

Aus der Abteilung Klinische Chemie
(Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Oellerich)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Therapie der experimentellen autoimmunen
Enzephalomyelitis mit Mitoxantron**

Vergleichende Analyse von C57BL/6J- mit
Abcg2-knock-out-Mäusen

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Bastian Huber
aus Frechen

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. von Ahsen (Betreuer)

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Brück (Korreferent)

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. Virsik-Köpp (Promoter)

Tag der mündlichen Prüfung: 12.03.2012

Inhaltsverzeichnis

1	<u>Einleitung</u>	9
1.1	<u>Multiple Sklerose</u>	9
1.1.1	<u>Pathogenese</u>	9
1.1.2	<u>Krankheitsverlauf</u>	10
1.1.3	<u>Prognose</u>	11
1.1.4	<u>Therapieoptionen</u>	12
1.1.4.1	<u>Glukokortikoide</u>	12
1.1.4.2	<u>Immunmodulation</u>	13
1.1.4.3	<u>Immunsuppression</u>	13
1.2	<u>Mitoxantron (MTx)</u>	15
1.2.1	<u>Strukturformel</u>	16
1.2.2	<u>Wirkungsmechanismus</u>	16
1.2.3	<u>Unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAWs)</u>	17
1.2.4	<u>Therapiekonzepte</u>	18
1.3	<u>Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)</u>	18
1.3.1	<u>C57BL/6J-Maus: MOG-induziertes EAE-Modell</u>	20
1.3.2	<u>Mitoxantron und EAE</u>	21
1.4	<u>ABC-Transporter</u>	22
1.4.1	<u>ABCG2 (BCRP)</u>	22
1.4.1.1	<u>Aufbau und Lokalisation</u>	23
1.4.1.2	<u>Expressionsmuster und Funktion</u>	23
1.4.1.3	<u>Regulation der Expression</u>	24
1.4.1.4	<u>Substrate</u>	25
1.4.1.5	<u>ABCG2-Transporter - Die Bedeutung von single-nucleotide polymorphisms (SNPs)</u>	26
1.4.1.6	<u>Abcg2 -/- Mäuse</u>	27
1.5	<u>Zielstellung</u>	28
2	<u>Materialien und Methoden</u>	30
2.1	<u>Materialien</u>	30
2.1.1	<u>Geräte</u>	30
2.1.2	<u>Verbrauchsmaterialien</u>	31

2.1.3	<u>Labormaterialien</u>	31
2.1.3.1	<u>Chemikalien</u>	31
2.1.3.2	<u>Enzyme</u>	32
2.1.3.3	<u>Antikörper</u>	32
2.1.3.4	<u>Lösungen und Puffer</u>	32
2.1.4	Tiere	33
2.2	<u>Methoden</u>	34
2.2.1	<u>Tierversuche</u>	34
2.2.1.1	<u>Induktion der MOG₃₅₋₅₅- EAE in der Maus</u>	34
2.2.1.2	<u>Klinische Beurteilung der EAE</u>	34
2.2.1.3	<u>Therapieschema</u>	35
2.2.1.4	<u>Injektionen</u>	35
2.2.2	<u>Gewebeaufbereitung</u>	36
2.2.2.1	<u>Gewebeentnahme</u>	36
2.2.2.2	<u>Einbetten von Rückenmarksstücken</u>	37
2.2.2.3	<u>Paraffinschnitte</u>	37
2.2.3	<u>Histologie</u>	37
2.2.3.1	<u>histochemische Färbung Luxol Fast Blue + PAS (LFB)</u>	37
2.2.3.1.1	<u>Auswertung der LFB-Färbung</u>	38
2.2.3.2	<u>immunhistochemische Färbungen</u>	39
2.2.3.2.1	<u>mCD-3/ B220-Färbung</u>	39
2.2.3.2.2	<u>MAC3-Färbung</u>	40
2.2.3.2.3	<u>Auswertung der immunhistochemischen Färbungen</u>	40
2.2.4	<u>Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)</u>	41
2.2.4.1	<u>RNA-Isolation</u>	41
2.2.4.2	<u>Nano Drop</u>	41
2.2.4.3	<u>complementary-DNA-Synthese</u>	41
2.2.4.4	<u>RT-qPCR</u>	42
2.2.5	<u>Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung</u> <u>(HPLC-MS)</u>	43
2.2.5.1	<u>Probengewinnung</u>	44
2.2.5.2	<u>Gewebeextraktion</u>	45
2.2.5.3	<u>Versuchsaufbau</u>	45
3	<u>Ergebnisse</u>	46
3.1	<u>Charakterisierung des Modells</u>	46
3.1.1	<u>Krankheitsverlauf der EAE in C57BL/6J- und Abcg2^{-/-} Mäusen</u>	46

3.1.2	<u>Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)</u>	47
3.2	<u>MTx in C57BL/6J-EAE-Mäusen</u>	49
3.2.1	<u>MTx-Dosisfindung in C57BL/6J-EAE-Mäusen</u>	49
3.2.1.1	<u>Orientierende Dosis-Versuche</u>	49
3.2.1.2	<u>Modifikation des Therapieschemas</u>	51
3.2.1.3	<u>Optimierung der MTx-Dosis</u>	53
3.3	<u>MTx in Abcg2 -/- EAE-Mäusen</u>	55
3.3.1	<u>Wirkung des MTx in Abcg2 -/- EAE-Mäusen</u>	55
3.3.2	<u>Etablierung der MTx-Therapie in Abcg2 -/- Tieren</u>	57
3.3.3	<u>Dosis-Modifikation: Die Wirkung von 0,2 mg/kg KG MTx auf Abcg2 -/- Mäuse</u>	59
3.4	<u>MTx in Abcg2 +/- EAE-Mäusen</u>	61
3.4.1	<u>Abcg2 +/- EAE-Mäuse und 0,5 mg/kg KG MTx</u>	61
3.5	<u>Histologie</u>	65
3.5.1	<u>Makrophagen</u>	65
3.5.2	<u>T-Lymphozyten</u>	68
3.5.3	<u>Luxol Fast Blue</u>	70
3.5.4	<u>B-Lymphozyten</u>	73
3.5.5	<u>Zusammenfassung der Histologie</u>	75
3.6	<u>Drug monitoring von MTx</u>	76
4	<u>Diskussion</u>	79
4.1	<u>MTx-Therapie in C57BL/6J-EAE-Mäusen</u>	79
4.1.1	<u>EAE - ein suffizientes Modell für die MS</u>	79
4.1.2	<u>MTx - Applikationsschema</u>	81
4.1.3	<u>MTx-Dosis und Applikationsmechanismus</u>	82
4.1.4	<u>MTx - Wirkmechanismus</u>	83
4.1.5	<u>MTx - alternative Therapieoptionen</u>	83
4.2	<u>Mitoxantron-Therapie in Abcg2 -/- Mäusen</u>	84
4.2.1	<u>MTx in Abcg2 -/- EAE-Mäusen</u>	84
4.2.2	<u>Abcg2 +/- EAE-Mäuse und die Wirkung von MTx</u>	86
4.2.3	<u>Zusammenfassung: MTx in Mäusen</u>	87
4.2.4	<u>MTx-Konzentrationen in Geweben von Abcg2 -/- Mäusen</u>	88
4.3	<u>Der humane ABCG2-Transporter</u>	89
4.3.1	<u>ABCG2-Transporter und MTx</u>	90

4.3.2	<u>MS und Therapieoptionen</u>	91
5	<u>Zusammenfassung und Ausblick</u>	94
6	<u>Literaturverzeichnis</u>	95

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding-cassette
BCRP	breast-cancer-resistance-protein
c-DNA	komplementäre-Desoxyribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
et al.	et alii
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers
GC	Glukokortikoide
GIT	Gastro-Intestinal-Trakt
IL-2	Interleukin-2
INF- β	Interferon- β
INF- γ	Interferon- γ
i.v.	intravenös
IVIG	intravenöse Immunglobuline
KG	Körpergewicht
KOF	Körperoberfläche
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MBP	Myelin-basisches Protein
MDR	multi-drug-resistance
MIMS	Mitoxantron in multipler Sklerose
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MRP	multi-drug-resistance-Protein
MS	Multiple Sklerose
MTx	Mitoxantron
NBD	Nukleotid-Bindungs-Domäne
NMR	nuclear magnetic resonance
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd-Lösung
P-gp	P-glykoprotein
PLP	Proteolipid-Protein

Abkürzungsverzeichnis

PP-MS	primär-progrediente Multiple Sklerose
RP-MS	schubförmig-progrediente Multiple Sklerose
RR-MS	schubförmig-remittierende Multiple Sklerose
RT-qPCR	real-time quantitative PCR
SNP	single-nucleotide polymorphism
SP-MS	sekundär chronisch-progrediente Multiple Sklerose
Tab.	Tabelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
UAWs	unerwünschte Arzneimittelwirkungen
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) stellt die häufigste neurologische Erkrankung des jungen Erwachsenenalters dar, sie zeigt eine ausgeprägte Gynäkotropie mit doppelt so häufig erkrankten Frauen. Die Prävalenz liegt bei 149 Erkrankten pro 100.000 Einwohnern, die Gesamtzahl der Erkrankten wird in Deutschland damit auf etwa 122.000 errechnet (Hein und Hopfenmüller 2000). Die Lebenserwartung eines MS-Patienten lag lange Zeit 6 bis 10 Jahre unter der von Nichterkrankten vergleichbaren Alters (Sadovnick et al. 1992; Brønnum-Hansen et al. 2004), durch Einführung von immunsuppressiven Therapien konnte jedoch in den letzten Jahren ein unverkennbarer Rückgang der Sterblichkeit beobachtet werden (Gold und Rieckmann 2004; Ebers et al. 2010). Die Diagnosestellung der Multiplen Sklerose erfolgt anhand einheitlicher Kriterien, welche als überarbeitete Fassung der McDonald-Kriterien bei der deutschen Multiplen Sklerose Gesellschaft (DMSG) einzusehen sind (McDonald et al. 2001; Polman et al. 2005; www.dmsg.de).

1.1.1 Pathogenese

Nach dem derzeitigen Wissensstand handelt es sich bei der MS um eine Autoimmunerkrankung, bei der sowohl eine genetische Prädisposition als auch Umwelteinflüsse als zusätzliche Einflussgrößen diskutiert werden (Sospedra und Martin 2005). Es wird davon ausgegangen, dass eine T-lymphozytäre, Makrophagen-getriggerte Schädigung der Axone im zentralen Nervensystem (ZNS) stattfindet, wobei der humoralen Komponente (B-Lymphozyten) im Prozess der Immunantwort eine ebenfalls wichtige Rolle zugeordnet wird (Ziemssen T und Ziemssen F 2005). Im weiteren Verlauf der Entzündungsreaktion kommt es zu Remyelinisierungen der geschädigten Bereiche, die histopathologisch in vier verschiedene Stadien eingeteilt

werden können (Subtypen I-IV) (Lassmann et al 2001). Ein anderer Erklärungsansatz führt die multiplen demyelinisierten Läsionen im ZNS auf eine primäre Schädigung der Oligodendrozyten durch T-Lymphozyten und Makrophagen zurück (Fugger et al. 2009; Goverman 2009). Demnach handelt es sich bei der Demyelinisierung der Axone um einen sekundären Folgeschaden, der auf den primären Oligodendrozyten-Untergang zurückzuführen ist (Aboul-Enein et al. 2003). Zusätzlich werden seit einigen Jahren axonale Schäden in Läsionen beschrieben, welche gerade in der frühen Krankheitsphase als sehr ausgeprägt dokumentiert werden. Durch die enorme Plastizität des Nervensystems bereiten die Läsionen in dieser Phase durchaus weniger Probleme. Einen hohen Stellenwert erfahren die Axonschäden wahrscheinlich innerhalb der sekundären Neurodegeneration, welche für die fortschreitende physische und psychische Beeinträchtigung der MS-Patienten verantwortlich ist (Trapp et al. 1998; Kuhlmann et al. 2002).

1.1.2 Krankheitsverlauf

Es werden unterschiedliche Verlaufsformen der Multiplen Sklerose beschrieben. Der „schubförmige“ Verlauf geht mit einer kompletten Remission (schubförmig remittierende MS – Abk.: RR-MS) oder auch nur mit einer Teilremission der Symptome einher (schubförmig progrediente MS – Abk.: RP-MS). Bei dem „chronisch progredienten“ Verlauf wird eine kontinuierliche Verschlechterung der Symptome beobachtet (ohne Remission) (primär progrediente MS – Abk.: PP-MS). Bei 30- 50% der initial „schubförmigen“ MS- Verläufe ist innerhalb von 10 Jahren ein Übergang in die progrediente Form zu beobachten. Hier spricht man von der „sekundär chronisch progredienten“ Form (SP-MS), die eine Unterform der „chronisch progredienten“ Form darstellt (Gold und Rieckmann 2004).

Als Schub wird hierbei ein akut aufgetretenes Symptom bezeichnet, welches länger andauert als 24 Stunden. Die Häufung von neuen Symptomen innerhalb von vier Wochen nach Beschreibung des vorangegangenen Schubes wird definitionsgemäß dem primären Schub zugeordnet.

Zu den Frühsymptomen der Multiplen Sklerose gehören in 40% der Fälle zu Krankheitsbeginn (Poser et al. 1979):

- Sehstörung/ Okulomotorik
- Paresen
- Parästhesien
- Ataxie.

Im weiteren Verlauf der Erkrankung können alle zentralen neurologischen Systeme betroffen sein. Ebenfalls zu beobachten sind unspezifische Allgemeinsymptome wie z.B. Müdigkeit und Abgeschlagenheit. Diese generelle Leistungsminderung korreliert mit dem Ausmaß der Läsion im kranialen Kernspintomogramm (Clark et al. 1992; Müller et al. 1994).

Unter diesen Faktoren der Erkrankung leidet die Lebensqualität der Betroffenen. Man geht davon aus, dass sich Aufmerksamkeits- und Informationsverarbeitungsstörungen bei 50% der Patienten wiederfinden (Rao et al. 1991a; Rao et al. 1991b). Diese kognitiven Defizite können jedoch nicht mit dem Ausmaß der physischen Einschränkung im Krankheitsverlauf der MS korreliert werden. Gadea et al. zeigen im Jahr 2002, dass eine homogene Patienten-Gruppe (RR-MS-Verläufe) mit milden physischen Manifestationen bereits in der Frühphase der Erkrankung verhältnismäßig schlechte Ergebnisse in Übungen zu Aufmerksamkeitsprozessen erzielt (Gadea et al. 2002). Diese Ergebnisse implizieren, dass neben der Beschreibung von physischen Komponenten im Verlauf der MS auch die Evaluation von kognitiven Defiziten in Frühstadien der Erkrankung einen hohen Stellenwert einnimmt.

1.1.3 Prognose

Zur Prognose der Erkrankung gibt es generell keinen Marker, der es ermöglicht, dem Patienten einen prognostisch günstigen oder prognostisch eher ungünstigen Verlauf seiner Erkrankung zu attestieren. Jedoch werden von Autoren Faktoren benannt, welche prognostisch günstig zu sein scheinen, und andere Faktoren wiederum, die eher als prognostisch ungünstig zu betrachten sind (Kesselring 1997; Rudick et al. 1997)

Prognostisch günstige Faktoren:

- erhaltene Gehfähigkeit
- ein Alter von unter 35 Jahren bei Beginn der Erkrankung
- monosymptomatischer Beginn
- kurze Dauer des letzten Schubes
- nur sensible Symptome.

Prognostisch ungünstige Faktoren:

- frühe motorische oder zerebelläre Zeichen
- rasche initiale Schubfolge
- lange Dauer des Schubes
- schlechte (Symptom-)Rückbildung nach ersten Schüben
- initial multiple NMR-Läsionen.

1.1.4 Therapieoptionen

Die Möglichkeiten zur Therapie der Multiplen Sklerose richten sich nach der Verlaufsform und sind demnach individuell auf den jeweiligen Patienten abgestimmt. Generell gibt es die Möglichkeit zur Behandlung mit Glukokortikoiden, die immunmodulatorischen Therapiekonzepte, die immunsuppressiven Therapien und die flankierende symptomatische Behandlung.

1.1.4.1 Glukokortikoide

Glukokortikoide (GC) eignen sich zur Therapie besonders aufgrund ihrer immunsuppressiven Wirkung sowohl auf die humorale als auch auf die zelluläre Immunabwehr (Boumpas et al. 1993). Als vermehrt eingesetztes Pharmazeutikum ist das GC-Methylprednisolon zu nennen, welches eine niedrige und generell unerwünschte mineralkortikoide Wirkung aufweist. Um klassische unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAWs) wie die vermehrte Infektneigung, Adipositas, Ödeme, Hypokaliämie, Diabetes mellitus und die arterielle Hypertonie zu reduzieren, gingen

behandelnde Ärzte Studien folgend dazu über, die GC in einer „Pulstherapie“ zu applizieren. Diese besteht aus einer hochdosierten intravenösen (i.v.) Applikation von 500-1000mg (Methyl-)Prednisolon über drei bis fünf Tage und einer anschließenden, ausschleichenden 14-tägigen Therapie mit oralen GC in abnehmender Dosis (Barnes et al. 1985; Milligan et al. 1987; Beck et al. 1992). Empfohlen wird die GC-Therapie bei akuter, schubförmiger Verschlechterung der MS. Versuchsweise wird eine Therapie ebenfalls bei PP-MS- und SP-MS-Verläufen in Erwägung gezogen.

1.1.4.2 Immunmodulation

In der Pathogenese und der Progression der MS wird den Zellen des Immunsystems eine große Rolle beigemessen. Die Kommunikation der unterschiedlichen Immunzell-Typen erfolgt über die eigenständige Sezernierung von Zytokinen. Diese sind in der Lage, gezielt Immunzellen zu stimulieren und deren Reifungsprozess zu modulieren. Der beschriebene Mechanismus beeinflusst in Bezug auf die MS sowohl deren Progression als auch die Schübe. Demnach beruht die Wirkung der Immunmodulatoren zum einen auf der Abschwächung von Schüben, zum anderen wird durch die Modulation eine Reduktion der Anzahl der Schübe erreicht. Die Progredienz der MS wird durch den Einsatz immunmodulatorischer Medikamente jedoch nicht wesentlich beeinflusst. Zum Einsatz kommen immunmodulatorisch wirksame Medikamente bei RR-MS- und teilweise bei PP-MS-Verläufen der Erkrankung. Zu den Immunmodulatoren zählen die Interferone- β 1a/ β 1b, das Glatirameracetat und die intravenösen Immunglobuline (IVIg) (Gold und Rieckmann 2004).

1.1.4.3 Immunsuppression

Eine andere Möglichkeit, das Immunsystem zu beeinflussen, wird durch den Mechanismus der Immunsuppression erreicht. Deren Ziel ist zum einen die direkte Apoptose-Induktion von Zellen des Immunsystems, zum anderen erfolgt durch die Immunsuppressiva eine Unterdrückung der Reifungsprozesse dieser Zellen. Dieser Mechanismus ermöglicht die Krankheitsprogression, welche durch das Immunsystem

erfolgt, einzudämmen. Einsatz finden unter dieser Art der Therapie das Purinanalogon Azathioprin, der Dihydrofolat-Reduktase-Hemmstoff Methotrexat und das zur Gruppe der Alkylanzien gehörige Cyclophosphamid. Gemeinsam haben diese drei Wirkstoffgruppen, dass sie in den Zyklus von proliferativen Zellsystemen eingreifen und dadurch eine Suppression der verschiedenen Zell-Typen des Immunsystems bewirken. Der Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A beschreitet als Immunsuppressivum einen alternativen Weg, indem es zu einer verminderten Synthese von Zytokinen führt und dementsprechend die Aktivierung und Proliferation von Lymphozyten gehemmt wird. Ein ebenfalls differenter Weg wird durch den monoklonalen Antikörper Natalizumab aufgezeigt. Jener verhindert durch die Bindung und Blockierung des α_4 -Integrin Rezeptors auf der Zelloberfläche von Lymphozyten das Eindringen dieser Zellen, von der Blutseite her, in das Gebiet der Entzündung. Der Wirkmechanismus macht deutlich, dass es sich bei Natalizumab nicht um ein Immunsuppressivum im klassischen Sinne handelt. Vielmehr ist Natalizumab in der Lage, eine funktionelle und auch nur temporäre Immunsuppression einzelner Organe zu bewirken, die durch ausbleibende Applikation unterbrochen werden kann. Das Fingolimod (FTY-720) verhindert die Auswanderung von Lymphozyten aus sekundär lymphatischen Organen ins Blut und bewirkt dadurch eine geringere Konzentration von Lymphozyten in Bereichen der Entzündung. Durch das Enzym Sphingosin-Kinase-2 wird aus dem eingenommenen Fingolimod das Spalt-Produkt FTY720-P. Dieses bindet an Sphingosin-1-phosphat(S1P1)-Rezeptoren auf den Zelloberflächen von B- und T-Lymphozyten und induziert eine Internalisierung des Rezeptors. Die Internalisierung exakt dieses Rezeptors verhindert die S1P1-Rezeptor-abhängige Auswanderung der B- und T-Lymphozyten aus sekundär lymphatischen Organen ins Blut (Matloubian et al. 2004). Die beschriebene funktionelle Lymphopenie kann durch Abbruch der medikamentösen Behandlung wieder rasch aufgehoben werden.

Besondere Betrachtung wird an dieser Stelle dem aus der Gruppe der synthetischen Anthracenedione stammenden Mitoxantron gewidmet. Entwickelt in den 80er Jahren zählt es als wirksamer Inhibitor der RNA- und DNA-Synthese ebenfalls zu den immunsuppressiven Medikamenten.

1.2 Mitoxantron (MTx)

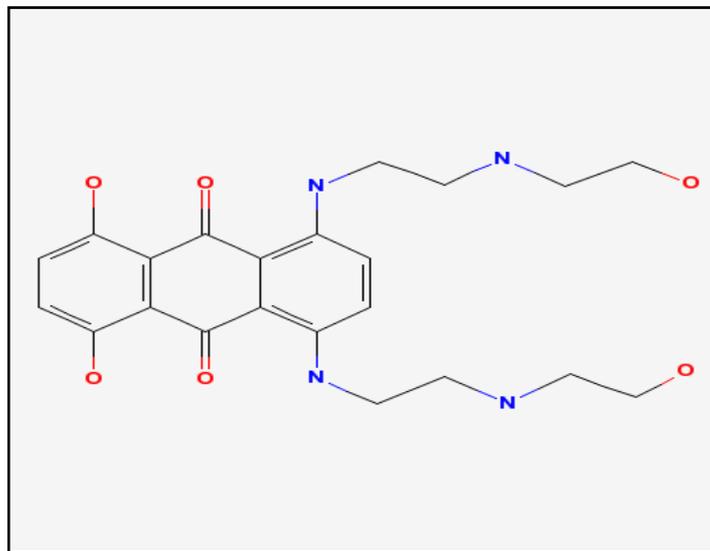
Die Krebstherapie verschiedener Tumore erfolgt unter Zuhilfenahme antineoplastisch wirksamer Medikamente. Eine wichtige Rolle wird in diesen Therapien dem bereits in den 1950er Jahren beschriebenen Anthrazyklin Doxorubicin beigemessen. Aufgrund der unerwünschten hohen Kardiotoxizität bei der Behandlung mit Doxorubicin erfolgte 1979 die Synthetisierung des strukturverwandten MTx. Dem synthetisierten MTx konnte eine niedrigere toxische Wirkung auf den Herzmuskel nachgewiesen werden.

MTx wurde danach im Jahre 1987 als antineoplastisches Agens zur Therapie der akuten myeloischen Leukämie des Erwachsenen und im Jahre 1996 zur Therapie des progredienten, hormonrefraktären Prostatakarzinoms zugelassen. Weitere zytostatische Anwendung des MTx erfolgt in der Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms und bei den Non-Hodgkin-Lymphomen.

Im Tiermodell der MS konnte bereits 1985 in EAE-Ratten gezeigt werden, dass MTx in der Lage ist, das klinische Bild der EAE günstig beeinflussen zu können (Ridge et al. 1985). Die beschriebenen immunsuppressiven Effekte des MTx in EAE-Ratten führten zu mehreren unkontrollierten Studien zur Therapie der MS. Aufgrund von randomisierten MRT-kontrollierten Studien zur Wirksamkeit des MTx in der MS (Edan et al. 1997; Millefiorini et al. 1997) erfolgte die endgültige Zulassung des MTx zur Therapie der MS, nach Veröffentlichung der MIMS-Studie („Mitoxantrone in Multiple Sclerosis“) durch die Gesundheitsbehörden in Deutschland (Hartung et al. 2002). MTx wird seitdem zur Eskalationstherapie bei RR-MS-, SP-MS- und RP-MS-Verläufen eingesetzt (Fox 2004; Boster et al. 2008).

Die Applikation des MTx erfolgt aufgrund der niedrigen oralen Bioverfügbarkeit intravasal. Eliminiert wird es vorwiegend über die Leber und die Galle, wobei 10% der totalen Clearance des MTx über die Nieren erfolgen. MTx akkumuliert über Zeiträume von über 200 Tagen in Geweben, wobei als Gewebe mit den höchsten Konzentrationen die Schilddrüse, die Leber und das Herz beschrieben wurden (Ehninger et al. 1990).

1.2.1 Strukturformel



Freiname:	Mitoxantron
IUPAC- Name:	1,4-Dihydroxy-5,8-bis[[2- [(2-hydroxyethyl)amino]ethyl] amino]-9,10-anthracenedione
Summenformel:	$C_{22}H_{28}N_4O_6$

1.2.2 Wirkungsmechanismus

Der frühe Einsatz des MTx als Chemotherapeutikum in verschiedenen Tumormodellen erfolgte aufgrund seiner zytotoxischen Wirkung auf die einzelnen Tumorzelllinien (Fox 2004). MTx interkaliert in die DNA, führt durch Bindung an den Topoisomerase-II-Komplex zu fehlerhafter DNA-Reparatur und DNA-Synthese (Smith 1983), Doppel- und Einzelstrangbrüche führen zur Inhibition der DNA-abhängigen RNA-Synthese. Fehlerhafte DNA-Synthese endet entweder in Apoptose, oder es kommt zu einer Blockierung des Zellzyklus in der G₂-Phase (Fisher und Patterson 1991; Thielmann et al. 1993; De Isabella et al. 1995).

Der genaue Wirkmechanismus des MTx bei der MS ist nicht völlig geklärt. MTx wirkt als „potentes Breitspektrum Immunsuppressivum“ besonders depletierend sowohl auf B-Lymphozyten als auch auf CD4(+)/CD8(+)-T-Zellen und Makrophagen durch die Induktion von Apoptose und die Inhibition ihrer Proliferation (Chan et al. 2005).

Zu beobachten sind unter der Therapie eine reduzierte Antikörperproduktion durch B-Lymphozyten und schließlich eine herabgesetzte Myelindestruktion durch Makrophagen und T-Lymphozyten, die auf die verminderte Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine Interferon- γ (INF- γ), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-2 (IL-2) zurückzuführen ist (Fidler et al. 1986a ; Fidler et al. 1986b; Levine und Gherson 1986; Wang BS et al. 1986; Watson et al. 1991) .

1.2.3 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAWs)

MTx wird von MS-Patienten gut toleriert. Es werden nur wenige UAWs beschrieben, die über die üblich hervorgerufenen Nebenwirkungen unter Behandlung mit zytotoxischen Pharmazeutika hinausgehen. Das Hauptproblem der MTx-Therapie liegt deshalb nicht bei leichtem Unwohlsein und dem Gefühl von Müdigkeit und Abgeschlagenheit, sondern vielmehr in der Kardiotoxizität. Zu den Folge-manifestationen aufgrund der Toxizität zählen Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, Kardiomyopathie und Arrhythmie. Als kumulative Gesamtdosis wird deshalb in einigen Therapieansätzen eine Dosis von 100 mg/m² Körperoberfläche (KOF), in anderen Therapieansätzen eine Maximaldosis von 140 mg/m² KOF, festgesetzt. In Studien konnte ein Risiko von 0,2 % bezüglich der Entwicklung einer kongestiven Herzinsuffizienz, unter Berücksichtigung kardioprotektiver Maßnahmen, beschrieben werden (Ghalie et al. 2002). An anderer Stelle führte die enge kardiologische Begleitung von Patienten unter MTx-Therapie bei einer Gesamtdosis von 100 mg/m² KOF zu keinen kardiologischen Nebenwirkungen (Strotmann et al. 2002). Doch es gibt auch Studien, die kardiale Manifestationen illustrieren, welche auch Jahre nach der Behandlung mit MTx auftreten können (Morrissey et al. 2005). Aktuell rückt mit der therapieassoziierten akuten Leukämie eine weitere überaus wichtige UAW, bedingt durch die MTx-Therapie, in den Fokus der Forschung. Allerdings sind bis dato in der Literatur weder zur genauen Inzidenz noch zu Risikofaktoren klare Aussagen zu finden (Meyer et al. 2010).

1.2.4 Therapiekonzepte

Ein typisches Therapieschema sind Infusionen von 10-12 mg/m² KOF, die in drei-monatigen Abständen erfolgen. Dieses Schema wird bei besonders ausgeprägter Krankheitsmanifestation oder Verschlechterung der MS unter der MTx-Therapie auf Behandlungen mit drei Infusionen von bis zu 10 mg/m² KOF in monatlichem Abstand umgestellt. Erhaltungstherapien werden in 3-monatigen Abständen durchgeführt. Das MTx gilt weiterhin als Eskalationstherapeutikum. In progredienten MS-Verläufen soll mit dem MTx als „Mittel der letzten Wahl“ eine Stabilisierung des bis dahin progredienten Verlaufes erreicht werden. Nach dem Rückgang und der Intensitätsschwächung der Schübe unter MTx-Therapie wird die Umstellung auf weniger toxische Immunmodulatoren/ Immunsuppressiva angestrebt. Eine erneute MTx-Therapie wird, aufgrund der beschriebenen Maximaldosis, erst nach wiederkehrender Verschlechterung eingeleitet (Gold und Rieckmann 2004).

1.3 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)

Die Geschichte der EAE geht weit in die 1930er Jahre zurück. Bereits 1933 beschrieben Rivers et al. eine inflammatorische Reaktion, die von einer perivaskulären Demyelinisierung in Bereichen des Gehirns von Affen begleitet wurde, nachdem diese als Versuchstiere intramuskulär mit Rückenmarkshomogenat behandelt wurden (Rivers et al. 1933).

Durch die Behandlung von Tierstämmen mit Rückenmarkshomogenat oder Bestandteilen des Myelins wird eine entzündliche/ demyelinisierende Erkrankung im zentralen Nervensystemes ausgelöst. Dabei stellte sich heraus, dass die verschiedenen, zur Applikation verwandten Bestandteile des Myelins (Myelinbasisches Protein (MBP), Proteolipidprotein (PLP), Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG), Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG)) zu unterschiedlichen Krankheitsmanifestationen bei verschiedenen Tiermodellen führen können. Die Hauptkomponenten der EAE sind die Entzündungsreaktion, die Demyelinisierung

und der resultierende axonale Schaden unter akuter oder chronisch-rezidivierender Manifestation. Die EAE wird in unterschiedlichen Tierspezies beschrieben, dazu gehören Affen, Meerschweinchen, Hamster, Mäuse, Ratten, Hasen, Hunde und Schafe. In den unterschiedlichen Tiermodellen zeigt die EAE bezogen auf die klinischen und pathologischen Manifestationen der Erkrankung interindividuell differente Ausprägungen (Baxter 2007).

Beschriebene Umstände bieten Grundlage für die Kritiker der EAE: Bei der MS handelt es sich um eine spontan auftretende Erkrankung, hingegen bei einer EAE, als akut monophasisch oder auch chronifizierenden Erkrankung, stets eine Induktion erfolgen muss. Des Weiteren illustrieren die verschiedenen EAE-Modelle jeweils nur einzelne Teilaspekte der MS, welche selbst eine komplexe Pathogenese aufzeigt. Die beschriebenen Differenzen bezüglich Pathogenese und klinischer- bzw. zellulärer Manifestationen bekräftigen die Kritiker der EAE darin, jenes Modell nicht als Tier-Äquivalent der MS zu akzeptieren (Sriram und Steiner 2005). Auf der anderen Seite argumentieren Steinman und Zamvil (2006), dass die EAE für die MS sehr wohl ein adäquates Modell darstellt: Die MS ist in vielen Bereichen nicht ausreichend verstanden. Teilaspekte von Entstehung, Verlauf, Diagnose und auch Prognose der MS konnten bis dato nicht vollends evaluiert werden. Seit der Etablierung der EAE in den frühen 30er Jahren des 20. Jahrhunderts konnten unter Zuhilfenahme dieses Modells zumindest einige Teilbereiche der MS besser beleuchtet, bzw. erklärt werden. Das EAE-Modell lieferte die Ergebnisse, die zur verbreiteten Annahme führen, dass es sich bei der MS um eine T-Zell-vermittelte Autoimmun-Erkrankung handelt. Zur Zeit befinden sich drei Medikamente in der Therapie der MS, welche ursprünglich in der EAE erforscht wurden und derzeit als Therapieoptionen zur Behandlung der MS nicht mehr wegzudenken sind. Es handelt sich dabei sowohl um den Immunmodulator Glatirameracetat, als auch um die Immunsuppressiva Natalizumab und MTx (Gold et al. 2006; Steinman und Zamvil 2006).

