Aus dem Institut für Neuroimmunologie und Multiple-Sklerose-Forschung
(Prof. Dr. med. A. Flügel)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Der Einfluss von Methylprednisolon auf Migration und Subpopulationen humaner Monozyten

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Tobias Lukas Klaus Finck
aus
Berlin

Göttingen 2021

Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Brück
Referent:	PD Dr. Fred Lühder
Ko-Referent:	Prof. Dr. Dieter Kube
Drittreferent/in:	Prof. Dr. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 11.05.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Der Einfluss von Methylprednisolon auf Migration und Subpopulationen humaner Monozyten" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den …… ……

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert.

Fischer HJ, **Finck TLK**, Pellkofer HL, Reichardt HM, Lühder F (2019): Glucocorticoid therapy of Multiple Sclerosis patients induces anti-inflammatory polarization and increased chemotaxis of monocytes. Front Immunol 10, 1200

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis ..... **VII**

Tabellenverzeichnis ..... **VIII**

Abkürzungsverzeichnis ..... **IX**

1 Einleitung **1**

1.1 Multiple Sklerose 1
1.1.1 Geschichte 1
1.1.2 Epidemiologie 1
1.1.3 Ätiologie 2
1.1.4 Klinik 4
1.1.5 Pathogenese 5
1.1.6 Diagnostik 7
1.1.7 Therapie 8
1.2 Glukokortikoide 9
1.3 Monozyten in MS 11
1.4 Von Monozyten zu Makrophagen 13
1.5 Zytokine und ihre Rolle bei ZNS-Entzündungen 14
1.5.1 Zytokine, Chemokine und deren Beeinflussung durch GC 14
1.5.2 Chemokinrezeptoren auf Monozyten und die Wirkung von GC auf ihre Expression. 16
1.6 Zielsetzung 17

2 Material und Methoden **19**

2.1 Geräte, Materialien, Puffer und Lösungen 19
2.2 Tiere, Probanden und Patienten 23
2.3 Zellbiologische Methoden 25
2.3.1 Isolierung von Monozyten aus Mäusen 25
2.3.2 Isolierung von Monozyten aus humanem Spenderblut 25
2.3.3 Inkubation mit Methylprednisolon 28
2.3.4 Durchflusszytometer 28
2.3.5 Migration mit Transwell® 29
2.4 Molekularbiologische Methoden 31
2.4.1 Isolation von mRNA 31
2.4.2 Quantifizierung der RNA mittels NanoDrop® 32
2.4.3 cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase 32
2.4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR) 32
2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese 33
2.4.6 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion 33
2.4.7 Primerwahl 34
2.4.8 Vorbereitung der Primer 35
2.4.9 Auswertung mittels ΔΔ-Ct-Methode 35
2.5 Statistik 36

3 Ergebnisse ... 37

3.1 Etablierung der experimentellen Bedingungen des Transmigrationsassays ... 37

3.1.1 Dauer des Migrationsassays ... 37

3.1.2 Zellzahl ... 39

3.1.3 Chemokinkonzentrationen ... 40

3.2 Gesunde Probanden ... 42

3.2.1 Der Einfluss von MP auf die Migration von Monozyten gesunder Probanden ... 42

3.2.2 Analyse der Expression von Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche und ihrer mRNA ... 43

3.2.3 Weiterführende Analyse von Genexpression auf mRNA-Ebene ... 47

3.3 Patienten ... 50

3.3.1 Vergleich von gesunden Probanden und Patienten ... 50

3.3.2 Der Einfluss der MP-Therapie auf die Migration von Monozyten ... 54

4 Diskussion ... 62

4.1 Monozytensubpopulationen und -migration von gesunden Probanden und MS-Patienten im Vergleich ... 62

4.2 Der Einfluss von MP auf Monozyten ... 66

4.3 Allgemeines ... 71

5 Zusammenfassung ... 74

6 Literaturverzeichnis ... 75

7 Danksagung ... 98

8 Lebenslauf ... 99

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schichtung der Blutbestandteile des Lymphoprep®-Gradienten 26
Abbildung 2: Schema der Funktionsweise des EasySep®-Zellseparationskit I 27
Abbildung 3: Schema der Funktionsweise des EasySep®-Zellseparationskit II 28
Abbildung 4: Transmigrationsassay mit Transwell®-Sieben 29
Abbildung 5: FACS-Gatingstrategie für Monozyten und APC^+-Beads 30
Abbildung 6: Festlegung der Dauer der Migrationsassays 38
Abbildung 7: Effekt der Zellzahl pro Ansatz auf die migratorische Kapazität muriner Monozyten 39
Abbildung 8: Titration von CCL2 im murinen System 40
Abbildung 9: Titration von CCL2 im humanen System 40
Abbildung 10: Titration von CCL5 im humanen System 41
Abbildung 11: Titration von CX_3CL_1 im humanen System 41
Abbildung 12: Einfluss von MP auf die Migration von Monozyten gesunder Probanden gegen CCL2, CCL5 und CX_3CL_1 42
Abbildung 13: Einfluss von MP auf die Subpopulationsverteilung von Monozyten gesunder Probanden 44
Abbildung 15: Der Einfluss von MP auf die mRNA-Expression von Chemokinrezeptoren von Monozyten gesunder Probanden 46
Abbildung 16: Der Einfluss von MP auf die mRNA-Expression von Adhäsionsmolekülen von Monozyten gesunder Probanden 47
Abbildung 17: Der Einfluss von MP auf die mRNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen von Monozyten gesunder Probanden 49
Abbildung 18: Migrationsraten von unbehandelten Monozyten von Gesunden und MS-Patienten im Vergleich 51
Abbildung 19: Der Anteil der verschiedenen Subpopulationen an der Monozytengesamtpopulation bei unbehandelten Proben von gesunden Probanden und MS-Patienten 52
Abbildung 20: Einfluss von MP auf die Migration von Monozyten an MS-Patienten gegen CCL2, CCL5 und CX_3CL_1 54
Abbildung 21: Der Einfluss von MP *in vitro* und *in vivo* auf die Monozytensubpopulationen von MS-Patienten 56
Abbildung 22: Die Oberflächenexpression von CCR2 und CX_3CR_1 auf Monozyten der verschiedenen Subtypen bei gesunden Probanden und an MS-Patienten 57
Abbildung 23: Die migratorische Aktivität von Monozyten bei MS-Patienten mit und ohne akuten Schub 58
Abbildung 24: Die Oberflächenexpression von CCR2 auf Monozyten von MS-Patienten 59
Abbildung 25: Der Einfluss eines der IVMP-Therapie auf die Monozytensubpopulationen von MS-Patienten mit und ohne akuten Schub 60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Humane Monozytenpopulationen 12
Tabelle 2: Geräte 19
Tabelle 3: Software 20
Tabelle 4: Puffer und Lösungen 20
Tabelle 5: Chemikalien 20
Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien 21
Tabelle 7: Enzyme und Kits 21
Tabelle 8: Antikörper 22
Tabelle 9: Chemokine 22
Tabelle 10: An der Studie teilnehmende gesunde Probanden 23
Tabelle 11: An der Studie teilnehmende Patienten 24
Tabelle 12: Auswertung des Migrationsassays 31
Tabelle 13: Protokoll der Taq-PCR 33
Tabelle 14: Protokoll der qrtPCR mit SYBR-Green 34
Tabelle 15: Verwendete Primersequenzen 35
Tabelle 16: Auswertungsalgorithmus der qrtPCR 36

Abkürzungsverzeichnis

11-β-HSD1	11β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase 1
ACTH	Adrenokortikotropin
BBB	*blood brain barrier*
BSA	*bovine serum albumin*
CCL2	*CC-chemokine ligand 2* = MCP-1
CCL5	*CC-chemokine ligand 5* = Rantes
CCL7	*CC-chemokine ligand 7*
CCR2	*CC-chemokine receptor type 2*
CCR5	*CC-chemokine receptor type 5*
CD	*Cluster of differentiation*
cDNA	*complementary DNA*
CIS	*clinically isolated syndrome*
cRNA	*complementary RNA*
CSF	*cerebrospinal fluid*
CSF2RA	*colony stimulating factor 2 receptor subunit alpha*
CX_3CL_1	*C-X3-C-chemokine ligand 1* = Fraktalkin
CX_3CR_1	*C-X3-C-chemokine receptor 1* = Fraktalkin-Rezeptor
CXCL12	*C-X-C-chemokin 12* = SDF-1
CXCR4	*C-X-C-chemokine receptor 4* = SDF-1-Rezeptor
DC	*dendritic cells*
Dex	Dexamethason
DNAM-1	*DNAX Accessory Molecule-1* = CD226
EAE	*experimental autoimmune encephalomyelitis*
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDSS	Expanded Disability Status Scale
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	*fluorescence-activated cell sorting*
FCS	*fetal calf serum*
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	*forward scatter*
GC	*glucocorticoids*
GM-CSF	*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*
GR	Glukokortikoidrezeptor

GRE	*glucocorticoid responsive element*
HLA	*human leukocyte antigen*
ICAM-1	*intercellular adhesion molecule 1*
IFNβ	Interferon β
IFNγ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KM	Knochenmark
LFA-1	*leucocyte function associated molecule 1* = CD11a
LPS	Lipopolysaccharide
Ly6C	*lymphozyte antigen 6c*
M-CSF	*macrophage colony stimulating factor*
MCP-1	*monocyte chemotactic protein 1* = CCL2
MDM	*monocyte derived macrophages*
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MP	Methylprednisolon
MR	Mineralkortikoidrezeptor
mRNA	*messenger RNA*
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
NF-κB	*nuclear facor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*
NNR	Nebennierenrinde
PBMNCs	*peripheral blood mononuclear cells*
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PPMS	*primary-progressive MS*
qrtPCR	*quantitative real-time polymerase chain reaction*
RNA	*ribonucleic acid*
ROCK	*Rho-associated proteinkinase*
ROS	*reactive oxygen species*
RPMI	Zellkulturmedium mit der Rezeptur des *Roswell Park Memorial Institute*
RRMS	*relapsing-remitting MS*
SDF-1	*stromal cell-derived factor 1* = CXCL12
SPMS	*seconday-progressive MS*

SSC	*side scatter*
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TGFβ	*transforming growth factor β*
Tm	*melting temperature*
TNFα	Tumornekrosefaktor α
VCAM-1	*vascular cell adhesion molecule 1*
VLA-4	*very late antigen-4*
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

1.1.1 Geschichte

Eine der ersten differenzierten Beschreibungen eines Falls von Multipler Sklerose (MS) stammt aus dem Jahr 1840 vom schottischen Augenarzt William MacKenzie. Er berichtete von einem 23-jährigen Patienten, der unter Symptomen wie Sehstörungen, Lähmungen, Dysarthrie und Harninkontinenz litt, die nach circa zwei Monaten eine spontane Remission zeigten. Ungefähr zur gleichen Zeit veröffentlichten Robert Carshwell, ein britischer Professor der Anatomie und Jean Curveilhier, ein französischer Professor der Pathologie, Beschreibungen und Zeichnung von verteilten Läsionen im zentralen Nervensystem (ZNS) ohne diese jedoch als eigenständiges Krankheitsbild zu sehen (Compston und Coles 2008). Als Krankheit mit dem Namen *la sclérose en plaque disséminées* definierte schließlich Jean-Martin Charcot 1868 den Symptomkomplex unter Berücksichtigung bekannter Fälle, eigener Fälle sowie pathologischer Befunde im ZNS (Compston 1988; Kumar et al. 2011). Er war es auch, der den Begriff der „Charcot Trias“ (Nystagmus, Intentionstremor, skandierende Sprache) prägte und damit einen ersten Versuch unternahm, diagnostische Kriterien zu definieren. Die Kriterien wurden über die Jahre standardisiert und verfeinert und so wird MS heute nach den McDonald-Kriterien diagnostiziert, die mehrfach revidiert und modernisiert wurden (McDonald et al. 2001; Milo und Miller 2014). Erste Therapieoptionen für die MS waren Glukokortikoide (GC) und Adrenokortikotropin.

1.1.2 Epidemiologie

Weltweit leiden ungefähr 2,5 Millionen Menschen an der Erkrankung (Milo und Kahana 2010), die damit die am weitesten verbreitete Autoimmunerkrankung des ZNS ist (Berer und Krishnamoorthy 2014; Reich et al. 2018). Dabei variiert die Prävalenzrate von <5 Fälle pro 100.000 in den Tropen oder Asien bis 100 - 200 Fälle pro 100.000 in gemäßigten Klimazonen. Führend dabei sind vor allem Staaten, deren Bevölkerung nordeuropäischen Ursprungs ist, wie zum Beispiel die USA, Kanada oder Neuseeland. Auffällig ist, dass die Prävalenz mit der geografischen Breite steigt (Kurtzke 1995; Vukusic et al. 2007), dieses Gefälle in den letzten Jahren aber abnimmt (Koch-Henriksen und Sorensen 2011). Auch der Unterschied der Inzidenz zwischen ethnischen Gruppen scheint abzunehmen, sodass sich beispielsweise das Erkrankungsrisiko für die US-afroamerikanische Bevölkerung langsam dem der weißen

annähert (Wallin et al. 2012; Langer-Gould et al. 2013). In Deutschland liegt die Prävalenz der MS bei circa 220.000 bis 230.000 (2015, ohne Privatversicherte). Frauen sind mit Raten von 382 je 100.000 (Frauen) gegenüber 167 je 100.000 (Männer) circa 2,5 mal häufiger betroffen (2010, ohne Privatversicherte) (Petersen et al. 2014). Neu diagnostiziert wird MS jedes Jahr bei 16 bis 18 pro 100.000 Versicherten. Auffällig ist eine Zunahme der Prävalenz in den letzten Jahren, insbesondere bei Frauen. Ob dies eine tatsächliche Zunahme der Erkrankungen widerspiegelt oder durch feinere Diagnostik bedingt ist, ist noch ungeklärt (Milo und Kahana 2010; Holstiege et al. 2017; Daltrozzo et al. 2018).

