Neurol* 58: 91-97.

Louw A, Swart P (1999) Salsola tuberculiformis Botschantzev and an aziridine precursor analog mediate the in vivo increase in free corticosterone and decrease in corticosteroid-binding globulin in female Wistar rats. *Endocrinology* 140: 2044-2053.

Louw A, Swart P, Allie F (2000) Influence of an aziridine precursor on the in vitro binding parameters of rat and ovine corticosteroid-binding globulin (CBG). *Biochem Pharmacol* 59: 167-175.

- Louw A, Swart P, de Kock SS, van der Merwe KJ (1997) Mechanism for the stabilization in vivo of the aziridine precursor --(4-acetoxyphenyl)-2-chloro-N-methyl-ethylammonium chloride by serum proteins. *Biochem Pharmacol* 53: 189-197.
- Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47: 707-717.
- MacPhee IA, Antoni FA, Mason DW (1989) Spontaneous recovery of rats from experimental allergic encephalomyelitis is dependent on regulation of the immune system by endogenous adrenal corticosteroids. *J Exp Med* 169: 431-445.
- Matous-Malbohan I, Holub M, Mares V, Lodin Z (1976) Experimental allergic encephalomyelitis.-- The effect of dexamethasone on growth and proliferation in the draining lymph node. *Exp Pathol (Jena)* 12: 295-300.
- McGeachy MJ, Stephens LA, Anderton SM (2005) Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol* 175: 3025-3032.
- Milligan NM, Newcombe R, Compston DA (1987) A double-blind controlled trial of high dose methylprednisolone in patients with multiple sclerosis: 1. Clinical effects. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 50: 511-516.
- Momcilovic M, Miljkovic Z, Popadic D, Markovic M, Savic E, Ramic Z, Miljkovic D, Mostarica-Stojkovic M (2008) Methylprednisolone inhibits interleukin-17 and interferon-gamma expression by both naive and primed T cells. *BMC Immunol* 9: 47.
- Nance DM, Sanders VM (2007) Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). *Brain Behav Immun* 21: 736-745.
- Navarro J, Aristimuno C, Sanchez-Ramon S, Vigil D, Martinez-Gines ML, Fernandez-Cruz E, de Andres C (2006) Circulating dendritic cells subsets and regulatory T-cells at multiple sclerosis relapse: differential short-term changes on corticosteroids therapy. *J Neuroimmunol* 176: 153-161.
- Nguyen KB, McCombe PA, Pender MP (1997) Increased apoptosis of T lymphocytes and macrophages in the central and peripheral nervous systems of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis treated with dexamethasone. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 58-69.
- Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000) Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343: 938-952.
- Olerup O, Hillert J (1991) HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* 38: 1-15.
- Opferman JT (2008) Apoptosis in the development of the immune system. *Cell Death Differ* 15: 234-242.
- Ossege LM, Sindern E, Voss B, Malin JP (1998) Corticosteroids induce expression of transforming-growth-factor-beta1 mRNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 84: 1-6.
- Paul C, Bolton C (1995) Inhibition of blood-brain barrier disruption in experimental allergic encephalomyelitis by short-term therapy with dexamethasone or cyclosporin A. *Int J Immunopharmacol* 17: 497-503.

Pender MP, McCombe PA, Yoong G, Nguyen KB (1992) Apoptosis of alpha beta T lymphocytes in the nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis: its possible implications for recovery and acquired tolerance. *J Autoimmun* 5: 401-410.

Pender MP, Wolfe NP (2002) Prevention of autoimmune attack and disease progression in multiple sclerosis: current therapies and future prospects. *Intern Med J* 32: 554-563.

Pitzalis C, Pipitone N, Bajocchi G, Hall M, Goulding N, Lee A, Kingsley G, Lanchbury J, Panayi G (1997) Corticosteroids inhibit lymphocyte binding to endothelium and intercellular adhesion: an additional mechanism for their anti-inflammatory and immunosuppressive effect. *J Immunol* 158: 5007-5016.

Pollak Y, Ovadia H, Orion E, Yirmiya R (2003) The EAE-associated behavioral syndrome: II. Modulation by anti-inflammatory treatments. *J Neuroimmunol* 137: 100-108.

Pozzilli C, Marinelli F, Romano S, Bagnato F (2004) Corticosteroids treatment. *J Neurol Sci* 223: 47-51.

Rahman AM, Yusuf SW, Ewer MS (2007) Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation. *Int J Nanomedicine* 2: 567-583.