1.3.1 C57BL/6J-Maus: MOG-induziertes EAE-Modell

Die Applikation einzelner Proteinstrukturen des Myelins ermöglicht die Induktion einer EAE, die in verschiedenen Mausmodellen mit unterschiedlichen EAE-Krankheitsverläufen einhergeht. Demnach zeigen SJL-Mäuse, die mit PLP₁₃₉₋₁₅₁-Protein, PL/J-Mäuse, welche mit MBP-Protein und Biozzi-ABH-Mäuse, die mit MOG-Protein behandelt wurden, einen akut-schubförmigen Verlauf der EAE, wobei chronisch-progressive Verläufe der EAE in C57BL/6J-Mäusen auftreten, die mit MOG- oder MOG₃₅₋₅₅-Protein behandelt wurden (Yasuda et al. 1975; Amor et al. 2005). Eine Schlüsselrolle im Prozess der EAE-Krankheitsinduktion wird dem MOG-Protein zugedacht (Lebar et al. 1986). Als Autoantigen ruft es in behandelten Tieren eine Immunantwort hervor, die in der Lage ist, das Spektrum von Pathogenese und klinischer Manifestation einer MS grundlegend imitieren zu können (Storch et al. 1998). Wichtige Mechanismen im Prozess der MOG-induzierten Immunantwort stellen zum einen die Aktivierung von T-Lymphozyten und Makrophagen, zum anderen die Produktion demyelinisierender Antikörper durch B-Lymphozyten dar (Schluesener et al. 1987; Genain et al. 1995). Im C57BL/6J-MOG (MOG-Protein von der Maus bzw. Ratte)-induzierten Mausmodell entstehen die neuronalen Krankheitsmanifestationen der EAE primär durch T-Lymphozyten und Makrophagen, wogegen der Antikörper-gerichteten Immunantwort in diesem Modell eine eher untergeordnete Rolle zugerechnet wird (Bourquin et al. 2003). 2003 demonstrierten Oliver et al. ebenfalls, dass zur Entwicklung einer EAE in C57BL/6J-Mäusen, welche mit humanem MOG behandelt wurden, die Anwesenheit von B-Zellen und deren Antikörper-Produktion einen wichtigen Pathomechanismus darstellen. Auf der anderen Seite ist die Anwesenheit von B-Zellen zur Entwicklung einer EAE nicht von Nöten, erfolgt doch die Immunisierung der Tiere mittels des MOG-Proteins der Ratte (Oliver et al. 2003).

Generell ist davon auszugehen, dass die alleinige Anwesenheit autoreaktiver B-Zellen, welche ein pathogenes Potential besitzen, keine autoimmune Reaktion bedingt. Die eigentliche Rolle von persistierenden autoreaktiven B-Zellen illustrieren Linington et al. in einem knock-in-Modell mit MOG-spezifischen B-Zellen (Linington et al. 1988). Erst die Induktion einer inflammatorischen Erkrankung des ZNS (EAE) bedeutet eine Modifizierung von deren Pathophysiologie und des klinischen

Verlaufes, bedingt durch die Antikörperproduktion von aktivierten autoreaktiven B-Zellen. Autoreaktive B-Zell-Klone, deren Targetstrukturen von Antigenen des ZNS repräsentiert werden, sind deshalb primär nicht in der Lage, eine Autoimmunantwort auszulösen, besitzen jedoch im Falle einer Aktivierung im Rahmen einer vorangehenden ZNS-Inflammation einen großen Stellenwert bezüglich der Modifikation von deren inflammatorischem Verlauf (Litzenburger et al. 1998).

1.3.2 Mitoxantron und EAE

Nach der Synthetisierung des MTx im Jahre 1979 erfolgte im Jahr 1987 die Zulassung zur Tumorthherapie der akuten myeloischen Leukämie. In den darauf folgenden Jahren gelang die weitere Zulassung zur antineoplastischen Behandlung des Prostata-, des Brustdrüsen-Karzinoms und des Non-Hodgkin Lymphoms. Bereits 1985 konnten Ridge et al. einen suppressiven Effekt des MTx auf die EAE-Krankheitsinduktion in Ratten illustrieren. Die Verwendung des MTx in der EAE erfolgte, da bereits zuvor positive Ergebnisse von zytotoxisch wirksamen Medikamenten auf den EAE-Krankheitsverlauf beschrieben werden konnten. Interessant wurde die Applikation des MTx in der EAE, da dieses, im Vergleich zu ähnlich wirksamen Medikamenten, eine niedrigere Kardiotoxizität aufweist. Die tägliche intraperitoneale Applikation von MTx verringert das Auftreten klinischer und histopathologischer Manifestationen der EAE in der Ratte (Ridge et al. 1985). Sowohl die intraperitoneale als auch die subkutane Injektion von MTx an den Tagen 1, 4, 8 und 11 nach der Immunisierung von Ratten führt zu supprimierten EAE-Krankheitsmanifestationen (Levine und Saltzman 1986). Lublin et al. beschrieben die Effekte des MTx in der Maus im Rahmen einer akuten und chronischen EAE. Die Applikation des MTx erfolgte in beiden Modellen intraperitoneal im täglichen bzw. drei mal wöchentlichen Zyklus. Die Ergebnisse zeigten unter MTx-Behandlung fehlende klinische und nur minimale pathologische Manifestationen in den Tieren mit akuter EAE. In den Tieren der chronischen EAE- Gruppe konnten unter MTx-Behandlung ein verspäteter Krankheitsbeginn, reduzierte klinische und pathologische Manifestationen beobachtet werden (Lublin et al. 1987). Neben der beschriebenen intraperitonealen und subkutanen Applikation wird in der Literatur ebenfalls die Methode der intrathekalen MTx-Applikation aufgezeigt (Baker et al. 1992).

1.4 ABC-Transporter

Die Fähigkeit des Organismus, eine Resistenz gegenüber (Zell-)schädigenden Noxen zu entwickeln, beruht auf der Existenz so genannter „multi-drug-resistance“-Transporter. Dem Überbegriff des ABC („ATP-binding-cassette“)-Transporters werden die Familie der MRP's/ ABCC 1-5 („Multidrug-resistance-protein“), das P-gp/ ABCB1 („P-glycoprotein“) und die ABCG-Transporter 1-5 + 8, zugeordnet. Der am besten verstandene Transporter der ABCG-Familie ist der ABCG2-Transporter, auch geläufig unter dem Synonym BCRP („breast-cancer-resistance-protein“).

Insgesamt sind zur Zeit 49 ABC-Transporter identifiziert, wobei die Funktion der Mehrzahl unbekannt ist. Sie sind in der Lage, Medikamente, Gallensäuren, Peptide, Steroide, Ionen und Phospholipide aktiv gegen einen Konzentrationsgradienten zu transportieren. Die Mehrzahl der humanen ABC-Transporter liegt als Monomere vor und fungiert als Exporter. Der ABC-Transporter besteht aus mindestens zwei hydrophoben transmembranalen Domänen (TMD) und zwei hydrophilen Domänen, die jeweils eine ATP-Kassette enthalten. Die Spezifität der einzelnen Transporter wird durch eine hydrophobe Permeasedomäne bestimmt. Gleichzeitig bewerkstelligt diese durch die Bindung und Hydrolyse von ATP den aktiven Transport von Substraten gegen einen womöglich vorhandenen Konzentrationsgradienten (Robey et al. 2007).

1.4.1 **ABCG2 (BCRP)**

Der BCRP-Transporter wurde erstmals von Doyle et al. 1998 isoliert. Die Grundlage der Isolation bildete eine MCF-7/AdrVp („breast-cancer-resistant“)-Zelllinie. Diese Zellen weisen eine fehlende Expression der bekannten MDR-Transporter Pgp und Mrp auf. Die Behandlung der MCF-7-Zellen mit MTx führte zu einer reduzierten intrazellulären Akkumulation des Anthracendions, obwohl die bekannten MDR-Transporter vermindert exprimiert werden. In folgenden Experimenten gelang die Isolation einer 2,4-kb großen mRNA-Sequenz, welche in den behandelten MCF-

7/AdrVp-Zellen vermehrt exprimiert wird. Die gesteigerte Expression dieses ABC-Transporters, ABCG2, wird durch die Applikation des Anthracendions MTx und der Anthrazykline Doxorubicin/ Daunorubicin bedingt und führt zum gesteigerten Efflux dieser zell-schädigenden Substanzen vom intra- in den extrazellulär Raum. Die erfolgreiche Isolierung des MDR-Transporters ABCG2 in MCF-7/AdrVp-Zellen, erklärt seinen alternativen Namen BRCP (Doyle et al. 1998; Heydrich 2003).

1.4.1.1 Aufbau und Lokalisation

Das humane Gen liegt auf Chromosom 4q22 und kodiert für ein 655 Aminosäuren langes und 72,1 kDa schweres Transmembranprotein. Als Halbtransporter hat der ABCG2-Transporter 6 Transmembran-Domänen (TMD's) am C-terminalen Ende und eine Nukleotid-Bindungs-Domäne (NBD) mit einer einzigen N-terminalen ATP-Kassette (Bailey-Dell et al. 2001; Kage et al. 2002). Es wird davon ausgegangen, dass sich die ABCG2-Transporter für den aktiven Transport von Substraten zu Homodimeren formieren. Als zelluläre Lokalisation des Transporters konnte die apikale Membran von Zellen identifiziert werden (Xia et al. 2005).

1.4.1.2 Expressionsmuster und Funktion

Betrachtet man die Lokalisation des ABCG2-Transporters unter Zuhilfenahme der Expression von *ABCG2*-mRNA, so sind die höchsten basalen Konzentrationen von mRNA in Geweben von Plazenta, Leber und Dünndarm nachzuweisen (Doyle und Ross 2003). Die Beobachtungen in der Plazenta weisen darauf hin, dass der ABCG2-Transporter den Fetus vor toxischen Metaboliten der Mutter schützen soll (Mao 2008). Die Lokalisation des ABCG2-Transporters an der kanalikulären Membran von Hepatozyten deutet auf eine Beteiligung an der Exkretion sulfatierter Abbauprodukte von Steroiden und Fremdstoffen hin (Vlaming et al. 2009). Eine Beteiligung an der Exkretion von konjugierten Gallensäuren in den Gastro-Intestinal-Trakt wird ebenfalls angenommen (Suzuki et al. 2003; Schinkel und Jonker 2003). Im Darm befinden sich ABCG2-Transporter in der apikalen Membran von Enterozyten. Hier liegt die Vermutung nahe, dass die Transporter eine Rolle bei der quantitativen

Absorption von aufgenommenen Stoffen spielen. Der Transporter limitiert durch begrenzte intestinale Absorption des chemotherapeutisch wirksamen Alkaloids Topotecan dessen orale Bioverfügbarkeit und schützt beispielsweise den Organismus vor dem phototoxischen Agens Pheophorbide a, welches ein Abbauprodukt des natürlichen Farbstoffes Chlorophyll darstellt (Jonker et al. 2002). Der ABCG2-Transporter konnte ebenfalls im gesunden Gewebe von Herz, Kolon, Mamma, Hoden, Nieren, Nebennieren, Schweißdrüsen und in Gefäßen beschrieben werden (Maliepaard et al. 2001; Litman et al. 2001; Mao und Unadkat 2005, Polgar et al. 2008).

Die Aufgaben des ABCG2-Transporters beinhalten dementsprechend zwei wichtige Komponenten: Zum einen die Regulation der zellulären Aufnahme zell-schädigender Noxen und zum anderen die Verhinderung der intrazellulären Akkumulation von Stoffen, wie dem Anthracendion MTx und den Anthrazyklinen Doxorubicin/ Daunorubicin, durch aktiven Efflux.

1.4.1.3 Regulation der Expression

Die Regulation der ABCG2-Transporter wird zum einen in Zusammenhang mit Hormonen gebracht, so wird beispielsweise dem Östrogen als Induktor Bedeutung beigemessen (Krishnamurthy und Schuetz 2006). Zum anderen stellt Sauerstoffmangel (Hypoxie) einen alternativen Weg zur vermehrten Expression des ABCG2-Transporters dar. Ein zentraler Mediator der gesteigerten Expression ist der Transkriptionskomplex HIF-1 („Hypoxia-inducible factor“), der unter hypoxämischen Bedingungen eine vermehrte Transkription des ABCG2-Transporters bewirkt (Krishnamurthy et al. 2004; Wang GL et al. 1995). Beschriebene Umstände erklären eine grundlegende Expression des Transporters in endothelialen Zellen der Venolen und Kapillaren und eine gegebenenfalls sporadische Expression in endothelialen Zellen der Arteriolen. Die Expression von ABCG2 an der luminalen Membran der endothelialen Zellen des ZNS deutet auf ihre bedeutende Funktion an der Blut-Hirnschranke hin (Cisternino et al. 2004).

1.4.1.4 Substrate

Der ABCG2-Transporter ist in der Lage, ein breites Spektrum von Substraten zu transportieren. Dabei gibt es einige Substrate, deren Transport ebenfalls von den Transportern der Gruppe der Pgp's und der Mrp's durchgeführt wird. Der ABCG2-Transporter zeigt eine starke Affinität gegenüber MTx, so dass die gesteigerte Expression des Transporters mit einer Resistenz gegen MTx einhergeht. Als Verbindungen gelten neben industriell synthetisierten Medikamenten und Metaboliten auch endogen vorkommende Stoffgruppen wie die Porphyrine (und verwandte Metabolite) und die Pheophorbide. In Tab.1 sind die Substanzgruppen aufgeführt mit einigen typischen Vertretern.

Substanzgruppe	Verbindung(en)
Topoisomerase-I-Inhibitoren	9- Aminocamptothecin Irinotecan
Topoisomerase-II-Inhibitoren	Mitoxantron Etoposid
Anthrazykline	Doxorubicin Daunorubicin
Anthracendione	Bisantren
Antimetaboliten	Methotrexat Lamivudine
Tyrosinkinase-Inhibitoren	Imatinib
Flavonoide	Flavopiridol
Natürliche Substanzen	Porphyrine Pheophorbide
Fluoreszenzfarbstoffe	Lysotracker Rhodamine

Tab.1: Substrate des ABCG2-Transporter (Krishnamurthy und Schuetz 2006)

Neben den Induktoren des ABCG2-Transporters gibt es mittlerweile eine Vielzahl von Inhibitoren des Transporters, die in der Lage sind, die Aktivität des Transporters zu hemmen. Tab. 2 zeigt eine Auswahl dieser.

Substanzgruppe	Verbindung(en)
Antikörper	Anti- ABCG2 monoklonaler Antikörper (5 D3)
Tyrosinkinaseinhibitoren	CI 1033 (Canertinib) Imatininib
Indoldiketopiperazin	Fumitremorgin C (FTC)
HIV-Protease-Inhibitoren	
Ribozyme	Hammerhead- Ribozym
Protonenpumpen- Inhibitoren	Pantoprazol
Alpha-Blocker	Prazosin
Indolalkaloid	Reserpin

Tab.2: Inhibitoren des ABCG2-Transporters (Krishnamurthy und Schuetz 2006)

1.4.1.5 **ABCG2-Transporter - Die Bedeutung von single-nucleotide polymorphisms (SNPs)**

Wie bereits beschrieben stellt der ABCG2-Transporter eine wichtige Komponente in der Resistenzentwicklung von Zellen, unter der Behandlung mit MTx, dar. So bedeutet die MTx-Behandlung eines Patienten, neben einer vermehrten Expression des ABCG2-Transporters, ebenfalls gesteigerte Expressionsmuster von anderen ABC-MDR-Transportern, bedingt durch deren breite Substratspezifität (Cervenak et al. 2006). Der anschließende Effekt ist ein gesteigerter Efflux des MTx, welcher letztlich eine herabgesetzte Wirkung der Substanz zur Folge hat.

Trotzdem können interindividuelle Unterschiede in Bezug auf die Wirkung zytotoxischer Substanzen beschrieben werden. Die Wirkung der gleichen Konzentration eines zellschädigend wirksamen Medikaments kann interindividuell sehr variabel erscheinen.

An dieser Stelle sei erneut auf die Resistenz-Entwicklung von Zellen verwiesen. Wollen diese ein zytotoxisches Agens aus dem intra- in den extrazellulären Raum transportieren, kann dies durch eine gesteigerte Expression von MDR-Transportern erfolgen. Unterschiedliche Expressionsmuster der MDR-Transporter bedeuten dementsprechend, dass sowohl die Expositionsdauer als auch die Konzentrationen des zytotoxischen Agens im Intrazellulärraum variieren kann.

In den letzten Jahren gelang diesbezüglich die Beschreibung von Single-Nucleotide-Polymorphisms (SNPs), welche unterschiedliche Expressions- und Funktionsmuster von bestimmten MDR-Transportern bedingen (Hoffmeyer et al. 2000).

Eine funktional wichtige Rolle spielen dabei einzelne (SNPs) in dem Polypeptid, welches das Gen für den *ABCG2*-Transporter darstellt. In diesem Gen sind mittlerweile mehrere SNPs bekannt. Dabei handelt es sich um Variationen einzelner Basenpaare im DNA-Strang des für das Protein kodierenden DNA-Abschnittes. Diese können homozygot oder heterozygot vorkommen. Die erforschten SNPs führen sowohl zu stillen Mutationen ohne Bedeutung für die Funktionstüchtigkeit des entstehenden Gens, als auch zu missense- beziehungsweise nonsense-Mutationen, welche Funktionsbeeinträchtigungen des Transporters zur Folge haben. Zwei wichtige missense-Mutationen sind die V12M (c.34G>A) und die Q141K (c.421C>A). Beide Mutationen können in verschiedenen ethnischen Gruppierungen in unterschiedlichen Frequenzen und Ausprägungen beobachtet werden und führen zu einer verminderten Resistenz der Zellen gegenüber dem MTx (Honjo et al. 2002; Backstrom et al. 2003; Mizuarai et al. 2004). Generell kann wie bereits angedeutet unter der MTx-Behandlung eine gesteigerte mRNA-Expression beobachtet werden. Cotte et al. beschreiben 2009 diesbezüglich einen gesteigerten Efflux von MTx aus untersuchten Zellen, welche keine Mutationen im *ABCG2*-Gen aufweisen. Auf der anderen Seite kann ein verminderter Efflux in Zellen beschrieben werden, welche hetero-/ homozygot variante Allele (V12M, Q141K) für dieses Gen aufweisen. Der verminderte Efflux führt weiterhin zu einer gesteigerten Akkumulation von MTx im Intrazellulärraum und dementsprechend zu einem vermehrten Zelltod (Cotte et al. 2009).

1.4.1.6 *Abcg2* ^{-/-} Mäuse

Das Gen, welches für den *ABCG2*-Transporter kodiert, besteht sowohl im humanen als auch im murinen Organismus aus 16 Exons. Des Weiteren bestehen keine großen Unterschiede bezüglich Aufbau und Lokalisation des *ABCG2*-Transporters zwischen beiden Organismen.

Die Generierung der *Abcg2* ^{-/-} Maus erfolgte mittels Inaktivierung des Gens in embryonalen Stammzellen (ES) aus einer 129/Ola-Mauslinie und der Injektion von ES-Klonen in Blastozysten von C57BL/6J-Mäusen. Durch weitere Kreuzungen der

entstehenden Chimären mit C57BL/6J-Mäusen können homozygote knock-out-Mäuse generiert werden (Jonker et al. 2002)

In folgenden Experimenten werden Abcg2 ^{-/-} Mäuse verwendet, die mindestens über 8 Generationen zur C57BL/6J-Maus zurück gekreuzt wurden.

1.5 Zielstellung

Für die humanen MDR-Transporter konnten in den letzten Jahren allelische Variationen in Form von SNP'S beschrieben werden. Diese führen zu unterschiedlichen Expressionsmustern und determinieren infolgedessen die Funktion des jeweiligen Transporters. Erfolgt die Behandlung von Zellen mit einem zytotoxisch wirksamen Medikament, welches wiederum ein Substrat für den jeweils funktionell beeinträchtigten MDR-Transporter darstellt, so ist es den Zellen im Umkehrschluss unmöglich, eine adäquate Resistenzentwicklung zu realisieren.

Bezug nehmend auf die Funktionsfähigkeit einzelner MDR-Transporter wird den beiden missense-Mutationen V12M und Q141K Bedeutung beigemessen, möchte man sich mit der Effektivität des ABCG2-Transporters auseinandersetzen. In Folge einer MTx-Behandlung bedingen die Mutationen zum einen die gesteigerte Wirkung des applizierten Anthracendions, zum anderen sorgen sie für eine erhöhte Toxizität in den exponierten Zellverbänden.

Aus diesem Grund soll in dieser Dissertation die Evaluation der in-vivo-Applikation von MTx in kompletten Abcg2-knock-out-Mäusen stattfinden. Dabei soll untersucht werden, ob sich die differierende Effektivität einer MTx-Behandlung als Konsequenz von SNPs im Gen für den humanen ABCG2-Transporter ebenso im murinen knock-out-Modell nachweisen lässt. Die MTx-Behandlung erfolgt deshalb vergleichend in Abcg2 ^{-/-} Mäusen und C57BL/6J-WT-Mäusen.

Einleitend findet diesbezüglich die alleinige Verwendung von MTx in der C57BL/6J-EAE-WT-Maus statt. Es gilt neben einem Therapieschema eine MTx-Konzentration experimentell zu bestimmen, welche zum einen die positive Beeinflussung des EAE-Krankheitsverlaufes in der C57BL/6J-Maus bewirkt, zum anderen die zeitgleiche

Anwendung des MTx zwischen C57BL/6J-EAE- und Abcg2 ^{-/-} EAE-Mäusen ermöglicht.

Die Evaluation der Effektivität einer MTx-Therapie in der EAE erfolgt daraufhin durch vergleichende Experimente zwischen erkrankten Abcg2 ^{-/-} Mäusen und C57BL/6J-WT-Mäusen. Abschließend findet neben der klinischen Untersuchung einer MTx-Behandlung die Evaluation der Histologien von Tieren der beschriebenen Gruppen statt, dabei geht es um die Eruierung mikroskopischer und zellulärer Veränderungen, die eventuell Rückschlüsse bezüglich der Effektivität einer MTx-Therapie in der EAE erlauben.

2 Materialien und Methoden

Im folgenden Kapitel sind zum einen jene Geräte, Verbrauchsmaterialien, Labormaterialien und Tiere aufgelistet, welche für die Experimente verwendet werden. Des weiteren werden in diesem Kapitel die bei den Experimenten angewandten Methoden näher erläutert.

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Entwässerungsgerät TP 1020	Leica, Nussloch, Deutschland
Heizblock Bio TDB-100	Biosan, Warren MI, USA
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Industries, Deutschland
Mikroskop Axioskop 40	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikrotom SM 2000R	Leica, Nussloch, Deutschland
OP- Besteck	
Paraffinausgießstation EG 1160	Leica, Nussloch, Deutschland
pH – Meter Inolab pH level1	Thomas Scientific, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Real-Time PCR 7500	Applied Biosystems, USA
Spektrometer Nano Drop – 1000	peQlab Biotechnology, Deutschland
Sterilbank	
Vortex Genie-2	Scientific Industries, USA
Wasserbad Medax	Nagel, Kiel, Deutschland
Wasseraufbereiter Arium 611	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifugen Multifuge 1 S-R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mini Spin plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Falcon (15ml/ 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Gewebeschaum	Labonord, Frankreich
Pap Pen (ab2601)	Abcam, UK
Pipettenspitzen (10µl/ 200µl/ 1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Micro Tube (1,5ml/ 2ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
RNeasy Mini- Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Spritzen Omnifix (F 1ml/ 5ml)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Kanülen Sterican Braun 0,45 mm × 12 mm	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Grau 0,40 mm × 20 mm	
Gelb 0,9 mm × 40mm	
Zytostatika- Schutzhandschuhe	Berner, Elmshorn, Deutschland
PCR-Plates ABgene, Thermo-Fast 96 Detection Plate	Thermo Fisher Scientific, USA

2.1.3 Labormaterialien

2.1.3.1 Chemikalien

70% Ethanol	Hausapotheke Universitätsmedizin Göttingen, Deutschland
96% Ethanol	Gesellschaft für Reststoff- und Sonderabfall-Verwertung, Deutschland
99% Ethanol	Gesellschaft für Reststoff- und Sonderabfall-Verwertung, Deutschland
Diamino- Benzidin (DAB)-Puffertablette	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Entellan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Inkomplettes Freund-Adjuvans	DIFCO Laboratories, Detroit MI, USA
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ketamin Inresa, 50mg/ ml	Inresa Arzneimittel GmbH, Deutschland
Kohlendioxid (CO ₂)	
Komplettes Freund-Adjuvans (CFA)	DIFCO Laboratories, Detroit MI, USA
+ Mycobacterium tuberculosis	
Methanol	Hausapotheke Universitätsmedizin Göttingen, Deutschland

MOG ₃₅₋₅₅ , Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein	Berliner Charitè, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Hausapotheke Universitätsmedizin Göttingen, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Hausapotheke Universitätsmedizin Göttingen, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pertussis- Toxin 100mg/ ml Stock	List Biological Laboratories, Campbell, USA
Rompun, Xylazin 2%	CEVA Tiergesundheit GmbH, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	

2.1.3.2 Enzyme

5x First Strand Buffer für reverse Transkription	Invitrogen, USA
dNTP- Mix für reverse Transkription	Invitrogen, USA
Oligo- dT- Primer für reverse Transkription	Thermo Fisher Scientific, USA
Reverse Transkriptase, Superscript™ II	Invitrogen, USA
ROX Referenz-Farbstoff	Invitrogen, USA
2x Supermix für Real-Time PCR, Platinum® qPCR SuperMix UDG 2	Invitrogen, USA

2.1.3.3 Antikörper

Primär-Antikörper für immunhistochemische Färbung:

Ah-CD-3-mAb, # MCA1477	Serotec, Düsseldorf, Deutschland
MAC-3-mAb, # 550292	BD Pharmingen, NJ, USA
B220-mAb, # 553091	BD Pharmingen, NJ, USA

Sekundär- Antikörper für immunhistochemische Färbung

Biotin-konjugierter anti-Rat IgG-mAb, BA-4001	Vector, CA, USA
---	-----------------

2.1.3.4 Lösungen und Puffer

0,1% Lithium-Carbonat (Li ₂ CO ₃)
0,1% Luxol Fast Blue Lösung

0,8% Perjodsäure

1% BSA/ PBS

10% BSA/ PBS

AB- Komplex (POD), # K0377, 1ml PBS+ 10µl Lsg. A + 1µl Lsg. B Dako, Dänemark

DAB- Färbelösung: 1 DAB- Puffertablette in 10ml PBS lösen + 75 µl 3% H₂O₂

EDTA- Puffer: 1mM EDTA, pH 8,0

Hämalaun-Lösung Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Narkotikum (Maus): 2ml Ketamin + 500µl Rompun + 10ml NaCl

Schiff-Reagenz

Sulfit-Wäsche: 0,5 ml konz. HCl + 2 ml 10% K₂S₂O₅

2.1.4 Tiere

Die Tierexperimente werden mit zwei verschiedenen Mauslinien durchgeführt. Die C57BL/6J-Mäuse werden von Elevage Janvier (Frankreich); Harlan Winkelmann GmbH (Borchen) und aus eigener Tierzucht in der zentralen Tiereinheit des Universitätsklinikums Göttingen bezogen.

Die Abcg2-knock-out-Tiere werden aus eigener Tierzucht aus dem European Neuroscience Institut (Göttingen) bezogen.

Für die EAE-Versuche werden in der Regel ca. zwölf Wochen alte Mäuse, männlichen und weiblichen Geschlechts, verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Tierversuche

2.2.1.1 Induktion der MOG₃₅₋₅₅- EAE in der Maus

Die EAE wird neben der Gabe von MOG₃₅₋₅₅ durch die Applikation von komplettem Freund-Adjuvans (CFA) induziert.

Die Tiere werden mit 10 µl/g Körpergewicht (KG) Narkotikum (siehe 2.1.3.4) intraperitoneal sediert.

Die Immunisierungsemulsion besteht aus einer 1:1 Mischung von MOG₃₅₋₅₅ (1 mg/ml) und CFA (1 mg/ml). Appliziert werden pro Tier 100µl der Paste, jeweils 50µl subkutan rechts und links des Schwanzes. Zusätzlich erfolgt eine intraperitoneale Gabe von 200ng Pertussis-Toxin pro Tier gelöst in einem Injektionsvolumen von 200µl an Tag 0 und an Tag 2.

2.2.1.2 Klinische Beurteilung der EAE

Die körperliche Verfassung sowohl als auch das Gewicht der Mäuse werden ab Tag 9 nach der Immunisierung täglich erfasst. Der dabei vergebene klinische Score wird nach folgendem Schema ermittelt:

Score	Klinik
0	normal
1	reduzierter Schwanztonus
2	schlaffe Schwanzlähmung
3	Fehlen reflektorischer Ausgleichbewegungen 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

Aus ethischen Gründen werden die Tiere bei einem Score > 7 aus dem Versuch genommen.

2.2.1.3 Therapieschema

Die Mäuse werden mit dem zur Gruppe der Anthracendione gehörenden MTx behandelt. Dazu werden verschiedene Therapieschemata angewandt.

Die Konzentration des zytostatischen MTx variiert dabei zwischen 0,05-, 0,2-, 0,5-, 1- und 2,5 mg/kg KG. Die eingesetzte Menge MTx aus der Stocklösung (2 mg/ml) wird mittels NaCl (0,9%) auf die jeweilige Konzentration in ein Injektionsvolumen von 100µl/ Tier überführt.

Das anfängliche Injektionsschema ist abhängig vom Krankheitsgrad der Mäuse und beginnt mit Tag X, an dem die Tiere einen durchschnittlich gleichen Score aufweisen:

1. Injektion	Tag X
2. Injektion	Tag X + 2
3. Injektion	Tag X + 4

Bei darauf folgenden Experimenten wird das Injektionsschema geändert. Dabei wird der Zeitpunkt der ersten Injektion präventiv gewählt, dass heißt vor der visuellen Erfassung eines Scores. Der Zeitpunkt wird festgesetzt auf den 12. Tag post Immunisierung. Das neue Injektionsschema lautet wie folgt:

1. Injektion	Tag 12
2. Injektion	Tag 13
3. Injektion	Tag 14
4. Injektion	Tag 16

2.2.1.4 Injektionen

Die Injektionen erfolgen in die Schwanzvenen der Tiere. Die Tiere werden für die Injektionen in einen eigens präparierten 50ml Falcon geführt und der Schwanz durch eine Öffnung des Falcon-Deckels nach außen bewegt, um den Injektionsvorgang in

Ruhe durchführen zu können. Die Tiere sollen mittels dieser Methode auf einem adäquaten Stresslevel gehalten werden.

2.2.2 Gewebeaufbereitung

2.2.2.1 Gewebeentnahme

Für weitere Versuche werden den Mäusen die Medullae spinalis entnommen. Die Tiere werden zuvor mit CO₂ artgerecht getötet.

Den weiteren Verbleib der Maus bestimmt der angestrebte Versuch:

1.) *real-time-PCR-Auswertung*

Die Medulla spinalis wird von zervikal bis sakral freipräpariert und im Ganzen entnommen. Die Gewebeproben werden für kurze Zeit in PBS gewaschen und anschließend in einen zervikalen, thorakalen und einen lumbalen Teil getrennt. Die Gewebstücke werden auf Eppendorf Gefäße verteilt und gewogen. Auf 30 mg Medulla spinalis werden 600 µl RLT-Puffer gegeben. Die RM-Stücke werden anschließend mittels einer gelben Sterican-Kanüle homogenisiert. Bis zur weiteren Verarbeitung werden die Eppendorf Gefäße im -80 Grad Celsius kalten Kühlschrank gelagert.

2.) *histologische Färbungen*

Infusionsbesteck mit einer NaCl-Lösung (0,9%) und einer Paraformaldehyd-Lösung (PFA) bestücken.

Die tote Maus wird auf einem Klemmbrett fixiert und anschließend der Thorax mit einer Schere eröffnet. Über den linken Ventrikel des Herzens wird das Tier für zehn Minuten mit NaCl perfundiert und direkt im Anschluss für weitere zehn Minuten mit PFA fixiert; die Medulla spinalis wird von zervikal bis sakral freipräpariert und zum Nachfixieren im 15ml Falcon mit PFA inkubiert. Nach zwei Stunden die RM in 15ml Falcons mit PBS überführen.

2.2.2.2 Einbetten von Rückenmarksstücken

Für histologische Färbungen werden die RM in zervikale, thorakale und lumbale Stücke unterteilt, jeweilige Teilstücke in zwei bis drei mm große Abschnitte getrennt. Über Nacht werden diese in der Entwässerungsmaschine (TP 1020, Leica, Nussloch) inkubiert; am darauf folgenden Tag aufrechtstehend in Paraffin eingebettet. (Paraffinausgießstation EG 1160, Leica, Nussloch)

2.2.2.3 Paraffinschnitte

Die Paraffinblöcke werden im Mikrotom (SM 2000R, Leica, Nussloch) zu 3,5 µm dicken Schnitten verarbeitet. Schnitte ins Wasserbad (Medax, Nagel, Kiel) überführen und auf Objektträgern für eine Nacht bei 50 Grad Celsius im Trockenschrank (Heraeus, Hanau) lagern.

2.2.3 Histologie

2.2.3.1 histochemische Färbung Luxol Fast Blue + PAS (LFB)

Anders als bei histologischen Färbung entwickelt sich in der Histochemie erst durch die Reaktion mit einem Gewebeinhaltsstoff eine farbige Substanz. Die LFB-Färbung lässt die Markscheiden tiefblau und die Kerne der Neurone blauviolett erscheinen.

Durch die Interaktion der Perjodsäure-Schiff-Reagenz (PAS) mit Aldehyden wird zusätzlich eine rosa-violette Färbung dargestellt. Diese Methode erlaubt Rückschlüsse auf den Schweregrad der Demyelinisierung von Axonen im RM.