1.1.3 Ätiologie

1.1.3.1 Genetik

Obwohl bis zu 100 Gene bekannt sind, die an der Entstehung der MS beteiligt sein könnten (Sawcer et al. 2014), wird sie nicht als klassische Erbkrankheit angesehen. Vielmehr scheint es eine genetische Prädisposition für die Erkrankung zu geben. Die Gene, die hierbei eine Rolle spielen, stehen mehrheitlich mit dem Immunsystem in Zusammenhang. Dabei scheint das *human leukocyte antigen* (HLA)-Allel DRB1*1501 den Hauptteil der Prädisposition auszumachen. In der Literatur werden weiterhin die Gene für die α-Ketten des Interleukin-2- und des Interleukin (IL)-7-Rezeptors, das Gen für den Tumornekrosefaktor α (TNFα)-Rezeptor TNFRSF1A, sowie andere Gene des Immunsystems genannt (Hohlfeld 2010). Immigrationsstudien deuten jedoch darauf hin, dass die Rolle von externen Faktoren mindestens genauso entscheidend ist. So ähnelt das Risiko einer immigrierten Gruppe, an MS zu erkranken dem der Bevölkerung des Immigrationslandes und nicht dem der der im Ursprungsland verbliebenen, genetisch verwandten Bevölkerung, wenn die Migration vor einem Lebensalter von circa 15 Jahren stattgefunden hat. Findet die Migration im höheren Alter statt, gleicht das Risiko dem der genetisch Verwandten im Ursprungsland. Dies spricht für externe Faktoren, die ihre Wirkung schon in jungen Jahren entfalten (Elian und Dean 1987; Zilber und Kahana 1996, Milo und Kahana 2010).

1.1.3.2 Sonne und Vitamin D

Eine ausgeprägte negative Korrelation gibt es zwischen dem Risiko, an MS zu erkranken und der Exposition gegenüber Sonnen- bzw. UV-Strahlung (Ascherio und Munger 2007), was sich mit dem bereits erwähnten Zusammenhang von MS-Prävalenz und Breitengrad deckt. Des Weiteren scheint Vitamin D eine protektive Wirkung bezüglich des Erkrankungsrisiko zu haben (Munger et al. 2006; Salzer et al. 2012). Da UV-Strahlung eine entscheidende Rolle

in der Synthese von Vitamin D spielt, ist die Sonne für große Teile der Bevölkerung die Hauptquelle (Holick 2004). Somit könnte Vitamin D ein mediierender Faktor zwischen Erkrankungsrisiko und Sonneneinstrahlung sein. Diese Vermutung wird durch ein vermindertes Erkrankungsrisiko durch die suffiziente Aufnahme von Vitamin D über die Nahrung oder Supplementierung gestützt (Salvini et al. 1989; Munger et al. 2004; Bäärnhielm et al. 2014; Cortese et al. 2015).

1.1.3.3 Hygienehypothese und Infektionen

Vertreter[1] der Hygienehypothese vermuten, dass Infektionen in der Kindheit zum Beispiel mit Parasiten das Risiko an MS zu erkranken senken, indem sie die Ausbildung des Th1-Th2-Gleichgewichts sowie die Reifung von regulatorischen T-Zellen maßgeblich beeinflussen (Bach 2002; Sewell et al. 2002; Bufford und Gern 2005). In tropischen und subtropischen Ländern bzw. Breitengraden, in denen diese Infektion vermehrt auftreten, ist das Risiko einer MS-Erkrankung im Vergleich reduziert (Ascherio und Munger 2016). Umgekehrt scheint es eine Verbindung zwischen bestimmten Infektionen und dem Erkrankungsrisiko für MS zu geben. Ein viel genanntes Beispiel hierfür ist neben Mumps, Masern und Röteln (Compston und Coles 2008) die Infektion mit dem Ebstein-Barr-Virus (EBV) (Warner und Carp 1981; Levin et al. 2010). Nicht mit EBV infizierte Personen haben ein geringeres MS-Risiko als solche, die seropositiv sind. Wie EBV pathophysiologisch mit MS zusammenhängt ist Gegenstand aktueller Forschung; diskutiert werden kreuzreagierende T-Zellen und Antikörper (Ascherio und Munger 2016).

1.1.3.4 Rauchen

Rauchen verstärkt in einer dosisabhängigen Form das Risiko, an MS zu erkranken (Villard-Mackintosh und Vessey 1993; Hernán et al. 2001; Hernán et al. 2005; Thorogood und Hannaford 2005), verschlechtert den Krankheitsverlauf (Wingerchuk 2012) und fördert den Übergang eines *clinically isolated syndrome* (CIS) in eine MS (Pauli et al. 2008), sowie den einer *relapsing remitting MS* (RRMS) in eine sich chronisch verschlechternde *secondary progressive MS* (SPMS) (Hernán et al. 2005; Healy et al. 2009).

[1]In der vorliegenden Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit bei Personenbezeichnungen auf die gleichzeitige Verwendung weiblicher und männlicher Sprachformen verzichtet. Entsprechende Bezeichnungen gelten ausdrücklich auch für nicht explizit erwähnte Geschlechteridentitäten und stellen keine Wertung dar.

1.1.3.5 Ernährung und Darmmikrobiom

Ein vielbeachtetes Thema ist der Einfluss der Ernährung auf das Mikrobiom des Darms bzw. dessen Einfluss auf das Risiko, an MS zu erkranken (Berer et al. 2011; Yamamura und Miyake 2013). So hat sich die Inzidenz der MS-Erkrankungen in der epidemiologisch untersuchten Provinz Tokachi im Norden Japans seit den 1980er Jahren bei Männern vervier-, bei Frauen sogar versechsfacht. Für diese Entwicklung wird die weltweit in Mode kommende westliche Ernährung mit wenig Ballaststoffen und viel Milchprodukten verantwortlich gemacht. Andere Studien konnten zeigen, dass MS-Patienten typische Darmmikrobiome haben (Chen et al. 2016; Tremlett und Waubant 2017; Pröbstel und Baranzini 2018), die proinflammatorisch wirken (Cekanaviciute et al. 2017). Weitere Faktoren wie Übergewicht im Kindesalter (Munger et al. 2009; Hedström et al. 2012; Munger et al. 2013), Toxine oder frühe hormonelle Reifung werden diskutiert (Reich et al. 2018).

1.1.4 Klinik

Patienten mit MS präsentieren sich primär häufig mit Symptomen wie Parästhesien, Taubheitsgefühl in den Extremitäten, motorischer Schwäche, einseitigen Sehbeschwerden, Diplopie, Geh- und Koordinationsstörungen oder Schwindel. Diese Symptome können einzeln oder in Kombination auftreten. Begleiterscheinungen können Fatigue, Spasmen, Ataxie, Nystagmus, neuropathischer Schmerz, Harndrang oder -verhalt, sexuelle Dysfunktion, Depression und andere emotionale Veränderungen, Hitzeintoleranz, das Lhermitte-Zeichen (Parästhesien an Rumpf und Extremitäten bei passiver Beugung des Kopfes nach vorne) und kognitive Dysfunktion sein. Zur Einteilung in Schweregrade der Erkrankung wird die „Expanded Disability Status Scale“ (EDSS) verwendet, bei deren Erhebung die Funktionssysteme Pyramidenbahn, Kleinhirn, Hirnstamm, Sensorium, zerebrale Funktion, Sehstörungen und Blasen- und Mastdarmstörungen getestet und die Resultate in einen Score von 0 (keine Veränderung) bis 10 (Tod durch MS) verrechnet werden (O’Connor und Canadian Multiple Sclerosis Working Group 2002).

Der Verlauf der MS beginnt mit einem einmaligen Auftreten von Symptomen, das als *clinically isolated syndrome* (CIS) bezeichnet wird. Hierzu muss die typische räumliche Dissemination kernspintomographisch gegeben sein. Das wiederholte schubförmige Auftreten von Symptomen und Läsionen im ZNS mit einer zusätzlichen zeitliche Dissemination sowie kompletter oder inkompletter Remission der Symptome wird nach den McDonald-Kriterien als klinisch manifeste RRMS definiert (Lublin 2014). Ein Schub wird hierbei als das akute Auftre-

ten von neuem oder reaktiviertem neurologischen Defizit bezeichnet, das länger als 24 Stunden (h) andauert, in einem Abstand von größer als 30 Tagen zu einem vorausgegangenen Schub auftritt und nicht durch das Uhthoff-Phänomen (Symptome durch Änderungen der (Körper-) Temperatur) oder andere Ursachen wie z. B. Infektionen erklärbar ist. Auch das wiederholte Auftreten von neuropsychiatrischen Symptomen, die länger als 24 h andauern, können als Schub betrachtet werden (Hemmer et al. 2021). Die RRMS geht später meist in einen (sekundär) progressiven Verlauf (SPMS) über, für den eine schleichende Zunahme der Symptomatik und Verschlechterung des Allgemeinzustandes des Patienten mit oder ohne Schübe kennzeichnend ist (Lublin 2014). 10-20% der Patienten hingegen leiden unter einer nicht-remittierenden, von Anfang an (primär) progressiven Form der MS, der PPMS (Lublin et al. 1996), deren Verlauf dem der SPMS gleicht. Man geht davon aus, dass die MS-Formen verschiedene klinische Ausdrücke der gleichen Krankheitsentität sind (Lassmann et al. 2012). Die Symptomatik wird anfänglich durch die Entstehung von entzündlichen demyelinisierenden Plaques bestimmt (Confavreux et al. 2000), nach deren Akkumulation und Erschöpfung der Kompensation sich das Krankheitsbild ändert und in eine progressive Form übergeht (Confavreux et al. 2003; Leray et al. 2010). Dieser Übergang findet meist im Alter von 35-50 Jahren statt, welches interessanterweise auch das typische Erkrankungsalter für eine *primary progressive MS* (PPMS) ist (Confavreux und Vukusic 2006), sodass sich noch nicht geklärte Unterschiede bzw. Zusammenhänge in der Pathogenese der verschiedenen Formen vermuten lassen.

1.1.5 Pathogenese

MS zeichnet sich in der schubförmigen Phase durch Entzündung, fokale Plaques mit De- und Remyelinisierung und glialen Narben der weißen Substanz des Hirns und des Rückenmarks aus. Während in dieser Phase neue aktive Läsionen entstehen, scheint die progressive Phase der Erkrankung von der Expansion der bestehenden Läsionen und einer zunehmenden diffusen Schädigung der nicht fokal betroffenen Hirnsubstanz, der sogenannten *normal appearing white matter* (NAMW) und der grauen Substanz gezeichnet zu sein. Diese mündet in eine Neurodegeneration und somit eine Atrophie des Hirns. In der progressiven Phase der MS fallen des weiteren kortikale Läsionen auf, die durch von den Meningen ausgehenden entzündlichen Infiltraten hervorgerufen werden (Allen et al. 2001; Kutzelnigg et al. 2005; Wegner et al. 2006, Lassmann et al. 2007). Die bekannte Pathophysiologie der RRMS bietet bisher mehr therapeutische Angriffspunkte (Hohlfeld und Wekerle 2004; Wiendl und Hohlfeld 2009) als die der progressiven Verlaufsformen, was die Frequenz und die Schwere der Schübe effektiv behandelbar macht. In klinischen Studien zeigten die Medikamente, die zur

Behandlung der RRMS eingesetzt werden keine Verbesserung bei PPMS. So beschränkte sich die Therapie lange Zeit hauptsächlich auf Symptomlinderung und Physiotherapie (Lassmann et al. 2012). Einen relativ neuen Ansatz in der Therapie der PPMS bietet die B-Zelldepletion über das Differenzierungsantigen CD20 mittels monoklonalen Antikörpern (Graf et al. 2020).

Zwei Thesen zur Pathogenese der MS werden gegenübergestellt: die *inside-out-* und die *outisde-in*-Hypothese. Erstgenannte geht davon aus, dass ein primär im ZNS stattfindender Prozess, der in erster Linie Neurone betrifft (z.B. eine virale Infektion oder ein Trauma) in der Folge zu einer Schädigung des Myelins bzw. der Oligodendrozyten führt, wodurch patrouillierende Immunzellen aktiviert werden. Die gegenüberstehende *outisde-in*-Hypothese wird durch einige Tiermodelle (z.B. die *experimental autoimmune encephalomyelitis* (EAE) mit Immunisierung) gestützt. Sie sieht eine antivirale oder autoimmune Reaktion von T- und B-Zellen in der Peripherie, der eine Schädigung von Myelin und dadurch von Axonen nach Invasion in das ZNS folgt, ursächlich (Tsunoda und Fujinami 2002). Die zentralnervösen Läsionen werden durch ein komplexes Zusammenspiel von T-Zellen, B-Zellen, Antikörpern, Komplementfaktoren und Zellen des angeborenen Immunsystems verursacht. Durch noch ungeklärte Ursachen werden Mikroglia aktiviert, welche Oligendrozyten schädigen bzw. zur Apoptose dieser führen. In der Folge kommt es zu einer gestörten Integrität der *blood brain barrier* (BBB) (Kermode et al. 1990) und einer erhöhten Gefäßpermeabilität (Absinta et al. 2015), die zusammen mit der Ausschüttung von Chemo- und Zytokinen zu einer Immigration von T-Zellen, B-Zellen und Monozyten führt (Barnett und Prineas 2004; Marik et al. 2007; Reijerkerk et al. 2008; Henderson et al. 2009).