Redford EJ, Kapoor R, Smith KJ (1997) Nitric oxide donors reversibly block axonal conduction: demyelinated axons are especially susceptible. *Brain* 120 (Pt 12): 2149-2157.

Reed JC (2001) Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends Mol Med* 7: 314-319.

Reichardt HM (2004) Immunomodulatory activities of glucocorticoids: insights from transgenesis and gene targeting. *Curr Pharm Des* 10: 2797-2805.

Reichardt HM, Gold R, Luhder F (2006) Glucocorticoids in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Expert Rev Neurother* 6: 1657-1670.

Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP (1933) Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J. Exp. Med.* 58, 39-53

Rosen J, Miner JN (2005) The search for safer glucocorticoid receptor ligands. *Endocr Rev* 26: 452-464.

Rzeski W, Pruskil S, Macke A, Felderhoff-Mueser U, Reiher AK, Hoerster F, Jansma C, Jarosz B, Stefovaska V, Bittigau P, Ikonomidou C (2004) Anticancer agents are potent neurotoxins in vitro and in vivo. *Ann Neurol* 56: 351-360.

Schacke H, Rehwinkel H, Asadullah K, Cato AC (2006) Insight into the molecular mechanisms of glucocorticoid receptor action promotes identification of novel ligands with an improved therapeutic index. *Exp Dermatol* 15: 565-573.

Schmidt J, Gold R, Schonrock L, Zettl UK, Hartung HP, Toyka KV (2000) T-cell apoptosis in situ in experimental autoimmune encephalomyelitis following methylprednisolone pulse therapy. *Brain* 123 (Pt 7): 1431-1441.

Song IH, Buttgerit F (2006) Non-genomic glucocorticoid effects to provide the basis for new drug developments. *Mol Cell Endocrinol* 246: 142-146.

Sorensen TL, Sellebjerg F, Jensen CV, Strieter RM, Ransohoff RM (2001) Chemokines CXCL10 and CCL2: differential involvement in intrathecal inflammation in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 8: 665-672.

Sospedra M, Martin R (2005) Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23: 683-747.

Springer TA (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346: 425-434.

Steiner I, Brenner T, Mizrahi-Kol R, Abramsky O (1991) Development of experimental allergic encephalomyelitis during steroid administration. Outcome of neurological immune-mediated disorders under immunosuppressive therapy. *Isr J Med Sci* 27: 365-368.

Steinman L, Zamvil SS (2006) How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Ann Neurol* 60: 12-21.

Strasser A (2005) The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 5: 189-200.

Swanborg RH (2001) Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat: lessons in T-cell immunology and autoreactivity. *Immunol Rev* 184: 129-135.

Swart P, Swart AC, Louw A, van der Merwe KJ (2003) Biological activities of the shrub *Salsola tuberculiformis* Botsch.: contraceptive or stress alleviator? *Bioessays* 25: 612-619.

Tabi Z, McCombe PA, Pender MP (1994) Apoptotic elimination of V beta 8.2+ cells from the central nervous system during recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis induced by the passive transfer of V beta 8.2+ encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol* 24: 2609-2617.

Tanner TM, Verrijdt G, Rombauts W, Louw A, Hapgood JP, Claessens F (2003) Anti-androgenic properties of Compound A, an analog of a non-steroidal plant compound. *Mol Cell Endocrinol* 201: 155-164.

Tong QS, Jiang GS, Zheng LD, Tang ST, Cai JB, Liu Y, Zeng FQ, Dong JH (2008) Natural jasmonates of different structures suppress the growth of human neuroblastoma cell line SH-SY5Y and its mechanisms. *Acta Pharmacol Sin* 29: 861-869.

Tosa N, Murakami M, Jia WY, Yokoyama M, Masunaga T, Iwabuchi C, Inobe M, Iwabuchi K, Miyazaki T, Onoe K, Iwata M, Uede T (2003) Critical function of T cell death-associated gene 8 in glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis. *Int Immunol* 15: 741-749.

Tuckermann JP, Kleiman A, Moriggl R, Spanbroek R, Neumann A, Illing A, Clausen BE, Stride B, Forster I, Habenicht AJ, Reichardt HM, Tronche F, Schmid W, Schutz G (2007) Macrophages and neutrophils are the targets for immune suppression by glucocorticoids in contact allergy. *J Clin Invest* 117: 1381-1390.