Paraffin-Schnitte in einer absteigenden Ethanol-Reihe rehydrieren. Dafür werden die Schnitte zwei Mal für zehn Minuten in Xylol und je zwei Mal für drei Minuten in 99%igem und 96%igem Ethanol inkubiert. Des Weiteren die Schnitte kurz in dH₂O waschen und über Nacht bei 56 Grad Celsius im Trockenschrank in 0,1% LFB-

Lösung inkubieren lassen. Die Schnitte werden am folgenden Tag nacheinander in 96%igem Ethanol und dH₂O gespült, bevor sie in 0,1% Li₂CO₃ ungefähr fünf Minuten differenziert werden. Ziel ist ein komplett entfärbter Hintergrund und türkis-blaue Myelinscheiden. Anschließend werden die Schnitte in 70%igem Ethanol gespült und in dH₂O gesammelt. Nachdem die Schnitte für zehn Minuten in 0,8% Perjodsäure inkubiert haben werden sie erneut in dH₂O gespült. Einer 20-minütigen Inkubation in Schiff-Reagenz folgt eine drei Mal zweiminütige Sulfite-Wäsche und ein abschließendes zehnmütiges Spülen der Schnitte in Leitungswasser. Die gefärbten Schnitte werden in einer aufsteigenden Alkoholreihe bestehend aus zwei Mal drei Minuten in 70% Ethanol, 96% Ethanol, 99% Ethanol und zehn Minuten in Xylol dehydriert, bevor sie mit Entellan eingedeckt und für zwölf Stunden bei Raumtemperatur getrocknet werden.

2.2.3.1.1 Auswertung der LFB-Färbung

Die gefärbten RM-Schnitte werden anhand eines Olympus-Mikroskops und der Software „ImageProcessing“ ausgewertet. Alle Schnitte eines Tieres werden begutachtet und jene sechs Schnitte, welche die größten Entmarkungsherde in Form von rötlichen Flächen zeigen, ausgewertet. Die rötlichen Entmarkungsherde heben sich deutlich von den ansonsten blau erscheinenden Axonen der Substantia alba ab. Jene Entmarkungsherde werden mit Hilfe der Computersoftware markiert. Der Grad der Demyelinisierung des Rückenmarkes eines Tieres errechnet sich wie folgt:

- 1) Fläche des gesamten RM-Ausschnittes
 - Fläche der Substantia grisea des RM-Ausschnittes

 - = Fläche der Substantia alba

- 2) Fläche der addierten Entmarkungsherde des RM-Ausschnittes
 - : Fläche der Substantia alba

 - = ***Demyelinisierung des RM in Prozent (%)***

2.2.3.2 immunhistochemische Färbungen

Hierbei beruht die Färbung der jeweiligen Zellstruktur auf einer Antigen-Antikörper Interaktion.

2.2.3.2.1 mCD-3/ B220-Färbung

Die Paraffin-Schnitte werden in der Alkoholreihe rehydriert. Sie inkubieren für je zehn Minuten zwei Mal in Xylol, danach für je drei Minuten zwei Mal in 99%igem, 96%igem und 70%igem Alkohol. Nachdem die Schnitte in dH₂O gewaschen worden sind, kochen sie für 30 min in 1mM EDTA-Puffer und kühlen anschließend im Puffer für 15 min auf Handwärme ab. Die Schnitte werden vier Mal in dH₂O und ebenfalls vier Mal in PBS gewaschen. Mit 10%igem BSA werden die Schnitte für 30 min bei Raumtemperatur geblockt.

Anschließend wird der primäre Antikörper (ahCD-3/ B220), welcher 1:200 in 1%igem BSA/PBS gelöst ist, auf die Schnitte gegeben und diese über Nacht bei vier Grad Celsius inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen mit PBS folgt der POD-Block für 13 min, wonach die Schnitte erneut mit PBS gewaschen werden. Der sekundäre Antikörper, welcher ebenfalls 1:200 in 1%igem BSA/PBS gelöst ist, verweilt für 45 min bei Raumtemperatur auf den Schnitten. Die Schnitte werden danach drei Mal in PBS gewaschen. Der 1:100 in PBS gelöste AB-Komplex wird für 35 min bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben. Nach der letzten dreimaligen PBS-Wäsche wird die DAB-Lösung für 10 bis 13 min bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben. Im Anschluss werden die Schnitte in dH₂O gespült und folgend mit Hämalaun gegengefärbt, um einzelne Strukturen besser unterscheiden zu können. Die Paraffin-Schnitte werden in der wie oben beschriebenen Alkoholreihe und Xylol dehydriert und mit Entellan eingedeckt.

2.2.3.2.2 MAC3-Färbung

Die Schnitte werden wie in der mCD-3-Färbung (2.2.3.2.1) beschrieben rehydriert. Sie kochen 30 min in Citratpuffer und kühlen in diesem auf Handwärme ab. Dem viermaligen dH₂O- und viermaligen PBS-Spülen folgt das 30-minütige blocken mit 10% BSA/PBS. Der primäre Antikörper (MAC3) gelöst in 1%igem BSA/PBS wird anschließend auf die Schnitte gegeben und inkubiert bei vier Grad Celsius über Nacht. Der POD-Block für 13 min folgt dem anschließenden dreimaligen Waschen mit PBS. Die Schnitte werden danach vier Mal in PBS gewaschen bevor der sekundäre Antikörper (anti-rat IgG Biotin), gelöst 1:200 in 1% BSA/PBS, für 45 min auf diese gegeben wird. Erneutes dreimaliges Waschen der Schnitte mit PBS geht der 10 bis 13-minütigen DAB-Reaktion voraus in deren Anschluss die Schnitte in dH₂O gewaschen, mit Hämalaun gegengefärbt, in der Alkoholreihe und Xylol dehydriert und mit Entellan eingedeckt werden.

Bei beiden Färbungen werden zwei differierende Methoden des Färbens verwendet. Bei der einen Methode wird die jeweilige Lösung auf einen Objektträger gegeben und ein weiterer auf diesen gelegt (Doppeldeckermethode). Die andere Methode funktioniert durch einen Pap-Pen mit dem die Schnitte auf dem Objektträger eingekreist werden um die jeweilige Lösung gezielt applizieren zu können. Die zweite Methode zeigt sich nach mehrmaligem Färben als die Konstantere.

2.2.3.2.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die Schnitte werden geblindet ausgewertet. Die T-Zellen bzw. die Makrophagen der RM-Schnitte werden mit einem Zählfenster unter einem Olympus-Mikroskop ausgezählt. Danach werden die Zellen von sechs Schnitten addiert und deren Mittelwert gebildet. Das Produkt von Mittelwert mal 10,4 gibt Auskunft über die zelluläre Dichte der Infiltration pro mm².

2.2.4 Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

2.2.4.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgt mittels des RNeasy Mini Kits 250 der Firma Qiagen. 350 µl des unter 2.2.2.1, S.36 verarbeiteten Zell-Lysats werden zusammen mit 350 µl 70%-Ethanol auf eine Säule des Kits gegeben. Nach anschließender Zentrifugation bei 10.000g für 30 sek. wird der Durchfluss verworfen und gleiche Prozedur wiederholt bis das jeweilige Zell-Lysat aufgebraucht ist. Die Säule wird auf ein neues 2-ml-Eppendorf-Gefäß gegeben und nach Zugabe von 700 µl RWI Puffer 30 sek. bei 10.000g zentrifugiert. Der Durchfluss wird erneut verworfen. Dieser Vorgang wird zwei Mal mit dem RPE-Puffer wiederholt, die letzte Zentrifugation dauert jedoch zwei min. Die Säule wird anschließend auf ein 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß gegeben. Eine Gabe von 50 µl DEPC auf diese Säule und eine einminütige Zentrifugation bei 10.000 g stellen den letzten Schritt in der Gewinnung von RNA mittels des RNeasy Kits dar.

2.2.4.2 Nano Drop

Die RNA-Konzentration im jeweiligen Cup wird mit Hilfe des Nano Drop 1000 bestimmt. Hierbei handelt es sich um ein Spektralfotometer welches in der Lage ist eine UV/Vis Analyse mit 1µl der Probe durchzuführen.

2.2.4.3 *complementary-DNA (c-DNA)-Synthese*

Ausgehend von den RNA-Proben entstehen mittels Superscript™ II, einer RNA-abhängigen reversen Transkriptase, c-DNA Transkripte. Diese werden als Ausgangsmaterial für die real Time PCR benötigt. Als Bausteine für die c-DNA werden desoxygenierte Thymidine als auch desoxygenierte Nukleotid-Triphosphate eingesetzt.

Einem 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß werden 200 ng RNA der jeweiligen Probe zugeführt. Die dabei einzusetzende Menge wird anhand des Nano-Drops bestimmt. Des Weiteren wird dem Gefäß 1 µl Oligo-desoxygenierte Thymidine und 1 µl desoxygenierte Nukleotid-Triphosphate zugeführt. Dieser Ansatz wird mittels RNase-freien Wassers auf 10 µl ergänzt. Der Ansatz inkubiert für 5 min. bei 65 Grad Celsius und wird nach dieser Zeit sofort auf Eis gelegt. Diesem Ansatz werden folgend 4 µl reverse Transkriptase-Puffer, 3 µl RNase-freies Wasser und 1 µl der reversen Transkriptase (Superscript™ II) hinzugefügt. Nach einer 50 min. Inkubation bei 40 Grad Celsius wird der Ansatz zentrifugiert und abschließend die reverse Transkriptase bei 70 Grad Celsius für 15 min. inaktiviert.

2.2.4.4 RT-qPCR

Die Methode der Polymerase Kettenreaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction) ermöglicht die Vervielfältigung von DNA in vitro. Das Enzym, welches dies durchführt, ist eine DNA-Polymerase. Durch die Vervielfältigung von Produkten aus den jeweiligen Zyklen kommt es zu einem exponentiellen Wachstum des DNA-Gehaltes.

Ist es bei einer herkömmlichen PCR sehr umständlich, während der einzelnen Zyklen Aussagen zum Fortschritt des Vervielfältigungsprozesses zu treffen, ermöglicht die RT- qPCR eine Differenzierung während der einzelnen Zyklen.

Bei den neuen Methoden zur Quantifizierung von Nukleinsäuren baut man auf Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) von markierten Oligonukleotiden. Diese beruhen auf dem Prinzip, dass sich Fluoreszenzfarbstoffe, so genannte Fluorochrome, mithilfe von Licht einer bestimmten Wellenlänge anregen lassen und dies in Form von Licht einer anderen Wellenlänge wieder abgeben.

Befinden sich zwei Fluorochrome, die sich von Licht gleicher Wellenlänge anregen lassen, in unmittelbarer Nähe, so gibt nicht das zuerst angeregte Fluorochrome (F1) die Erregung in Form von Licht ab (L1), es erregt wiederum das zweite Fluorochrom (F2), welches die Erregung in Form von Licht einer bestimmten Wellenlänge abgibt (L2). Durch die unterschiedlichen Wellenlängen des Lichtes ist es nun möglich, während einer PCR Aussagen über den räumlichen Bezug dieser Fluorochrome zu treffen (Cardullo et al. 1988). Wird in diesem Zusammenhang in der PCR nun L1

gemessen, so bezeichnet man F1 als *reporter* und F2 als *quencher*. Liegen F1 und F2 in unmittelbarer Nähe, so dass L2 entsteht, so bezeichnet man F1 als Donor und F2 als Akzeptor.

Aus dem Prinzip des FRET entstanden drei spezifische Nachweismethoden. Das älteste und im Rahmen dieser Dissertation benutzte Prinzip ist das des TaqMan. *Reporter* (F1) und *quencher* (F2) sitzen auf dem gleichen Oligonukleotid am 5' - und 3' - Ende. Die Lichtstärke (L1) ist bei diesem intakten Oligonukleotid gering und erhöht sich erst, wenn der *reporter* (F1) durch die Polymerase freigesetzt wird. Je mehr DNA synthetisiert wird, desto mehr *reporter* (F1) Moleküle werden freigesetzt und dementsprechend steigt auch die Signalstärke (Livak et al. 1995).

Die Quantifizierung der PCR wird anhand der Kinetik der PCR durchgeführt. In der frühen Phasen der PCR findet eine exponentielle Vermehrung der DNA-Fragmente statt. Der C_T - Wert wird daher von der Zykluszahl abhängig gemacht, bei der sich das Fluoreszenzsignal deutlich vom Hintergrund abhebt. Aus diesen Daten lässt sich eine Standardkurve erstellen, mittels dieser können dann anhand eines C_T - Wertes Rückschlüsse auf die Template-Menge gezogen werden.

2.2.5 Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (HPLC-MS)

Die Methode der HPLC-MS ermöglicht die Kombination der Trennung verschiedener Substanzen durch die Flüssigchromatographie (HPLC) mit der Quantifizierung der Substanzen durch die massenspektrometrische Analyse (MS). Bei der HPLC-Methode wird die zu untersuchende Substanz zusammen mit einem Laufmittel, welches die mobile Phase (Eluent) darstellt, auf eine Trennsäule gegeben, die wiederum die stationäre Phase enthält.

Entscheidend für die Interpretation ist die Wechselwirkung der zu untersuchenden Substanz mit der stationären Phase. Kommt es zu starken Wechselwirkungen zwischen der Substanz und der stationären Phase, so ist der Verbleib der Substanz in der Trennsäule länger, als wenn die Substanz nur schwach mit der stationären Phase wechselwirkt. Die dadurch entstehende Retentionszeit kann mittels eines Detektors am Ende der Säule erfasst werden. Im nächsten Schritt kann die Retentionszeit mit den Zeiten von Standards abgeglichen werden um die

Eigenschaften der untersuchten Substanz beschreiben zu können (externe Standardisierung). Bei einer internen Standardisierung wird dem Laufmittel, welches die zu untersuchende Substanz enthält, vor dem Probendurchlauf eine bestimmte Menge eines Standards hinzugefügt.

Die Kopplung der HPLC-Methode mit der Massenspektrometrie ermöglicht mit einer hohen Sensitivität und Spezifität die Quantifizierung und potentielle Identifikation von Analyten durch die zeitgleiche Verwendung von Standards.

2.2.5.1 Probengewinnung

Es werden zwei Gruppen gebildet. In Gruppe 1 werden Mäuse (C57BL/6J- und Abcg2 -/- Tiere) nur mit MTx behandelt; in Gruppe 2 wird in den Tieren eine EAE induziert und diese anschließend mit MTx behandelt. Beide Gruppen 1 und 2 bestehen jeweils aus sechs Tieren (drei C57BL/6J und drei Abcg2 -/-). Die Tiere der Gruppe 1 werden an drei aufeinander folgenden Tagen mit 0,5 mg/kg KG MTx behandelt, am dritten Tag erfolgt die Tötung der Tiere zwei Stunden nach der MTx-Injektion und anschließend die Organaufbereitung (siehe unten). In der zweiten Gruppe erfolgt die Immunisierung zur Induktion einer EAE in den Mäusen wie unter 2.2.1.1, S.36 beschrieben. Anlehnend an die Dosis-Experimente werden die Tiere der Gruppe 2 an den Tagen 12/ 13/ 14 mit 0,5 mg/kg KG MTx behandelt und zwei Stunden nach der MTx-Injektion an Tag 14 getötet, anschließend erfolgt auch hier die Organaufbereitung.

Den Tieren werden jeweils das Herz, die Nieren, die Leber, die Milz und das RM entnommen. Aus jedem Organ wird ein Homogenat mittels Vortex Genie-2 hergestellt, welches aus 50 mg des Organs und 1 ml einer 20%igen Ascorbinsäure-Lösung (gelöst in 0,9% Natrium-Chlorid) besteht. Neben der kühlen Lagerung des Homogenats erfolgt die Zugabe von Vitamin C zur antioxidativen Protektion des präanalytisch instabilen MTx.

Die Homogenate werden als 200- μ l-Aliquots bis zur Analyse bei -70 Grad Celsius eingefroren.

2.2.5.2 Gewebeextraktion

Aus einem 200- μ l-Alliquot von Homogenat werden 160 μ l in ein zweites Eppendorf-Gefäß überführt, 40 μ l Acetonitril und 2 Metallkugeln hinzugefügt. Nachdem das Eppendorf-Gefäß für 1 min. gevortext wurde, werden die 2 Metallkugeln entfernt und das Gefäß für 10 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wird das Gemisch für 15 min. bei 4 Grad Celsius und 17000g zentrifugiert. Vom Überstand werden mindestens 160 μ l in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt (= Extrakt).

2.2.5.3 Versuchsaufbau

In folgender Tabelle soll anhand eines Tieres der Versuchsaufbau zur darauffolgenden HPLC-MS-Messung dargestellt werden.

Cup	MTx in μ g/l (in 0,9% NaCl)	Ascorbinsäure (10%) (μ l)	MTx-Standard 50 μ g/l (μ l)	Acetonitril (μ l)
1	5 - Standard	144	16	40
2	10 - Standard	128	32	40
3	25 - Standard	80	80	40
4	50 - Standard	-	160	40
5	5 - Kontrolle	-	160	40
6	5 - Kontrolle	-	160	40
7	Extrakt - Herz	-	-	-
8	Extrakt - Leber	-	-	-
9	Extrakt - Milz	-	-	-
10	Extrakt - Nieren	-	-	-
11	Extrakt - ZNS	-	-	-

Die Proben werden auf eine Mikrotiterplatte gegeben und im HPLC-MS-Messgerät analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse des Modells

3.1.1 Krankheitsverlauf der EAE in C57BL/6J- und Abcg2 -/- Mäusen

In folgendem Tierversuch wird der Vergleich des EAE-Krankheitsverlaufs zwischen Abcg2 -/- Mäusen und C57BL/6J-Mäusen durchgeführt. Die Interpretation folgender, geplanter Therapieansätze würde durch generell differierende Krankheitsverläufe der beiden Mausmodelle deutlich erschwert werden.

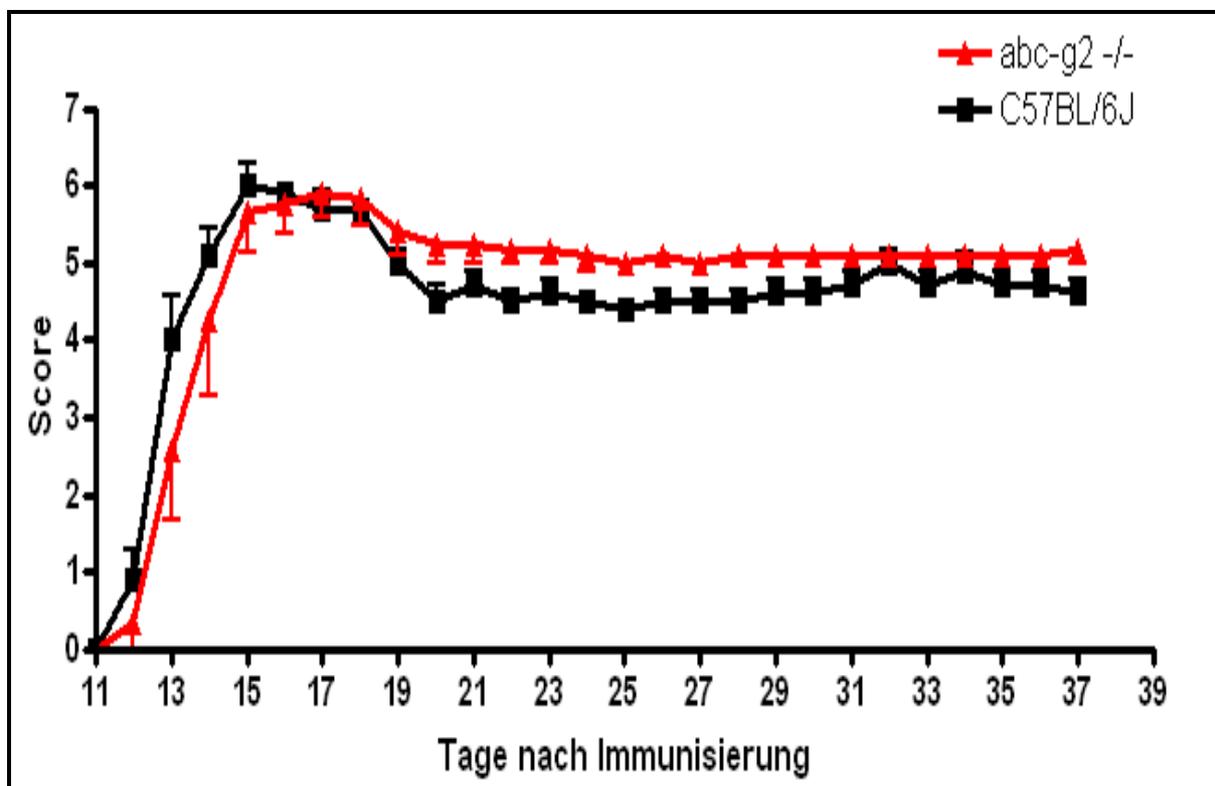


Abb. 1: Krankheitsverlauf der EAE in C57BL/6J- und Abcg2 -/- Mäusen. Mittelwert aus Gruppen à 5 Tieren (C57BL/6J) und 6 Tieren (Abcg2 -/-).

Abb.1 illustriert in beiden Gruppen einen homogenen EAE-Krankheitsverlauf. Die Erstmanifestationen beginnen um den 12. Tag nach der Immunisierung. In den folgenden Tagen kommt es zu einer rapiden Verschlechterung des Gesundheitsstatus der Mäuse. Am „peak of disease“ weisen die Tiere einen durchschnittlichen Score von 5 bis 6 auf. Im weiteren Krankheitsverlauf zeigt sich ein durchschnittlicher Score von 4 bis 6 über einen Zeitraum von 20 Tagen bis zur Beendigung des Experiments. Aufgrund des illustrierten Ergebnisses kann von einem homogenen Krankheitsverlauf der EAE in beiden Mausstämmen ausgegangen werden.

3.1.2 Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

Das folgende RT-qPCR-Experiment (Abb. 2) illustriert unter verschiedenen Voraussetzungen die Expression der Gene für die MDR-Transporter *Abcg2*, *Abcb1a* und *Abcb1b* in C57BL/6J-WT-Mäusen.

Die längerfristige Applikation zytotoxischer Substanzen bewirkt auf zellulärer Ebene eine gesteigerte Expression von MDR-Transportern. Zellen verhindern durch eine vermehrte Synthese dieser Transporter eine Akkumulation zellschädigender Substanzen im Intrazellulärraum. Dementsprechend wird dem beschriebenen Mechanismus bei der Entwicklung von Resistenzen eine wichtige Rolle zugedacht (Schinkel und Jonker 2003; Krishnamurthy und Schuetz 2006). Hierbei ist es die längerfristige Applikation von zytotoxischen Metaboliten, welche zu einer gesteigerten MDR-Transporter-Synthese in exponierten Zellen führt (Sharom 2008). Das dargestellte Experiment zeigt die basale MDR-Transporter-Expression in WT-Tieren und zusätzlich sowohl die Wirkung der EAE auf das Expressionsmuster als auch die Folgen einer einmaligen MTx-Applikation auf die MDR-Transporter.

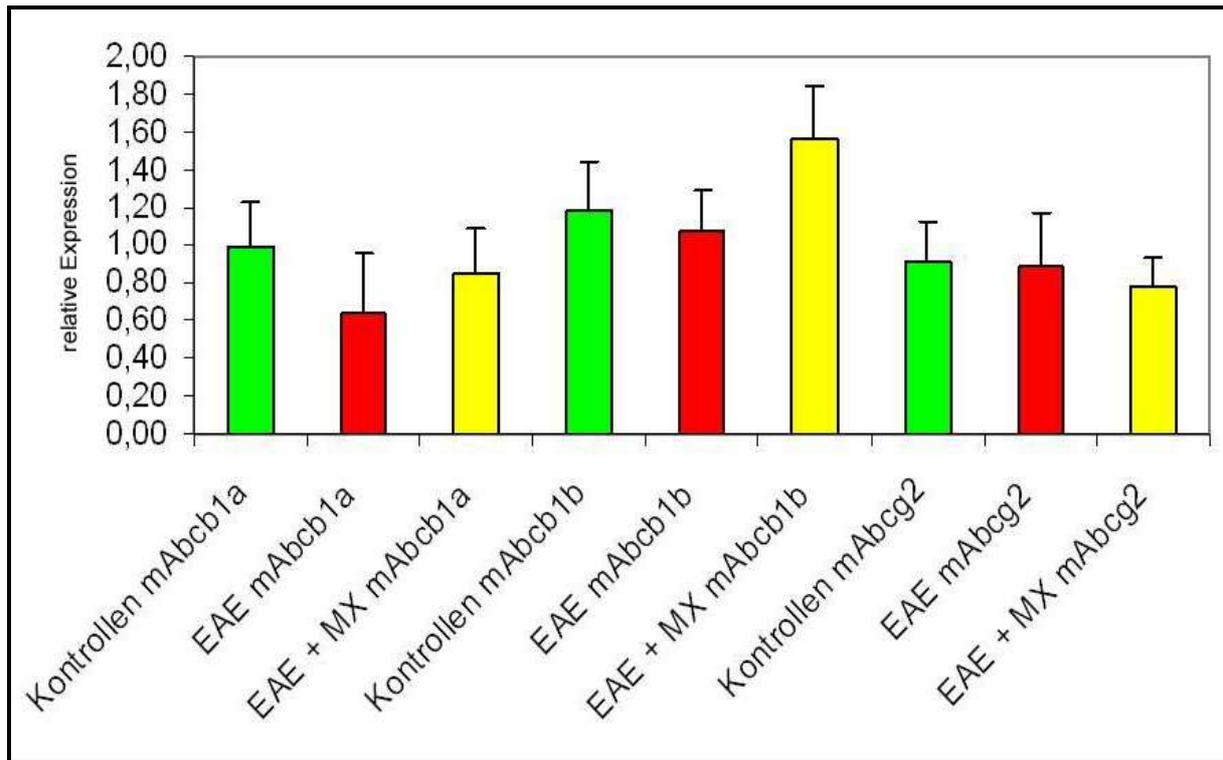


Abb. 2: Expression des *Abcg2*-, *Abcb1a*- und des *Abcb1b*-Genes in C57BL/6J-Tieren. Gruppen unterteilt in Kontrollen (unbehandelte Wildtypen), EAE-Tiere (Wildtypen + EAE-Induktion) und EAE-Tiere + MTx (Wildtypen + EAE-Induktion + MTx-Behandlung). Mittelwerte gebildet aus Gruppen à 5 Tieren (Kontrollgruppe), 6 Tieren (EAE-Gruppe) und 7 Tieren (EAE + MTx-Gruppe)

In Bezug auf die relative Expression der Transporter *Abcg2*, *Abcb1a* und *Abcb1b* in den WT-Kontrolltieren kann weder eine reduzierte, noch eine gesteigerte Synthese der jeweiligen MDR-Transporter in den dargestellten Versuchsgruppen beschrieben werden. Es ist keine signifikante Abweichung des Expressionsmusters in den Tieren zu erkennen, die an einer induzierten EAE erkranken (WT+EAE). Auch die Behandlung der EAE-Tiere mit MTx (WT+EAE+MTx) führt zu keiner signifikanten Abweichung des Expressionsmusters verglichen mit den jeweiligen Kontrollnormen (WT) der drei Gruppen.

In folgenden Experimenten wird deshalb von einem grundlegenden Expressionsmuster der MDR-Transporter in C57BL/6J-WT-Tieren ausgegangen. Weder die kurzzeitige MTx-Applikation noch die Induktion der EAE wirken sich auf die Synthesemuster der Transporter aus. In den *Abcg2* ^{-/-} Mäusen wird eine grundlegend limitierte Expression des *Abcg2*-Transporters vorausgesetzt.

3.2 MTx in C57BL/6J-EAE-Mäusen

In folgenden Experimenten erfolgt die Verwendung von MTx in WT-Mäusen vom Stamm C57BL/6J zur Generierung einer geeigneten MTx-Dosis.

3.2.1 MTx-Dosisfindung in C57BL/6J-EAE-Mäusen

3.2.1.1 Orientierende Dosis-Versuche

In der Literatur sind Angaben über die Verwendung von MTx in EAE-Mäusen zu finden. Anlehnend an diese MTx-Experimente wird ein Therapieansatz zur Behandlung der EAE in der C57BL/6J-Maus konstruiert. Das primäre Ziel stellt zunächst die Bestätigung bzw. die Rekapitulation der Ergebnisse aus der Literatur, in eigenem Therapieansatz, dar.

Zur Anwendung kommen im folgenden Experiment zum einen die Konzentrationen 0,05 mg/kg KG und 0,5 mg/kg KG MTx (Lublin et al. 1987), zum anderen soll die Dosis von 2,5 mg/kg KG MTx (Watson et al. 1991) in der C57BL/6J-EAE-Maus appliziert werden. Sowohl Lublin et al. als auch Watson et al. behandeln die Versuchstiere mit intraperitonealen MTx-Injektionen. Sie applizieren dieses, über einen Zeitraum von 13 (ab dem Zeitpunkt der Immunisierung) bzw. acht Tagen (ab dem 12. Tag nach der Immunisierung), täglich.

Die Grundlage der kommenden Experimente stellt die Entwicklung und Etablierung eines Therapieschemas zur positiven Beeinflussung des EAE-Krankheitsverlaufes in der C57BL/6J-Maus dar. Das anschließende Ziel dieses etablierten Therapieschemas soll die zeitgleiche Verwendung des MTx, zum einen in C57BL/6J-WT- und zum anderen in Abcg2^{-/-} Mäusen, darstellen. Anlehnend an den bevorstehenden Vergleich der Wirksamkeit des MTx in beiden Mausmodellen, wird der MTx-Dosis im Therapieschema-Ansatz besondere Bedeutung beigemessen.

Die generelle Wirkung des MTx auf den EAE-Krankheitsverlauf scheint unumstritten. Der Vergleich der C57BL/6J-Maus mit dem Abcg2^{-/-} Tier ist jedoch nur dann möglich, wenn beide Tiermodelle keiner maximal verträglichen MTx-Dosis ausgesetzt sind. Vielmehr soll jene MTx-Dosis experimentell ermittelt werden, welche sich im unteren Bereich der therapeutischen Wirksamkeit des MTx befindet und

dementsprechend einen Vergleich der C57BL/6J-WT- mit der Abcg2 ^{-/-} Maus ermöglicht.

Die Applikation des MTx erfolgt intravasal in die Schwanzvene der Tiere. Die Frequenz der Injektionen wird initial, ebenfalls in Anlehnung an die Verwendung des MTx bei der MS, mit drei Applikationen begonnen, wobei zwischen den einzelnen Injektionen jeweils ein Tag pausiert wird.

Den drei Dosis-Gruppen 0,05-, 0,5-, 2,5 mg/kg KG MTx wird zu Anfang des Experiments eine Kontrollgruppe zugeordnet, welche im selben Zyklus und mit dem gleichen Volumen an PBS behandelt wird. Die erste Injektion der Tiere erfolgt an Tag 13 nach der Immunisierung. Zu diesem Zeitpunkt zeigen die Tiere Erstmanifestationen der Erkrankung, die sich mit niedrigen Score-Punkten visuell beschreiben lassen. Die Zuordnung der Tiere zur jeweiligen Gruppe erfolgt nach dem Zufallsprinzip an Tag 13, wobei darauf geachtet wird, dass die Gruppen einen durchschnittlich ähnlichen Krankheits-Score aufweisen und keinem einzelnen Tierkäfig zugehörig sind. Demnach ergeben sich die Tage 13/ 15/ 17 nach der Immunisierung als Tage der Injektionen. Die Dosis-Gruppen (0,05-, 0,5- und 2,5 mg/kg KG MTx) bestehen jeweils aus drei Tieren, die PBS-Kontrollgruppe beinhaltet zwei Tiere.