Die Beteiligung der einzelnen Zellarten der Pathogenese der MS ist noch nicht endgültig geklärt. Sowohl $CD4^+$-T-Zellen, als auch $CD8^+$-T-Zellen sind in Läsionen beobachtet worden, ihre Rolle ist aber weiterhin umstritten (Babbe et al. 2000; Frisullo et al. 2008; Tzartos et al. 2008; Frischer et al. 2009). Da es Hinweise auf eine Rolle von B-Zellen gibt (z.B. oligoklonale Banden im Liquor von Patienten) und gute Behandlungserfolge mit B-Zellendepletierenden Antikörpern (Rituximab *(off-label)*, Ocrelizumab) erreicht wurden, sind B-Zellen wieder mehr in den Fokus der Forschung gerückt (Palanichamy et al. 2014; Dendrou et al. 2015; Michel et al. 2015; Wekerle 2017). Auch die Rolle von Monozyten und Makrophagen ist noch nicht komplett definiert. Lucchinetti et al. beschrieben vier verschiedene Läsionspattern in Hirnbiopsien von MS-Patienten. Diese unterscheiden sich hinsichtlich Zusammensetzung der Infiltrate, Beziehung zu Blutgefäßen und Ausmaß des Verlustes von Oligodendrozyten. Dies legt nahe, dass MS eine heterogene Erkrankung sein könnte. Eine Ge-

meinsamkeit der o.g. Pattern ist das Vorliegen von klassisch und alternativ aktivierten Makrophagen neben den residenten Mikroglia (Lucchinetti et al. 2000; Prinz et al. 2011; Wong et al. 2012; Miron et al. 2013; Vogel et al. 2013). In einer Studie wurde gezeigt, dass die Patterns sich im Verlauf der Krankheit angleichen und bei allen Läsionsarten ein gemeinsamer Typ der Demyelinisierung vorliegt, der hauptsächlich durch mononukleäre Zellen angetrieben wird (Breij et al. 2008). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass dabei ins ZNS immigrierte, von Monozyten abstammende Makrophagen eine wichtige Rolle spielen (Ajami et al. 2011; Yamasaki et al. 2014). Monozyten und Makrophagen lassen sich in Subpopulationen einteilen, die pro- oder antiinflammatorische Eigenschaften besitzen (siehe Kapitel 1.3). In Tierexperimenten zeigte sich, dass Monozyten und Makrophagen nicht nur Gewebeschaden verursachen, sondern auch Entzündungsreaktionen abmildern und die Remyelinisierung in den Läsionen beeinflussen (Ruckh et al. 2012; Miron et al. 2013). Zusammengenommen zeigen diese Erkenntnisse die wichtige Rolle von Monozyten bzw. Makrophagen in der Pathogenese von MS und in potentiellen Therapieoptionen (Mishra und Yong 2016).

1.1.6 Diagnostik

Die Diagnostik stützt sich auf die neurologische Untersuchung, klinische Tests sowie die Analyse von Liquor und die Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie (MRT). Bei über 90% der Patienten lassen sich im Liquor erhöhte Konzentrationen von Immunglobulinen und zwei oder mehr oligoklonale Banden finden. Diese entstehen durch eine vermehrte Antikörperproduktion der Klasse Immunglobulin G (IgG) durch wenige Plasmazellklone. Durch Elektrophorese des Liquors und des Blutes im Vergleich kann der Schluss auf eine Antikörpersynthese im ZNS als Ausdruck zum Beispiel einer lokalen Entzündung gezogen werden (Housley et al. 2015). Zu beachten ist, dass die Spezifität dieser Diagnostik gering ist und oligoklonale Banden auch durch Infektionen des ZNS entstehen können. Biomarker, die in der Zukunft eine Rolle in der Diagnostik der MS spielen könnten und dabei unkompliziert z.B. im Serum nachzuweisen sind, sind *neurofilament light chains* (Kuhle et al. 2016) und nicht kodierende *micro*RNA-Moleküle, die die Expression von Genen beeinflussen (Gueraude-Arellano et al. 2012). Weiterhin stützt sich die Diagnostik auf elektrophysiologische Untersuchungen, die häufig erhöhte Latenz von auditorisch, somatosensorisch und visuell evozierten Potenzialen sowie verlängerte motorisch evozierte Potentiale als Zeichen der Demyelinisierung zeigen. Wichtig bei der Diagnostik ist der Ausschluss von Erkrankungen, deren Symptomatik der von MS gleichen können, wie zum Beispiel der Neuroborrelliose oder einer Enzephalopathie im Rahmen einer HIV-Infektion. Maßgeblich stützt sich die Diagnostik auf die MRT, die den sensitivsten Test zur Entdeckung von MS-Läsionen und eine

gute nicht-invasive Technik zum Verfolgen des Verlaufs der Krankheit für die Prognose oder auch Studien darstellt. Mithilfe von Kontrastmittel, das in den Bereichen mit geschädigter BBB bzw. erhöhter Gefäßpermeabilität ins Parenchym austritt, können die ZNS-Läsionen sichtbar gemacht werden. Nach Ausschluss der Differentialdiagnosen wird die Diagnose MS mithilfe der revidierten Diagnose-Kriterien nach McDonald gestellt (McDonald et al. 2001; Milo und Miller 2014; Thompson et al. 2018). Wichtig für die Erfüllung der Kriterien ist die zeitliche und räumliche Dissemination (unterschiedliches Alter und räumliche Verteilung) von im MRT sichtbaren Läsionen im ZNS, die scharf begrenzt und mindestens 3 mm groß sein, sowie drei der vier Barkhof-Kriterien (≥ 1 KM-aufnehmende Läsion oder ≥ 9 T2-hyperintense Läsionen; ≥ 1 infratentorielle Läsion; ≥ 1 juxtakortikale Läsion; ≥ 3 periventrikuläre Läsionen) erfüllen müssen (Okuda et al. 2009). Neuerdings kann das Vorliegen von oligoklonalen Banden im Liquor den MRT-Nachweis zeitlicher Dissemination ersetzen (Thompson et al. 2018).

1.1.7 Therapie

Zur Wahl bei der Therapie der MS stehen verschiedene Substanzen, die immunsuppressiv oder immunmodulatorisch wirken. Zu nennen sind Interferon-β (IFNβ), ein Immunmodulator, der seine Wirkung in T-Zellen und der BBB entfaltet (Dhib-Jalbut und Marks 2010) sowie das vielfältig wirkende Glatirameracetat. Weiterhin gibt es verschiedene monoklonale Antikörper, hierunter Natalizumab, der Integrine auf Leukozyten blockiert, Alemtuzumab, der zu einer Depletion von T- und B-Zellen führt und der B-Zellen-depletierende Antikörper Ocrelizumab (eine Weiterentwicklung des *off-label* verwendeten Rituximab). Auch das klassische Chemotherapeutikum Mitoxantron kann eingesetzt werden. Kleinmolekulare Wirkstoffe, die bei der Therapie der MS eine Rolle spielen, sind Fingolimod, das die Evasion von Lymphozyten aus lymphoiden Organen ins Blut verhindert, das antiinflammatorisch und antioxidativ wirkende Dimethylfumarat, Teriflunomid, das in den Pyrimdinstoffwechsel eingreift und die Teilung von T-Zellen vermindert und Dalfampridin, ein neuroprotektiver Kaliumkanalblocker. Bis auf Ocrelizumab sind die Wirkstoffe für RRMS, nicht aber für die progressiven Formen der MS zugelassen und reduzieren die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von neuen Läsionen, klinischen Rezidiven und führen damit zu einer Verzögerung des Fortschreitens der Behinderung. Eine der ersten Optionen für die Therapie der bisher schlecht behandelbaren PPMS stellt das oben genannte Ocrelizumab dar, das auch bei der Behandlung dieser Form der MS Erfolge zeigt (Montalban et al. 2017; Graf et al. 2020). Eine weitere neue Therapiemöglichkeit könnte die Immunoablation mit autologer Stammzell-

transplantation darstellen, die zur Depletion der autoreaktiven Zellen und einer Implementierung eines „neuen“ adaptiven Immunsystems führt (Muraro et al. 2017). Eine der ältesten (Milligan et al. 1987), aber noch immer verwendeten Optionen stellen GC, speziell Methylprednisolon (MP) dar, die zur Abschwächung und Verkürzung von akuten Schüben, sowie als Intervalltherapie bei Kontraindikation anderer Medikamente trotz fehlender Hinweise auf einen langfristen positiven Effekt weiterhin Teil der medikamentösen Therapie sind (McDonald et al. 2001; Berkovich 2013).

1.2 Glukokortikoide

Nach der erstmaligen Isolation aus der Nebenniere in den 1930er Jahren und der darauffolgenden Ermöglichung ihrer Synthese wurden GC eines der ersten Immunsupressiva der Schulmedizin. Ihre ausgeprägten antientzündlichen und immunsuppressiven Wirkungen werden topisch und systemisch bei einer Vielzahl von entzündlichen Erkrankungen genutzt, darunter Rheumatoide Arthritis, MS, Asthma, *Graft-versus-host-disease*, Lymphome oder Entzündungen der Haut (Granner et al. 2015). Trotz der Entwicklung von neueren Immunsuppressiva, die die Häufigkeit und die Schwere von Schüben in MS reduzieren können, wird auch heute noch die Gabe von GC zur Behandlung von akuten Schüben praktiziert (Berkovich 2013). Zu beachten bei der Therapie mit GC sind ihre diversen Nebenwirkungen, die sich vor allem bei hohen Dosen oder Langzeitbehandlung zeigen. Hierzu gehören Osteoporose, Hypertonie, Hyperglykämie und Diabetes, Muskelatrophie, Stammfettsucht, Ödeme, Wachstumsverzögerung, gastrointestinale Beschwerden sowie Auswirkungen auf die Psyche der Patienten (Caplan et al. 2017). Ein weiteres beobachtetes Phänomen ist die Resistenz gegen eine GC-Therapie, die den Behandlungserfolg bisweilen einschränkt (Barnes und Adcock 2009). GC entfalten ihre Wirkung durch die Bindung an die intrazellulären GC-Rezeptoren Typ-1 (Mineralkortikoidrezeptor, MR) und Typ-2 (Glukokortikoidrezeptor, GR). Der MR wird weniger ubiquitär als der GR exprimiert. Das im physiologischen Zustand im Körper vor allem vorliegende GC ist endogenes Cortisol. Da seine Affinität zum MR jedoch genauso groß ist wie die von Aldosteron, wird es in den Zielgeweben von Aldosteron durch das Enzym 11-β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 (11-β-HSD II) inaktiviert, um dort eine reine Aldosteronwirkung zu erzielen. Interessanterweise exprimieren auch Zellen der myeloiden Reihe den MR, jedoch keine 11-β-HSD II. Dies lässt vermuten, dass GC hier auch über den MR Wirkungen entfalten. Passend dazu konnte im Tiermodell der MS, der Experimentellen EAE) gezeigt werden, dass ein *knock-out* des MR spezifisch in myeloiden Zellen den Verlauf lindert, was eine potentielle Rolle für MR-Antagonisten impliziert (Montes-Cobos et al. 2017). Der GR liegt im Zytoplasma gebunden an das Hitzeschockprotein Hsp90

vor. Dieses wird bei Bindung eines Liganden verdrängt, woraufhin der Rezeptor in den Kern transloziert. Als Homodimer bindet der Rezeptor an *glucocorticoid response elements* (GRE) der DNA, wodurch abhängige Gene vermehrt exprimiert werden (Transaktivierung). Ein zweiter Wirkungsmechanismus ist die sogenannte Transrepression, bei der ein aktiviertes Rezeptormonomer die Transkription von Genen, die von den Transkriptionsfaktoren *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF-kB), Aktivator-Protein-1 (AP-1) und weiteren abhängig sind, hemmt. Die Effekte der GC beinhalten die Beeinflussung von Überleben, Differenzierung, Migration und andere Funktionen von verschiedensten Zelltypen. Neben dem beim Menschen hauptsächlich wirkenden endogenen Kortisol gibt es eine Reihe von synthetischen, therapeutisch eingesetzten GCs, die sich in ihrer mineralo- und glukokortikoiden Wirkung sowie ihrer Potenz unterscheiden (Buttgereit et al. 1999). Auch für das Immunsystem spielen endo- und exogene GC eine entscheidende Rolle (Reichardt et al. 2001). Sie induzieren Apoptose von T-Zellen, stabilisieren die Barrierefunktion der BBB und vermindern die Expression von Rezeptoren der interzellulären Kommunikation und Adhäsionsmolekülen (Elovaara et al. 1998; Schweingruber et al. 2012). Des Weiteren wurde gezeigt, dass GC die Expression (Rhen und Cidlowski 2005) und die Signalwege von *C-X-C-chemokine receptor 4* (CXCR4) in T-Zellen (Schweingruber et al. 2014) verstärken, diese im perivaskulären Raum fixiert werden und so eine Ablenkung der T-Zellen vom Ort der Entzündung im ZNS bewirkt wird. Neben T-Zellen beeinflussen GC auch Zellen des mononukleären Phagozytensystems: Sie führen zu einer Verminderung der zirkulierenden Monozyten und unterdrücken die Freisetzung von Zytokinen (Joyce et al. 1997, Steer et al. 1997). Im Tiermodell (EAE) wurde gezeigt, dass der Verlauf der Krankheit durch eine Behandlung mit liposomal verkapselten GC verbessert werden kann (Schweingruber et al. 2011). Eine weitere Studie zeigte, dass MP in PEGylierten Liposomen und in freier Form zu einer verminderten Akkumulation von Makrophagen und Mikoglia im Parenchym des ZNS bei an EAE erkrankten Mäusen zur Folge hatte (Lee et al. 2014). Hierbei übertraf der verkapselte Wirkstoff das freie MP weit in seiner Effizienz. Auch insgesamt weisen neuere Studien darauf hin, dass modifizierte Darreichungsformen der Gabe der klassischen freien GC überlegen sind. Eine mögliche Technik hierbei ist zum Beispiel die oben genannte Verkapselung der GC in PEGylierten Liposomen oder in hybriden Nanopartikeln, welche die Probleme der gleichmäßigen Verteilung der GC in allen Geweben oder ihre kurze Halbwertszeit vermindern und so bei geringerer Dosis zum gleichen Erfolg führen (Lühder und Reichardt 2017). Für die Entfaltung der Wirkung von in Partikel eingebundenen GC ist Phagozytose notwendig, zu der Zellen des mononukleären Phagozytensystems im Gegensatz zu T-Zellen fähig sind. So wurde der symptommildernde

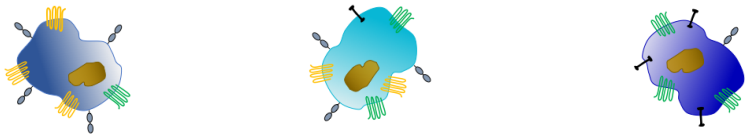
Effekt der GC-Partikel von Schweingruber et al. auf eine Repression von proinflammatorischen Eigenschaften der Makrophagen und die verstärkte Expression von Genen, die mit dem regulatorischen Makrophagentyp M2 assoziiert sind, zurückgeführt (Schweingruber et al. 2011; Fischer et al. 2019). Die Wirkung der GC wurde hier also über Zellen des mononukleären Phagozytensystems vermittelt, was die wichtige Rolle von Monozyten bzw. Makrophagen in der Pathogenese und Therapie der EAE unterstreicht.