Tuckermann JP, Reichardt HM, Arribas R, Richter KH, Schutz G, Angel P (1999) The DNA binding-independent function of the glucocorticoid receptor mediates repression of AP-1-dependent genes in skin. *J Cell Biol* 147: 1365-1370.

Ulvestad E, Williams K, Vedeler C, Antel J, Nyland H, Mork S, Matre R (1994) Reactive microglia in multiple sclerosis lesions have an increased expression of receptors for the Fc part of IgG. *J Neurol Sci* 121: 125-131.

Vayssiere BM, Dupont S, Choquart A, Petit F, Garcia T, Marchandeu C, Gronemeyer H, Resche-Rigon M (1997) Synthetic glucocorticoids that dissociate transactivation and AP-1 transrepression exhibit antiinflammatory activity in vivo. *Mol Endocrinol* 11: 1245-1255.

Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA (2004) Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 199: 971-979.

Wang D, Muller N, McPherson KG, Reichardt HM (2006) Glucocorticoids engage different signal transduction pathways to induce apoptosis in thymocytes and mature T cells. *J Immunol* 176: 1695-1702.

Wang Y, Kai H, Chang F, Shibata K, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Shibuya A, Shibuya K (2007) A critical role of LFA-1 in the development of Th17 cells and induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochem Biophys Res Commun* 353: 857-862.

Wiegmann K, Muthyala S, Kim DH, Arnason BG, Chelmicka-Schorr E (1995) Beta-adrenergic agonists suppress chronic/relapsing experimental allergic encephalomyelitis (CREAE) in Lewis rats. *J Neuroimmunol* 56: 201-206.

Yemelyanov A, Czornog J, Gera L, Joshi S, Chatterton RT, Jr., Budunova I (2008) Novel steroid receptor phyto-modulator compound a inhibits growth and survival of prostate cancer cells. *Cancer Res* 68: 4763-4773.

9 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Multiple Sklerose Forschung (IMSF), Gemeinnützige Hertie-Stiftung, der Universität Göttingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ralf Gold durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Ralf Gold danke ich herzlich für die Überlassung des äußerst interessanten Themas.

Meinem Betreuer Herrn PD Dr. Fred Lühder danke ich besonders für die kontinuierliche Unterstützung, ausführliche und ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei

- allen Mitarbeitern/Mitarbeiterinnen des IMSF
- unseren Kooperationspartnern der Zellulären und Molekularen Immunologie der Universität Göttingen - Herrn Prof. Dr. Holger Reichardt, Herrn Dr. Jens van den Brandt, Frau Dr. Denise Tischner und Frau Amina Bassibas
- unseren Kooperationspartnern der Neuropathologie der Universität Göttingen - Herrn Prof. Dr. Uwe-Karsten Hanisch, Frau Dr. Denise van Rossum und Frau Astrid Wohltmann
- Frau Dr. Angelika Escher, Institut für Neuropathologie der Universität Göttingen
- Herrn Dr. Michael John, Institut für Anorganische Chemie der Universität Göttingen
- Herrn Dr. Holm Frauendorf, Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Universität Göttingen

Besonderer Dank gilt

- Herrn Christian Kling, Institut für Anorganische Chemie der Universität Göttingen
- Herrn Jörg Scheffel, Institut für Neuropathologie der Universität Göttingen und
- meiner Familie

10 Lebenslauf

Simone Christiane Wüst

Geboren am 27. August 1978 in Aschaffenburg

Familienstand: ledig

Eltern: Nikolaus und Rosemarie Wüst

Schulische und Berufliche Ausbildung

09/1984 – 07/1988	Hefner-Alteneck-Grundschule, Aschaffenburg
09/1988 – 06/1997	Maria-Ward-Gymnasium, Aschaffenburg
09/1997 – 07/1999	Lehranstalt für pharmazeutisch technische Assistenten (PTA), Würzburg
09/1999 – 02/2000	PTA-Praktikum, Antonius-Apotheke, Aschaffenburg
04/2000 – 04/2004	Pharmazie-Studium, Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
05/2004 – 04/2005	Praktisches Jahr, Krankenhaus-Apotheke des Universitätsklinikums der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität und Neue Apotheke Lengfeld, Würzburg
06/2005 – 07/2005	3. Staatsexamen und Erlangung der Approbation
Seit 09/2005	Dissertation am Institut für Multiple Sklerose Forschung (IMSF), Göttingen