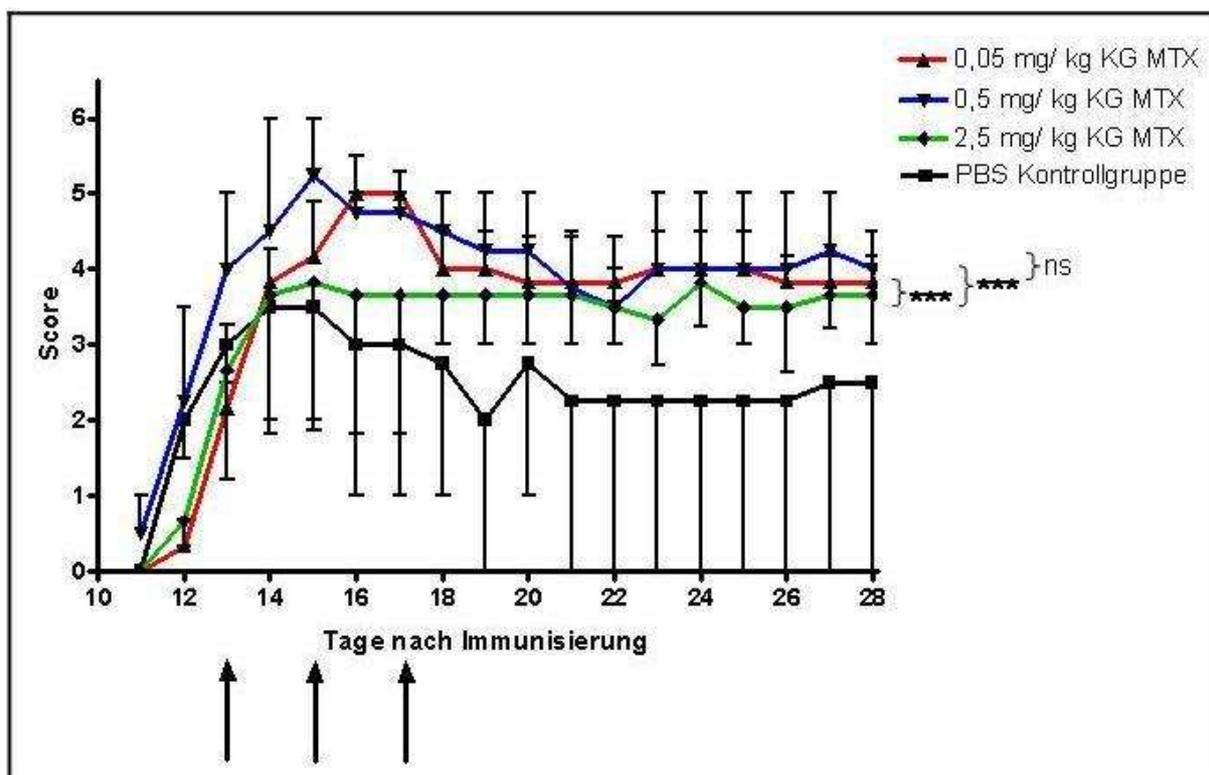


Abb. 3: Krankheitsverlauf der EAE in C57BL/6J-Mäusen mit 0,05- vs. 0,5- vs. 2,5 mg/kg Körpergewicht MTx therapiert vs. PBS-Kontrollgruppe. Pfeile illustrieren die MTx-Injektionen an Tag 13/ 15/ 17 nach der Immunisierung. Mittelwert aus Gruppen à 3 Tieren (0,05-, 0,5- und 2,5 MTx) und à 2 Tieren (PBS). Signifikanzen: *ns*, P nicht signifikant (0,05- vs. 0,5 MTx); ****P* < 0,001 (0,05- vs. 2,5- und 0,5- vs. 2,5 MTx), Mann-Whitney U-Test.

Das erste Dosis-Experiment zeigt Tendenzen zwischen den Gruppen, denen MTx im Laufe des Experimentes injiziert wird. In *Abb. 3* wird eine signifikante Modifikation des Krankheitsverlaufes der 2,5 mg/kg KG MTx-Gruppe gegenüber den beiden Wirkstoffgruppen 0,05- und 0,5 mg/kg KG MTx illustriert. Der Krankheitsverlauf der 0,05- gegenüber der 0,5 mg/kg KG MTx-Gruppe wird durch die MTx-Therapie nicht signifikant modifiziert. Die PBS-Kontrollgruppe besteht aus zwei Tieren und zeigt keinen repräsentativen EAE-Krankheitsverlauf, wie er bereits für die Kontrollgruppen unter 3.1 illustriert wurde. Die Ergebnisse des ersten Dosis-Experiments weisen auf eine Wirksamkeit des MTx hin, betrachtet man den beschriebenen EAE-Krankheitsverlauf unter 3.1.

In den folgenden Experimenten gilt es, die beschriebenen Tendenzen anhand größerer Tierzahlen zu festigen. Des Weiteren bedarf der Applikationszyklus gesonderter Betrachtung und eventueller Umstellung.

3.2.1.2 Modifikation des Therapieschemas

Um die Wirksamkeit des MTx in folgendem Experiment zu verstärken, wird eine kontinuierliche Konzentration des MTx im Blut angestrebt, um eine ausreichende Anreicherung im Gewebe zu gewährleisten.

Dafür wird der Applikationszyklus auf drei aufeinanderfolgende Tage (Tag X, X+1, X+2) festgelegt und anschließend an Tag X+4 eine Erhaltungsdosis injiziert. Die Dosen umfassen 0,5 mg/kg KG MTx und 2,5 mg/kg KG MTx, wobei die zuvor verwandte Minimaldosis von 0,05 mg/kg KG MTx für die weiteren Experimente vernachlässigt wird. Sie zeigt in einem nicht illustrierten unrepräsentativen Versuch keine eindeutige Wirkung. Der Tag der ersten Injektion wird auf Tag 15 nach der Immunisierung festgelegt. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich die EAE im fort-

geschrittenen Anfangsstadium, die Zuteilung der Tiere in Gruppen soll dadurch erleichtert werden. Behandelt werden in diesem Stadium der EAE Tiere, die bereits einen durchschnittlichen Krankheits-Score von drei aufweisen. Dafür werden die Mäuse möglichst zu Gruppen zusammengelegt, die bezogen auf Durchschnitts-Score und individuelle Krankheitsprogression alle die gleichen Attribute aufweisen. Die Gruppen bestehen aus jeweils sechs Tieren.

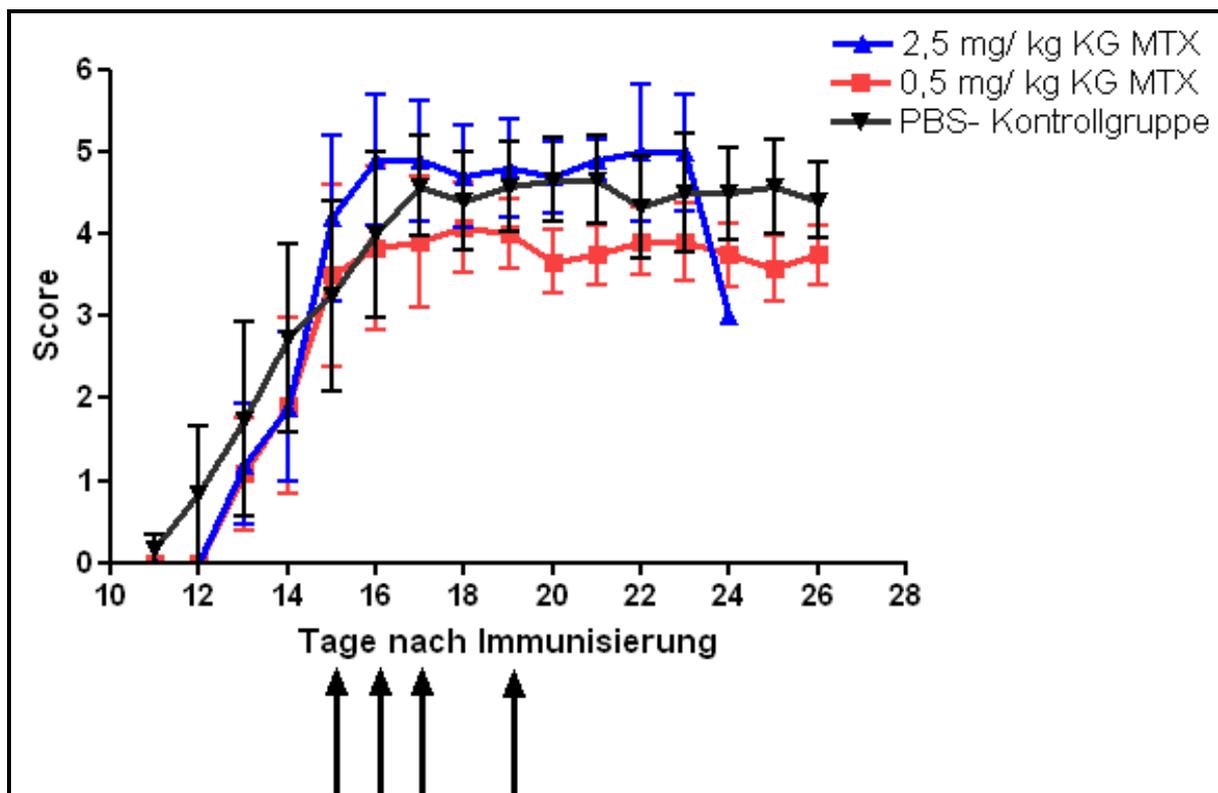


Abb. 4: Krankheitsverlauf der EAE in C57BL/6J-Mäusen mit 0,5- vs. 2,5 mg/kg KG MTx therapiert vs. PBS-Kontrollgruppe. Pfeile illustrieren die MTx-Injektionen an Tag 15/ 16/ 17 + 19 nach der Immunisierung. Mittelwert aus Gruppen à 6 Tieren.

Die Erkrankung der drei einzelnen Gruppen beginnt um den 11./12. Tag nach der Immunisierung. An Tag 15 zeigen die Gruppen einen einheitlichen Krankheitsverlauf der EAE, sodass der Applikationszyklus begonnen wird. An den Tagen 16 und 17 ist der „peak of disease“ in den drei Gruppen zu erkennen. Fortan zeigt die Gruppe der Tiere, welche mit 0,5 mg/kg KG MTx behandelt werden, den mildesten Krankheitsverlauf. Die Krankheitsverläufe der PBS-Kontrollgruppe und der 2,5 mg/kg KG MTx Gruppe verlaufen auf einem vergleichbaren Niveau.

An Tag 23 versterben vier von fünf Mäusen der 2,5 mg/kg KG MTx-Gruppe. Die letzte Applikation von MTx erfolgte an Tag 19. Es ist davon auszugehen, dass die mit dem Leben zu vereinbarende Gesamtdosis an MTx überschritten wurde. Folglich wird die 2,5 mg/kg KG MTx-Dosis aus dem Dosispool eliminiert.

Nach Ausschluss zweier MTx-Dosen soll nun im nächsten Experiment die Wirksamkeit der 0,5 mg/kg KG MTx-Konzentration weiter bestätigt und andere Dosen zur weiterführenden Orientierung im Dosisbereich des MTx verabreicht werden.

3.2.1.3 Optimierung der MTx-Dosis

Die Versuche 3.2.1.1, S.49 und 3.2.1.2, S.51 illustrieren eine deutliche Wirkung der MTx-Dosis von 0,5 mg/kg KG auf den EAE-Krankheitsverlauf. Vorangegangene Experimente konnten ebenfalls illustrieren, dass durch höhere MTx-Dosen keinesfalls bessere Ergebnisse, bezogen auf die Modifikation des EAE-Krankheitsverlaufes in C57BL/6J- Mäusen erreicht werden können. Auf der anderen Seite wurde ebenfalls keine niedrigere Dosis appliziert, welche bessere Ergebnisse in Bezug auf den Krankheitsverlauf der EAE bewirkte.

Mit dem Hintergedanken eine MTx-Dosis zu ermitteln, die eine möglichst minimale, jedoch trotzdem therapeutische MTx-Dosis darstellt, wird im folgenden Experiment die finale Etablierung von 0,5 mg/kg KG MTx angestrebt. Gleichzeitig soll mit der synchronen Applikation einer zuvor nicht verwendeten niedrigeren (0,2 mg/kg KG MTx) und einer ebenfalls nicht verwendeten höheren Konzentration (1 mg/kg KG MTx) eine wohlmöglich weitere Doseingrenzung erreicht werden.

Die erstmalige MTx-Behandlung wird auf den Tag 12 post Immunisierung gelegt. Unter der nach vorne datierten ersten MTx-Injektion (Versuch 3.2.1.2: Tag 15 post Immunisierung) soll eine signifikante Modulation des EAE-Krankheitsverlaufes erfolgen. Die Tiere zeigen zu diesem Zeitpunkt erste oder keine visuellen Manifestationen der EAE. Die vorzeitige MTx-Injektion soll das Auftreten der EAE-Krankheitsmanifestationen signifikant reduzieren, beziehungsweise im Anfangsstadium der EAE eine adäquate Regulation ermöglichen.

An dem beschriebenen Zeitpunkt weisen die Tiere zugeteilt auf die jeweiligen Gruppen einen durchschnittlichen Krankheits-Score von 0,75 bis 1 auf. Die

Applikation des MTx erfolgt in den Gruppen an Tag 12/ 13/ 14 + 16 post Immunisierung. Neben der PBS-Kontrollgruppe bestehen auch die Dosisgruppen aus je sieben Tieren.

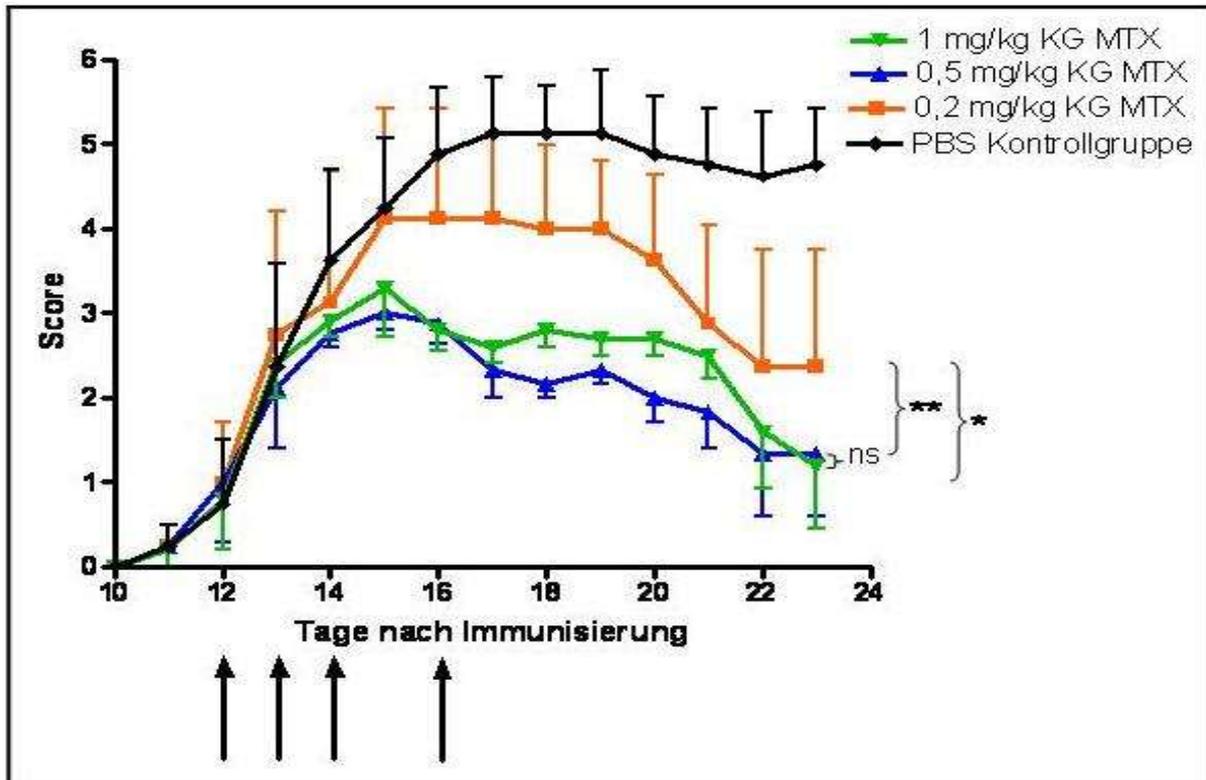


Abb. 5: Krankheitsverlauf der EAE in C57BL/6J-Mäusen mit 0,2 - vs. 0,5 - vs. 1,0 mg/kg KG MTx therapiert vs. PBS-Kontrollgruppe. Pfeile illustrieren die MTx-Injektionen an Tag 12/ 13/ 14 + 16 nach der Immunisierung. Mittelwerte aus Gruppen à 7 Tieren. Signifikanzen: *ns*, *P* nicht signifikant (0,5- vs. 1,0 MTx); *****P* < 0,01** (0,2 vs. 0,5 MTx); ****P* < 0,05** (0,2- vs. 1,0 MTx), Mann-Whitney U-Test.

Die Kurve der PBS-Kontrolltiere kann erneut mit dem EAE-Verlauf der Tiere im Eingangsexperiments (3.1.1, S.46) verglichen werden.

Unter der Behandlung mit 0,5- und 1 mg/kg KG MTx ist ein milder Krankheitsverlauf der EAE bei den Tieren zu erkennen, die Unterschiede der Kurvenverläufe beider Dosisgruppen sind nicht signifikant. An Tag 23 zeigen beide Dosisgruppen einen durchschnittlichen Krankheitsscore von 1. Jene Tiere, welche mit 0,2 mg/kg KG MTx behandelt werden, zeigen einen im Vergleich zu den beiden Dosisgruppen (0,5- und 1,0 mg/kg KG MTx) signifikant fulminanteren Krankheitsverlauf der EAE.

Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgt die Elimination der 0,2 mg/kg KG MTx-Dosis aus dem Dosispool. Es gelingt die Konzentration von 0,5 mg/kg KG MTx in diesem

Experiment final zu etablieren. Sie führt zu einer positiven Beeinflussung des EAE-Krankheitsverlaufes. Aufgrund der Wirksamkeit der Dosis von 0,5 mg/kg KG MTx erfolgt die Vernachlässigung der Dosis von 1,0 mg/kg KG MTx in nachfolgenden Experimenten, obwohl auch deren Wirksamkeit dargestellt werden konnte (*Abb.5*).

In den folgenden Experimenten soll die zu diesem Zeitpunkt in Wildtypieren vom Stamm C57BL/6J etablierte Dosis von 0,5 mg/kg KG MTx in Abcg2 ^{-/-} Mäusen zur Anwendung kommen.

3.3 MTx in Abcg2 ^{-/-} EAE-Mäusen

3.3.1 Wirkung des MTx in Abcg2 ^{-/-} EAE-Mäusen

Nach der Etablierung sowohl eines Therapieschemas als auch einer therapeutisch wirksamen MTx-Dosis in der C57BL/6J-WT-Maus, soll in kommenden Experimenten die MTx-Applikation in der Abcg2 ^{-/-} Maus erfolgen.

Mit der MTx-Applikation soll der Fragestellung nachgegangen werden, ob es bei der gleichzeitigen Behandlung von C57BL/6J-EAE- und Abcg2 ^{-/-} EAE Mäusen einen Unterschied in der MTx-Effizienz zu beschreiben gibt. Getestet wird die Wirkung der zuvor ermittelten MTx-Dosis von 0,5mg/kg KG auf den EAE-Krankheitsverlauf der beiden Tier-Gruppen. Zusätzlich erfolgt die Behandlung von jeweils einer Kontrollgruppe mit PBS. Der vier-armige Versuch setzt sich jeweils aus vier Tieren in den beiden Wirkstoffgruppen (0,5 mg/kg KG MTx in C57BL/6J- und Abcg2 ^{-/-} Mäusen), vier Tieren in der C57BL/6J-PBS- und drei Tieren in der Abcg2 ^{-/-} PBS-Kontrollgruppe, zusammen.

Die Gruppenverteilung und das Therapieschema erfolgen wie unter 3.2.1.3, S.53 beschrieben.

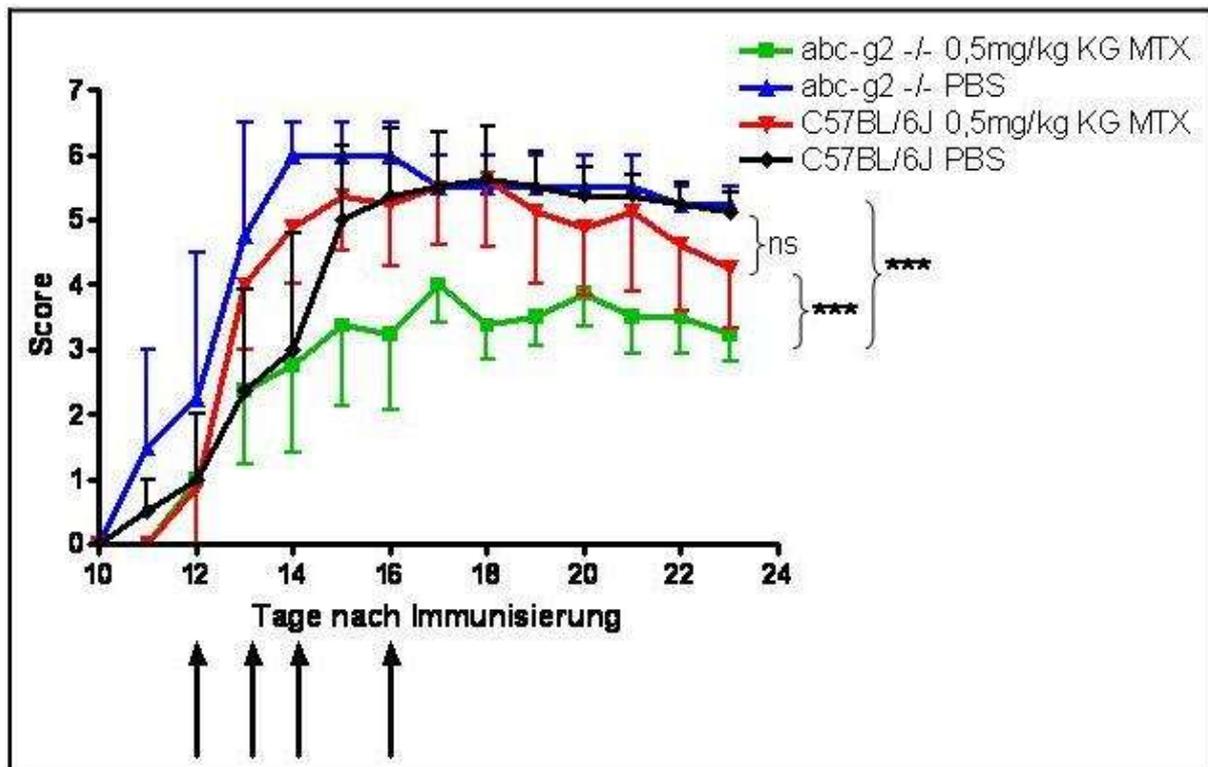


Abb. 6: Krankheitsverlauf der EAE in C57BL/6J-Mäusen mit 0,5mg/kg KG MTx therapiert- vs. C57BL/6J-PBS-Kontrollgruppe vs. Abcg2 -/- Mäuse mit 0,5mg/kg KG MTx therapiert- vs. Abcg2 -/- PBS-Kontrollgruppe. Pfeile illustrieren die MTx-Injektionen an Tag 12/ 13/ 14 + 16 nach der Immunisierung. Mittelwert aus Gruppen à 4 Tieren (C57BL/6J-MTx, C57BL/6J-PBS und Abcg2 -/- MTx) und 3 Tieren (Abcg2 -/- PBS). Signifikanzen: *ns*, *P* nicht signifikant (C57BL/6J-MTx vs. C57BL/6J-PBS); ****P* < 0,001 (Abcg2 -/- MTx vs. Abcg2 -/- PBS); ****P* < 0,001 (Abcg2 -/- MTx vs. C57BL/6J-MTx), Mann-Whitney U-Test.

Das erste Dosis-Experiment mit Abcg2 -/- Mäusen zeigt einen annähernd gleichen EAE-Krankheitsverlauf der beiden PBS-Kontrollgruppen ab Tag 17 post Immunisierung. Einzig ihr Krankheitsbeginn weist leichte Unterschiede auf. So ist zu beobachten, dass die Abcg2 -/- PBS-Gruppe einen fulminanteren Krankheitsbeginn aufzeigt als die C57BL/6J-Kontrollgruppe.

Die Behandlung der Abcg2 -/- Tiere mit 0,5 mg/kg KG MTx führt zu einer signifikanten Beeinflussung des EAE-Krankheitsverlaufes verglichen mit der Abcg2 -/- Kontrollgruppe und der C57BL/6J-MTx-Gruppe. Die MTx-Behandlung der C57BL/6J-Mäuse bedeutet, verglichen mit ihrer PBS-Kontrollgruppe, keinen signifikanten Unterschied bezogen auf den EAE-Verlauf.

Das Experiment wird an Tag 23 beendet und die Tiere für histologische Untersuchungen aufbereitet.

3.3.2 Etablierung der MTx-Therapie in Abcg2 -/- Tieren

Im kommenden Experiment erfolgt die erneute Applikation von 0,5 mg/kg KG MTx in beiden Maus-Stämmen. Ziel dessen soll die Rekapitulation und die Untermauerung der Ergebnisse aus 3.3.1, S.55 sein.

Um die Aussagekraft des Experiments zu erhöhen, wird den einzelnen Gruppen eine größere Anzahl Tiere zugewiesen. Dementsprechend bestehen neben der C57BL/6J PBS-Gruppe beide Wirkstoffgruppen (C57BL/6J- und Abcg2 -/- MTx) aus jeweils sechs Mäusen. Einzig der Abcg2 -/- PBS-Gruppe werden fünf Tiere zugewiesen.

Die Gruppenverteilung und das Therapieschema erfolgen auch in diesem Experiment wie unter 3.2.1.3, S.53 beschrieben.

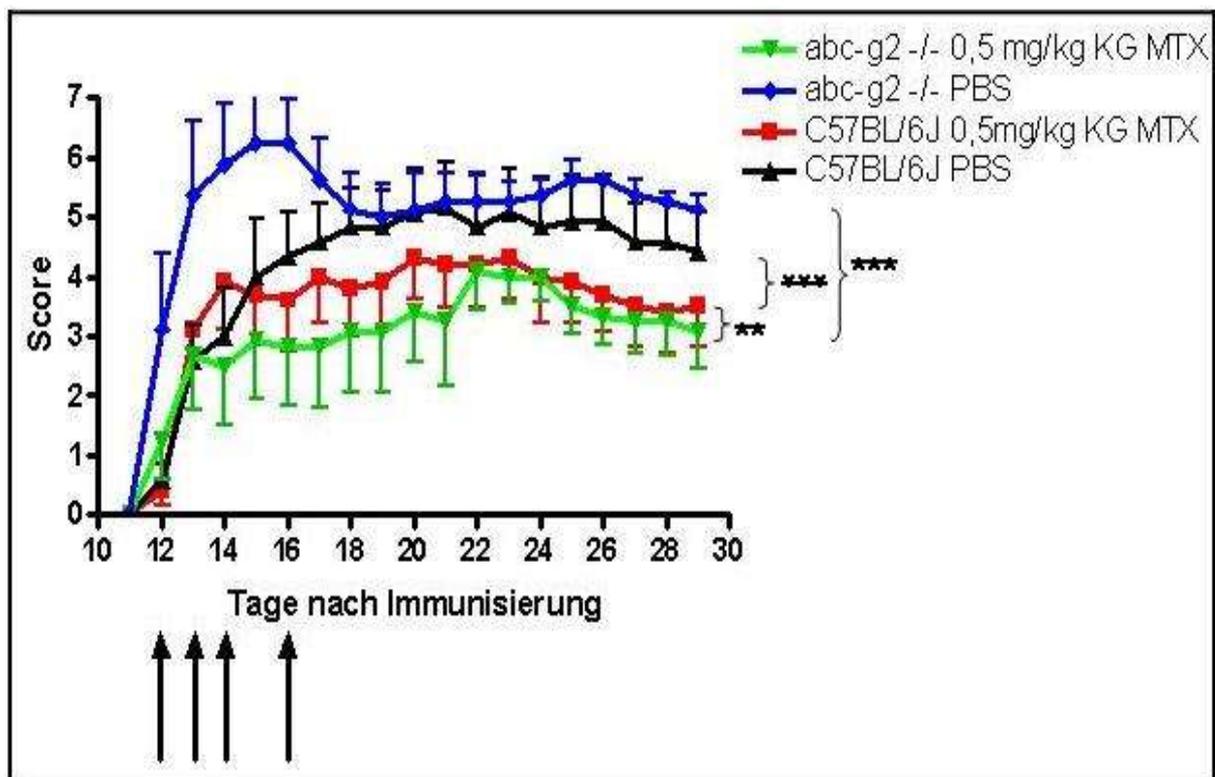


Abb. 7: Krankheitsverlauf der EAE in C57BL/6J-Mäusen mit 0,5mg/kg KG MTx therapiert- vs. C57BL/6J-PBS-Kontrollgruppe- vs. Abcg2 -/- mit 0,5mg/kg KG MTx therapiert- vs. Abcg2 -/- PBS-Kontrollgruppe. Pfeile illustrieren die MTx-Injektionen an Tag 12/ 13/ 14 + 16 nach der Immunisierung. Mittelwert aus Gruppen à 6 Tieren (C57BL/6J-MTx, C57BL/ 6J-PBS, Abcg2 -/- MTx) und aus 5 Tieren (Abcg2 -/- PBS). Signifikanzen: $***P < 0,001$ (Abcg2 -/- MTx vs. Abcg2 -/- PBS); $***P < 0,001$ (C57BL/6J-MTx vs. C57BL/6J-PBS); $**P < 0,01$ (Abcg2 -/- MTx vs. C57BL/6J-MTx). Mann-Whitney U-Test.

Abb. 7 illustriert erneut den zuvor beschriebenen fulminanten frühen EAE-Krankheitsverlauf der Abcg2 ^{-/-} PBS-Kontrollgruppe. Ab Tag 18 laufen beide Kurven der PBS-Kontrollgruppen (C57BL/6J und Abcg2 ^{-/-}) annähernd parallel, mit einer erneuten, geringen Krankheitsprogression zu Lasten der Abcg2 ^{-/-} PBS-Kontrollgruppe.

Die EAE-Krankheitsverläufe beider Tierstämme (C57BL/6J und Abcg2 ^{-/-}) können durch die Applikation von MTx signifikant beeinflusst werden, verglichen mit der zugehörigen PBS-Kontrollgruppe. Jedoch bewirkt die MTx-Applikation eine aussagekräftigere, signifikante EAE-Krankheitsmodulation in den behandelten Abcg2 ^{-/-} Tieren, vergleicht man diese mit den behandelten C57BL/6J-WT-Mäusen.

Der Versuch wird an Tag 27 post Immunisierung beendet, die Tiere für histologische Untersuchungen aufbereitet.

Folgende Illustration zeigt die zusammengelegten Versuche zu *Abb. 6, S.56* und *Abb. 7, S.57*, welche beide die gleichzeitige Wirkung von 0,5 mg/kg KG MTx auf C57BL/6J-EAE-Tiere und Abcg2 ^{-/-} EAE-Tiere darstellen.

Die Tierzahlen erhöhen sich dadurch auf jeweils zehn Tiere in den beiden Wirkstoffgruppen C57BL/6J-, Abcg2 ^{-/-} MTx und in der C57BL/6J-PBS-Kontrollgruppe. Die Gruppe der Abcg2 ^{-/-} PBS-Kontrolltiere besteht aus acht Mäusen.

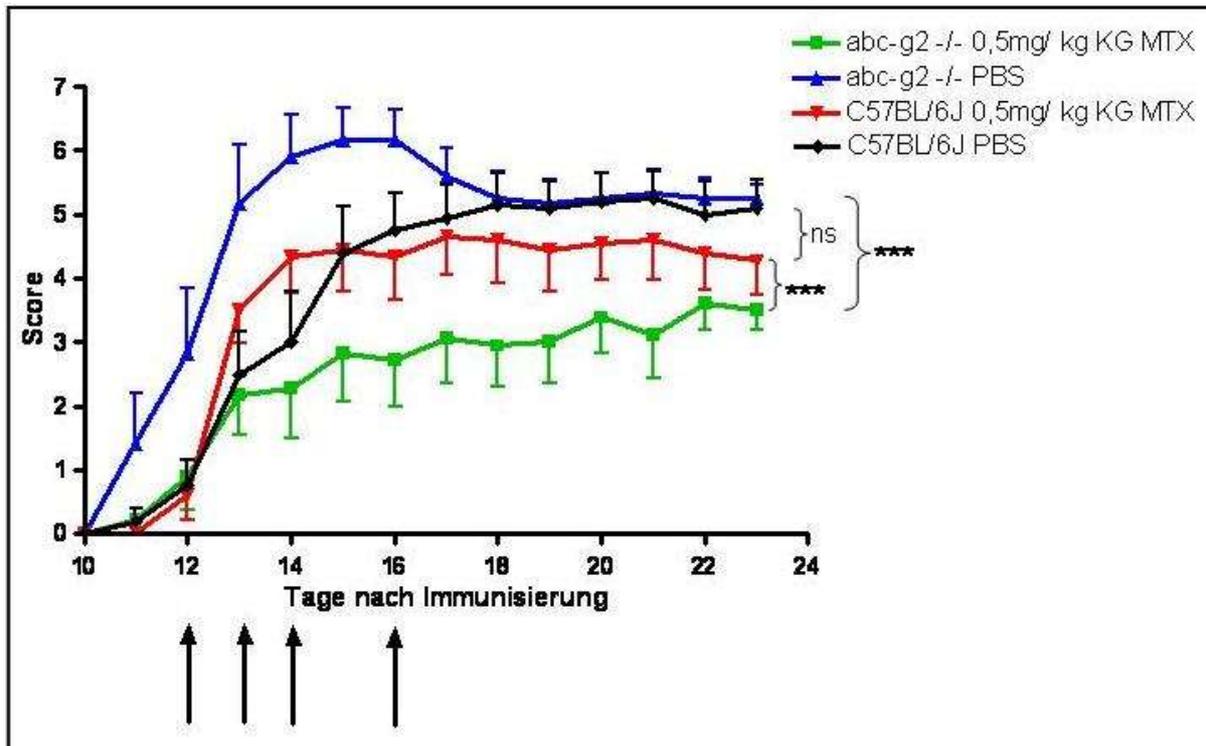


Abb. 8: Krankheitsverlauf der EAE in C57BL/6J-Mäusen mit 0,5 mg/kg KG MTx therapiert- vs. C57BL/6J-PBS-Kontrollgruppe- vs. Abcg2 -/- mit 0,5 mg/kg KG MTx therapiert- vs. Abcg2 -/- PBS-Kontrollgruppe. Pfeile illustrieren die MTx-Injektionen an Tag 12/ 13/ 14 + 16 nach der Immunisierung. Mittelwert aus Gruppen à 10 Tieren (C57BL/6J-MTx, C57BL/6J-PBS, Abcg2 -/- MTx) und aus 8 Tieren (Abcg2 -/- PBS). Signifikanzen: *ns*, P nicht signifikant (C57BL/6J-MTx vs. C57BL/6J-PBS); *****P** < 0,001 (Abcg2 -/- MTx vs. Abcg2 -/- PBS); *****P** < 0,001 (Abcg2 -/- MTx vs. C57BL/6J-MTx). Mann-Whitney U-Test.