1.3 Monozyten in MS

Monozyten sind neben Makrophagen, *dendritic cells* (DC) und ihren Vorläufern im Knochenmark (KM) Teil des mononukleären Phagozytensystems (Yona und Gordon 2015). Dieses System spielt eine wichtige Rolle in der Homöostase, zum Beispiel beim Entfernen von Zelltrümmern und beim Induzieren sowie Terminieren einer Immunantwort (Davies et al. 2013; Wynn et al. 2013; Ginhoux und Jung 2014). Während Monozyten lange Zeit nur als Vorläufer für Makrophagen gesehen wurden, weiß man inzwischen, dass die Populationen der Gewebemakrophagen schon vor der Geburt gebildet werden und sich - mit nur minimaler Unterstützung durch Monozyten - selbst am Leben erhalten (Ginhoux et al. 2010; Hashimoto et al. 2013; Yona et al. 2013; Mass et al. 2016). Vielmehr stellen Monozyten neben ihrer Progenitorfunktion eine eigene Gruppe von Effektorzellen der angeborenen Immunität dar (Serbina et al. 2008). Monozyten machen beim Menschen ungefähr 10% der zirkulierenden Leukozyten aus. Sie entstehen im KM über mehrere Zwischenstufen aus hämatopoetischen Stammzellen. Ihre Entwicklung ist unter homöostatischen Bedingungen abhängig vom *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) (Hamilton 2008), unter entzündlichen Bedingungen auch vom *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) (Gasson 1991). Nach ihrer Freisetzung ins Blut zirkulieren sie 1-2 Tage; werden sie in dieser Zeit nicht in ein Gewebe rekrutiert, werden sie apoptotisch und aus der Zirkulation entfernt (Italiani und Boraschi 2014). Beim Menschen sind bislang drei verschiedene Subpopulationen von Monozyten bekannt, die nach der Expression von CD14, CD16, CCR2 und *C-X3-C-chemokine receptor 1* (CX_3CR_1) eingeteilt werden: die klassische ($CD14^{++}$, $CD16^{-}$, $CCR2^{+}$) Subpopulation macht circa 85% der zirkulierenden Monozyten aus, die intermediäre ($CD14^{++}$ $CD16^{++}$) und die nicht-klassische ($CD14^{-}$, $CD16^{++}$, $CX3CR1^{+}$) zusammen etwa 15% (Ziegler-Heitbrock et al. 2010; Wong et al. 2012). Klassischen Monozyten werden proinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben, nicht-klassischen antiinflammatorische (Wong et al. 2012). Details der humanen Subpopulationen werden in Tabelle 1 dargestellt. Für Mäuse sind zwei Subpopulationen beschrieben (Geissmann et al. 2003), die in Rezeptorexpression und Eigenschaften denen der

humanen ähneln: Ly6C^{hi} CCR2^{+} CX$_3$CR$_1^{int}$ (klassisch) und Ly6C^{lo} CCR2^{-} CX$_3$CR$_1^{hi}$ (nicht-klassisch).

Tabelle 1: **Humane Monozytenpopulationen**



	klassisch (inflammatorisch)	intermediär	nicht-klassisch (regulatorisch)
Marker	CD14^{++} CD16^{-}	CD14^{++} CD16^{+}	CD14^{-} CD16^{++}
Chemokinrezeptor	CCR2^{++} CX$_3$CR$_1^{+}$	CCR2^{+} CX$_3$CR$_1^{+}$	CCR2^{-} CX$_3$CR$_1^{++}$
Funktion	Schnelle Rekrutierung zu Entzündung und Verletzung, Phagozytose	Antigenprozessierung und -präsentation, *reactive oxygen species* (ROS)-Produktion, Angiogenese	Kontrolle der Endothelintegrität, Stimulation der T-Zellproliferation

Bei Menschen sind drei Monozytensubpopulationen bekannt, die sich hinsichtlich ihrer Chemokinrezeptorexpression und ihrer Funktion unterscheiden. Die Definition der Subpopulationen wird nach den Markern CD14 und CD16 vorgenommen. In Tabelle 1 sind definierende Charakteristika von humanen Monozyten zusammengefasst. Basierend auf Wong et al. 2012.

Man geht davon aus, dass Monozyten bei Nagern (Sunderkötter et al. 2004; Yrlid et al. 2006; Varol et al. 2007; Yona et al. 2013; Thomas et al. 2016) und Menschen (Shi und Pamer 2011; Patel et al. 2017) das KM als klassische verlassen und sich während ihrer Verweildauer im Blut zu intermediären und schließlich nicht-klassischen Monozyten entwickeln. Die Rekrutierung aus dem KM in das Blut sowie zum Ort der Entzündung oder Verletzung erfolgt bei Maus und Mensch über den *CC-chemokine ligand 2* (CCL2), dessen Rezeptor *CC-chemokine receptor type 2* (CCR2) nur von klassischen Monozyten exprimiert wird (Serbina und Pamer 2006; Shi und Pamer 2011; Patel et al. 2017). Unter homöostatischen Bedingungen hingegen kommen klassische Monozyten im Tierversuch ihrer Versorgerrolle nach und ersetzen residente von Monozyten abgeleitete Zellen (Varol et al. 2009; Tamoutounour et al. 2013; Bain et al. 2014; Guilliams et al. 2014), während nicht-klassische mithilfe von *lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1, CD11a) (Auffray et al. 2007) und CX$_3$CR$_1$ (Geissmann et al. 2003), dessen Ligand CX$_3$CL$_1$ hauptsächlich von Endothelzellen exprimiert wird (Bazan et al. 1997), das Gefäßsystem kontrollieren. Über LFA-1 und seinen Ligand *intercellular adhesion molecule 1* (I-CAM-1) funktioniert neben der Bindung an Antigen-präsentierende Zellen auch die Adhäsion von Monozyten am Endothel und das sogenannte *crawling* als Vorstufe der Extravasation von Immunzellen (Meerschaert und Furie 1994; Hmama et al. 1999; Auffray et al. 2007). Weitere Adhäsionsmoleküle, die eine Rolle in der Funktionalität von Monozyten spielen,

sind CD226, auch bekannt als *DNAX Accessory Molecule-1* (DNAM-1), und *very late antigen-4* (VLA-4). CD226 ist ein Adhäsionsmolekül, das von inflammatorischen Monozyten exprimiert wird (Vo et al. 2016). Es ist einer der Hauptbindungspartner von CD155 (poliovirus receptor PVR), das auf Endothelzellen vorkommt und mit dessen Bindung die Transmigration durch endotheliale Verbindungen reguliert wird (Reymond et al. 2004). VLA-4 wird auf Monozyten und Lymphozyten exprimiert und ist der Bindungspartner des endothelialen *vascular cell adhesion protein 1* (VCAM-1, CD106) (Elices et al. 1990; Raine 1994). Die Diapedese von Monozyten wird über die Bindung dieser beiden Liganden bewerkstelligt (Meerschaert und Furie 1994). Neben den oben genannten Monozytensubtypen ist der sogenannte *glucocorticoid induced monocyte* erwähnenswert, der bei Maus und Mensch unter Behandlung mit GC nachgewiesen wurde. Er zeichnet sich durch eine hohe Migrationsfähigkeit, Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen und antioxidativen Mediatoren, hohe Phagozytosefähigkeit und Lebensdauer aus (Ehrchen et al. 2007; Varga et al. 2008).

In Tierversuchen wird mithilfe der EAE unter anderem versucht, die Rolle von Monozyten bei neuroinflammatorischen Erkrankungen besser zu verstehen. Bisher zeigte sich, dass proinflammatorische Monozyten kurz nach der Immunisierung mit Myelinpeptiden aus dem KM emigrieren und im Blut akkumulieren, bevor sie das ZNS infiltrieren (King et al. 2009; Mildner et al. 2009). Die Transmigration in das ZNS erfolgt zeitgleich mit dem Auftreten der klinischen Manifestation von MS und ist entscheidend für die Schwere der Symptomatik (Ajami et al. 2011; Mishra et al. 2012). Hierzu passend konnte gezeigt werde, dass eine Blockierung der Monozytenrekrutierung die Progression einer EAE aufhalten kann (Mildner et al. 2009; Ajami et al. 2011). Bei humanen Patienten konnten im Vergleich zu gesunden Probanden vermehrt Monozyten gefunden werden, die die proinflammatorischen Zytokine IL-12 und IL-6 produzieren (Kouwenhoven et al. 2001). Deren Auftreten korrelierte zusätzlich mit dem von aktiven Läsionen im MRT (Makhlouf et al. 2001), was eine entscheidende Rolle von Monozyten in beiden Erkrankungsentitäten impliziert.

1.4 Von Monozyten zu Makrophagen

Im Falle einer Extravasation von Monozyten können diese weiter zu Makrophagen differenzieren (*monocyte derived macrophages*, MDM) (Hashimoto et al. 2013). Makrophagen sind sehr anpassungsfähige Zellen, deren Funktion und Form durch ein lokales Zytokinmilieu beeinflusst wird (Cassetta et al. 2011; Biswas et al. 2012; Bashir et al. 2016). Unter Makrophagen sind mehrere Subtypen bekannt, die sich in Oberflächenmarkern, Zytokinproduktion und biologischer Funktion unterscheiden. Makrophagen lassen sich unter anderem in die Subgruppen M1 und M2 einteilen, auch „Polarisierung“ genannt. Die M1-Polarisierung von

Makrophagen wird durch Lipopolysaccharide (LPS) allein oder in Kombination mit Th1-Zytokinen wie Interferon γ (IFNγ) oder GM-CSF ausgelöst. Diese Makrophagen haben pro-inflammatorische Eigenschaften und produzieren dementsprechend Zytokine wie IL-1β, IL-6, IL-12, IL-23 und TNFα. Sie sind in der Erregerabwehr involviert und in der Lage, Zellproliferation zu unterbinden (MacMicking et al. 1997). Über die Produktion von *reactive oxygen species* (ROS) bekämpfen M1-Makrophagen körperfremde Pathogene sowie Tumorgewebe, wodurch jedoch auch gesundes körpereigenes Gewebe geschädigt und Gewebereparatur bzw. Wundheilung gestört werden kann (Mantovani et al. 2004; Murray und Wynn 2011; Sica und Mantovani 2012; Locati et al. 2013; Murray et al. 2014; Murray 2017). Die M2-Polarisierung von Makrophagen wird durch Th2-Zytokine wie IL-4 oder IL-13 ausgelöst. M2-Makrophagen weisen anti-inflammatorische und immunregulatorische Eigenschaften auf und produzieren Zytokine wie IL-10 und *transforming growth factor β* (TGFβ). M2-Makrophagen haben ausgeprägte Kapazitäten zur Phagozytose, Entfernung von Zelltrümmern und apoptotosischen Zellen, Gewebereparatur und -umbau (Mantovani et al. 2013), Wundheilung, Angiogenese und fördern Fibrose (Kurowska-Stolarska et al. 2009; Murray und Wynn 2011; Sica und Mantovani 2012; Jetten et al. 2014; Braga et al. 2015). Durch ihre Eigenschaften sind sie in der Lage, die durch M1-Makrophagen entstehenden Gewebeschaden einzudämmen und den Ort der Entzündung von Überresten zu befreien. Allerdings führen M2-Charakteristika auch zu einer Förderung von Tumorentstehung und -wachstum (Qian und Pollard 2010; Ruffell et al. 2012; Porta et al. 2015; Schultze und Schmidt 2015; Belgiovine et al. 2016) sowie Th2-typischen Immunreaktionen wie allergische Entzündungen der Luftwege (Kurowska-Stolarska et al. 2009). Wie oben beschrieben wird Monozyten, nachdem sie lange Zeit nur als Vorläufer von Makrophagen gesehen worden waren, inzwischen eine eigene Rolle im Immunsystem zugeordnet. Auch erkennt man Parallelen zwischen den Monozyten- und den Makrophagensubpopulationen: Es gibt Anzeichen dafür, dass klassische Monozyten zu M1-Makrophagen differenzieren, nicht-klassische zu M2-Makrophagen (Auffray et al. 2007; Italiani und Boraschi 2014; Olingy et al. 2017).