Das Zusammenlegen der Versuche 3.3.1, S.55 und 3.3.2, S.57 untermauert die zuvor in den einzelnen Experimenten beschriebenen Unterschiede in der MTx-Effizienz zwischen behandelten Abcg2 -/- Tieren und C57BL/6J-Tieren. Das MTx bewirkt eine signifikante Modulation des EAE-Krankheitsverlaufes in behandelten Abcg2 -/- Tieren, vergleicht man diese mit ihrer eigenen Kontrollgruppe und den ebenfalls behandelten Tieren der C57BL/6J-MTx-Gruppe.

3.3.3 Dosis-Modifikation: Die Wirkung von 0,2 mg/kg KG MTx auf Abcg2 -/- Mäuse

Nachdem die positive Wirkung der Dosis von 0,5 mg/kg KG MTx auf den EAE-Krankheitsverlauf von Abcg2 -/- Mäusen in vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, soll in kommendem Experiment die Applikation einer geringeren

MTx-Konzentration erfolgen. Der Hintergedanke liegt in einem möglichen Effekt der Dosis von 0,2 mg/kg KG MTx auf den EAE-Krankheitsverlauf der Abcg2 ^{-/-} Tiere, in Verbindung mit einer anschaulichen Vergleichbarkeit der MTx-Effizienz in beiden Tierstämmen (Abcg2 ^{-/-} vs. C57BL/6J). Die PBS-Kontrollgruppen werden vernachlässigt, da der EAE-Krankheitsverlauf der Kontrollgruppen zuvor mehrmals rekapituliert werden konnte. Es werden je eine Abcg2 ^{-/-} Gruppe und eine C57BL/6J-Gruppe gebildet, welche mit 0,2 mg/kg KG MTx behandelt werden. Beide Gruppen bestehen aus je sechs Tieren.

Therapiert werden die Tiere nach dem unter 3.2.1.3, S.53 beschriebenen Schema.

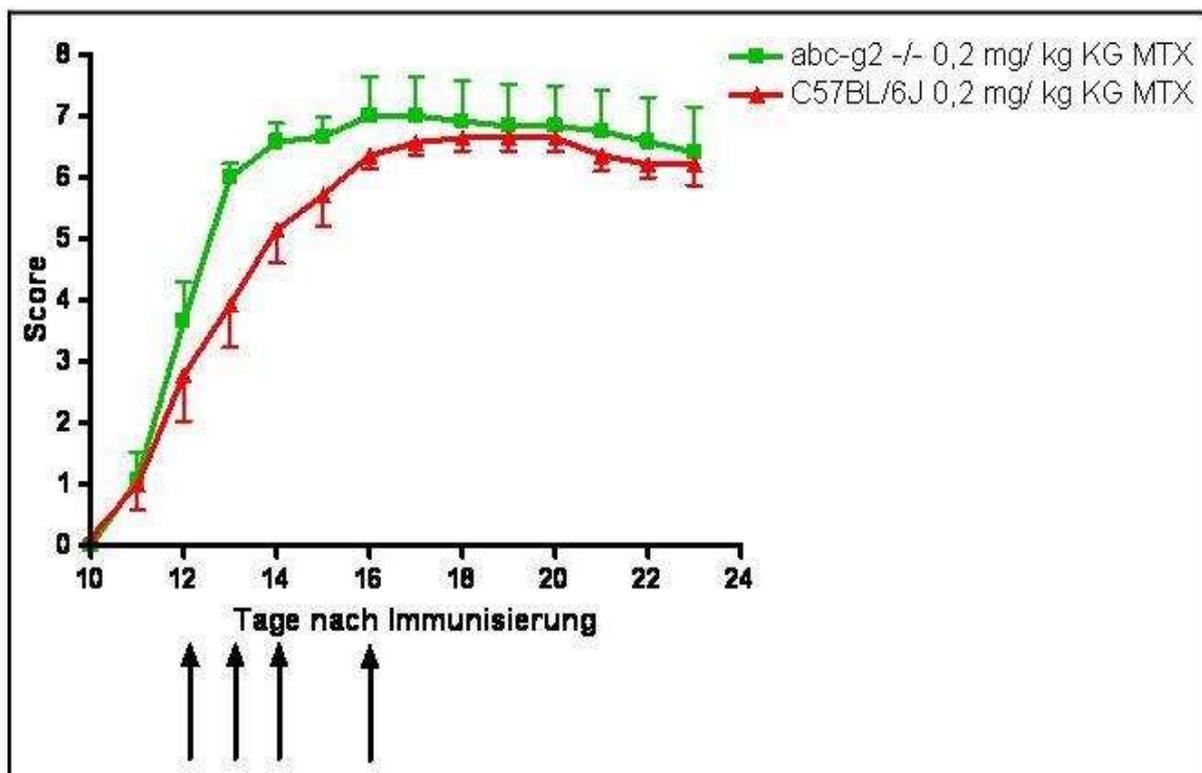


Abb. 9: Krankheitsverlauf der EAE in C57BL/6J-Mäusen mit 0,2 mg/kg KG MTx- vs. Abcg2 ^{-/-} mit 0,2 mg/kg KG MTx therapiert. Pfeile illustrieren die MTx-Injektionen an Tag 12/ 13/ 14 + 16 nach der Immunisierung. Mittelwert aus Gruppen à 6 Tieren (C57BL/6J-MTx, Abcg2 ^{-/-} MTx).

Grundsätzlich ist ein fulminanter EAE-Krankheitsverlauf in beiden mit MTx-behandelten Mausstämmen zu beobachten. Der EAE-Krankheitsverlauf der C57BL/6J-WT-Gruppe gleicht sich dem der Abcg2 ^{-/-} Gruppe ab Tag 17 an. Von Tag 11 bis Tag 17 ist ein fulminanter EAE-Krankheitsbeginn in den Abcg2 ^{-/-} Tieren zu beobachten.

Die MTx-Injektionen bedeuten in diesem Experiment keinen positiven Effekt für den EAE-Krankheitsverlauf beider Mausstämme. Da in beiden Gruppen ein annähernd identischer EAE-Krankheitsverlauf unter MTx-Therapie zu beschreiben ist wird davon ausgegangen, dass auch frühere MTx-Injektionen von 0,2 mg/kg KG nicht in der Lage sein werden, einen Unterschied in der Behandelbarkeit zwischen beiden Mausstämmen herausarbeiten zu können.

3.4 MTx in Abcg2 +/- EAE-Mäusen

Anschließend an die Etablierung der Konzentration von 0,5 mg/kg KG MTx sowohl in der C57BL/6J- als auch in der Abcg2 -/- Maus, sollen nachfolgende Experimente einen abschließenden Blick auf die MTx-Therapie in heterozygoten Abcg2 +/- Mäusen werfen. In Anlehnung an die SNPs im ABCG2-Gen des Menschen soll durch die MTx-Applikation in der Abcg2 +/- Maus ein möglicher Gendosis-Effekt evaluiert werden. Die Abcg2 +/- Tiere weisen eine limitierte Anzahl funktionsfähiger Abcg2-Transporter auf. Die beschriebenen SNPs (1.4.1.5, S.26) bewirken eine Funktionseinschränkung im humanen ABCG2-Transporter welche mit einem limitierten Niveau an ABCG2-abhängigem Transport einhergeht.

3.4.1 Abcg2 +/- EAE-Mäuse und 0,5 mg/kg KG MTx

Nachfolgendes Experiment wird sechs-armig durchgeführt. Dazu werden die Mausstämme (Abcg2 -/-, Abcg2 +/- und C57BL/6J) jeweils in eine MTx-Wirkstoffgruppe und eine PBS-Kontrollgruppe aufgeteilt. Die Zuteilung der jeweiligen Tiere erfolgt wie in vorangegangenen Versuchen nach gleichem durchschnittlichen Krankheitsscore und nicht Käfig spezifisch. Die Gruppen bestehen aus je fünf Tieren in der Abcg2 +/- MTx- und der Abcg2 +/- MTx-Gruppe. Die Abcg2 -/- MTx-, Abcg2 -/- PBS-, C57BL/6J-MTx- und die C57BL/6J-PBS-Gruppe besteht aus vier Tieren. Die Tiere in den Wirkstoffgruppen werden mit 0,5 mg/kg KG MTx behandelt. Da der EAE-

Krankheitsbeginn der Mäuse in vorangegangenen Experiment zu 3.3.3, S.59 und in nicht illustrierten Experimenten tendenziell früher stattfindet, erfolgt die erstmalige MTx-Applikation in diesem Versuch bereits an Tag 9. Die erste MTx-Injektion soll bereits zu Anfang der EAE-Krankheitsmanifestationen erfolgen, um die Progression der Erkrankung erfolgreich modulieren zu können.

Das Applikationsschema ändert sich dementsprechend wie folgt: 9./ 10./ 11. +13. Tag nach der Immunisierung.

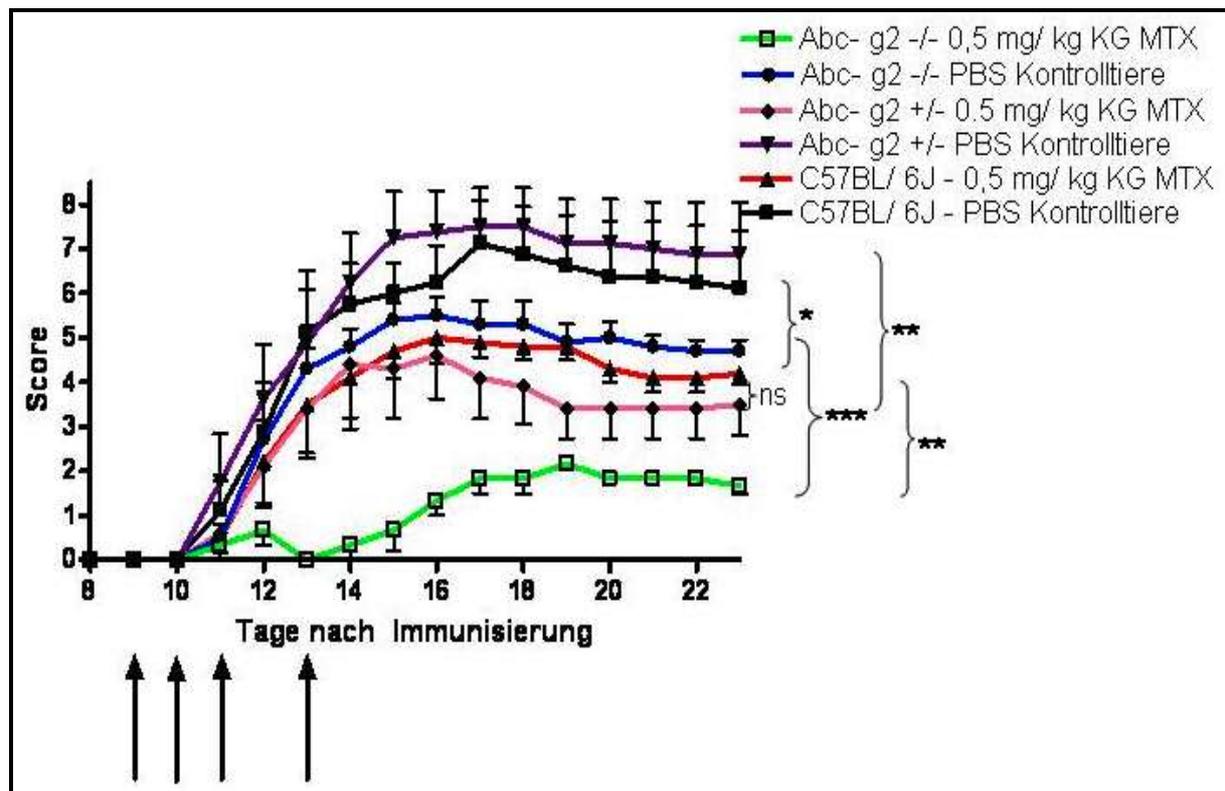


Abb 10.: Krankheitsverlauf der EAE in C57BL/6J-Mäusen mit 0,5 mg/kg KG MTx therapiert- vs. C57BL/6J-PBS-Kontrollgruppe- vs. Abcg2 +/- mit 0,5 mg/kg KG MTx therapiert- vs. Abcg2 +/- PBS-Kontrollgruppe- vs. Abcg2 -/- mit 0,5 mg/kg KG MTx therapiert- vs. Abcg2 -/- PBS-Kontrollgruppe. Pfeile illustrieren die MTx-Injektionen an Tag 9/ 10/ 11 + 13 nach der Immunisierung. Mittelwert aus Gruppen à 5 Tieren (Abcg2 +/- MTx, Abcg2 +/- PBS) und aus 4 Tieren (Abcg2 -/- MTx, Abcg2 -/- PBS, C57BL/6J-MTx, C57BL/6J-PBS). Signifikanzen: *ns*, P nicht signifikant (Abcg2 +/- MTx vs. C57BL/6J-MTx); *****P** ≤ 0,001 (Abcg2 -/- MTx vs. Abcg2 -/- PBS); ****P** < 0,01 (Abcg2 +/- MTx vs. Abcg2 +/- PBS); ****P** < 0,01 (Abcg2 -/- MTx vs. Abcg2 +/- MTx); ***P** < 0,05 (C57BL/ 6J MTx vs. C57BL/6J PBS). Mann-Whitney U-Test.

Zum Zeitpunkt der ersten MTx-Applikation weist keines der Tiere Krankheitsmanifestationen auf. Die Krankheitsverläufe der drei Kontrollgruppen sind keinesfalls

identisch. Den fulminantesten Verlauf einer EAE gibt es in der Abcg2 +/- PBS-Kontrollgruppe zu beschreiben, hingegen der mildeste EAE-Krankheitsverlauf in der Abcg2 -/- PBS-Kontrollgruppe zu beobachten ist.

Die MTx-Therapie bewirkt einen milden EAE-Krankheitsverlauf in der Abcg2 -/- Gruppe mit Maximalscorewerten von 2 Punkten. Dieser unterscheidet sich signifikant vom EAE-Verlauf der eigenen PBS-Kontrollgruppe als auch von der Abcg2 +/- MTx-Gruppe.

Die Mäuse der Abcg2 +/- Gruppe weisen unter der MTx-Therapie verglichen mit der C57BL/6J-MTx-Gruppe einen milderen, jedoch nicht signifikanten EAE-Krankheitsverlauf auf. Die EAE-Verläufe dieser beiden Gruppen (Abcg2 +/-, C57BL/6J) unterscheiden sich signifikant von den Verläufen ihrer zugehörigen PBS-Kontrollgruppen.

Dargestellte Wirksamkeit der MTx-Therapie in der Reihenfolge Abcg2 -/- > Abcg2 +/- > C57BL/6J soll abschließend, unter Verwendung des etablierten Therapieschemas (3.2.1.3, S.53), erneute Begutachtung erfahren.

Ziel der Repetition des vorangegangenen Experiments soll zum einen die Rekapitulation der Tendenzen, zum anderen die Anwendung des bereits etablierten Therapieschemas (3.2.1.3, S.53) unter gegebenen Versuchsbedingungen darstellen. In diesem sechs-armigen Versuch bestehen die Gruppen aus je fünf Tieren in den Wirkstoffgruppen (Abcg2 -/- MTx, Abcg2 +/- MTx, C57BL/6J-MTx) und je vier Tieren in den Kontrollgruppen (Abcg2 -/- PBS, Abcg2 +/- PBS, C57BL/6J-PBS). Die Zuordnung der Tiere zu den einzelnen Gruppen erfolgt abermals mit dem Ziel, gleiche durchschnittliche Scorepunkte aufzuweisen und ebenfalls Käfig-unspezifisch.

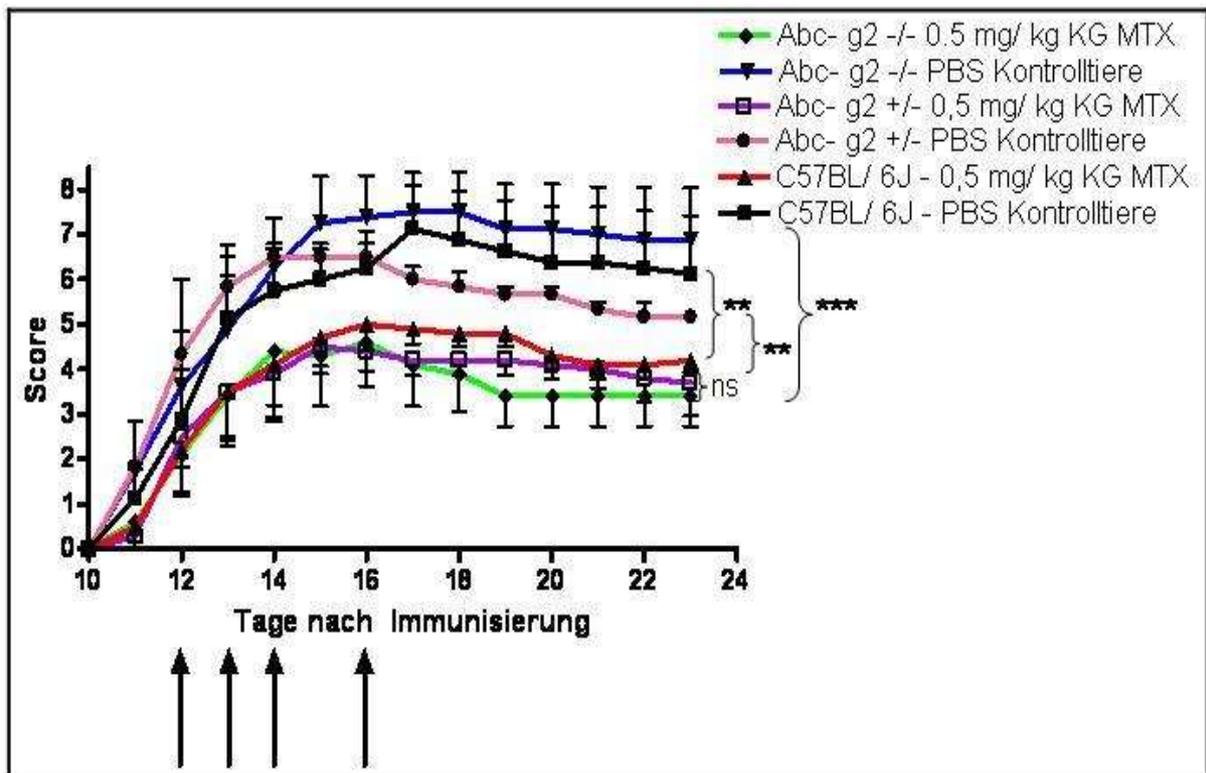


Abb. 11: Krankheitsverlauf der EAE in C57BL/6J-Mäusen mit 0,5 mg/kg KG MTx therapiert- vs. C57BL/6J-PBS-Kontrollgruppe- vs. Abcg2 +/- mit 0,5 mg/kg KG MTx therapiert- vs. Abcg2 +/- PBS-Kontrollgruppe- vs. Abcg2 -/- mit 0,5 mg/kg KG MTx therapiert- vs. Abcg2 -/- PBS-Kontrollgruppe. Pfeile illustrieren die MTx-Injektionen an Tag 9/ 10/ 11 + 13 nach der Immunisierung. Mittelwert aus Gruppen à 5 Tieren (Abcg2 -/- MTx, C57BL/6J-MTx, Abcg2 +/- MTx) und aus 4 Tieren (Abcg2 -/- PBS, Abcg2 +/- PBS, C57BL/6J-PBS). Signifikanzen: *ns*, P nicht signifikant (Abcg2 -/- MTx vs. Abcg2 +/- MTx); (Abcg2 -/- MTx vs. C57BL/6J-MTx); (Abcg2 +/- MTx vs. C57BL/6J-MTx); *** $P \leq 0,0001$ (Abcg2 -/- MTx vs. Abcg2 -/- PBS); ** $P < 0,01$ (Abcg2 +/- MTx vs. Abcg2 +/- PBS); (C57BL/6J-MTx vs. C57BL/6J-PBS). Mann-Whitney U-Test.

Erneut ist ein Unterschied in den EAE-Krankheitsverläufen der Kontrollgruppen zu verzeichnen. In diesem Experiment ist der fulminanteste EAE-Verlauf in der Abcg2 -/- PBS-Gruppe zu beschreiben, hingegen die Tiere der Abcg2 +/- PBS-Kontrollgruppe den mildesten EAE-Krankheitsverlauf illustrieren.

Die Verläufe der MTx-Dosisgruppen gleichen den Tendenzen unter 3.4.1, S.61 (Behandelbarkeit: Abcg2 -/- > Abcg2 +/- > C57BL/6J) wobei sich die EAE-Verläufe der Gruppen untereinander (Abcg2 -/- vs. Abcg2 +/-, Abcg2 -/- vs. C57BL/6J, Abcg2 +/- vs. C57BL/6J) nicht signifikant unterscheiden. Jedoch unterscheiden sich die EAE-Verläufe der mit MTx behandelten Gruppen (Abcg2 -/-, Abcg2 +/-, C57BL/6J) erneut signifikant von ihren zugehörigen PBS-Kontrollgruppen.

Es gelingt die Rekapitulation der Tendenzen des unter 3.4.1, S.61 gezeigten Experiments unter Anwendung des etablierten Applikationsschemas (12./ 13./ 14. +16. Tag nach der Immunisierung).

3.5 Histologie

Die Tierversuche zu 3.3.1, S.55 + 3.3.2, S.57 wurden an Tag 23/ Tag 29 post Immunisierung beendet und die RM der Tiere für histologische Untersuchungen präpariert.

An den angefertigten Paraffinschnitten werden vier verschiedene histologische Färbungen durchgeführt. Untersucht wird die Anzahl an B-Zellen (B220⁺), T-Zellen (CD3⁺) und Makrophagen (MAC3⁺). Des Weiteren wird der Grad an Demyelinisierung des RM bestimmt (LFB).

3.5.1 Makrophagen

Als wichtige Zelllinie betreffend Progression und Aufrechterhaltung einer EAE werden die Makrophagen in den RM von EAE-Tieren analysiert. Dafür werden die RM-Schnitte der einzelnen Tiere mit der unter 2.2.3.2.2, S.40 beschriebenen MAC3-Färbung behandelt.

Nachfolgend sind drei dieser RM-Färbungen illustriert. Neben zwei RM-Abbildungen von Tieren, die mit MTx behandelt sind (Abcg2 ^{-/-} (3), C57BL/6J (2)) wird zur Verdeutlichung der Makrophagen-Infiltrationsdichte der RM-Ausschnitt eines beliebigen PBS-Kontrolltieres (1) abgebildet.

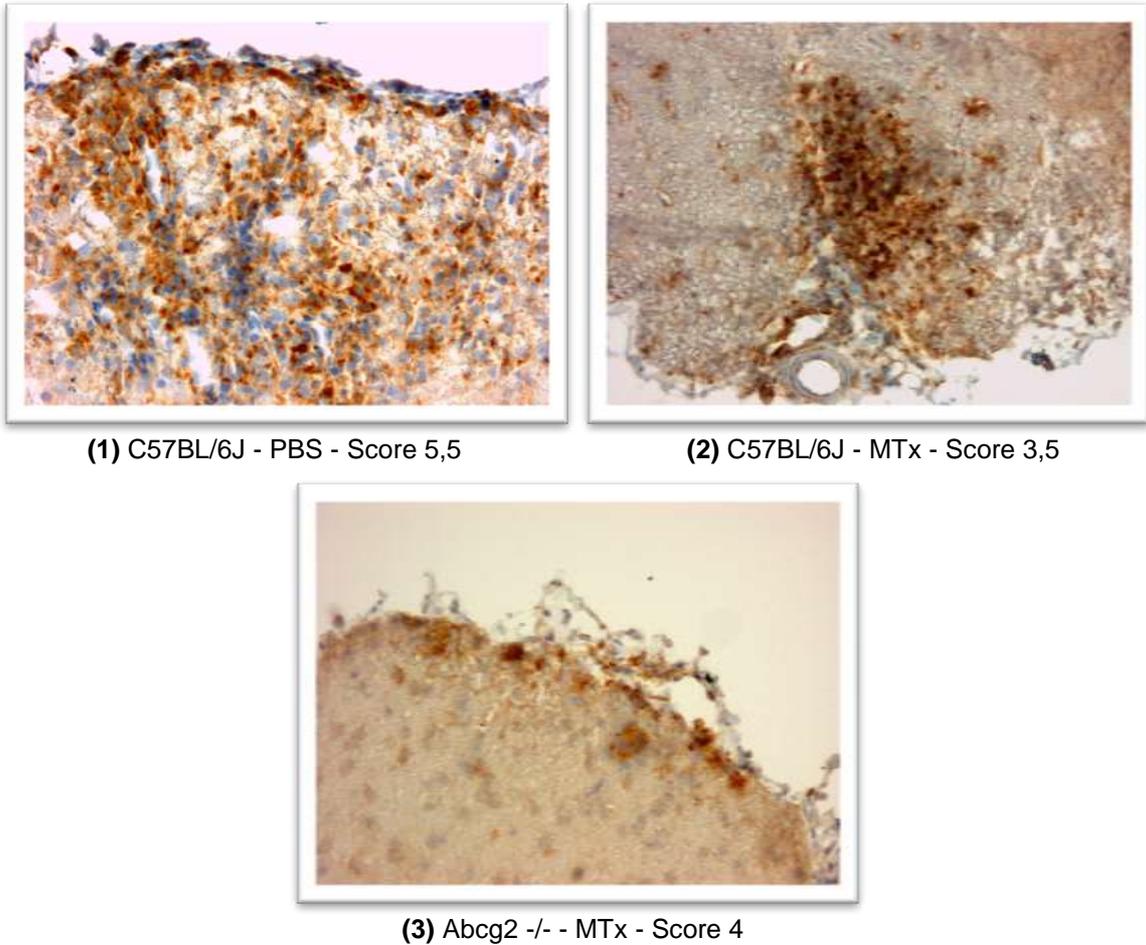


Abb.12: Makrophagen-Färbungen (MAC3): **(1)** C57BL/6J-Maus, EAE-Induktion und Behandlung mit PBS. Ausschnitt des RM mit 4758 Makrophagen/mm² bei einem Score von 5,5. - **(2)** C57BL/6J-Maus, EAE-Induktion und Behandlung mit MTx. Ausschnitt des RM mit 2688 Makrophagen/mm² bei einem Score von 3,5. - **(3)** Abcg2 -/- Maus, EAE-Induktion und Behandlung mit MTx. Ausschnitt des RM mit 725 Makrophagen/mm² bei einem Score von 4.

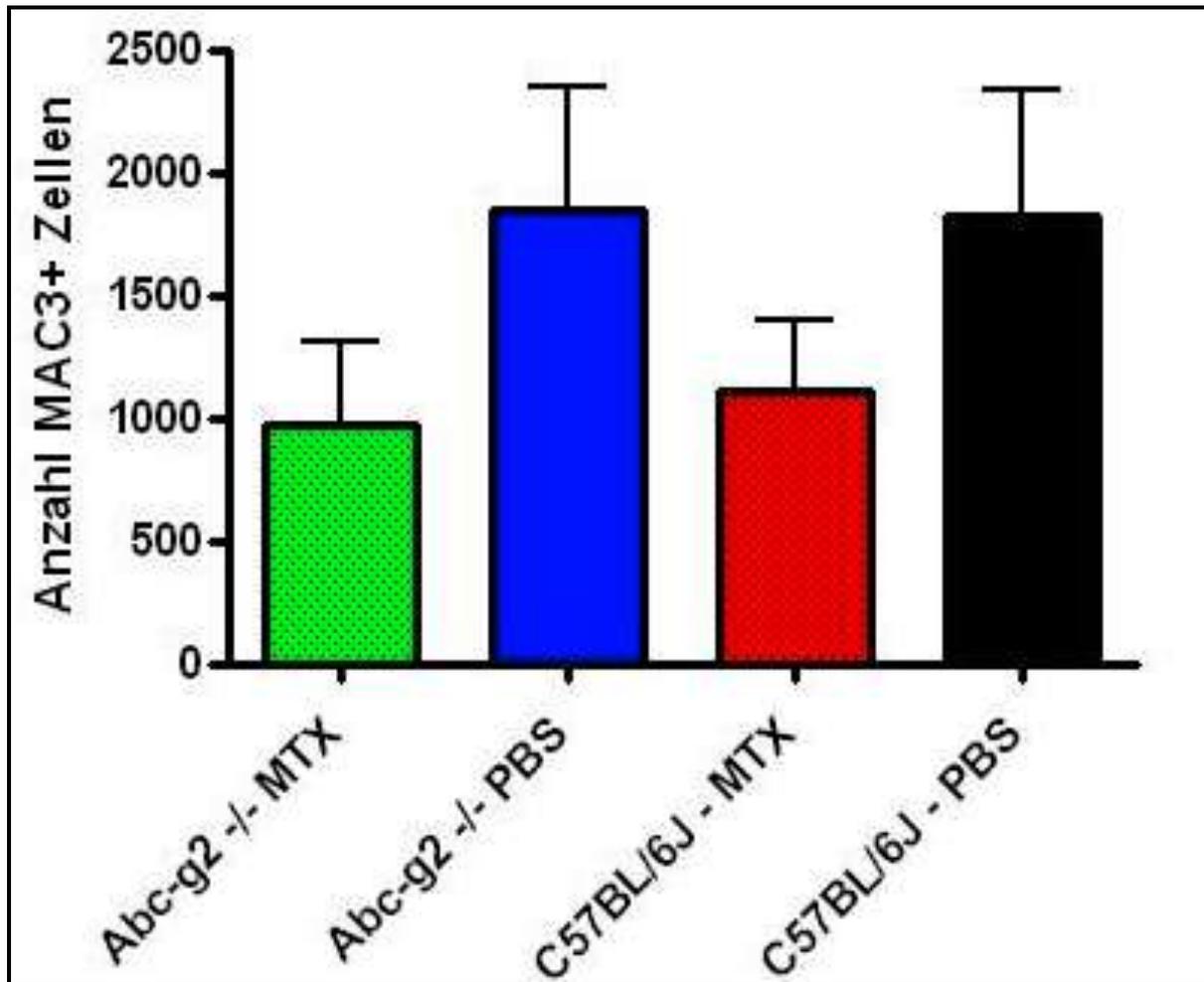


Abb. 13: Makrophagen-Färbung (MAC3) der Tiere von Versuchen 3.3.1, S.55 + 3.3.2, S.57 (Tage 23/29 post Immunisierung); Tierzahlen + durchschnittliche Anzahl an MAC3⁺-Zellen/mm²: Abcg2 -/- MTx (10 - 975,4/mm²); Abcg2 -/- PBS (7 - 1840,6/mm²); C57BL/6J-MTx (10 - 1110/mm²); C57BL/6J-PBS (10 - 1830,6/mm²). Signifikanzen: **ns**, P nicht signifikant (Abcg2 -/- MTx vs. PBS; C57BL/6J-MTx vs. PBS)

Die Applikation von MTx in der Abcg2 -/- Maus führt zu einer reduzierten Anzahl an MAC3⁺-Zellen (975,4 pro mm²) in den RM der untersuchten Tiere, im Vergleich zu den Abcg2 -/- PBS-Kontrolltieren (1840,6 pro mm²). Daraus ergibt sich eine 47%ige Reduktion der Infiltration von Makrophagen im ZNS von Abcg2 -/- MTx-Tieren, verglichen mit der Abcg2 -/- Kontrollgruppe. In den RM von C57BL/6J-Mäusen sind unter der MTx-Therapie 1110 MAC3⁺-Zellen pro mm² zu finden, daneben sind 1830,6 MAC3⁺-Zellen pro mm² in der C57BL/6J-PBS-Kontrollgruppe zu verzeichnen. Die aus der MTx-Therapie resultierende, prozentuale Reduktion der Infiltration von MAC3⁺-Zellen im ZNS von C57BL/6J-Mäusen liegt bei 39%.

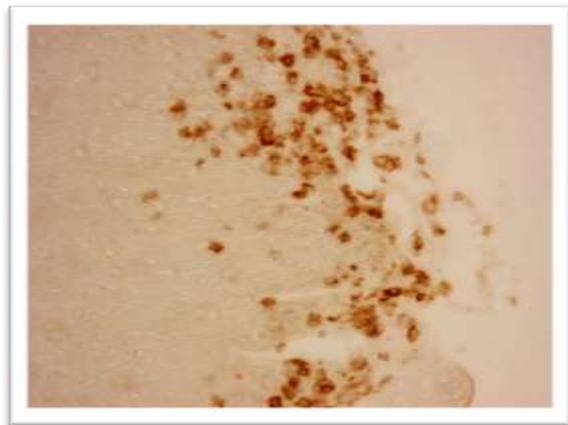
Daraus ergibt sich, eine tendenziell stärkere Reduktion der durchschnittlichen Makrophagen-Anzahl unter MTx-Therapie in den RM von Abcg2 ^{-/-} Mäusen (verglichen mit der C57BL/6J-MTx-Gruppe und der jeweiligen PBS-Kontrollgruppe). Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.

3.5.2 T-Lymphozyten

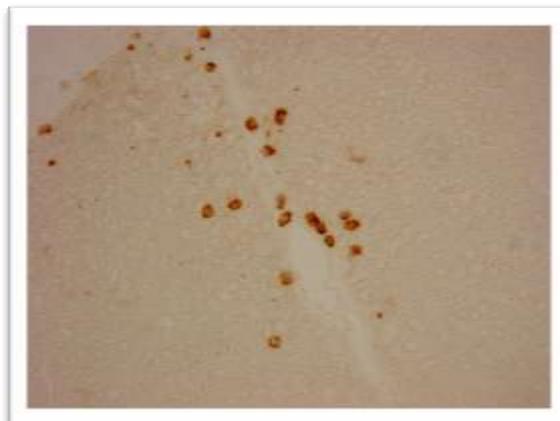
Es sollen nun Schnitte von Mäusen dargestellt werden, die auf das Vorhandensein von T-Zellen im ZNS histologisch untersucht worden sind. Dafür werden die RM-Schnitte der Tiere aus den Versuchen 3.3.1, S.55 + 3.3.2, S.57 mit der unter 2.2.3.2.1, S.39 beschriebenen mCD-3-Färbung behandelt, um das Ausmaß der T-Lymphozyten-Infiltration darzustellen. Erneut wird zur Verdeutlichung von Dichte der Infiltration der RM-Ausschnitt eines PBS-Kontrolltieres (1) abgebildet, daneben wird jeweils ein RM-Ausschnitt eines mit MTx behandelten Tieres der Abcg2 ^{-/-} (3)-Gruppe und eines der C57BL/6J (2)-Gruppe illustriert.



(1) Abcg2 ^{-/-} - PBS- Score 5,5



(2) C57BL/6J - MTx - Score 3,5



(3) Abcg2 ^{-/-} - MTx - Score 4

Abb.14: T-Lymphozyten-Färbung (mCD3): **(1)** Abcg2 ^{-/-} Maus, EAE-Induktion und Behandlung mit PBS. Ausschnitt des RM, mit 1966 T-Lymphozyten/mm² bei einem Score von 5,5 - **(2)** C57BL/6J-Maus, EAE-Induktion und Behandlung mit MTx. Ausschnitt des RM mit 811 T-Lymphozyten/mm² bei einem Score von 3,5 - **(3)** Abcg2 ^{-/-} Maus, EAE-Induktion und Behandlung mit MTx. Ausschnitt des RM mit 249 T-Lymphozyten/mm² bei einem Score von 4.

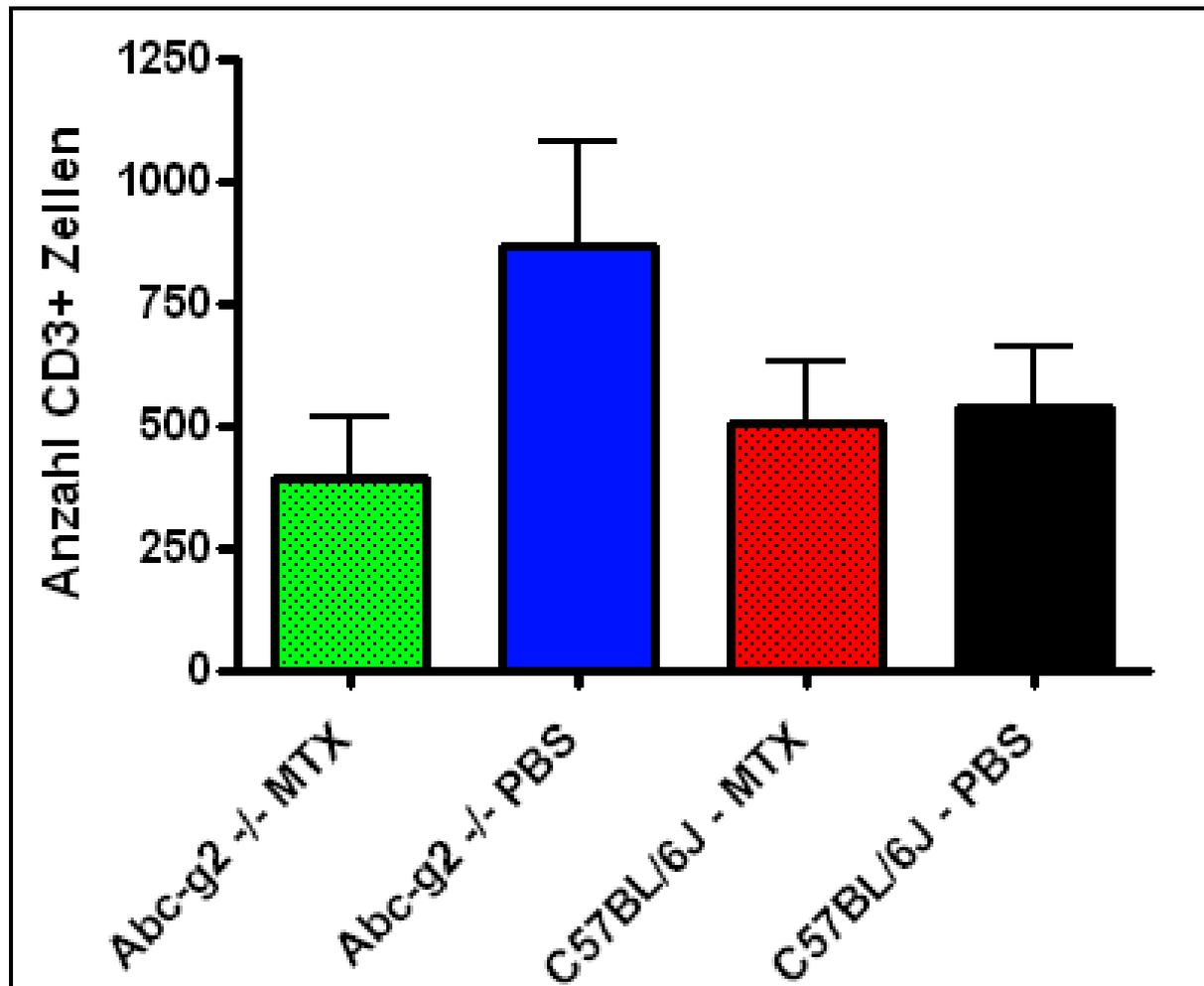


Abb.15: T-Lymphozyten-Färbung (mCD3) der Tiere von Versuchen 3.3.1, S.55 + 3.3.2, S.57 (Tage 23/29 post Immunisierung); Tierzahlen + durchschnittliche Anzahl an CD3⁺-Zellen/mm²: Abcg2 ^{-/-} MTx (10 - 393,1/mm²); Abcg2 ^{-/-} PBS (8 - 867/mm²); C57BL/ 6J-MTx (9 - 505,6/mm²); C57BL/6J-PBS (9 - 593,5/mm²). Signifikanzen: *ns*, P nicht signifikant (Abcg2 ^{-/-} MTx vs. PBS; C57BL/6J-MTx vs. PBS)

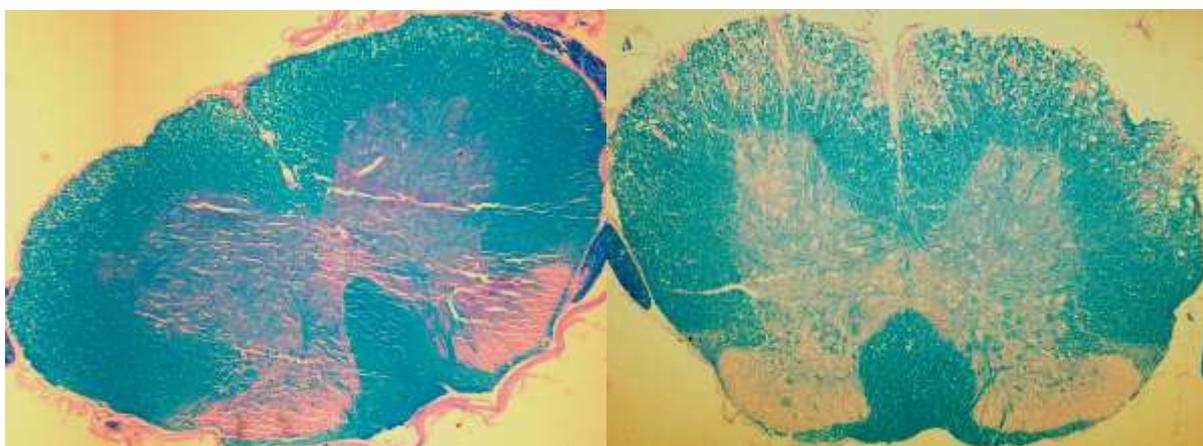
Die MTx-Behandlung führt in den RM der Abcg2 ^{-/-} Tiere zu einer durchschnittlichen Zahl von 393,1 CD3⁺-Zellen pro mm². In der Abcg2 ^{-/-} PBS- Kontrollgruppe sind 867 CD3⁺-Zellen pro mm² zu verzeichnen. Daraus ergibt sich eine 55%ige Reduktion von

CD3⁺-Zellen in den RM von Abcg2 ^{-/-} MTx-Tieren im Vergleich zur Abcg2 ^{-/-} PBS-Kontrollgruppe. Die C57BL/6J-MTx-Gruppe lässt eine durchschnittliche Anzahl von 505,6 CD3⁺-Zellen pro mm² erkennen. In der C57BL/6J-PBS-Kontrollgruppe sind dies 593,5 CD3⁺-Zellen pro mm². Die Reduktion von CD3⁺-Zellen unter der MTx-Therapie beläuft sich zwischen der Wirkstoff- und der Kontrollgruppe auf 15%.

Es ist davon auszugehen, dass die MTx-Behandlung von Abcg2 ^{-/-} Tieren im Vergleich zu behandelten C57BL/6J-Mäusen eine effizientere Reduktion der durchschnittlichen Anzahl CD3⁺-Zellen (T-Lymphozyten) in den RM der behandelten Tiere hervorruft. Dabei handelt es sich um Tendenzen, da die Unterschiede der MTx-Gruppen (Abcg2 ^{-/-}, C57BL/6J) gegenüber ihrer PBS-Kontrollgruppe nicht signifikant sind.

3.5.3 Luxol Fast Blue

Die LFB-Färbung ermöglicht den Grad der Demyelinisierung von Axonen des Rückenmarks zu ermitteln. RM-Schnitte werden wie unter 2.2.3.1, S.37 beschrieben gefärbt, ausgewertet und der Grad der Entmarkung in Prozent angegeben. Zur Verdeutlichung der Methode wird folgend der RM-Schnitt eines gesunden Tieres abgebildet (1), neben dem RM-Schnitt eines kranken PBS-Kontrolltieres mit manifesten Demyelinisierungen (2). Stellvertretend für die Gruppe der mit MTx behandelten Tiere, erfolgt die Abbildung des RM-Ausschnitt eines behandelten Abcg2 ^{-/-} (4)-Tieres und eines C57BL/6J (3)-Tieres.



(1) Abcg2 ^{-/-} - PBS - Score 0

(2) C57BL/6J - PBS - Score 5,5

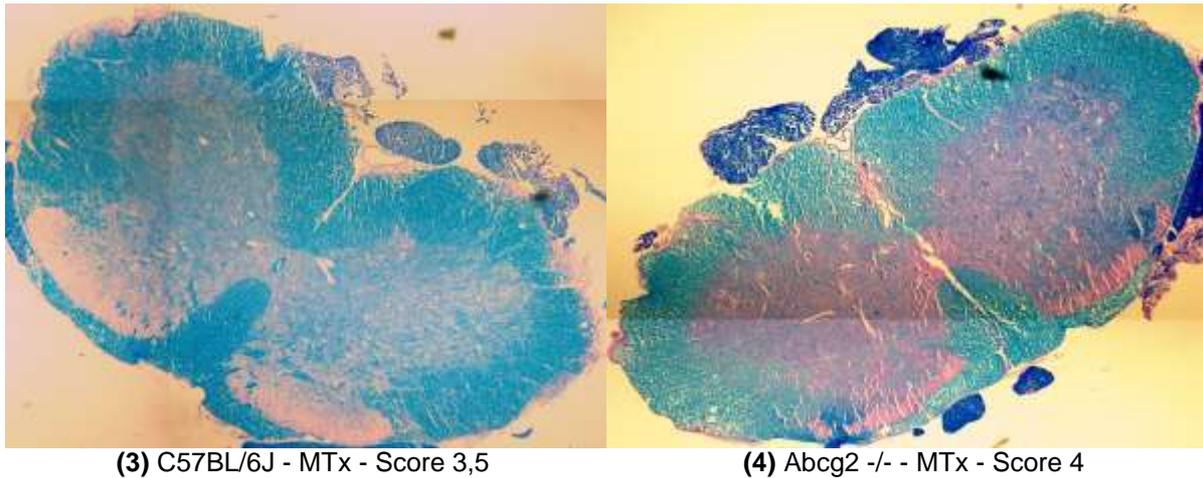


Abb.16: LFB-Färbung: **(1)** Abcg2 -/- Maus, EAE-Induktion und Behandlung mit PBS. Ausschnitt des RM ohne sichtbare Demyelinisierung bei einem Score von 0 - **(2)** C57BL/6J-Maus, EAE-Induktion und Behandlung mit PBS. RM-Ausschnitt mit 17,97% Demyelinisierung bei einem Score von 5,5 - **(3)** C57BL/6J-Maus, EAE-Induktion und Behandlung mit MTx. RM-Ausschnitt mit 7,06% Demyelinisierung bei einem Score von 3,5 - **(4)** Abcg2 -/- Maus, EAE-Induktion und Behandlung mit MTx. RM-Ausschnitt mit 1,41% Demyelinisierung bei einem Score von 4.

Neben der LFB-Färbung eines RM ohne sichtbare Demyelinisierungen (1), illustriert der RM-Ausschnitt unter (2) die hochgradige Demyelinisierung eines C57BL/6J-Kontrolltieres mit einem Score von 5,5 bei Versuchsbeendigung. Zu erkennen sind die Areale der Demyelinisierung anhand der rot-gefärbten Bereiche in der weißen Substanz und einer zusätzlichen Durchsetzung mit Vakuolen. Beschriebene Veränderungen befinden sich in Bild (2) sowohl im linken als auch im rechten Funiculus anterior (Vorderstrang) und um die Fissura mediana anterior herum. Im Funiculus lateralis (Seitenstrang) rechts ist ebenfalls ein größerer demyelinisierter Bereich zu erkennen.

Der Einsatz von MTx in der EAE bewirkt eine reduzierte Demyelinisierung, vergleicht man die RM-Schnitte der behandelten Tiere mit dem RM-Schnitt des PBS-Kontrolltieres. Die Demyelinisierungen des Abcg2 -/- EAE-MTx-Tieres sind mit 1,41% wesentlich geringer ausgeprägt als die des C57BL/6J-EAE-MTx-Tieres (7,06%).

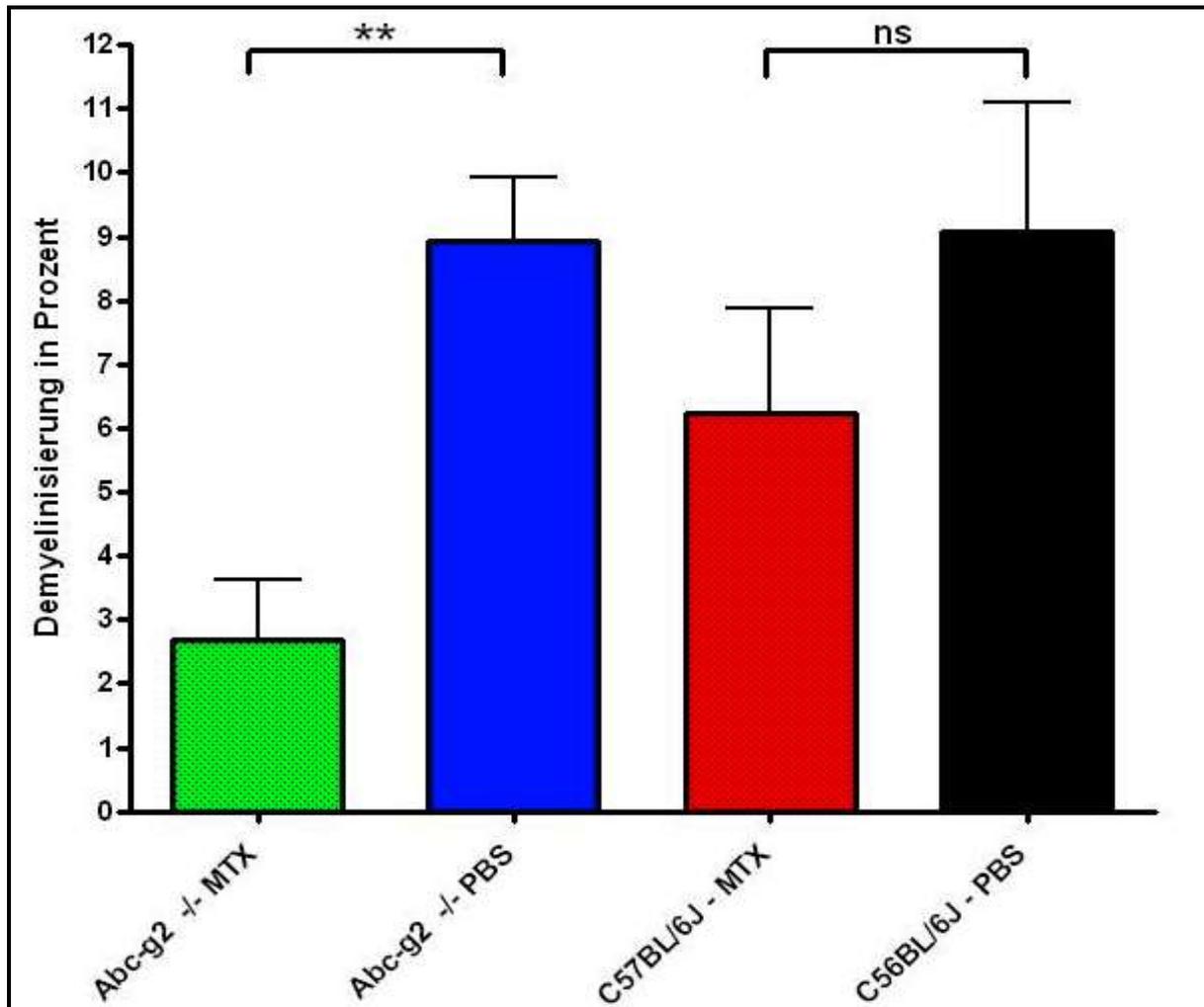


Abb. 17: LFB-Färbung der Tiere von Versuchen 3.3.1, S.55 + 3.3.2, S.57. Tierzahlen + durchschnittliche Demyelinisierung der RM in Prozent: Abcg2 -/- MTx (10 - 2,7%); Abcg2 -/- PBS (7 - 8,9%); C57BL/6J-MTx (9 - 6,2%); C57BL/6J-PBS (10 - 9,1%). Signifikanzen: **ns**, P nicht signifikant (C57BL/6J-MTx vs. C57BL/6J-PBS); ****P** < 0,01 (Abcg2 -/- MTx vs. Abcg2 -/- PBS).

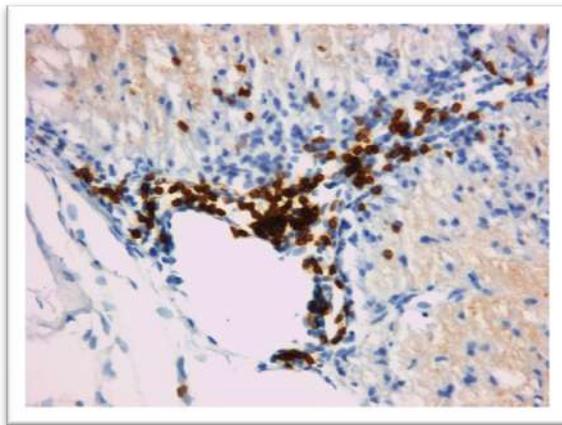
MTx bewirkt in Abcg2 -/- Tieren eine signifikante Reduktion (****P** < 0,01) der Demyelinisierungs-Rate im Vergleich zur Abcg2 -/- PBS-Kontrollgruppe (Abcg2 -/- MTx - 2,7% vs. Abcg2 -/- PBS - 8,9%).

In den C57BL/6J-Tieren bewirkt die MTx-Therapie ebenfalls eine Reduktion der Demyelinisierungs-Rate, vergleicht man die C57BL/6J-MTx-Gruppe (6,2%) mit der C57BL/6J-PBS-Gruppe (9,1%), die Reduktion erfolgt jedoch auf keinem signifikanten Niveau.

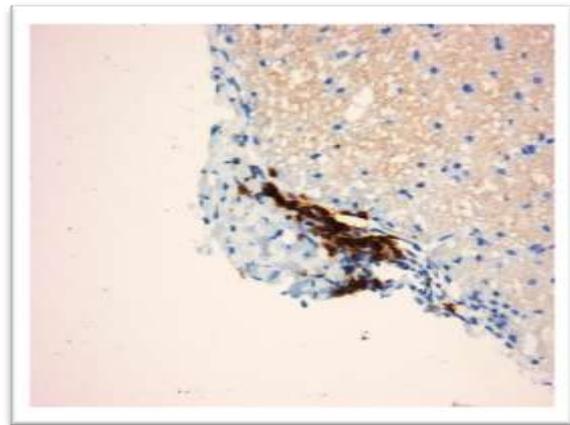
Es ist davon auszugehen, dass die MTx-Therapie in Abcg2 -/- Tieren zu mildereren histologischen Krankheitsmanifestationen führt, im Vergleich zur behandelten C57BL/6J-Gruppe.

3.5.4 B-Lymphozyten

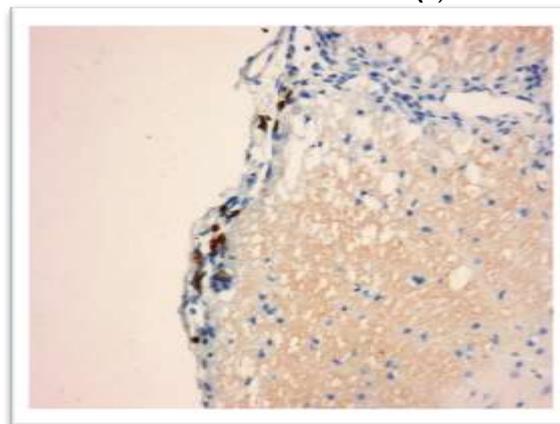
Die Begutachtung der B-Lymphozyten-Infiltration erfolgt anhand der B220-B-Zell-Färbung, die unter 2.2.3.2.1, S.39 beschrieben wird. Nachfolgende Abbildungen zeigen eine Auswahl von Färbungen mit unterschiedlichen, gleich den zuvor beschriebenen, charakteristischen Merkmalen.



(1) C57BL/6J - PBS - Score 6



(2) C57BL/6J - MTx - Score 4



(3) Abcg2 -/- - MTx - Score 4

Abb.18: B-Lymphozyten-Färbung (B220): **(1)** C57BL/6J-Maus, EAE-Induktion und Behandlung mit PBS. Ausschnitt des RM mit 1354 B-Lymphozyten/mm² bei einem Score von 6 - **(2)** C57BL/6J-Maus, EAE-Induktion und Behandlung mit MTx. Ausschnitt des RM mit 314 B-Lymphozyten/mm² bei einem Score von 4 - **(3)** Abcg2 -/- Maus, EAE-Induktion und Behandlung mit MTx. Ausschnitt des RM mit 125 B-Lymphozyten/mm² bei einem Score von 4.

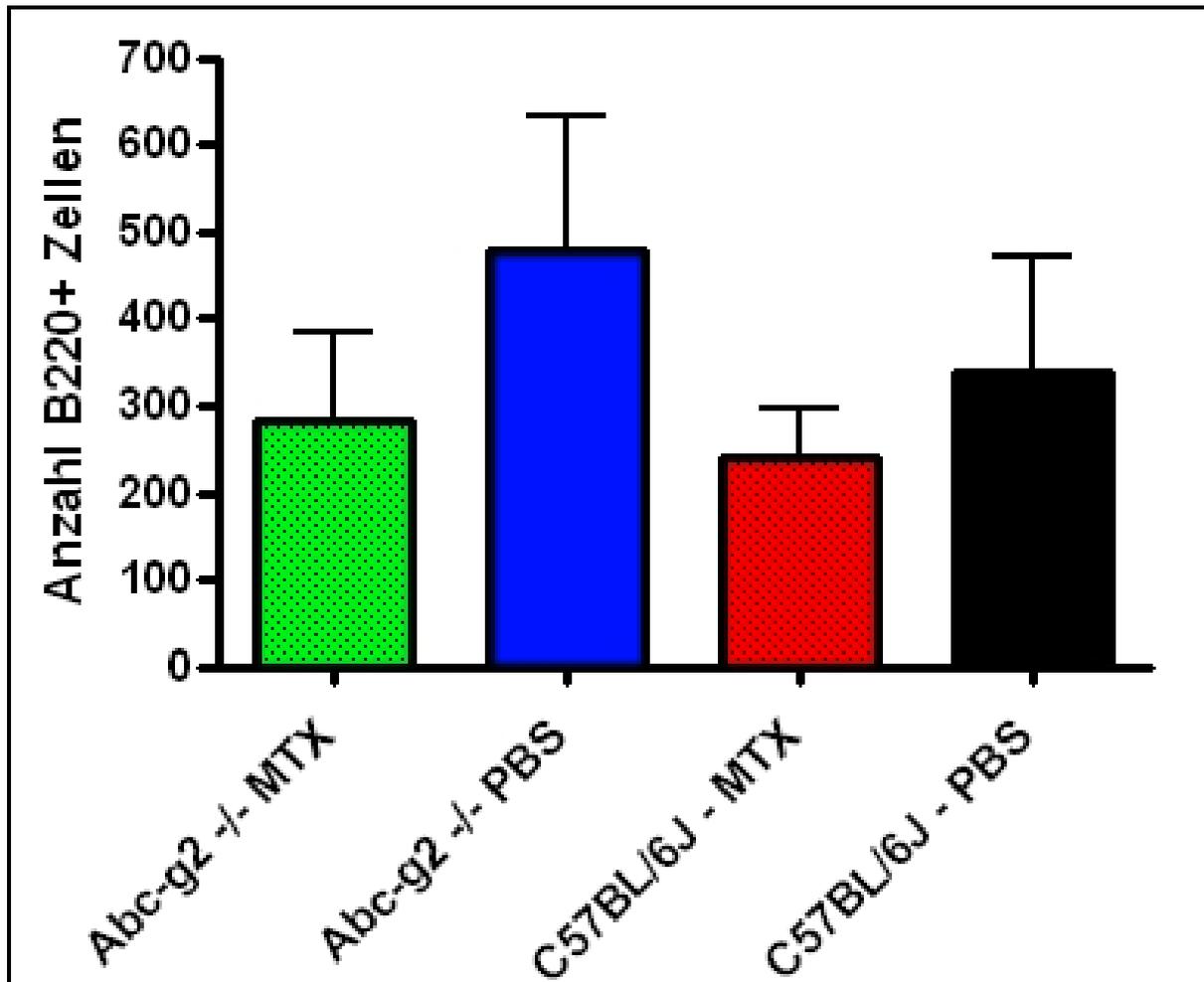


Abb. 19: B-Lymphozyten-Färbung (B220) der Tiere von Versuchen 3.3.1, S.55 + 3.3.2, S.57. Tierzahlen + durchschnittliche Anzahl an B220⁺-Zellen/mm²: Abcg2 -/- MTx (10 - 282,6/mm²); Abcg2 -/- PBS (7 - 479,3/mm²); C57BL/6J-MTx (10 - 240/mm²); C57BL/6J-PBS (9 - 362,5/mm²).

Die zuvor dargestellten Tendenzen bezüglich der Infiltration des RM durch B220-positive Zellen werden in *Abb. 19* verdeutlicht. Die Gruppe der Abcg2 -/- Tiere, welche mit MTx behandelt werden, weist mit einer durchschnittlichen Anzahl von 282,6 B220⁺-Zellen pro mm² eine tendenziell deutlich niedrigere Anzahl an Zellen auf verglichen mit der Abcg2 -/- PBS-Kontrollgruppe, welche Durchschnittswerte von 479,3 B220⁺-Zellen pro mm² zeigt. Daraus lässt sich schließen, dass der Einsatz von MTx in Abcg2 -/- EAE-Mäusen zu einer durchschnittlich 41%igen Reduktion der B-Lymphozyten-Infiltration führt. Betrachtet man diese Tatsache vergleichend in der Gruppe der C57BL/6J-MTx-Mäuse, können in dieser durchschnittlich 240 B220⁺-Zellen pro mm² ermittelt werden, im Gegensatz zu 362,5 B220⁺-Zellen pro mm² in

der C57BL/6J-PBS-Kontrollgruppe. Daraus ergibt sich eine Reduktion der Zellzahl zwischen MTx- und PBS-Gruppe von 34%.

Die beiden Prozentzahlen weisen auf einen effizienteren Einsatz von MTx in Abcg2^{-/-} Mäusen hin, verglichen mit der Wirkung in C57BL/6J-Mäusen. Es können nur Tendenzen beschrieben werden, da kein signifikanter Unterschied besteht.

3.5.5 Zusammenfassung der Histologie (3.5.1, S.65 - 3.5.4, S.73)

Die prozentualen Reduktionen der Zellzahlen beziehen sich jeweils auf die PBS-Kontrollgruppen (Abcg2^{-/-}, C57BL/6J) aus den Abbildungen 13, 15, 17 und 19 der histologischen Färbungen.

Makrophagen (3.5.1, S.65)

	Abcg2 ^{-/-} + MTx	C57BL/6J + MTx	Differenz Abcg2 vs. C57BL/6J
Reduktion Zellzahl in % (MTx vs. PBS)	47%	39%	8%

T-Lymphozyten (3.5.2, S.68)

	Abcg2 ^{-/-} + MTx	C57BL/6J + MTx	Differenz Abcg2 vs. C57BL/6J
Reduktion Zellzahl in % (MTx vs. PBS)	55%	15%	40%

Demyelinisierungsgrad des ZNS (3.5.3, S.70)

	Abcg2 ^{-/-} + MTx	C57BL/6J + MTx	Differenz Abcg2 vs. C57BL/6J
Reduktion Grad an Demyelinisierung in % (MTx vs. PBS)	70% (signifikant)	30%	40%

B- Lymphozyten (3.5.4, S.73)

	Abcg2 ^{-/-} + MTx	C57BL/6J + MTx	Differenz Abcg2 vs. C57BL/6J
Reduktion Zellzahl in % (MTx vs. PBS)	41%	34%	7%

Die MTx-Behandlung von C57BL/6J- und Abcg2 ^{-/-} Tieren führt zu einer Reduktion der Zellzahlen sowohl von **Makrophagen** als auch von **B-Lymphozyten** im ZNS der Tiere, verglichen mit der dazugehörigen PBS-Kontrollgruppe. MTx-Applikationen bewirken eine vermehrte Reduktion beider Zelllinien in Abcg2 ^{-/-} Mäusen, vergleicht man diese mit behandelten MTx-C57BL/6J-Mäusen. Die Differenz beträgt sieben bis acht Prozent.

In Abcg2 ^{-/-} Tieren bewirkt die MTx-Applikation im Hinblick auf die **T-Lymphozyten**-Anzahl im ZNS eine eindeutige Reduktion im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu führt die MTx-Injektion bei den Wildtyptieren (C57BL/6J) zu keiner eindeutigen Reduktion der T-Zellzahlen gegenüber ihrer PBS-Kontrollgruppe.

Betrachtet man die **Demyelinisierungsrate** in den RM von Abcg2 ^{-/-} Tieren, welche mit MTx behandelt wurden, so kann diesbezüglich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion der Demyelinisierung beschrieben werden. Auf der anderen Seite findet keine signifikante Reduktion der Demyelinisierungsrate in MTx-behandelten C57BL/6J-Tieren im Vergleich zu ihrer PBS-Kontrollgruppe statt.