1.5 Zytokine und ihre Rolle bei ZNS-Entzündungen

1.5.1 Zytokine, Chemokine und deren Beeinflussung durch GC

Chemokine sind Zytokine, die zur Chemotaxis (gerichtete Zellwanderung) anregen. Chemokine, die auf Makrophagen und Monozyten wirken und in der Pathogenese der MS eine Rolle spielen, sind CCL2, CCL5 und *C-X3-C-chemokine ligand 1* (CX_3CL_1, Fractalkin) (Shi und Pamer

2011). CCL2 ist ein proinflammatorisches Chemokin, das klassische Monozyten zum Ort der Entzündung dirigiert (Mahad und Ransohoff 2003). Mehrere Autoren beschreiben ein reduziertes Level von CCL2 im Liquor bei an MS erkrankten Patienten im Vergleich zu Patienten mit nicht-entzündlichen neurologischen Erkrankungen. Patienten im akuten Schub zeigen hierbei ein geringeres CCL2-Level im Liquor als solche ohne akuten Schub. Verantwortlich gemacht wird ein Überwiegen von Th1-Zytokinen, welches im Zusammenhang mit dem Auftreten eines akuten Schubes steht (Sørensen et al. 1999; Franciotta et al. 2001; Sørensen et al. 2001; Mahad et al. 2002). Weiterhin wurde gezeigt, dass eine Behandlung mit MP das CCL2-Level erhöht (Sørensen et al. 2001). CCL5, ebenfalls ein proinflammatorisches Chemokin, trägt dazu bei, Lympho- und Monozyten zum Ort der Entzündung zu dirigieren (Trebst et al. 2001). Mehrfach wurde festgestellt, dass die CCL5-Level bei Patienten mit MS sowohl in stabilen Stadien, als auch im Schub in Liquor (Szczuciński und Losy 2011; Mori et al. 2016) und Serum (Rentzos et al. 2010) erhöht sind. Ebenso weiß man, dass eine Therapie mit MP zu keiner Senkung dieser Level führt (ebenda). CX_3CL_1 ist ein Chemokin, das vor allem von Endothelzellen exprimiert wird. In seiner löslichen Form hat es eine chemoattraktive Wirkung auf Monozyten und Lymphozyten, in seiner membrangebundenen Form vermittelt es die Adhäsion eben dieser Zellen (Bazan et al. 1997) an der Gefäßwand über zwei Wege. Zum einen hat die Bindung eine eigene adhäsive Kapazität, zum anderen führt sie zu einer vermehrten Expression von Integrinen (Goda et al. 2000). So wird das *crawlen* von Monozyten im Gefäßsystem bewerkstelligt. IL-1β wird hauptsächlich von Monozyten als Antwort auf Aktivierung produziert (Hsi und Remick 1995) und entfaltet seine proinflammatorische Wirkung vielerorts. Es bewirkt einen Anstieg der Körpertemperatur, der Akute-Phase-Proteine und von IL-6 im Blut, eine vermehrte Freisetzung von neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten aus dem KM und erhöht darüber hinaus die Freisetzung von Kortisol aus der Nebennierenrinde. Die Rolle von IL-1β für den Verlauf einer MS verdeutlicht sich in verschiedenen Erkenntnissen: der Verlauf einer EAE bei IL-1R- oder IL-1β-defizienten Mäusen ist milder als in Kontrollen (Schiffenbauer et al. 2000; Sutton et al. 2006; Lévesque et al. 2016), bei MS-Patienten sind erhöhte Spiegel in ZNS-Läsionen, im Blut und im Liquor zu finden (Lin und Edelson 2017) und erhöhte Konzentrationen von IL-1β führen durch die Induktion von Apoptose via Aktivierung von p53 zu Neurodegeneration (Rossi et al. 2014). Weiterhin ist bekannt, dass Dexamethason (Dex) *in vitro* u.a. die Expression von IL-1β in humanen Monozyten senkt (Amano et al. 1993). TNFα wird von Monozyten und Makrophagen ausgeschüttet. Als proinflammatorisches Molekül hat es viele Funktionen, wie die Erhöhung der Körpertemperatur und des Kortisolspiegels, Induktion von Apoptose, Stimu-

lation von der Migration von neutrophilen Granulozyten und der Phagozytose in Makrophagen. Die Sekretion von TNFα wird durch GC in Monozyten und Makrophagen supprimiert (Joyce et al. 1997; Steer et al. 1997; Reichardt et al. 2001). ICAM-1 wird neben Endothelzellen, wo es der Adhäsion von Leukozyten dient, auch von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) exprimiert. Hier spielt es eine wichtige Rolle bei der Interaktion von APC und T-Zellen, indem es über die Bindung an LFA-1 auf T-Zellen eine *low affinity*-Bindung eingeht, die die Interaktion zwischen dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und dem *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-Klasse-II-Komplex der APC einleitet. Die Expression von ICAM-1 ist bei MS-Patienten stärker als bei gesunden Probanden ausgeprägt (Cannella und Raine 1995; Elovaara et al. 2000). *Colony stimulating factor 2 receptor subunit alpha* (CSF2RA) ist eine Untereinheit des Rezeptors für GM-CSF, der von Zellen der myeloischen Reihe exprimiert wird. GM-CSF ist ein proinflammatorisches Zytokin, das unter entzündlichen Bedingungen die Entwicklung von mononukleären Phagozyten (Burgess und Metcalf 1980; Gasson 1991) und die M1-Polarisierung von Makrophagen fördert (Mantovani et al. 2002; Fleetwood et al. 2007). Des Weiteren spielt es eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von EAE und MS (Rasouli et al. 2015; Ifergan et al. 2017). Mäuse, die GM-CSF-defizient sind, besitzen eine Resistenz gegen die Induktion einer EAE, genauso wie Mäuse mit einem Knockout des GM-CSF-Rezeptors (McQualter et al. 2001). Es wurde beobachtet, dass bei Mäusen unter der Gabe von GM-CSF klassische ($CD11b^{+}/Ly6C^{hi}$) Monozyten vermehrt in die Zirkulation freigesetzt werden (King et al. 2009) und so periphere myeloide Zellen und nicht etwa Mikroglia als zentrale Responderzellen von GM-CSF agieren (Codarri et al. 2013).

1.5.2 Chemokinrezeptoren auf Monozyten und die Wirkung von GC auf ihre Expression

Passend zu den jeweiligen Chemokinen werden von Zielzellen Rezeptoren exprimiert. CCR2 ist auf klassischen Monozyten und von MS-Läsionen infiltrierenden Makrophagen zu finden (Sørensen et al. 1999; Simpson et al. 2000; Geissmann et al. 2003; Sunderkötter et al. 2004; Dal-Secco et al. 2015). Durch seine Liganden CCL2 und CCL7 werden Monozyten aus dem KM rekrutiert und zum Ort der Entzündung gelenkt (Tsou et al. 2007). CX_3CR_1 wird in Mäusen vor allem von residenten ($CX_3CR_1^{+}/Ly6C^{-}$) Monozyten, deren Vertreter im humanen System die nicht-klassischen ($CX_3CR_1^{+}/CD16^{++}/CD14^{-}$) sind, exprimiert. (Auffray et al. 2007). CX_3CR_1 hat eine tragende Rolle in der Hömostase von Monozyten und verhindert Apoptose (Landsman et al. 2009). Die Interaktion zwischen dem Rezeptor und seinem Liganden CX_3CL_1, der vor allem von Endothelzellen exprimiert wird (Bazan et al. 1997), ist außerdem an der Adhäsion von Monozyten an der Gefäßwand beteiligt (Goda et al. 2000).

CCR5 wird unter anderem von Monozyten exprimiert (D'Ambrosio et al. 2003) und ist bei der Rekrutierung von Makrophagen zum Ort der Entzündung involviert (Balashov et al. 1999; Sørensen et al. 1999; Simpson et al. 2000). CCR5 wurde in MS-Plaques nachgewiesen (Balashov et al. 1999; Sørensen et al. 1999; Trebst et al. 2001; Jalonen et al. 2002) und ein kurzfristiger supprimierender Effekt von MP auf die Expression von CCR5 auf $CD14^+$ Monozyten ist bekannt (Elovaara et al. 2006). CXCR4 wird von Monozyten exprimiert (Loetscher et al. 1994; Nagasawa et al. 1994; Bleul et al. 1996) und ist über seinen Liganden CXCL12 an der Navigation von Monozyten in Gewebe beteiligt (Sallusto et al. 1998).

1.6 Zielsetzung

In vorangegangenen Versuchen der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass GC T-Zellen – ebenfalls Akteure in der Pathogenese der MS – in ihrer Migrationsfähigkeit beeinflussen. Eine Verstärkung der Expression und der Signalwege der CXCR4-*C-X-C-chemokin 12* (CXCL12)-Achse durch GC in T-Zellen führt zu einer Fixierung der Zellen im perivaskulären Raum im ZNS und somit zu einer Ablenkung der Zellen vom Ort der Entzündung (Schweingruber et al. 2014). Weiterhin wurde gezeigt, dass Monozyten und Makrophagen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der MS spielen (Makhlouf et al. 2001; Mildner et al. 2009; Ajami et al. 2011; Mishra et al. 2012) und dass eine Verschiebung des M1/M2-Polarisierungsgleichgewichts zugunsten M2 zu einer Linderung einer EAE führt (Mikita et al. 2011). Liposomal verkapselte, vor allem in Phagozyten wirkende GC sind in der Lage, den regulatorischen M2-Makrophagentyp zu induzieren und so den Verlauf einer EAE zu attenuieren (Schweingruber et al. 2011). Dabei übertreffen sie freie GC in ihrer Wirksamkeit (Lee et al. 2014). Es ist bekannt, dass es eine enge Verbindung zwischen klassischen Monozyten und M1-Makrophagen sowie zwischen nicht-klassischen Monozyten und M2-Makrophagen gibt (Auffray et al. 2007; Italiani und Boraschi 2014; Olingy et al. 2017). GC führen bei Maus und Mensch zu der Induktion von sog. *glucocorticoid stimulated monocytes*, die nicht der Einteilung in klassisch, intermediär und nicht-klassisch zuzuordnen ist (Ehrchen et al. 2007; Varga et al. 2008) und M2-, also anti-inflammatorische Charakteristika besitzen. Zusammengenommen führte dies zu der Frage, ob GC – hier aufgrund der täglichen Praxis in der Klinik in Form von MP – auch die Migration von Monozyten bei neuroinflammatorischen Prozessen beeinflussen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll die Motilität von Monozyten von gesunden Probanden und MS-Patienten gegen inflammatorische und nicht-inflammatorische Chemokine unter der Behandlung mit MP *in vitro* und *in vivo* mithilfe von Migrationsassays untersucht werden. Darüber hinaus sollen Monozyten von verschiedenen Probandengruppen verglichen werden, wobei sich folgende Fragestellungen ergeben:

- Wie unterscheiden sich Monozyten von gesunden Probanden von denen von MS-Patienten hinsichtlich Chemokinrezeptorexpression und Subpopulationen?
- Wie unterscheiden sich Monozyten von MS-Patienten, die zum Zeitpunkt der Untersuchung an einem akuten Schub litten von denen ohne Schub in dieser Hinsicht?
- Wo liegen die Unterschiede zwischen Monozyten von MS-Patienten, die sich in verschiedenen Stadien der Erkrankung befinden bzw. an verschiedenen Formen von MS leiden?

Hierzu werden in einem ersten Schritt Monozyten von gesunden Probanden isoliert und drei Stunden *in vitro* mit MP inkubiert. Weiterhin erfolgt eine Isolation und eine dreistündige *In-vitro*-Inkubation auch von Monozyten von MS-Patienten. Da die klinische Wirkung einer MP-Therapie in MS meist schon innerhalb von 24 h eintritt und sich bisher wenige Studien mit den kurzfristigen Effekten von GC auf Monozyten beschäftigten, werden außerdem vor und 24 h nach einer intravenösen Gabe von MP als Therapie Monozyten von Patienten isoliert. Mit den an den verschiedenen Zeitpunkten isolierten Zellgruppen werden anschließend Transmigrationsassays gegen die oben besprochenen Chemokine CCL2, CCL5 und CX_3CL_1 durchgeführt. Weitere Eigenschaften der Zellen im Sinne der Expression von Zytokinen, Chemokinrezeptoren und Markern für die Einteilung in Subpopulationen der Monozyten werden mithilfe der qrtPCR und des Durchflusszytometers bestimmt. So sollen Erkenntnisse darüber gewonnen werden, wie sich MP auf die Motilität von Monozyten auswirkt und ob sich der Therapieerfolg der GC mit einer Änderung der Taxis der Monozyten oder einer Änderung ihrer Subpopulationsverteilung begründen lässt.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte, Materialien, Puffer und Lösungen

Tabelle 2: **Geräte**

Produkt	Hersteller
7500 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Arium 611 Reinstwassersystem	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Axiovert 35 Mikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
BD FACSCanto™ II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD LSR II Cell Analyzer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Capsulefuge PMC-060	TOMY Digital Biology, Tokyo, Japan
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ChemiLux Imager	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland
Electrophoresis Power Supply EPS 301	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St. Giles, England
Gel Imager	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland
Heizblock Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
HeraCell 240 Brutschrank	Haraeus Instruments, Hanau, Deutschland
HeraSafe Sterilbank	Haraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Mastercycler Gradient PCR-Cycler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mini-PROTEAN Tetra Cell SDS-Gelkammer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Multifuge 4KR	Haraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Pipettierhilfe PipetBoy Multipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Power Pac Basic Netzanschluss	Bio-Rad Laboratories, Hercules USA
RS 225 A X-Ray Box	Gulmay Medical, Camberley, Großbritannien
SE 600 Ruby Standard Vertical Unit	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont, St. Giles, England
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Sigma 2-5 Zentrifuge	SIGMA Laborzentrifugen, Osterode, Deutschland
Analysewaage TE612	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Telaval 31	Zeiss, Jena, Deutschland
Primo Star Mikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Vortex-Genie 2	Bender und Hopstein, Zürich, Schweiz
Kühlschrank/Tiefkühltruhe: Liebherr Gastroline/Comfort/Premium	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Pipette eppendorf Reference, research (plus)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette Gilson pipetman	Gilson, Inc., Middleton, USA
Thermo Scientific™ Nano Drop™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts
EasySep™ Magnet	StemCell Technologies, Köln, Deutschland

Tabelle 3: **Software**

Produkt	Hersteller
FlowJo	Tree Star Inc., Ashland, USA
ImageJ	Wayne Rasband (frei verfügbar)
AB 7500	Applied Biosystems, Foster City, USA
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
FACSDiva	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 4: **Puffer und Lösungen**