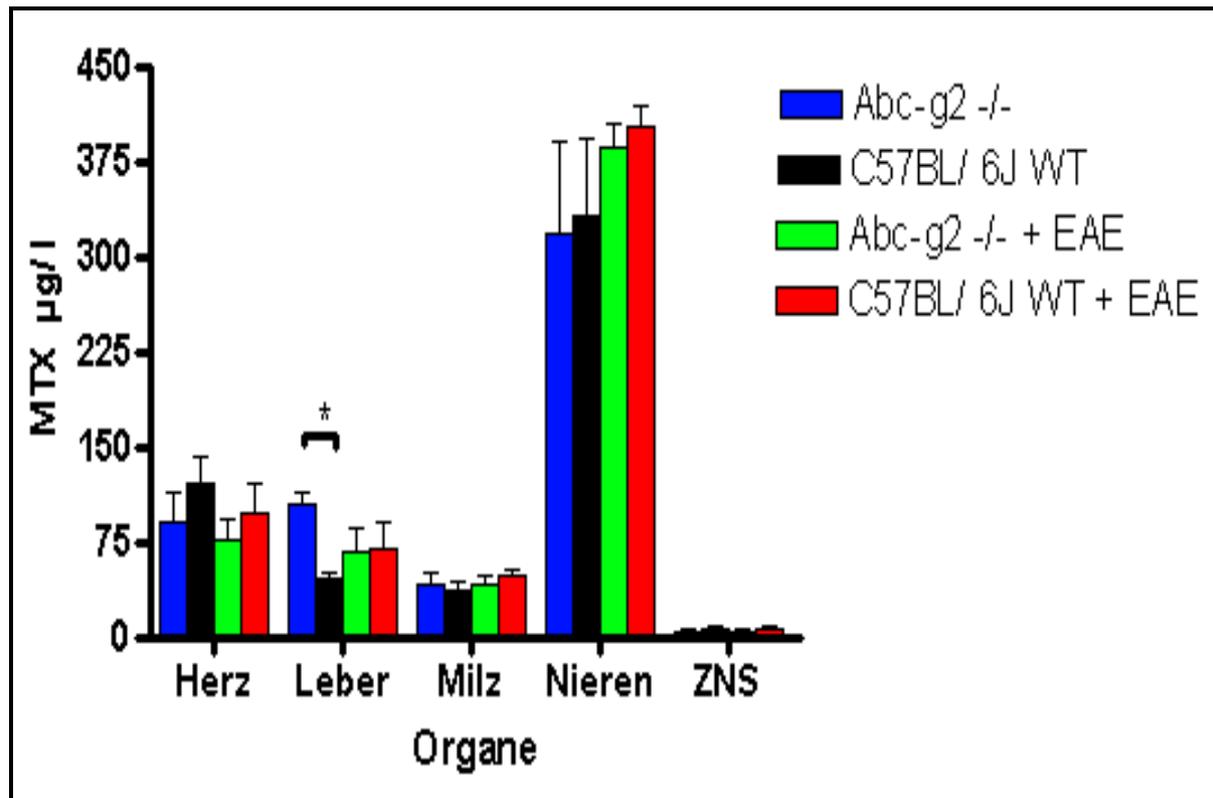
3.6 Drug monitoring von MTx

Die Expression der MDR-Transporter findet in Organen auf unterschiedlichen Niveaus statt. Mittels der HPLC/MS-Methode kann die MTx-Konzentration in verschiedenen Geweben von Mäusen bestimmt und somit eine Aussage über die Verteilungsmuster der MDR-Transporter in Organen sowie deren Bezug zur MTx-Konzentration getroffen werden. Folgender Versuch illustriert die MTx-Konzentrationen in fünf unterschiedlichen Organen, welche jeweils von vier verschiedenen Mausexperimenten stammen.

Dazu werden jeweils drei Abcg2 ^{-/-} Mäuse und drei C57BL/6J-WT-Mäuse mit 0,5 mg/kg KG MTx an drei aufeinander folgenden Tagen behandelt. Schließlich erfolgt die Verarbeitung der Organe, zwei Stunden nach der letzten MTx-Injektion. In jeweils drei Abcg2 ^{-/-} Mäusen und drei C57BL/6J-WT-Mäusen erfolgt die Induktion einer EAE und die MTx-Behandlung (0,5 mg/kg KG) der Tiere an den Tagen 12/13 und 14.

Die Organentnahme und Verarbeitung erfolgt auch in diesem Versuchsansatz ungefähr zwei Stunden nach der letzten MTx-Injektion.

Die aus den jeweiligen Versuchsgruppen entnommenen Organe werden zu Extrakten verarbeitet (2.2.5.1, S.44), welche an einem Tag anhand der HPLC/MS-Methode analysiert werden.



Tab. 8: HPLC/MS Ergebnisse. Mittelwerte der Gruppen: **Abcg2 -/- MTx** (Herz 91 µg/l; Leber 105 µg/l; Milz 42 µg/l; Nieren 320 µg/l; ZNS 4 µg/l); **C57BL/6J-MTx** (Herz 123 µg/l; Leber 47 µg/l; Milz 38 µg/l; Nieren 333 µg/l; ZNS 7 µg/l); **Abcg2 -/- + EAE + MTx** (Herz 77 µg/l; Leber 67 µg/l; Milz 42 µg/l; Nieren 387 µg/l; ZNS 5 µg/l); **C57BL/6J + EAE + MTx** (Herz 102 µg/l; Leber 62 µg/l; Milz 46 µg/l; Nieren 404 µg/l; ZNS 7 µg/l). Gruppen à 3 Tieren. Signifikanz: * $P < 0,05$ (Abcg2 -/- MTx vs. C57BL/6J-MTx in der Leber). Mann-Whitney U-Test.

Die Akkumulation von MTx ist in den Organen Herz, Leber, Milz, Nieren und ZNS bezogen auf die Menge in µg/l unterschiedlich. Es lassen sich klare Differenzen bezüglich der Konzentration in diesen Organen beschreiben. Fasst man dabei jeweils die 4 Versuchsgruppen (Abcg2 -/- MTx + C57BL/6J-MTx + Abcg2 -/- EAE-MTx + C57BL/6J-EAE-MTx) zusammen, so kann die größte Konzentration von MTx

in den Nieren > Herz \geq Leber > Milz > ZNS, gemessen werden. Vergleicht man die einzelnen Gruppen (Abcg2 -/- MTx, C57BL/6J-MTx, Abcg2 -/- EAE-MTx, C57BL/6J-EAE-MTx) für das jeweilige Organ untereinander, so lassen sich, bis auf eine Ausnahme, weder signifikante noch tendenzielle Unterschiede beschreiben. Bei der Ausnahme handelt es sich um den signifikanten Unterschied zwischen der Abcg2 -/- MTx- und der C57BL/6J-MTx-Gruppe in der Leber. Die Tiere der Abcg2 -/- MTx-Gruppe zeigen mit 105 $\mu\text{g/l}$ MTx einen signifikant höheren durchschnittlichen Konzentrations-Wert als die Tiere der C57BL/6J-MTx-Gruppe mit 47 $\mu\text{g/l}$ MTx.

4 Diskussion

4.1 MTx-Therapie in C57BL/6J-EAE-Mäusen

Die Eskalationstherapie verschiedener MS-Verläufe (RR-MS, SP-MS, RP-MS) beinhaltet zur Stabilisierung von progredienten Sequenzen die therapeutische Applikation von MTx (Neuhaus et al. 2006).

Die Erforschung der Wirksamkeit, der Wechselwirkungen und der UAWs von MTx finden in verschiedensten EAE-Tiermodellen und unter unterschiedlichsten Konditionen statt. Im Rahmen dieser Dissertation erfolgt die in-vivo-Verwendung von MTx in der C57BL/6J-Maus. Grundlage der MTx-Injektionen ist die Induktion einer EAE durch die einmalige, subkutane Applikation von MOG₃₅₋₅₅-Protein und complete Freund-Adjuvans, wobei die Bluthirn-Schranke durch die intraperitoneale Applikation von Pertussis-Toxin an Tagen 0 und 2 überwunden werden soll. Die MTx-Behandlung der akuten EAE erfolgt intravenös an Tag 12/ 13/ 14 und 16 nach der Immunisierung.

4.1.1 EAE - ein suffizientes Modell für die MS

Damit Ergebnisse aus EAE-Tierversuchen Einfluss auf zukünftige Entscheidungen zu Therapiemodalitäten in der Behandlung der MS nehmen können, ist es von Nöten, mit der EAE ein Modell zu beschreiben, welches grundsätzlich mit der MS verglichen werden kann.

Generell kann davon ausgegangen werden, dass es der EAE in vielen Punkten gelingt, einer MS gerecht zu werden. Es ist möglich, jeweils Teilaspekte von Induktion, Prozess und Progress der MS durch EAE-Tiermodelle patho-physiologisch zu rekonstruieren. Trotzdem gibt es bezogen auf die EAE als Korrelat zur MS durchaus differierende Meinungen. Aus dem Lager der Widersacher wird der EAE vor- geworfen, dass sie durch ihre Induktion der Komplexität der MS keinesfalls gerecht wird (Sriram und Steiner 2005). Aus diesem Grund stelle die EAE kein

geeignetes Modell dar, welches in der Lage sei, Therapien hervorzubringen, die in der Behandlung der MS von Nöten sein könnten. Steinman und Zamvil antworten darauf 2006 vielversprechend, indem sie auf die Fakten aufmerksam machen die besagen, dass das Model der EAE zu der Entwicklung und Etablierung von drei überaus wichtigen und aktuellen Therapie-Möglichkeiten in der Behandlung der MS beigetragen hat (Glatirameracetat, Natalizumab und MTx) (Steinman und Zamvil 2006). Die initiale Verwendung von MTx in der EAE geht bis ins Jahr 1985 zurück. Auf der Suche nach einem zytotoxisch wirksamen, jedoch im Vergleich zu anderen Chemotherapeutika eine geringere Kardiotoxizität aufweisenden Zytostatikum applizierten Ridge et al. 1985 MTx erstmals erfolgreich in EAE-Ratten. Nach weiteren Publikationen zur Verwendung des MTx in EAE-Tiermodellen haben die ersten randomisierten MRT-kontrollierten Studien zur Wirksamkeit des MTx in der MS stattgefunden (Edan et al. 1997; Millefiorini et al. 1997). Die Zulassung des MTx zur Therapie der MS in Deutschland erfolgte nach Veröffentlichung der MIMS-Studie durch die Gesundheitsbehörden (Hartung et al. 2002). Als Eskalationstherapeutikum erfährt MTx seine Verwendung mittlerweile in RR-MS-, SP-MS- und RP-MS-Verläufen (Fox 2004; Boster et al. 2008).

Die Tatsache, dass eine experimentell erzeugte Krankheit der MS nicht gerecht werden soll, weil sie die Komplexität im Entstehungsprozess dieser Erkrankung nicht aufzeigen kann, ist deshalb schwer verständlich. Erst recht, wenn man bedenkt, dass einzelne EAE-Modelle in der Lage sind, Teilaspekte der MS, welche selbst eine nicht homogene Erkrankung darstellt, in breitem Spektrum zu illustrieren. Wäre es zu diesem Zeitpunkt möglich, die Ätiologie, den Krankheitsprozess und auch den Progress der MS vollends zu erklären, so wäre man durchaus in der Situation, solche Umstände bemängeln zu können. Eine Möglichkeit der EAE-Induktion besteht durch die Applikation von MOG₃₅₋₅₅ -Antigen und der daraus resultierenden Immunantwort, die sowohl zelluläre als auch humorale Komponenten aufweist. Neben den T-Lymphozyten, deren Rolle in der MS lange bekannt zu sein scheint, ermöglicht dieses EAE-Modell auch einen Blick auf die B-Zellen, welchen durch ihre gerichtete Antikörperproduktion eine zunehmend wichtige Rolle in der Pathogenese der MS zugedacht wird (Ziemssen und Ziemssen 2005). Oliver et al. demonstrieren diesbezüglich 2003 die wichtige Rolle der Antikörperproduktion im C57BL/6J-EAE-Mausmodell, welches mit humanem MOG-Protein behandelt wurde und damit eine Verbindung zur Pathophysiologie der MS illustriert (Oliver et al. 2003).

4.1.2 MTx - Applikationsschema

Dem einleitend erwähnten Applikationsschema gehen Versuche voraus, in denen die Injektion von MTx zu verschiedenen Zeitpunkten und in verschiedenen Schemata evaluiert wird. Grundsätzlich wird die Etablierung eines therapeutisch wirksamen Schemas in Anlehnung an die Verwendung des MTx in der MS angestrebt. Schemata, die in der Literatur angewandt werden, um ein Ausbleiben der EAE-Manifestationen sowohl klinischer als auch histologischer Art zu bewirken, werden deshalb nicht berücksichtigt. Bereits im Jahre 1987 konnten Lublin et al. diesbezüglich demonstrieren, dass die Behandlung von (SJLxBALB/c)F1-EAE-Mäusen mit intraperitoneal verabreichtem MTx (0,5 mg/kg KG) ab dem Zeitpunkt der Immunisierung (mit RM-Homogenat) und für zwölf aufeinander folgende Tage zum kompletten Ausbleiben von klinischen Symptomen führte. Auch histologisch konnten durch diese Konstellation nur minimale pathologische Veränderungen in den Versuchstieren beschrieben werden (Lublin et al. 1987). Ähnliche Effekte konnten zu dieser Zeit auch in Lewis-Ratten illustriert werden (Ridge et al. 1985; Levine und Saltzman 1986). Obwohl die präventive MTx-Gabe überaus eindrucksvolle Ergebnisse liefert, soll diese Art des Applikationszyklus aufgrund mangelnder klinischer Relevanz außer Acht gelassen werden.

Die ersten Applikationszyklen dieser Dissertation orientierten sich deshalb an dem Gesundheitszustand der Mäuse. Demnach erfolgten die ersten MTx-Injektionen in den Versuchen 3.2.1.1, S.49 und 3.2.1.2, S.51 zu Zeitpunkten, an denen die Tiere bereits manifeste EAE-Krankheitsmerkmale aufwiesen. Die Anzahl der MTx-Injektionen belief sich im ersten Experiment auf drei (Tag X, Tag X+2, Tag X+4), wurde jedoch für die folgenden Experimente aufgrund ausbleibender klarer Wirkung auf vier Injektionen an den Tagen X, X+1, X+2, X+4 moduliert. Da in diesen Experimenten generell keine überzeugenden Daten gewonnen werden konnten, erfolgte für die kommenden Versuche die Terminierung der ersten MTx-Applikation auf einen früheren Zeitpunkt. Die Behandlung der EAE in einem früheren Stadium sollte dementsprechend mit einer fest umrissenen positiven Beeinflussung des Verlaufs einhergehen. Anhand dieser Überlegungen entstand jenes Applikationsschema (Tag 12, 13, 14 +16), welches in den folgenden Experimenten zur Anwendung kommen sollte. Der Versuch, die EAE zu einem abermals früheren

Zeitpunkt (erste MTx Injektion an Tag 9) aussagekräftiger beeinflussen zu können, konnte unter 3.4.1, S.61 keinesfalls untermauert werden und wurde deshalb folgend außer Acht gelassen.

4.1.3 MTx-Dosis und Applikationsmechanismus

Neben dem Applikationsschema galt es sowohl eine geeignete MTx-Dosis abzugrenzen, als auch einen passenden Applikationsmechanismus zu bestimmen. In der Literatur wird diesbezüglich von Watson et al. die MTx-Behandlung von SJL-EAE-Mäusen dargestellt. Die Tiere wurden erstmals an Tag 12 nach der Immunisierung mit 2,5 mg/kg MTx, intraperitoneal, behandelt. Nach mehrfacher MTx-Applikation zeigt der EAE-Verlauf der Mäuse ein positives Ansprechen auf die Therapie (Watson et al. 1991).

Der Applikationsmechanismus wurde für diese Arbeit grundlegend überdacht, mit dem Ergebnis, dass die intravenöse Injektion die einzige Möglichkeit darstellt, den Bezug zur MTx-Therapie des MS-Patienten weiterhin verfolgen zu können. Demnach wurden der intraperitonealen, der subkutanen und der intrathekalen MTx-Injektion in dieser Dissertation aufgrund des großen Spektrums an lokalen und systemischen Nebenwirkungen, keine weitere Bedeutung beigemessen.

Die MTx-Konzentrationen wurden in den ersten Dosis-Versuchen einem breiten Intervall entnommen (3.2.1.1, S.49 + 3.2.1.2, S.51). Dabei wurde schnell deutlich, dass niedrige Dosen (0,05 mg/kg KG MTx) keinen positiven Effekt bezüglich des EAE-Krankheitsverlaufes bewirken. Im Gegensatz dazu zeigte die hohe MTx-Dosis (2,5 mg/kg KG) eine letale Wirkung, obwohl sowohl Watson et al. als auch Baker et al. einen positiven Effekt dieser MTx-Dosis illustrierten (Watson et al. 1991; Baker et al. 1992). Die Dosis-Intervalle wurden daraufhin enger gesteckt. In Anlehnung an die Ergebnisse von Lublin et al. und Fidler et al. wurde für folgende Experimente die Dosis von 0,5 mg/kg KG MTx als Standarddosis disponiert, nachdem auch in eigenen Experimenten aussagekräftige Ergebnisse evaluiert werden konnten (Fidler et al. 1986a; Fidler et al. 1986b; Lublin et al. 1987).

Bei der Verwendung alternativer Dosen wurde deutlich, dass der EAE-Krankheitsverlauf durch die niedrigere Dosis von 0,2 mg/kg KG MTx nur begrenzt zu beeinflussen war. Auf der anderen Seite konnte durch die höhere Dosis von 1,0

mg/kg KG MTx kein besserer Effekt im Vergleich mit der Dosis von 0,5 mg/kg KG MTx erzielt werden. Deshalb wurden die Dosen von 0,2 und 1,0 mg/kg KG MTx für folgenden Experimente zuerst vernachlässigt.

4.1.4 MTx - Wirkmechanismus

Die MTx-Therapie von C57BL/6J-Mäusen mündet in einer verminderten Infiltration von B-Zellen (B220⁺), T-Zellen (CD3⁺) und von Makrophagen (MAC3⁺) im ZNS der behandelten Tiere. Diesbezüglich stimmen die Ergebnisse mit den Beobachtungen von Fidler et al. 1986 überein. Die zellulären Veränderungen unter der MTx-Therapie beziehen sich auf den Vergleich mit C57BL/6J-EAE-Kontrolltieren, welche zu gleichen Teilen mit PBS behandelt wurden. Aufgrund mangelnder Signifikanz (Mann-Whitney) lässt sich der Unterschied in der Behandlung nur tendenziell beschreiben. Klare Tendenzen lassen sich ebenfalls beschreiben, betrachtet man die Rate an Demyelinisierung im ZNS von behandelten Tieren und Kontrolltieren. Die mit MTx behandelten Tieren weisen in der LFB-Färbung eine prozentual geringere Demyelinisierung des ZNS im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (3.5.5, S.75).

4.1.5 MTx - alternative Therapieoptionen

Es gelingt in den Experimenten, die Wirksamkeit von MTx in der C57BL/6J-EAE-Maus darzustellen. Der Verlauf der akuten EAE kann in der frühen Phase der Erkrankung modifiziert werden. Die Applikation von MTx führt jedoch nicht nur zu positiven Ergebnissen. Sehr schnell konnte die Toxizität des MTx verdeutlicht werden. Wie zuvor bereits angedeutet, führen vier intravenöse MTx-Injektionen von 2,5 mg/kg KG zum Exitus letalis von 80% der behandelten Mäuse (3.2.1.2, S.51). Erneut soll an dieser Stelle auf die in der Fachliteratur oftmals beschriebene Kardiotoxizität des MTx (Martinelli et al. 2009) hingewiesen werden, welche bereits in oben beschriebenen Dosen einen Grund für das abrupte Ableben der Tiere darstellen könnte. Da diese Probleme zu der kumulativen MTx-Gesamtdosis von 100-140 mg/m² KOF für die Behandlung der MS geführt haben, dauert die Suche nach Alternativen zum MTx an. So untersuchten Piao et al. 2007 alternativ zum MTx

die Wirkung von Ethonafide, welches in seiner chemischen Struktur dem MTx sehr ähnlich ist. Es konnte eine geringere Kardiotoxizität evaluiert, jedoch die positive Wirkung des MTx auf den EAE-Krankheitsverlauf durch die Gabe von Ethonafide nicht zufriedenstellend etabliert werden (Piao et al. 2007). In EAE-Ratten wurde von Mazzanti et al. 2005 das immunsuppressive Pixantron mit seiner Wirkung auf die Zellen des Immunsystems diskutiert. Die Ergebnisse reichen auf zellulärer Ebene an die des MTx heran. Dem Pixantron, welches dem MTx strukturverwandt ist, wurde eine geringere Kardiotoxizität nachgewiesen (Mazzanti et al. 2005). Zukünftige Experimente werden zeigen, ob die Wirkung des Pixantron mit der breiten immunsuppressiven Wirkung des MTx vergleichbar ist. Eine andere Variante, die Kardiotoxizität des potenten MTx abzuschwächen, kann die Kombitherapie mit Dexrazoxan, einem Kardioprotektor auf Basis eines Eisen-III-Chelators, darstellen (Pai und Nahata 2000). Im Jahr 2004 konnten Weilbach et al. in EAE-Ratten die kardioprotektive Wirkung des vor der MTx-Therapie zu applizierenden Dexrazoxane nachweisen. Neben diesem Effekt konnte eine stärkere Immunsuppression unter der Kombi-Therapie (MTx + Dexrazoxan), verglichen mit einer MTx-Monotherapie, illustriert werden (Weilbach et al. 2004).

4.2 Mitoxantron-Therapie in Abcg2 -/- Mäusen

Nachdem die Wirksamkeit des MTx in der C57BL/6J-Maus rekapituliert und neben dem Applikationsschema die Dosis und der Applikationsmechanismus abgestimmt werden konnten, erfährt MTx seine Verwendung in der Abcg2 -/- Maus.

4.2.1 MTx in Abcg2 -/- EAE-Mäusen

Dem Abcg2-Transporter wird als MDR-Transporter beim zellulären Efflux von MTx eine wichtige Rolle beigemessen (Sharom 2008). Die Wirkung der MTx-Applikation auf die Abcg2 -/- EAE-Maus soll mit der Wirkung auf C57BL/6J-EAE-Mäuse durch synchrone MTx-Applikation verglichen werden.

Die Ergebnisse zur MTx-Therapie in *Abcg2*^{-/-} Mäusen illustrieren einen besseren Therapieerfolg dieser EAE-Tiere verglichen mit den gleichzeitig behandelten C57BL/6J-EAE-Mäusen. Eine Behandlung beider Mausmodelle mit 0,5 mg/kg KG MTx bewirkt, bezogen auf die Klinik der Tiere, einen signifikanten Unterschied zugunsten der *Abcg2*^{-/-} Tiere (3.3.1, S.55 + 3.3.2, S.57). Diese Tendenzen können ebenfalls in den histologischen Untersuchungen beschrieben werden. Die MTx-Behandlung bedeutet abnehmende Zellzahlen von Makrophagen, T-Lymphozyten und B-Lymphozyten (3.5.5, S.75) in den RM jener Tiere. Die prozentuale Reduktion der drei Zelllinien findet in den *Abcg2*^{-/-} Mäusen mit den aussagekräftigsten Ergebnissen statt. Dabei ist die eindeutigste Tendenz unter MTx-Behandlung in den Zellzahlen der CD3⁺-T-Lymphozyten zu beschreiben. Beschriebene Tendenzen differieren mit den in-vitro-Ergebnissen der Experimente von Chan et al., welche 2005 einen stärkeren depletiven Effekt des MTx auf kultivierte humane B-Zellen (CD19⁺) verglichen mit der Wirkung des MTx auf die Reduktion von (CD8⁺)-T-Zellen beschreiben (Chan et al. 2005). Die MTx-Therapie bewirkt diesbezüglich in *Abcg2*^{-/-} Mäusen eine 55%ige Reduktion der T-Lymphozyten-Zahlen verglichen mit der unter PBS-Behandlung stehenden *Abcg2*^{-/-} Kontrollgruppe. Bei den mit MTx behandelten C57BL/6J-WT-Mäusen kann diesbezüglich nur eine 15%ige Reduktion der T-Lymphozyten-Zellzahlen verglichen mit den Kontrolltieren unter PBS-Behandlung dokumentiert werden. Es sei darauf hingewiesen, dass auch B-Zellen (B220⁺) und Makrophagen (MAC⁺) unter der MTx-Behandlung eine Reduktion erfahren, jedoch sind diese und die Tendenzen zwischen *Abcg2*^{-/-} und Kontrollgruppe unter MTx-Behandlung wesentlich schwächer ausgeprägt, vergleicht man jene mit der Reduktion von Zell-Zahlen der CD3⁺-T-Lymphozyten unter MTx-Therapie.

Eindeutige Unterschiede können ebenfalls beschrieben werden, untersucht man die RM der Tiere im Hinblick auf Demyelinisierungen. Diese bedeuten einen erheblichen Einfluss, hinsichtlich des Krankheitsverlauf der EAE, und stellen schließlich als Demyelinisierungen auch im ZNS von MS-Patienten eine wichtige Einflussgröße bezogen auf den individuellen Krankheitsverlauf dar. Die prozentuale Reduktion der Demyelinisierung im ZNS findet innerhalb der *Abcg2*^{-/-} MTx- verglichen mit der PBS-Kontrollgruppe auf signifikantem Niveau statt. Hingegen besteht in der C57BL/6J-Gruppe zwischen der MTx- und der PBS-Kontrollgruppe ein tendenzieller, jedoch nicht signifikanter Unterschied bezogen auf die Demyelinisierungsraten des ZNS.

Die Applikation von MTx ermöglicht einen klinisch stärkeren Dosis-Effekt in Abcg2-/- Tieren darzustellen, vergleicht man diese mit der MTx-Wirkung auf C57BL/6J-WT-Tiere. Außerdem spiegelt sich der beschriebene Dosis-Effekt in einer aussagekräftigeren Reduktion der Zelllinien des Immunsystems (Makrophagen, B- und T-Lymphozyten) und einem geringeren Grad an Demyelinisierung im ZNS von Abcg2 -/- Mäusen wider.

4.2.2 Abcg2 +/- EAE-Mäuse und die Wirkung von MTx

Aufgrund dieser eindeutigen Ergebnisse soll die Wirkung des MTx auf heterozygote Abcg2-EAE-Mäuse evaluiert werden, um einen möglichen Gendosis-Effekt, in Analogie zu den SNPs des Menschen, darzustellen zu können. Dabei wird jedoch im Versuchsaufbau deutlich, dass sich die Realisierung eines sechs-armigen Versuches (Abcg2 +/- MTx-, Abcg2 -/- MTx-, C57BL/ 6J MTx- zusätzlich zur jeweiligen PBS-Kontrollgruppe) im Gegensatz zu den ansonsten durchgeführten vier-armigen Versuchen als schwieriger gestaltet. Sowohl der EAE-Krankheitsbeginn als auch die EAE-Progression sind schwer terminierbar und stellen deshalb bei der multiplen Anzahl von Gruppen ein relatives Problem dar, die Bildung homogener Kollektive sicherzustellen, denen unter gleichwertigen Bedingungen MTx oder PBS verabreicht werden kann.

In 3.4.1, S.61 kann ein tendenzieller Unterschied zwischen den illustrierten Gruppen beschrieben werden. Die Kurven der Kontrollgruppen verlaufen nicht identisch. Es bestehen tendenzielle Unterschiede zwischen den EAE-Krankheitsverläufen der drei Gruppen, welche mit MTx behandelt wurden (Scorewerte: C57BL/6J > Abcg2 +/- > Abcg2 -/-). Nun stellt sich jedoch die Frage ob der zuvor beschriebene, klare Unterschied zwischen den zwei MTx-Gruppen (Abcg2 -/- vs. C57BL/6J in 3.3.1, S.55 + 3.3.2, S.57) ebenfalls innerhalb dieser drei Gruppen derart eindeutig beschrieben werden kann. Auch wenn sich die Abgrenzung der einzelnen EAE-Krankheitsverläufe schwieriger gestaltet als in 3.3.1, S.55 und 3.3.2, S.57, so ist es generell möglich, einen Gendosis-Effekt in der Abcg2 +/- MTx-Gruppe zu postulieren. Die exakte Interpretation der MTx-Wirksamkeit in den Abcg2 +/- EAE-Tieren gestaltet sich jedoch weiterhin als schwierig.

Es bleibt deshalb an dieser Stelle bezüglich der Charakterisierung offen, ob die MTx-Behandlung von Abcg2 +/- EAE-Tieren eher in Richtung der MTx-Behandlung und deren Erfolg in Abcg2 -/- EAE-Tieren tendiert oder ob die Behandlung der Abcg2 +/- EAE-Tiere tendenziell an die Wirkung der MTx-Behandlung in C57BL/6J-EAE-WT-Tieren heranreicht.

4.2.3 Zusammenfassung: MTx in Mäusen

Aufgrund der EAE-Experimente kann davon ausgegangen werden, dass die Applikation von MTx in Abcg2 -/- Mäusen mit einem aussagekräftigeren Therapieerfolg einhergeht, vergleicht man diesen mit der MTx-Wirkung in Wildtypmice (C57BL/6J) die mit den gleichen MTx-Mengen behandelt worden sind. Auch die Behandlung von heterozygoten Mäusen zeigt eine effektive Wirksamkeit des MTx, nur ist es schwer, diese Tendenzen mit der Wirksamkeit des MTx in den Mausmodellen Abcg2 -/- und C57BL/6J zu vergleichen.

In der Literatur wird das MTx als eines der Hauptsubstrate für den ABCG2-Transporter beschrieben und seine Bedeutung für den zellulären Efflux des MTx hervorgehoben (Robey et al. 2007). Trotzdem sind auch andere MDR-Transporter in der Lage, das MTx aus der Zelle zu befördern. Namentlich gehören dazu die Transporter ABCB1 (P-glycoprotein) und ABCC1 (MRP-1) (Schinkel und Jonker 2003).

Unter dieser Voraussetzung liegt die Überlegung nahe, dass die Zellen eines Abcg2-defizienten Tieres als Reaktion auf eine MTx-Applikation die Expression der alternativen MDR-Transporter steigern, um der drohenden Toxizität entgegenzuwirken. Etwaige Überlegungen konnten zumindest teilweise unter 3.1.2, S.47 widerlegt werden. In diesem Versuch war es nicht möglich, eine gesteigerte Expression zumindest der MDR-Transporter Abcb1a und Abcb1b unter der Applikation von MTx festzustellen. Gleichzeitig decken diese RT-qPCR-Experimente nur die Auswirkung einer kurzzeitigen MTx-Applikation auf den Organismus der Mäuse ab. Weiterhin bleibt die Frage offen, ob eine rezidivierende MTx-Therapie über mehrere Monate/Jahre, wie sie beim MS-Patienten zur Anwendung kommt, eine Veränderung des Expressionsmusters der MDR-Transporter hervorruft. Im Umkehrschluss müssten solche Umstände dazu führen, dass auch bei Abcg2 -/-

Tieren eine Inhibition der anderen Transporter erfolgen muss, um eine dauerhafte Wirksamkeit der MTx-Therapie zu gewährleisten.

4.2.4 MTx-Konzentrationen in Geweben von Abcg2 -/- Mäusen

Anschließend an die MTx-Experimente erfolgte zum Abschluss der Versuchsreihe die Messung von MTx-Organkonzentrationen anhand der HPLC/MS-Methode. Die Messung der MTx-Konzentrationen erfolgte in den Organen sowohl von behandelten C57BL/6J-, C57BL/6J-EAE-, als auch von Abcg2^{-/-}, bzw. Abcg2^{-/-} EAE-Mäusen. Die Anfertigung dieses Experimentes erfolgte aufgrund der Hypothese möglicherweise höhere MTx-Konzentrationen in den Organen von Mäusen nachweisen zu können, die eine Defizienz in einem der MDR-Transporter besitzen (Abcg2^{-/-}, Abcg2^{-/-} EAE-Tiere). In Anlehnung an die bessere Wirksamkeit der MTx-Behandlung in der Abcg2^{-/-} EAE-Maus verglichen mit der C57BL/6J-EAE-Maus lieferten die HPLC/MS-Experimente diesbezüglich keine eindeutigen Werte, die darauf hinweisen, dass sich die Organe von behandelten Abcg2^{-/-} Tieren im Vergleich zu C57BL/6J-Tieren mit höheren Konzentrationen von MTx konfrontiert sehen. Die vier Versuchsgruppen (Abcg2^{-/-} + MTx, C57BL/6J + MTx, Abcg2^{-/-} + EAE + MTx, C57BL/6J + EAE + MTx) bestehen in diesen ersten Versuchen aus jeweils drei Tieren. Die Präparation von deren Organen erfolgt zwei Stunden nach der letzten von insgesamt drei MTx-Injektionen. Die gefundenen MTx-Konzentrationen von Nieren > Herz ≥ Leber > Milz > ZNS stimmen zumindest teilweise mit den Ergebnissen von Rentsch et al. (1996) überein. Diese beschreiben über einen Zeitverlauf von 24 Stunden die gefundenen MTx-Konzentrationen in den verschiedenen Organen. In den Nieren scheint das MTx zumindest sehr rasch nach der Applikation anzufuten, wahrscheinlich nicht zuletzt weil diese ein großes Blutminuten-Volumen besitzen. Die höchsten MTx-Konzentrationen lassen sich jedoch in der Leber bestimmen, wobei in Herz und Milz die niedrigsten Konzentrationen nachgewiesen werden (Rentsch et al. 1996). Johnsson et al. beschreiben unter Verwendung von liposomal verpacktem MTx die höchsten MTx-Konzentrationen in Leber und Milz > Nieren > Herz (Johnson et al. 2004).

Es gelingt im Rahmen dieser Dissertation die Bestimmung von MTx-Konzentrationen in verschiedenen Organen durch die beschriebene HPLC/MS-Methode. Die Generierung von aussagekräftigen Ergebnissen wird durch die Verwendung größerer Tierzahlen sicherlich möglich sein, wobei dem Zeitpunkt der Organentnahme in Relation zur letzten MTx-Applikation erneute Begutachtung gewidmet werden sollte. Das Organsystem wird zum Zeitpunkt der Organentnahmen sicherlich überladen gewesen sein. Interpretationswürdige Aussagen zu differierenden MTx-Konzentrationen in den verschiedenen Organen beider Mauslinien (Abcg2 -/-; C57BL/6J) werden wohl nur möglich sein, wenn die Analysen zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt und damit zumindest die akute Elimination des MTx vonstatten gegangen ist.

4.3 Der humane ABCG2-Transporter

Die Rolle und die Funktionen der MDR-Transporter stellen im menschlichen Organismus den Gegenstand der Forschung dar. Neben der Funktion sowohl des Zell- als auch Protektor ganzer Systeme des Körpers (ZNS, Fetus im maternalen Körper) (Mao 2008), kann dem Transporter bei der Exkretion körpereigener Abbauprodukte (konjugierte Gallensäuren in den GIT) große Bedeutung beigegeben werden (Polgar et al. 2008). Eine wichtige Rolle wird dem ABCG2-Transporter bei der Ernährung des Feten durch die Sekretion von Vitaminen in die Muttermilch zuteil. Jedoch ist der ABCG2-Transporter auch für die Sekretion, der sich im maternalen Kreislauf befindlichen zirkulierenden Noxen in die Muttermilch verantwortlich (Van Herwaarden und Schinkel 2006; Van Herwaarden et al. 2007).