Produkt	Zusammensetzung
1% Agarosegel	1% Agarose in TAE-Puffer; 0,1 µg/mL Ethidiumbromid
RPMI Medium 1640 (1x) + GlutaMAX™ 500mL	Gibco® life technologies™, Darmstadt, Deutschland
BSA-Lösung	PBS/Tween, 5% BSA + 0,01% NaN_3
FACS-Puffer	PBS (pH 7,2) + 0,1% BSA + 0,01% NaN_3
PBS	0,8% NaCl; 0,02% KCl; 0,29% Na_2HPO_4 x 12 H_2O; 0,02% KH_2PO_4
PBS/BSA	PBS; 0,1% BSA
TAE	40 mM Tris-Acetat + 1 mM EDTA
Migrationsmedium	RPMI, 0,5% fettfreies BSA
Inkubationsmedium	RPMI, 0,5% fettfreies BSA
Detachement Buffer	PBS, 2mM EDTA
Recommended Medium für EasySep	PBS, 1mM EDTA, 2% FCS

Tabelle 5: **Chemikalien**

Produkt	Hersteller
Agarose	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA fettfrei	Sigma Aldrich, München, Deutschland
DNA-Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
EDTA	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
FCS	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ketamin	Medistar, Ascheberg, Deutschland
Lymphoprep™	Axis Shield, Norwegen
NaCl	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaN_3	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Orange G	Sigma Aldrich, St. Luis, USA

Produkt	Hersteller
RPMI Medium	Invitrogen, Carlsbad, USA
SDS	Serva, Heidelberg, Deutschland
Xylazin	Ecuphar, Greifswald, Deutschland
Heparin 25.000 I.E./5mL	ROTEXMEDICA GmbH, Trittau, Deutschland

Tabelle 6: **Verbrauchsmaterialien**

Produkt	Hersteller
Falcons (15 mL/50 mL)	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Platten (96-well)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Transwell® 24-well Platten	Corning Life Sciences, Acton MA, USA
Transwell® 24-well Platten mit 12 Sieben (5 µm), Nr.: 3527	Corning Life Sciences, Acton MA, USA
Reaktionsgefäße (1,5 mL/2 mL)	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Rundbodenröhrchen (5 mL)	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Spritzen (1mL/2mL/5mL/10mL)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Braun 100 Sterican® 20Gx2$^{3/4}$“ und 27G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Zellkulturschalen (10x2 cm)	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschand
cellstar (5/10/25mL) für Multipette	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Zellsiebe EASYstrainer™ 40µm	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Nitril® NextGen® Handschuhe	Rösner-Mautby Meditrade GmbH, Kiefersfelden, Deutschland
Multifly®-Kanüle für S-Monovette® inkl. Multiadapter, Nr.2, grün, 80 mm	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschand
S-Monovette 9mL LH	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschand
Pipettenspitzen 1000µL/10µL	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschand
Pipettenspitzen 100µL	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Cell Scraper	SPL Life Sciences Co., Ltd., Korea
Parafilm „µ“	Pechiney Plastic Packages, Chicago, USA
Spin-Away™ Säule	Zymo-Research, Orange, USA
Collection Tube™	Zymo-Research, Orange, USA
Zymo-Spin™ IIICG Säule	Zymo-Research, Orange, USA

Tabelle 7: **Enzyme und Kits**

Produkt	Hersteller
Easy Sep™ Human Monocyte Enrichement Kit	StemCell Technologies, Köln, Deutschland

Produkt	Hersteller
DNAse I	Roche, Grenzach, Deutschland
GeneScan 400 HD®	Applied Biosystems, Foster City, USA
Taq-Poymerase	Genaxxon, Ulm, Deutschland
Quick-RNA™ Mini Prep	Zymo-Research, Orange, USA
RNeasy® MiniKit	Quiagen, Hilden, Deutschland
iScript™ Reverse Transkriptase Kit	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Proteinase K	Applichem, Gatersleben, Deutschland
SYBR-Green Powermix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Primer für qrtPCR (siehe Tabelle 7)	metabion GmbH, Planegg/Steinkirchen, Deutschland

Tabelle 8: **Antikörper**

Produkt	Hersteller
Anti-Human CD14-PE/Cy7 Klon: HCD14	BioLegend, Niederlande
Anti-Human CD16-APC/Cy7 Klon: 3G8	BioLegend, Niederlande
Anti-Human CD192 (CCR2)-PerCP/Cy5.5 Klon: K036C2	BioLegend, Niederlande
Anti-Human CX3CR1-FITC Klon: 2A9-1	BioLegend, Niederlande

Tabelle 9: **Chemokine**

Produkt	Hersteller
rh CCL2	ImmunoTools, Germany
rh CX_3CL_1	ImmunoTools, Germany
rh CCL5	ImmunoTools, Germany
rm CCL2	ImmunoTools, Germany
rm CX_3CL_1	ImmunoTools, Germany
rm CCL5	ImmunoTools, Germany

2.2 Tiere, Probanden und Patienten

Für die Etablierung der Experimente wurden Monozyten aus Milz und Blut von Mäusen verwendet. Hierbei handelte es sich um Mäuse des Stammes C57/Bl6. Die an unseren Studien zu humanen Monozyten teilnehmenden Probanden und Patienten wurden im Vorfeld über die Risiken der Blutentnahme aufgeklärt und gaben mithilfe eines Aufklärungsbogens und einer Erklärung schriftlich ihr Einverständnis zum Mitwirken. Auch die Einwilligung der Ethikkommission wurde im Vorfeld eingeholt (Ethikantrag Az. 1/7/14). Eine Auflistung der an der Studie beteiligten Probanden und Patienten findet sich in Tabelle 10 und 11.

Tabelle 10: **An der Studie teilnehmende gesunde Probanden**

	Alter	**Geschlecht**
1	29	W
2	23	M
2	22	M
3	26	M
4	41	M
5	40	M
6	29	W
7	27	W
8	22	W
9	28	W
10	23	W
11	27	M
12	24	M
13	24	M
14	22	W
15	23	W
16	47	M
17	23	M
18	23	M
19	25	M

Tabelle 10 zeigt die Auflistung der gesunden Probanden, die an der Studie zur vorliegenden Arbeit teilnahmen. Auf ein ausgewogenes Verhältnis von weiblichen und männlichen Teilnehmern wurde geachtet.

Tabelle 11: **An der Studie teilnehmende Patienten**

a) RRMS

	Alter	Geschlecht	Dauer (Jahre)	EDSS	Therapie	Monate seit letzter MP-Gabe	Schub
1	24	W	1	2,5	Fingolimod	1-2	ja
2	44	W	3	1	Copaxone	-	ja
3	47	W	1	2	Glatirameracetat	3	ja
4	38	W	4	2,5	IFNβ	-	ja
5	44	M	7	3	Fingolimod	-	ja
6	43	M	20	4	IFNβ	3	ja
7	42	M	1	2,5	DMF	11	ja
8	25	M	6	2,5	-	-	ja
9	49	M	1	3	-	1,5	ja
10	44	M	4	1	Teriflunomid	-	ja
11	47	M	6	3	IFNβ	2	ja
12	24	W	4	3	-	2 Wochen	ja

b) SPMS

	Alter	Geschlecht	Dauer (Jahre)	EDSS	Therapie	Monate seit letzter MP-Gabe	Schub
1	41	M	12	6	Intervall MP	3	nein
2	54	W	41	8	Intervall MP	3	nein
3	60	W	34	6	-	Jahr 2010	nein

c) SPMS mit Schüben

	Alter	Geschlecht	Dauer (Jahre)	EDSS	Therapie	Monate seit letzter MP-Gabe	Schub
1	55	W	3	5	Copaxone	3	ja
2	55	W	28	6,5	Copaxone	3	ja
3	65	M	45	6,5	-	3	ja
4	52	M	7	4	-	-	nein

d) PPMS

	Alter	Geschlecht	Dauer (Jahre)	EDSS	Therapie	Monate seit letzter MP-Gabe	Schub
1	66	W	10	5	Intervall MP	3	nein
2	60	W	14	4,5	-	4	nein
3	50	W	14	4	Intervall MP	3	nein
4	54	W	11	6,5	-	3	nein
5	35	W	15	7,5	-	4	nein
6	65	M	7	6,5	Intervall MP	6	nein
7	58	W	11	4	Intervall MP	3	nein
8	69	M	18	6	Intervall MP	3	nein

Tabelle 11 a-d zeigt eine Auflistung aller Patienten, die an der Studie zur vorliegenden Arbeit teilnahmen. Als Charakteristika der Patienten wurde das Alter, das Geschlecht, die Dauer der Erkrankung in Jahren, die aktuelle EDSS vor MP-Applikation, anderweitige Therapien, die verstrichene Zeit seit der letzten MP-Gabe in Monaten und die Aktivität der Erkrankung im Sinne eines Schubes gewählt. Je nach Zellzahl flossen die Proben der Patienten in die Studie der Migration und/oder der Analyse der Oberflächenexpression von Chemokinrezeptoren und Markerproteinen ein. Die Auflistung der Patienten ist nach MS-Form geordnet.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von Monozyten aus Mäusen

Die Euthanasie der Maus erfolgte tierschutzgerecht durch CO_2. Sofort nach dem Tod erfolgte die Punktion des Herzens mit einer Kanüle (27G) und einer mit 10 µL Heparin vorgefüllten Spritze. Das Blut wurde auf mehrere 0,5 mL Eppendorff-Gefäße verteilt. Im Anschluss wurde die Milz präpariert, mithilfe des Stempels einer 2 mL Spritze durch ein 100 µm Sieb in einen 50 mL Röhrchen gedrückt. Das Sieb wurde mehrfach mit PBS/*bovine serum albumin* (BSA) gespült und das Röhrchen 5 min bei 300xg zentrifugiert. Hiernach wurde der Überstand abgezogen und in PBS resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Hämolyse.

2.3.2 Isolierung von Monozyten aus humanem Spenderblut

Nach Abnahme von circa 40mL Vollblut in Lithium-Heparin-Röhrchen wurde es im Verhältnis 1:1 mit PBS-Ethylendiamintetraacetat (PBS-EDTA) 1 mM verdünnt. In einem 50 mL Falcon wurden danach zwei Teile Blut vorsichtig auf einen Teil Lymphoprep® geschichtet. Die Zentrifugation im Anschluss erfolgte bei 4 °C und 800 x g für 25 Minuten mit langsamer Rotationsbeschleunigung (4) und Bremse 0. Ein Schema der sich durch die Zentrifugation bildenden Schichtung der Blutbestandteile ist in Abbildung 1 dargestellt.

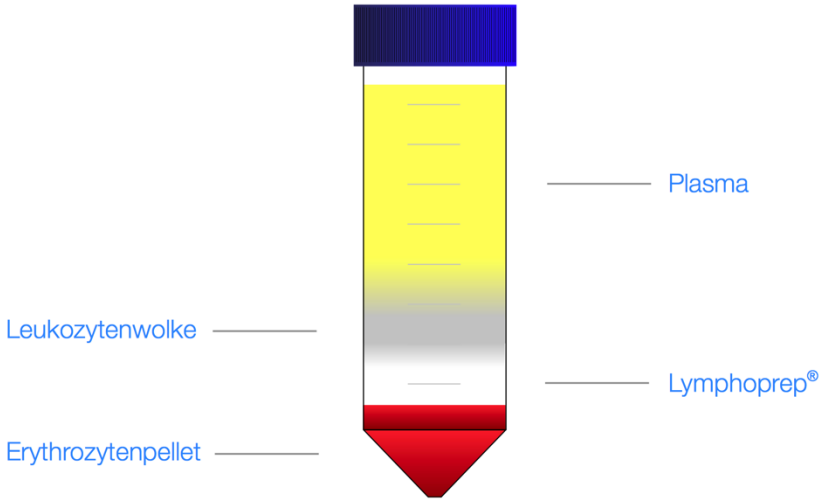


Abbildung 1: **Schichtung der Blutbestandteile des Lymphoprep®-Gradienten** Der Falcon mit Vollblut und Lymphoprep® wird bei 800 x g und 4 °C für 25 min zentrifugiert. Dabei sammelt sich am Boden des Falcons das Erythrozytenpellet und zwischen Plasma und Lymphoprep® die Leukozytenwolke, die mit einer Kanüle aspiriert wird. Basierend auf: *product information sheet* des Easy Sep™ Human Monocyte Enrichement Kit und Böyum 1968.

Nach der Zentrifugation fanden sich die Leukozyten als trübe Wolke zwischen Lymphoprep® und dem überstehenden Plasma. Mit einer 2 mL Spritze und einer langen Kanüle (20Gx23/4“) wurden die weißen Blutzellen nun abgezogen, bis an der Grenze zwischen Lymphoprep® und Plasma kein Schleier mehr zu erkennen war. Die in einem weiteren 50 mL Falcon gesammelte Zellsuspension wurde nun mit PBS-EDTA 1 mM aufgefüllt und bei 4 °C und 300 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Dieser Schritt diente dazu, eventuell mit aufgezogenes Lymphoprep® zu verdünnen und auszuwaschen. Nach der Zentrifugation war das Leukozytenpellet fertig zur Verwendung (Abb.1).

2.3.2.1 Quantifizieren der Leukozyten

Für ein optimales Ergebnis beim Aufreinigen der Monozyten wurde eine Zellsuspension mit der Konzentration 5 x 10^7 Zellen pro mL benötigt; hierzu wurde das Leukozytenpellet in 500 µL Recommended Medium (PBS, 1mM EDTA, 2% *fetal calf serum* (FCS)) resuspendiert und ein 1:100 verdünntes Aliquot in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Formel zur Berechnung der absolut enthaltenden Zellzahl:

$$[\text{gezählte Zellen}]/4 \times 10^4 \text{ Zellen/mL} \times 100 \times 0{,}5 \text{ mL}$$

Anschließend wurde die Konzentration eingestellt.