Eine wichtige Komponente der Arzneitherapie stellt die individualisierte Dosisanpassung von Medikamenten dar. So konnten variierende orale Bioverfügbarkeiten und differierende Kinetiken ebenfalls in der Eliminierung von Medikamenten beobachtet werden, welche bekanntermaßen als Hauptsubstrate des ABCG2-Transporters gelten. In weiterführenden Experimenten gelang die Beschreibung verschiedener SNPs im DNA-Abschnitt, welcher die kodierende Region für den

ABCG2-Transporter darstellt (Cervenak et al. 2006). Zu diesen natürlich auftretenden Sequenz-Variationen gehören stille Mutationen, Missense-, eine Nonsense- und eine Framehift-Mutation, welche sich in der kodierenden Region des BCRP-Gens befinden (Backstrom et al. 2003; Honjo et al. 2002). Die Missense-Mutationen V12M und Q141K werden polymorph und in unterschiedlichen Allel-Frequenzen in ethnischen Bevölkerungsgruppen auf der Welt beobachtet (Backstrom et al. 2003; Kobayashi et al. 2005). Die V12M und Q141K Polymorphismen bewirken zum einen den fehlerhaften Einbau des ABCG2-Transporters in die apikalen Membranen der Zellen (V12M), zum anderen haben sie eine verminderte ATPase-Aktivität des Transporters zur Folge (Q141K) (Mizuarai et al. 2004). Die Konsequenz der beschriebenen Mutationen besteht in einer reduzierten, bzw. ausbleibenden Resistenzentwicklung z.B. medikamentös-toxisch belasteter Zellverbände. Die Zellen werden durch die Mutationen des Mechanismus beraubt, der ihnen im Regelfall (d.h. ohne Mutation im Transporter-Gen) ermöglicht, eine gesteigerte Expression des ABCG2-Transporters zu initiieren und dementsprechend einen erhöhten Efflux der zytotoxisch wirksamen Substanz vom intra- in den extrazellulären-Raum zu realisieren.

Neben der erhöhten zytotoxischen Belastung einzelner Zellverbände bedeuten Mutationen dieser Art eine umfangreiche Belastung für den gesamten Organismus und bedürfen deshalb gesonderter Betrachtung.

4.3.1 ABCG2-Transporter und MTx

Den klinischen Bezug dieser Beobachtungen liefern Patienten, die infolge einer Grunderkrankung auf Medikamente angewiesen sind, welche Substrate von MDR-Transportern darstellen. So beinhaltet die Eskalationstherapie zur Behandlung von MS-Patienten im fortgeschrittenen Stadium die Applikation von MTx. Dieses stellt wiederum eines der Hauptsubstrate für den ABCG2-Transporter dar (Robey et al. 2007), wobei sowohl der ABCB1- als auch der ABCC1-Transporter am zellulären Efflux von längerfristig applizierten MTx mitwirken.

Im Jahr 2009 untersuchten Cotte et al. die Häufigkeit zweier SNPs des *ABCG2*-Transporter-Gens (V12M; Q141K) und zwei SNPs im Gen für den *ABCB1*-Transporter.

Dafür wurde ein Patienten-Kollektiv von 832 an MS erkrankten Menschen untersucht. Das Kontrollkollektiv bildeten 263 gesunde Spender (von Ahsen et al. 2000). Die Analyse zu den Daten der MS-Patienten erfolgt nach 12-monatiger MTx-Behandlung. Die Untersuchungen ergeben, dass kein Unterschied bezüglich Ausprägung, Variation und Vorkommen der SNPs zwischen Erkrankten und Kontrollkollektiv beschrieben werden kann. Nur 14% der gesamten untersuchten Patienten weisen die natürliche Nukleotid-Sequenz für beide Gene (*ABCG2* und *ABCB1*) auf, womit die betroffenen Personen in der Lage sein sollten eine adäquate Resistenz gegenüber MTx, als Substrat der Transporter, auszubilden. Der prozentuale Anteil an Personen, die zumindest Heterozygotien für variante Allele in der Sequenz entweder für den *ABCG2*- oder aber für den *ABCB1*-Transporter aufweisen, beläuft sich auf 65% des untersuchten Kollektivs. Dementsprechend reagieren 65% der untersuchten Personen nicht mit einer adäquaten zellulären Resistenzentwicklung auf eine MTx-Therapie. In 21% der untersuchten Patienten konnten sogar Heterozygotien für variante Allele sowohl des *ABCG2*-, als auch des *ABCB1*-Transporters nachgewiesen werden. Diesem Patientenkollektiv wird es wahrscheinlich unmöglich sein eine adäquate zelluläre Resistenz auf Transporterebene, als Antwort auf eine MTx-Behandlung, zu entwickeln.

Die Überlegungen zu den Folgen der SNPs in den MDR-Transporter-Genen konnten in weiteren in-vitro Experimenten an isolierten (CD56⁺)-Zellen verifiziert werden. Die Zellen wurden von Personen des Kollektivs gewonnen, welche eine Heterozygotie varianter Allele in beiden Transportern (*ABCG2* + *ABCB1*) aufweisen. Diese CD56⁺-Zellen zeigen einen verminderten Efflux von appliziertem MTx und eine gesteigerte Zelltod-Rate, im Gegensatz zu isolierten CD56⁺-Zellen von Personen des Kollektivs, welche die natürliche Nukleotid-Sequenz in beiden Transporter-Genen aufweisen. Diese CD56⁺-Zellen illustrieren einen im Vergleich dazu gesteigerten Efflux und reduzierte Zelltod-Raten (Cotte et al. 2009).

4.3.2 MS und Therapieoptionen

Der unter 4.3.1, S.90 diskutierte Sachverhalt bietet klare Anhaltspunkte, die von einem gesteigerten Ansprechen einer MTx-Therapie bei Patienten ausgehen lassen, deren MDR-Transporter-Gene allelische-Variationen in Form von SNPs aufweisen.

Cotte et al. liefern diesbezüglich im Jahr 2009 aussagekräftige Ergebnisse (4.3.1, S.90).

Daraus ergeben sich für die nähere Zukunft klare Vorstellungen bezüglich der MTx-Therapie von MS-Patienten. Die individualisierte Therapieplanung, welche sich auf molekular-genetische Untersuchungen stützt, sollte Beachtung erfahren und zu einer Beschreibung von Therapiemodalitäten führen, die auf den einzelnen Patienten und dessen genetischen „MDR-Transporter-Hintergrund“ abgestimmt werden können. Demnach würden Patienten, welche über allelische Variationen in den Transporter-Genen (*ABCG2*, *ABCB1*, *ABCC1*) verfügen, mit geringeren Dosen zyklisch applizierten MTx behandelt, woraus sich wiederum ein zeitlich verlängertes MTx-Behandlungskonzept zur Eskalationstherapie ergeben könnte. An dieser Stelle sei erneut das Augenmerk auf die kumulative Gesamtdosis von 100-140 mg/m² KOF MTx (die Angaben variieren zwischen den einzelnen Autoren) gerichtet. Diese wurde etabliert nachdem die kardiotoxische Potenz des MTx verdeutlicht wurde. Ziel der kumulativen Gesamtdosis ist deshalb sowohl die Manifestierung von Herzinsuffizienzen, Kardiomyopathien und Arrhythmien gering zu halten, als auch ergänzende sekundäre Folgeschäden, wozu neuerdings ebenfalls die therapie-assoziierte akute Leukämie gehören sollte, unter MTx-Therapie auf ein Mindestmaß zu beschränken

Geringere MTx-Dosen würden deshalb das Erreichen der beschriebenen kumulativen Gesamtdosis hinauszögern. Etwaige Überlegungen betreffen jedoch nicht nur die mögliche Verlängerung eines MTx-Therapieplanes. In der Literatur werden Zwischenfälle beschrieben, bei denen MS-Patienten Nebenwirkungen der MTx-Therapie bereits weit vor Erreichen (Gesamtkonzentrationen <80 mg/m² KOF MTx) der kumulativen Gesamtdosis entwickeln (Dorr et al. 2009). Diese Ergebnisse geben Anlass zur Spekulation, dass durch den insuffizienten ABC-Transporter ein verminderter Efflux des MTx und auf Grund dessen eine Akkumulation in verschiedenen Zellverbänden erfolgt, welche innerhalb kurzer Zeitintervalle eine toxische Wirkung an unerwünschter Stelle bedingen kann. Anhand der gemessenen mRNA-Expressionen kann die Verteilung und die Konzentration des *ABCG2*-Transporters in verschiedenen Organen und Zellen illustriert werden. Die höchsten Konzentrationen des *ABCG2*-Transporters können in den Zellen von Leber, Myokard, ZNS und in natürlichen Killer-Zellen (CD56⁺) nachgewiesen werden (Cotte

et al. 2009). Die Verteilung der Transporter unterstreicht die Signifikanz einer MTx-Akkumulation und deren Ausmaß auf die Funktion der betroffenen Organsysteme. Es gibt genetische Konstellationen, die demnach die individualisierte MTx-Therapie in Folge der Typisierung zu einer protektiven Methode avancieren lassen, weil sich anhand derartiger genetischer Untersuchungen die toxischen Nebenwirkungen des MTx wohlmöglich auf ein Minimum beschränken lassen. Zusätzlich ist jedoch auch deutlich geworden, dass eine genetische Untersuchung, die das Vorhandensein von SNPs überprüft, ebenfalls von Nöten sein könnte, um die Mutationsträger vor den Nebenwirkungen einer zu hoch dosierten MTx-Therapie zu schützen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Gedankenansätze und die Durchführung der Experimente, welche zur Anfertigung der Dissertation geführt haben konnten realisiert und in zufriedenstellender Weise bestätigt werden. Die Rekapitulation der MTx-Wirksamkeit erfolgte neben der Etablierung eines Dosis-/ Therapieschemas in der C57BL/6J-EAE-Maus. Durch die vergleichende Applikation von MTx in der C57BL/6J- und der Abcg2 -/- EAE-Maus wurde deutlich, dass die insuffiziente Expression des Abcg2-Transporters die Wirkung des MTx zu verstärken vermag. Sichtbar wird die gesteigerte Wirksamkeit durch mildere Manifestationen im klinischen EAE-Verlauf der Abcg2 -/- Mäuse und durch die tendenziell niedrigeren Zellzahlen an Immunzellen (Makrophagen, B- und T-Lymphozyten) in den RM dieser Tiere im Vergleich zur C57BL/6J-EAE-WT-Gruppe. Ergänzend können signifikante Reduktionen der Demyelinisierungsraten im ZNS von Abcg2 -/- Mäusen bestätigt werden. Abschließende Experimente, welche einen Blick auf den womöglichen Gen-Dosis-Effekt der MTx-Therapie in Abcg2 +/- Tieren und damit vollends den Bezug zu den variierenden SNPs der Transporter-Gene des Menschen herstellen sollten, konnten nicht ausreichend verifiziert werden. Die Wirksamkeit des MTx kann auch in den heterozygoten Mäusen zufriedenstellend rekapituliert werden, nur fällt die Interpretation der Tendenzen zur vergleichenden Wirksamkeit (Abcg2 +/- vs. Abcg2 -/- vs. C57BL/6J) zu diesem Zeitpunkt noch sehr schwer.

An dieser Stelle könnte auf die Zukunft der MTx-Experimente in der Maus verwiesen werden. Neben etablierten knock-out-Mausmodellen für den Abcg2-Transporter gibt es derartige Modelle sowohl für den Abcb1-Transporter, als auch im kombinierten knock-out-Modell. Der Vergleich, die Interpretation von Bedeutung und die Interaktionen der Transporter für die MTx-Therapie in der Maus lassen Überlegungen offen und geben genügend Ansatz, die Experimente zur MTx-Therapie in der Maus fortzusetzen. Diese Ergebnisse sollen längerfristig der Humanmedizin dienen, die Anwendung individualisierter MTx-Therapien zur Behandlung der MS in Zukunft als Therapieoption in Erwägung ziehen zu können.

6 Literaturverzeichnis

Aboul-Enein F, Rauschka H, Kornek B et al. (2003): Preferential loss of myelin-associated glycoprotein reflects hypoxia-like white matter damage in stroke and inflammatory brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 62, 25-33

Amor S, Smith PA, Hart B, Baker D (2005): Biozzi mice: of mice and human neurological diseases. *J Neuroimmunol* 165(1-2), 1-10

Backstrom G, Taipalensuu J, Melhus H, Brandstrom H, Svensson AC, Artursson P, Kindmark A (2003): Genetic variation in the ATP-binding cassette transporter gene ABCG2 (BCRP) in a Swedish population. *Eur J Pharm Sci* 18(5), 359- 364

Bailey-Dell KJ, Hassel B, Doyle LA, Ross DD (2001): Promoter characterization and genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette transporter G2) gene. *Biochim Biophys Acta* 1520(3), 234-241

Baker D, O'Neill JK, Davison AN, Turk JL (1992): Control of immune-mediated disease of the central nervous system requires the use of a neuroactive agent: elucidation by the action of mitoxantrone. *Clin Exp Immunol* 90(1), 124-128

Barnes MP, Bateman DE, Cleland PG, Dick DJ, Walls TJ, Newman PK, Saunders M, Tilley PJ (1985): Intravenous (IV) methylprednisolone for multiple sclerosis in relapse. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 48, 157-159

Baxter AG (2007): The origin and the application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol* 7(11), 904- 912

Beck RW, Cleary PA, Anderson MM, 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. *N Engl J Med* 326, 581-588

Boster A, Edan G, Frohman E, Javed A, Stuve O, Tselis A, Weiner H, Weinstock-Guttman B, Khan O (2008): Intense immunosuppression in patients with rapidly worsening multiple sclerosis: treatment guidelines for the clinician. *Lancet Neurol* 7(2), 173-183

Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, Balow JE (1993): Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med* 119, 1198-1208

Bourquin C, Schubart A, Tobollik S, Mather I, Ogg S, Liblau R, (2003): Selective unresponsiveness to conformational B cell epitopes of the myelin oligodendrocyte glycoprotein in H-2b mice. *J Immunol* 171, 455-461

Brønnum-Hansen H, Koch-Henriksen N, Stenager E (2004): Trends in survival and cause of death in Danish patients with multiple sclerosis. *Brain* 127(4), 844-50

Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE (1988): Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 8790- 8794

Cervenak J, Andrikovics H, Ozvegy-Laczka C, Tordai A, Nemet K, Varadi A, Sarkadi B (2006): The role of the human ABCG2 multidrug transporter and its variants in cancer therapy and toxicology. *Cancer Lett* 234(1), 62-72

Chan A, Weilbach FX, Toyka KV, Gold R (2005): Mitoxantrone induces cell death in peripheral blood leucocytes of multiple sclerosis patients. *Clin Exp Immunol* 139(1), 152-158

Cisternino S, Mercier C, Bourasset F, Roux F, Scherrmann JM (2004): Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier. *Cancer Res* 64(9), 3296-3301

Clark CM, Fleming JA, Li D, Oger J, Klonoff H, Paty D (1992): Sleep disturbance, depression and lesion site in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 49, 641-643

Cotte S, von Ahsen N, Kruse N, **Huber B**, Winkelmann A, Zettl UK, Starck M, König N, Tellez N, Dorr J (2009): ABC-transporter gene-polymorphisms are potential pharmacogenetic markers for mitoxantrone response in multiple sclerosis. *Brain* 132 (9), 2517-2530

De Isabella P, Palumbo M, Sissi C, Capranico G, Carenini N, Menta E, Oliva A, Spinelli S, Krapcho AP, Giuliani FC (1995): Topoisomerase II DNA cleavage stimulation, DNA binding activity, cytotoxicity, and physico-chemical properties of 2-aza- and 2-aza-oxide-anthracenedione derivatives. *Mol Pharmacol* 48(1), 30-38

Dorr J, Bitsch A, Schmailz KJ, Chan A, von Ahsen N, Hummel M, Varon R, Lill CM, Vogel HP, Zipp F (2009): Severe cardiac failure in a patient with multiple sclerosis following low-dose mitoxantrone treatment. *Neurology* 73(12), 991-993

Doyle LA, Ross DD (2003): Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 22(47), 7340-7358

Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD (1998): A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26), 15665-15670

Ebers GC, Traboulsee A, Li D, Langdon D, Reder AT, Goodin DS, Bogumil T, Beckmann K, Wolf C, Konieczny A (2010): Analysis of clinical outcomes according to original treatment groups 16 years after the pivotal IFNB-1b trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81(8), 907-912

Edan G, Miller D, Clanet M, Confavreux C, Lyon-Caen O, Lubetzki C, Brochet B, Berry I, Rolland Y, Froment JC (1997): Therapeutic effect of mitoxantrone combined with methylprednisolone in multiple sclerosis: a randomised multicentre study of active disease using MRI and clinical criteria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 62(2), 112-118

Ehninger G, Schuler U, Proksch B, Zeller KP, Blanz J (1990): Pharmacokinetics and metabolism of mitoxantrone. A review. *Clin Pharmacokinet* 18(5), 365- 380

Fidler JM, DeJoy SQ, Gibbons JJ Jr. (1986a): Selective immunomodulation by the antineoplastic agent mitoxantrone. I. Suppression of B lymphocyte function. *J Immunol* 137(2), 727- 732

Fidler JM, DeJoy SQ, Smith FR 3rd, Gibbons JJ Jr. (1986b): Selective immunomodulation by the antineoplastic agent mitoxantrone. II. Nonspecific adherent suppressor cells derived from mitoxantrone-treated mice. *J Immunol* 136(8), 2747-2754

Fisher GR, Patterson LH (1991): DNA strand breakage by peroxidase-activated mitoxantrone. *J Pharm Pharmacol* 43(1), 65-68.

Fox EJ (2004): Mechanism of action of mitoxantrone. *Neurology* 63(12), 15-18

Fugger L, Friese MA, Bell JI (2009): From genes to function: the next challenge to understanding multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 9(6), 408- 417

Gadea M, Marti-Bonmati L, Arana E, Espert R, Casanova V, Pascual A (2002): Dichotic listening and corpus callosum magnetic resonance imaging in relapsing-remitting multiple sclerosis with emphasis on sex differences. *Neuropsychology* 16(2), 275-281

Genain CP, Nguyen MH, Letvin NL, Pearl R, Davis RL, Adelman M, Lees MB, Linington C, Hauser SL (1995): Antibody facilitation of multiple sclerosis-like lesions in a nonhuman primate. *J Clin Invest* 96(6), 2966-2974.

Ghalie RG, Edan G, Laurent M, Mauch E, Eisenman S, Hartung HP, Gonsette RE, Butine MD, Goodkin DE (2002): Cardiac adverse effects associated with mitoxantrone (Novantrone) therapy in patients with MS. *Neurology* 59(6), 909- 913

Gold, R, Rieckmann P: Pathogenese und Therapie der Multiplen Sklerose. International Medical Publishers, 3. Auflage, Uni- Med Verlag AG, Bremen 2004

Gold R, Lington 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(8), 1953-1971

Goverman J (2009): Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 9(6), 393- 407

Hartung HP, Gonsette R, König N, Kwiecinski H, Guseo A, Morrissey SP, Krapf H, Zwingers T (2002): Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet* 360(9350), 2018-2025

Hein T, Hopfenmüller W (2000): Hochrechnung der Zahl an Multiple Sklerose erkrankten Patienten in Deutschland. *Nervenarzt* 71(4), 288-94

Heydrich BN: Nachweis der ABC-Transporter ABCG2 und MRP5 in humanem Herzgewebe mit real-time PCR und Immunhistochemie. Med. Diss. Greifswald 2003

Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M (2000): Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7), 3473-3478

Honjo Y, Morisaki K, Huff LM, Robey RW, Hung J, Dean M, Bates SE (2002): Single-nucleotide polymorphism (SNP) analysis in the ABC half-transporter ABCG2 (MXR/BCRP/ABCP1). *Cancer Biol Ther* 1(6), 696-702

Johnson JL, Ahmad A, Khan S, Wang YF, Abu-Qare AW, Ayoub JE, Zhang A, Ahmad I (2004): Improved liquid chromatographic method for mitoxantrone quantification in mouse plasma and tissues to study the pharmacokinetics of a liposome entrapped mitoxantrone formulation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 799(1), 149-155

Jonker JW, Buitelaa M, Wagenaar E, Van Der Valk MA, Scheffer GL, Scheper RJ, Plosch T, Kuipers F, Elferink RP, Rosing H (2002): The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24), 15649-15654

Kage K, Tsukahara S, Sugiyama T, Asada S, Ishikawa E, Tsuruo T, Sugimoto Y (2002): Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *Int J Cancer* 97(5), 626-630

Kesselring J: Klinik. In: Kesselring J (Hrsgbr.) Multiple Sklerose. Verlag Kohlhammer, Stuttgart 1997. 95-172

Kobayashi D, Ieiri I, Hirota T, Takane H, Maegawa S, Kigawa J, Suzuki H, Nanba E, Oshimura M, Terakawa N (2005): Functional assessment of ABCG2 (BCRP) gene polymorphisms to protein expression in human placenta. *Drug Metab Dispos* 33(1), 94-101

Krishnamurthy P, Schuetz JD (2006): Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46, 381-410

Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, Bailey-Dell K, Zhou S, Mercer KE, Sarkadi B, Sorrentino BP, Schuetz JD (2004): The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem* 279(23), 24218-24225

Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Bruck W (2002): Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 125, 2202-2212

Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti C (2001): Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 7(3), 115-121

Lebar R, Lubetzki C, Vincent C, Lombrail P, Boutry JM (1986): The M2 autoantigen of central nervous system myelin, a glycoprotein present in oligodendrocyte membrane. *Clin Exp Immunol* 66(2), 423-434

Levine S, Gherson J (1986): Morphologic effects of mitoxantrone and a related anthracenedione on lymphoid tissues. *Int J Immunopharmacol* 8(8), 999-1007

Levine S, Saltzman A (1986): Regional suppression, therapy after onset and prevention of relapses in experimental allergic encephalomyelitis by mitoxantrone. *J Neuroimmunol* 13(2), 175-181

Linington C, Bradl M, Lassmann H, Brunner C, Vass K (1988): Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am J Pathol* 130, 443- 454

Litman T, Druley TE, Stein WD, Bates SE (2001): From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell Mol Life Sci* 58(7), 931-959

Litzenburger T, Fassler R, Bauer J, Lassmann H, Linington C, Wekerle H, Iglesias A (1998): B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice. *J Exp Med* 188(1), 169-180

Livak KJ, Flood SJA, Marmaro J, Giustu W, Deetz K (1995): Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* **4**, 357-362

Lublin FD, Lavasa M, Viti C, Knobler RL (1987): Suppression of acute and relapsing experimental allergic encephalomyelitis with mitoxantrone. *Clin Immunol Immunopathol* **45(1)**, 122-128

Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ, Schellens JH (2001): Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* **61(8)**, 3458-3464

Mao Q (2008): BCRP/ABCG2 in the placenta: expression, function and regulation. *Pharm Res* **25(6)**, 1244-1255

Mao Q, Unadkat JD (2005): Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *AAPS J* **7(1)**, 118-133

Martinelli V, Radaelli M, Straffi L, Rodegher M, Comi G (2009): Mitoxantrone: benefits and risks in multiple sclerosis patients. *Neurol Sci* **30(2)**, 167-170

Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG (2004): Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* **427(6972)**, 355-360

Mazzanti B, Biagioli T, Aldinucci A, Cavaletti G, Cavalletti E, Oggioni N, Frigo M, Rota S, Tagliabue E, Ballerini C (2005): Effects of pixantrone on immune-cell function in the course of acute rat experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* **168(1-2)**, 111-117

McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC (2001): Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50(1), 121-127

Meyer C, Ansorge N, Siglienti I, Salmen S, Stroet A, Nuckel H, Duhrsen U, Ritter PR, Schmidt WE, Gold R (2010): Mitoxantrone-related acute leukemia by multiple sclerosis. Case report and practical approach by unclear cytopenia. *Nervenarzt* 81(12), 1483-1489

Millefiorini E, Gasperini C, Pozzilli C, D'Andrea F, Bastianello S, Trojano M, Morino S, Morra VB, Bozzao A, Calo A (1997): Randomized placebo-controlled trial of mitoxantrone in relapsing-remitting multiple sclerosis: 24-month clinical and MRI outcome. *J Neurol* 244(3), 153-159

Milligan NM, Newcombe R, Compston DA (1987): A double-blind trial of high dose methylprednisolon in patients with multiple sclerosis: 1. clinical effects. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 50, 511-516

Mizuarai S, Aozasa N, Kotani H (2004): Single nucleotide polymorphisms result in impaired membrane localization and reduced atpase activity in multidrug transporter ABCG2. *Int J Cancer* 109(2), 238-246

Morrissey SP, Le Page E, Edan G (2005): Mitoxantrone in the treatment of multiple sclerosis. *Int MS J* 12(3), 74-87

Müller A, Wiedermann G, Rohde U, Backmund H, Sonntag A (1994): Correlates of cognitive impairment and depressive mood disorder in multiple sclerosis. *Acta Psychiatr Scand* 89, 117-121

Neuhaus O, Kieseier BC, Hartung HP (2006): Mitoxantrone in Multiple Sclerosis. *Adv Neurol* 98, 293-302

Oliver AR, Lyon GM, Ruddle NH (2003): Rat and human myelin oligodendrocyte glycoproteins induce experimental autoimmune encephalomyelitis by different mechanisms in C57BL/6 mice. *J Immunol* 171(1), 462-468.

Pai VB, Nahata MC (2000): Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug Saf* 22(4), 263-302

Piao WH, Wong R, Bai XF, Huang J, Campagnolo DI, Dorr RT, Vollmer TL, Shi FD (2007): Therapeutic effect of anthracene-based anticancer agent ethonafide in an animal model of multiple sclerosis. *J Immunol* 179(11), 7415-7423

Polgar O, Robey RW, Bates SE (2008): ABCG2: structure, function and role in drug response. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4(1), 1-15

Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW (2005): Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 58(6), 840-846

Poser S, Wickstrom J, Bauer HJ (1979): Clinical data and the identification of special forms of multiple sclerosis in 1271 cases studied with a standardized documentation system. *J Neurol Sci* 40, 150-168

Rao SM, Leo GJ, Bernardin L, Unverzagt F (1991a): Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. I. Frequency, patterns, and prediction. *Neurology* 41, 685-691

Rao SM, Leo GJ, Ellington L, Nauertz T, Bernardin L, Unverzagt F (1991b): Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. II. Impact on employment and social functioning. *Neurology* 41, 685-691

Rentsch KM, Schwendener RA, Hanseler E (1996): Determination of mitoxantrone in mouse whole blood and different tissues by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 679(1-2), 185-192

Ridge SC, Sloboda AE, McReynolds RA, Levine S, Oronsky AL, Kerwar SS (1985): Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by mitoxantrone. *Clin Immunol Immunopathol* 35(1), 35-42

Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP (1933): Observations on Attempts to Produce Acute Disseminated Encephalomyelitis in Monkeys. *J Exp Med* 58(1), 39-53

Robey RW, Polgar O, Deeken J, To KW, Bates SE (2007): ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer Metastasis Rev* 26(1), 39-57

Rudick R, Antel J, Confavreux C, Cutter G, Ellison G, Fischer J (1997): Recommendations from the national multiple sclerosis society clinical outcomes assessment task force. *Ann Neurol* 42, 379-382

Sadovnick AD, Ebers GC, Wilson RW, Paty DW (1992): Life expectancy in patients attending multiple sclerosis clinics. *Neurology* 42(5), 991-994

Schinkel AH, Jonker JW (2003): Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* 55(1), 3-29

Schluesener HJ, Sobel RA, Lington C, Weiner HL (1987): A monoclonal antibody against a myelin oligodendrocyte glycoprotein induces relapses and demyelination in central nervous system autoimmune disease. *J Immunol* 139(12), 4016-4021

Sharom FJ (2008): ABC multidrug transporters: structure, function and role in Chemoresistance. *Pharmacogenomics* 9(1), 105-127

Smith IE (1983): Mitoxantrone (novantrone): a review of experimental and early clinical studies. *Cancer Treat Rev* 10(2), 110-115.

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

Sriram S, Steiner I (2005): Experimental allergic encephalomyelitis: a misleading model of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 58(6), 939-945

Steinman L, Zamvil SS (2006): How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Ann Neurol* 60(1), 12-21

Storch MK, Stefferl A, Brehm U, Weissert R, Wallstrom E, Kerschensteiner M, Olsson T, Linington C, Lassmann H (1998): Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol* 8(4), 681-694

Strotmann JM, Spindler M, Weilbach FX, Gold R, Ertl G, Voelker W (2002): Myocardial function in patients with multiple sclerosis treated with low-dose mitoxantrone. *Am J Cardiol* 89(19), 1222- 1225

Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y, Sugiyama Y (2003): ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J Biol Chem* 278(25), 22644-22649

Thielmann HW, Popanda O, Gersbach H, Gilbert F (1993): Various inhibitors of DNA topoisomerases diminish repair-specific DNA incision in UV-irradiated human fibroblasts. *Carcinogenesis* 14(11), 2341-2351

Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bo L (1998): Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 338, 278-285

Van Herwaarden AE, Schinkel AH (2006): The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins. *Trends Pharmacol Sci* 27(1), 10-16

Van Herwaarden AE , Wagenaar E, Merino G, Jonker JW, Rosing H, Beijnen JH, Schinkel AH (2007): Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk. *Mol Cell Biol* 27(4), 1247-1253

Vlaming ML, Lagas JS, Schinkel AH (2009): Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in *Abcg2* knockout mice. *Adv Drug Deliv Rev* 61(1), 14-25

Von Ahsen N, Lewczuk P, Schutz E, Oellerich M, Ehrenreich H (2000): Prothrombin activity and concentration in healthy subjects with and without the prothrombin G202110A mutation. *Thromb Res* 99, 549-556

Wang BS, Lumanglas AL, Silva J, Ruzsala-Mallon VM, Durr FE (1986): Inhibition of the induction of alloreactivity with mitoxantrone. *Int J Immunopharmacol* 8(8), 967-973

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995): Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(12), 5510-5514

Watson CM, Davison AN, Baker D, O'Neill JK, Turk JL (1991): Suppression of demyelination by mitoxantrone. *Int J Immunopharmacol* 13(7), 923- 930

Weilbach FX, Chan A, Toyka KV, Gold R (2004): The cardioprotector dexrazoxane augments therapeutic efficacy of mitoxantrone in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 135(1), 49-55

Www.dmsg.de, Internetauftritt der Deutschen Multiple Sklerose Gesellschaft, Bundesverband e. V., Küsterstr. 8, 30519 Hannover

Xia CQ, Liu N, Yang D, Miwa G, Gan LS (2005): Expression, localization, and functional characteristics of breast cancer resistance protein in Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos* 33(5), 637-643

Yasuda T, Tsumita T, Nagai Y, Mitsuzawa E, Ohtani S (1975); Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice. I. Induction of EAE with mouse spinal cord homogenate and myelin basic protein. *Jpn J Exp Med* 45(5), 423-427

Ziemssen T, Ziemssen F (2005): The role of the humoral immune system in multiple sclerosis (MS) and its animal model experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Autoimmun Rev* 4(7), 460-467

Danksagung

Einen besonderen Dank möchte ich Herrn PD Dr. rer. nat. Fred Lühder aussprechen, mit seiner unermüdlichen Hilfe und seiner fachlichen Kompetenz hat er wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Daneben war er für mich in persönlichen Anliegen immer eine große Stütze und ohne ihn würde ich mich zu diesem Zeitpunkt nicht an dieser Stelle sehen.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Nicolas von Ahsen bedanken, der zu jeder Zeit einen Ansprechpartner darstellte und mir rasche Hilfestellung leistete.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Frank Streit und Herrn Reiner Andag für die wissenschaftliche Unterstützung danken.

Ich danke Herrn Dr. rer. nat. Nils Kruse für seine Unterstützung. Großer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Seray Cetin, die mich lange Zeit begleitet und mich in vielen Dingen maßgeblich unterstützt hat. Ebenso danke ich diesbezüglich Frau Alexandra Bohl, die neben ihrer fachlichen Kompetenz mit Herzlichkeit glänzte.

Herrn Prof. Dr. med. Alexander Flügel danke ich stellvertretend für das Institut für Multiple Sklerose Forschung.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Frau Julia Huber von Herzen danken sowohl für die Korrektur als auch für die mentale Unterstützung, welche einen wesentlichen Faktor zur Fertigstellung dieser Dissertation beigetragen haben.

Lebenslauf

Am 11.07.1984 wurde ich als erstes von zwei Kindern von Peter-Josef Huber und Brigitte Huber, geb. Rohe, in Frechen geboren.

Von 1991 bis 2004 besuchte ich zunächst die Astrid-Lindgren-Grundschule in Bergheim. Im Rahmen meiner gymnasialen Schullaufbahn besuchte ich das Gutenberg-Gymnasium in Bergheim, wobei ich im Jahr 2000 ein Auslands-Semester an der Apache-Junction High-School in Phoenix, Arizona verbrachte. Im Jahr 2004 absolvierte ich mein Abitur am Gutenberg-Gymnasium, Bergheim. Danach leistete ich zwischen 2004 und 2005 meinen Zivildienst am Krankenhaus St. Hubertus-Stift in Bedburg. Von 2005 bis 2012 studierte ich Humanmedizin an der Georg-August-Universität zu Göttingen. Mein Studium werde ich mit dem Staatsexamen im Jahr 2012 abschließen.