2.3.2.2 Isolierung von Monozyten aus dem Leukozytenpool via EasySep™

Wir testeten zwei Methoden zur Isolierung von Monozyten. EasySep™ stellte sich als der Adhäsion in Petrischalen (Bennet et al. 1966, Bennet et Breit 1994) überlegen heraus, sodass EasySep™ in allen folgenden Experimenten verwendet wurde. Bei EasySep™ handelt es sich um ein negatives Zellisolierungsverfahren, bei dem tetramere Antikörper als Bindeglied zwischen einer Zelle und einem magnetischen Partikel fungieren, diesen Komplex in einem starken Magneten halten und so am Ausfluss hindern. Hierfür sind verschiedene Antikörpercocktails verfügbar. So können alle außer den gewünschten Zellen - hier Monozyten - von Antikörpern erfasst und am Magneten fixiert werden (Abb. 2 und 3).

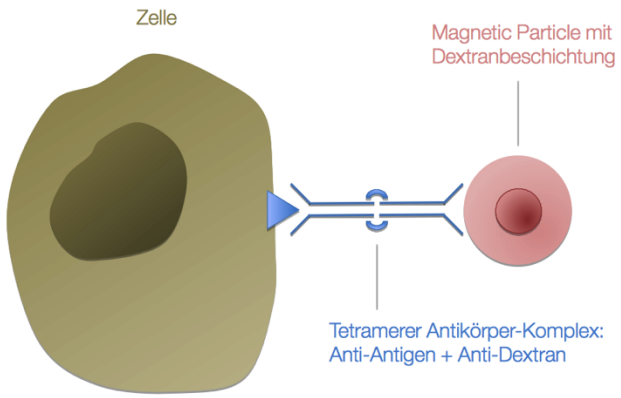


Abbildung 2: **Schema der Funktionsweise des EasySep™-Zellseparationskit I** Easy Sep™ bietet verschiedene, fertig gemischte Kits mit Mischungen aus tetrameren Antikörpern zur Zellseparation an. Die bivalenten Antikörper binden Dextran und Antigene, die von den zu eliminierenden Zellen exprimiert werden. So vermitteln sie die Bindung zwischen mit Dextran beschichteten magnetische Partikel und den Zellen, die entfernt werden sollen. Basierend auf: *product information sheet* des EasySep™ Human Monocyte Enrichement Kit.

Nachdem eine Zellsuspension mit einer Konzentration von $5x10^7$ Zellen pro mL hergestellt und diese in ein 5 mL Rundbodenröhrchen transferiert worden war, wurden 50 µL pro mL Zellsuspension hinzugeben und für 10 Minuten bei 8 °C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden 50 µL pro mL Zellsuspension der 30 Sekunden lang gevortexten Magnetic Particles hinzugegeben und 5 Minuten bei 8 °C inkubiert. Hiernach wurde das Volumen auf 2,5 mL mit Recommended Medium (PBS, 1mM EDTA, 2% FCS) aufgefüllt, zwei- bis dreimal vorsichtig gemischt und das Röhrchen im EasySep®-Magenten platziert. Nach 2,5 Minuten bei Raumtemperatur wurde der Inhalt in einer gleichmäßigen Bewegung abgegossen und in einem Rundbodenröhrchen aufgefangen. Die Monozyten befanden sich nun im Röhrchen,

alle anderen Zellen blieben im Magneten fixiert. Im Anschluss erfolgte eine Waschung mit mit RPMI gewaschen (4 °C, 300xg, 6 Minuten) und waren gebrauchsfertig.

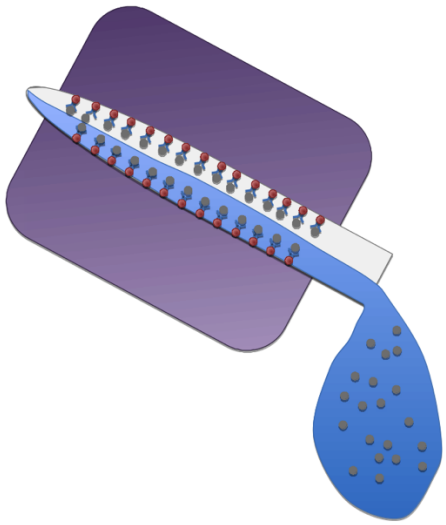


Abbildung 3: **Schema der Funktionsweise des EasySep™-Zellseparationskit II** Während der Inkubationszeit von 2,5 min werden die Komplexe aus magnetischen Partikeln, bivalenten Antikörpern und zu eliminierenden Zellen an der Wand des Röhrchens magnetisch fixiert. Beim anschließenden Entleeren verbleiben die Komplexe im Rundbodenröhrchen, während die Zellen, die isoliert werden sollen, aufgefangen werden. Basierend auf: *product information sheet* des EasySep™ Human Monocyte Enrichement Kit.

2.3.3 Inkubation mit Methylprednisolon

Für die Inkubation wurden die Zellen in 1mL RPMI, 0,5% fettfreies BSA suspendiert wurden diese ohne und mit MP in einer Konzentration von 10^{-6} mol/mL MP bei 37 °C für drei Stunden inkubiert. Nach drei Stunden wurden die Monozyten einmal mit RPMI gewaschen (4 °C, 300 x g, 6 Minuten) und waren nun für die weitere Verwendung geeignet. Im Falle der Patienten wurden Monozyten vor (A-Probe) und 24h nach einer IVMP Therapie mit 1 g MP (B-Probe) isoliert. Die A-Probe wurde wie oben behandelt, die B-Probe nur 3 h ohne MP inkubiert.

2.3.4 Durchflusszytometer

Sowohl zur Zählung von Zellen zum Auswerten der Migrationsassays als auch zur Bestimmung ihrer Eigenschaften wurde die Durchflusszytometrie verwendet. Um die die Zellproben zu färben, wurden je 10^5 bis 10^6 Zellen in Suspension in ein 5 mL Rundbodenröhrchen transferiert, auf 4 mL mit FACS-Puffer (PBS (pH 7,2) + 0,1% BSA + 0,01% NaN_3) aufgefüllt, dann pelletiert (1500 U/min, 5 min). Nach Abschütten des Überstandes wurden die

Zellen im Restvolumen resuspendiert (circa 100 bis 200 µL) und mit 20 µL eines vorher vorbereiteten titrierten Antikörpercocktails versetzt. Nach 20 Minuten Inkubation bei 4 °C, wurde das Rundbodenröhrchen mit FACS-Puffer gefüllt und erneut gewaschen (1500 U/min, 5 min), um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Das verwendete Durchflusszytometer war ein FACSCanto™ II von BD Biosciences, die dazugehörige Software FACSDiva™ von selbiger Firma. Zur Auswertung wurde die Software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, USA) verwendet.

2.3.5 Migration mit Transwell®

Der Einfluss von Methylprednisolon auf die Motilität von Monozyten wurde mithilfe von Migrationsassays mit Sieben (Transwell®) untersucht. In Versuchen mit Monozyten von anderen Autoren (Varga et al. 2008; Jalosinski et al., 2008) und unserer Arbeitsgruppe wurden Siebe mit einer Porengröße von 5 µm Durchmesser verwendet, sodass auch für unsere Versuche diese Größe gewählt wurde. Ein Schema des Aufbaus eines Transmigrationsassays ist in Abbildung 4 dargestellt.

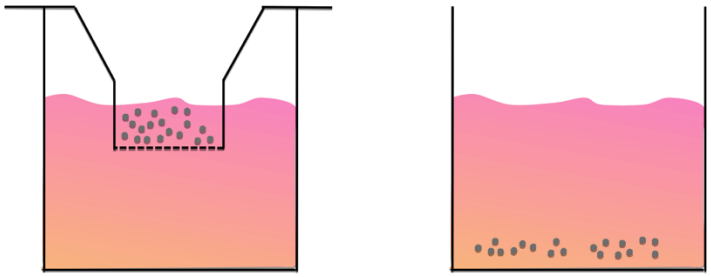


Abbildung 4: **Transmigrationsassay mit Transwell®-Sieben** Die Zellsuspension wurde in ein Siebchen pipettiert, in die Kammer darunter verschiedene Chemokine (links). Bei einem Ansatz wurde die Zellsuspension direkt in die Kammer pipettiert (rechts). Diese diente später als Referenz bei der Auswertung der anderen Ansätze. Basierend auf: *product information sheet* zu Transwell® von Corning Life Sciences.

Zur Vorbereitung wurde das Migrationsmedium (RPMI + 5% fettfreies BSA) mit Chemokin versetzt. Nach Titrationsversuchen konnten die besten Ergebnisse mit 10 ng/mL für CCL2 und CCL5, mit 1 ng/mL für CX_3CL_1 erreicht werden. Unter das Sieb wurden 600 µL Migrationsmedium pipettiert, in das Sieb 100 µL der in Migrationsmedium suspendierten Zellen. Pro Ansatz wurden 500.000 Zellen (im Vorfeld optimiert) benötigt; je nach Menge der gewonnenen Zellen wurde so die Anzahl der möglichen Ansätze gewählt. In einen Ansatz pro Zellprobe („Referenzwert“) wurden die Zellen direkt in das Medium pipettiert (500 µL plus 100 µL Zellsuspension) und kein Sieb platziert (Abb. 4); so konnten die in den anderen

Ansätzen gewanderten Zellen als Anteil an diesen 100% dargestellt werden (siehe Auswertung).

Der Effekt des MPs auf die Wanderungsfähigkeit der Monozyten wurde bei gesunden Probanden nach drei Stunden Inkubationszeit (37 °C) mit und ohne MP gemessen, bei an MS erkrankten Patienten an Tag 1 nach drei Stunden Inkubation mit und ohne MP (A-Probe) und an Tag 2 (nach Hochdosis MP-Behandlung, B-Probe) nach drei Stunden Inkubation ohne MP. Nach einer Stunde (im Vorfeld etabliert) Inkubationszeit (37 °C) wurde die Migration gestoppt. Das Medium unter dem Sieb wurde abgezogen, in 5mL Rundbodenröhrchen gesammelt und durch 600 µL Detachement Buffer (PBS, 2mM EDTA) ersetzt. Die Siebchen wurden wieder in das Well gesetzt, sodass auch Monozyten, die das Sieb passiert, jedoch auf der Unterseite desselben fixiert blieben, mit erfasst wurden. Nach 45 Minuten Detachement wurde der Boden eines jeden Wells mit einem Cell Scraper vorsichtig bearbeitet, um die haftenden Monozyten in Suspension zu bringen. Der Detachment Buffer wurde mit den suspendierten Zellen abgezogen und in den oben erwähnten Rundbodenröhrchen gesammelt. In die Röhrchen wurde je 100 µL der vorher gut aufgemischten Suspension mit APC^+-Beads gegeben, die als Referenz für die Zellzählung dienten. Danach wurde mit FACS-Puffer auf 4 mL aufgefüllt und bei 1500 U/min für fünf Minuten zentrifugiert. Hiernach erfolgte eine zweimalige Auswertung jeder Probe. Das Gating für Monozyten und Beads in FlowJo ist exemplarisch in Abbildung 5 dargestellt.

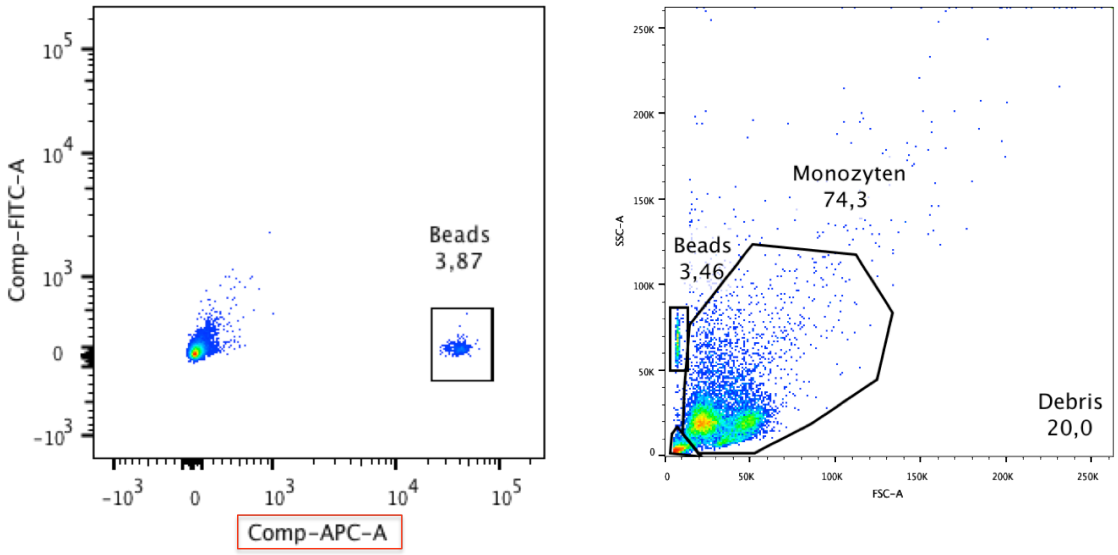


Abbildung 5: **FACS-Gatingstrategie für Monozyten und APC^+-Beads** Die Abgrenzung der Monozyten erfolgte im *forard scatter* (FSC)/*sideward scatter* (SSC)-Fenster, die Defintion der Beads im APC-Fenster. Eigener Screenshot aus FlowJo (Tree Star Inc.).

Hierbei diente der Ansatz ohne Sieb (Referenzwert) als „100% migriert“, so dass die gewanderten Zellen in einem Ansatz mit Sieb anteilig daran dargestellt werden konnten. Der Auswertungsalgorithmus ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: **Auswertung des Migrationsassays**

Ansatz	Zellzahl	Beadzahl	Zellen/Bead	mean	% Migration
Referenzwert	A	B	A/B	((A/B)+(A’/B’))/2 = X	
	A’	B’	A’/B’		
Ansatz	C	D	C/D	((C/D)+(C’/D’))/2 = Y	
mit Sieb	C’	D’	C’/D’		Y/Xx100

Jede Probe wurde zweifach analysiert, um Messfehler zu minimieren. Es wurde der Quotient aus der gemessenen Zellzahl und der gemessenen Zahl der Beads gebildet (Zellen/Bead), dieser Wert mit der zweiten Messung zu einem Mittelwert verrechnet. Die so berechneten Werte der Probe (Y) wurden anteilig am Referenzwert (X) in Prozent dargestellt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolation von mRNA

Für die Extraktion von RNA wurde das Isolationskit „QuickRNA Mini Prep“ von Zymo Research verwendet. Im ersten Schritt wurden die Zellen bei 500 x g für 8 Minuten pelletiert, im Anschluss das überstehende Medium abgezogen. Der Zellaufschluss erfolgte mit dem mitgelieferten Lysis Buffer. Das Pellet wurde mit 300 µL von diesem und Auf- und Abpipettieren gelöst. Das Lysat wurde für eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit (gilt für alle folgenden Zentrifugationen) geklärt, der Überstand auf eine Spin-Away™-Säule gegeben und für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde in einer mitgelieferten Collection Tube gesammelt und die Säule verworfen. In diesem Schritt wurde der größte Teil der genomischen DNA entfernt. Der Durchfluss (ca. 300 µL) wurde 1:1 mit Ethanol (99,8%) vermischt und anschließend auf eine Zymo-Spin™ IIICG Säule in einem Collection Tube gegeben. Nach der Zentrifugation (30 s) wurde der Durchfluss verworfen und 400 µL Prep Buffer auf die Säule gegeben. Nach der Zentrifugation (30 s) wurde der Durchfluss verworfen und 700 µL Wash Buffer auf die Säule gegeben. Nach erneuter Zentrifugation (30 s) wurde der Durchfluss verworfen und 400 µL Wash Buffer auf die Säule gegeben, danach für zwei Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Säule in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß platziert und mit 30 µL RNAse-freiem Wasser benetzt. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute wurde für 30 s zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt nun RNA, welche gebrauchsfertig war.

Nach der Isolation wurde eine Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop® und eine Qualitätsbestimmung mittels PCR mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt.

2.4.2 Quantifizierung der RNA mittels NanoDrop®

Die Konzentration der RNA in den einzelnen Proben wurde mit einem Spektrometer analysiert. Verwendet wurde ein NanoDrop® ND2000. Eine Einheit auf der Absorptionsskala entspricht 40 µg ssRNA und RNA hat bei circa $\lambda = 260$ nm sein Absorptionsmaximum. Die Konzentration der *complemantary RNA* (cRNA) kann demenstprechend mit

$$\text{cRNA } [\mu g/mL] = A260x40$$

berechnet werden. Im Programm wird ein Absorptionsspektrum von 220 bis 350 nm dargestellt. In der Probe enthaltenes Protein oder Lösungsmittel führen zu verstärkten Absorptionen auf anderen Wellenlängen als $\lambda = 260$ nm. Über den Absorptionsquotient A260/A280 kann eine Verunreinigung der RNA bestimmt werden. Für reine RNA sollte A260/A280 zwischen 1,9 und 2,1 liegen.

2.4.3 cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase

Die Produktion von *complementary DNA* (cDNA) aus der isolierten RNA für die folgenden PCR erfolgte mithilfe des iScript™ Reverse Transcriptase Kit von Bio-Rad. Maximal 1 µg RNA oder maximal 15,75 µL, 4 µL 5x iScript Mix und 0,25 µL Reverse Transkriptase (RT) wurden in einem Volumen von 20 µL angesetzt. Die Menge der eingesetzten RNA-Lösung berechnete sich durch die vorher mit NanoDrop® bestimmte Konzentration, sodass in jedem Ansatz etwa die gleiche Menge RNA enthalten war. Wenn weniger als 15,75 µL RNA-Lösung zur Verfügung stand, wurde mit H_20 auf dieses Volumen aufgefüllt. Durch 5 min Inkubation bei 25 °C lagerten sich die im iScript Mix enthaltenden Random Primer an die RNA an; die cDNA-Synthese durch die RT erfolgte für 30 min bei 42 °C. Nach Ablauf der Zeit wurde die Reaktion durch Denaturierung des Enzyms bei 85 °C (5 min) gestoppt. Die Qualität des cDNA Produktes wurde dann in einer PCR und anschließender Gelelektrophorese überprüft. Hierfür wurde ein Primer eines *housekeeping genes* (hier GAPDH) verwendet.

2.4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Sowohl um die Qualität der cDNA aus dem vorangegangenen Schritt, als auch die Qualität der Primer für die qrtPCR zu bestimmen, wurde eine klassische PCR durchgeführt. Das Protokoll hierzu ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: **Protokoll der Taq-PCR**

1 µL	cDNA	Annealing: 25 °C, 5 min
0,5 µL	Primermix (10 µM)	Elongation (30x): 42 °C, 30 min
0,2 µL	Taq-Polymerase	Denaturierung: 85 °C, 5 min
19,8 µL	H_2O	
2,5 µL 10x	Puffer S	
2,5 µL	Desoxynukleosidtriphosphat	

Tabelle 13 gibt einen Überblick über die Bestandteile und die Zyklusbedingungen der Taq-PCR.

Nach der PCR wurde das Produkt auf ein 1%-Agarosegel aufgetragen.

2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe einer Gelelektrophorese wurde die DNA auf ihre Qualität hin untersucht. Die Größe der Nukleinsäuren kann mithilfe einer DNA-Ladder ungefähr zugeordnet werden. Hierfür wurde ein 1%iges Agarosegel vorbereitet (5 g Agarose und 50 µL Ethidiumbromidlösung auf 500 mL TAE). Zum Testen der Qualität der isolierten RNA wurde eine Gelelektrophorese (220 mA,130 V, 12 min) durchgeführt und darauf geachtet, ob sich zwei eindeutige Banden darstellen ließen, die die RNA der eukaryotischen 40S- und 60S-Untereinheiten der Ribosomen darstellten.
Zum Testen der Qualität der Primerprodukte und der mit iScript™ RT hergestellten cDNA wurde eine Test-PCR (s.o.) durchgeführt. Hierbei wurden verschiedene Primer mit einer Referenz-cDNA (behandelt und unbehandelt) oder mehrere Ansätze mit neu aus RNA hergestellter cDNA mit GAPDH als *housekeeping gene* inkubiert. Anschließend wurde eine Gelelektophorese (220 mA, 130 V, 35 min) durchgeführt und darauf geachtet, dass sich eine abgrenzbare Bande darstellen ließ, deren Größe (vergleiche mit DNA-Ladder) im Bereich der erwarteten Produktgröße lag.

2.4.6 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Quantitativen Real Time Polymerase Kettenreaktion (qrtPCR) wurde die aus der zu untersuchenden RNA hergestellte cDNA verwendet (Tabelle 14). In jedem Elongationszyklus interkaliert ein Farbstoff (hier SYBR-Green) in die neu entstehende doppelsträngige DNA. Der DNA-SYBR-Green-Komplex absorbiert blaues Licht bei λ_{max} = 494 nm und emittiert grünes Licht bei λ_{max} = 521 nm, welches nach einer jeden Elongationsphase analysiert wird. Je nach vorliegender Menge an ursprünglich vorliegender cDNA wird nach einer

gewissen Anzahl an Zyklen (Ct-Wert) einen den die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigenden Intensitätsschwellenwert erreicht, der zur späteren Analyse der Genexpression herangezogen wird. Neben den Zielgenen wurde immer noch ein *housekeeping gene* analysiert. *Housekeeping genes* sind Gene, die von einer etwaigen Behandlung nicht beeinflusst werden, damit in allen Zellen gleich exprimiert werden und so als Referenz dienen können. Da man davon ausgehen muss, dass aus jeder Zellprobe eine andere Menge cDNA gewonnen wurde, wurden die Ergebnisse in Relation zu dem *housekeeping gene* gesetzt (siehe „Auswertung").
Der Effekt des MP auf die Expression bestimmter Gene der Monozyten wurde bei gesunden Probanden nach drei und 20 Stunden Inkubationszeit (37 °C) mit und ohne MP gemessen, bei an MS erkrankten Patienten an Tag 1 nach drei Stunden Inkubation mit und ohne MP und an Tag 2 (nach Hochdosis MP Behandlung) nach drei Stunden Inkubation ohne MP.

Tabelle 14: **Protokoll der qrtPCR mit SYBR-Green**

1 µL	cDNA	Annealing: 25 °C, 5 min
11 µL	H_2O	Elongation (50x): 42 °C, 30 min
12,5 µL	SYBR-Green	Denaturierung: 85 °C, 5 min
0,25 µL	Primermix (10µM)	

Tabelle 14 gibt einen Überblick über die Bestandteile und die Zyklusbedingungen der qrtPCR.

2.4.7 Primerwahl

Die Primer, die bei einer PCR verwendet werden, haben einen entscheidenden Einfluss auf Effektivität und Spezifität. Deshalb müssen sie sorgfältig ausgewählt werden. Die ausgewählten Primer sind zwischen 18 und 20 Basenpaare lang, haben einen GC-Anteil von 50 bis 60 Prozent und eine Schmelztemperatur (Tm) zwischen 59 und 60 °C, wobei die Tm des *foward* und des *reverse* Primers nicht zu sehr differieren sollten. Die Primer wurden mithilfe des *primer designing tools* von NCBI ausgewählt und bei metabion GmbH (Planegg/Steinkirchen, Deutschland) bestellt. Tabelle 15 bietet einen Überblick über die verwendeten Primer.

Tabelle 15: **Verwendete Primersequenzen**

Gen	Primersequenz
Human GAPDH	Fwd.: 5´ - CCT CCT GTT CGA CAG TCA GC Rev.: 5´- ACG ACC AAA TCC GTT GAC TCC
Human HPRT	Fwd.: 5´ - CCT GGC GTC GTG ATT AGT GA Rev.: 5´ - CGA GCA AGA CGT TCA GTC CT
Human CCR2	Fwd.: 5´ - ACC AGT CAA CTG GAC CAA GC Rev.: 5´ - GAA AAA GGC TTC TGA ACT TCT CCC
Human CCR5	Fwd.: 5´ - TGG CAT AGT ATT CTG TGT AGT GGG Rev.: 5´ - GAG AAT AGA TCT CTG GTC TGA AGG T
Human CX3CR1	Fwd.: 5´ - CCA GGC CGT GGA CTT AAA CC Rev.: 5´ - GAT CCA TGG TGA AGG CCC CA
Human CXCR4	Fwd.: 5´ - GCA GCA GGT AGC AAA GTG AC Rev.: 5´ - TGA AGT GTA TAT ACT GAT CCC CTC C
Human CD163	Fwd.: 5´ - GGC TTG CAG TTT CCT CAA GA Rev.: 5´ - AGC TGA CTC ATG GGA ATT TTC TG
Human VCAM1	Fwd.: 5´ - GTC AAT GTT GCC CCC AGA GA Rev.: 5´ - TGC CTG CTC CAC AGG ATT TT
Human ICAM1	Fwd.: 5´ - AGC TTC GTG TCC TGT ATG GC Rev.: 5´ - GAC ACT TGA GCT CGG GCA AT
Human LFA-1 (CD11a)	Fwd.: 5´ - GAG GAG GAA GGG ACA CCG A Rev.: 5´ - TCT CAA AAG GGA TCT CCC AGG
Human VLA4 (CD19d)	Fwd.: 5´ - CAA CGT GGA CAC TGA GAG CG Rev.: 5´ - ACC CAC TAG GAG CCA TCG G
Human TNFα	Fwd.: 5´ - TGT TGT AGC AAA CCC TCA AGC Rev.: 5´ - ATG AGG TAC AGG CCC TCT GAT
Human IL-10	Fwd.: 5´ - TTG CTG GAG GAC TTT AAG GGT T Rev.: 5´ - TCA CAT GCG CCT TGA TGT CT
Human IL-1β	Fwd.: 5´ - AAC AGG CTG CTC TGG GAT TC Rev.: 5´ - AGT CAT CCT CAT TGC CAC TGT
Human CD226	Fwd.: 5´ - CAG TGA CCA AGA GGG TGT TGA Rev.: 5´ - ACT GTT TGA AAG GCT GGT TCT TG

2.4.8 Vorbereitung der Primer

Die Primer wurden lyophilisiert geliefert. Es erfolgte ein Lösen in salzfreiem Wasser, sodass eine Konzentration von 10 µg/mL entstand. Für den Einsatz wurde eine gemeinsame 1:10 Verdünnung der Primer hergestellt (je 5 µL des *forward* und des *reverse* Primers, 40 µL destilliertes H_2O)

2.4.9 Auswertung mittels ΔΔ-Ct-Methode

Bei der ΔΔCt-Methode wird die Differenz aus dem *houskeeping gene* als Referenz und dem untersuchten Gen gebildet (ΔCt). Im nächsten Schritt wird die Differenz der ΔCt-Werte der Gene der Kontroll- und behandelten Gruppen gebildet (ΔΔCt). Mit der Formel: n-fache

Expression (Kontrolle/Behandelt) $=2^{-\Delta\Delta Ct}$ kann die Expression als Verhältnis dargestellt werden. Der Auswertungsalgorithmus ist in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: **Auswertungsalgorithmus der qrtPCR**

Probe	Ct-Wert (Referenz)	Ct-Wert (Probe)	ΔCt	ΔΔCt	Relative Expression
Kontrolle	X	A	A – X	(A – X) – (A – X)	$2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$
Behandelt	X'	B	B – X'	(B – X') – (A – X)	$2^{-\Delta\Delta Ct} = n$

Tabelle 16 gibt einen Überblick über den Auswertungsalgorithmus mit den in der qrtPCR ermittelten Ct-Werten. Bei Kontrollen und Behandelten wird die Differenz der Ct-Werte des *housekeeping gene* und dem zu untersuchenden Gen gebildet. Die anschließend berechnete Differenz der ΔCt-Werte von Kontrollen und Behandelten führt über $2^{-\Delta\Delta Ct} = n$ zur relativen Expression (n).

Nach abgelaufener PCR wird vom Programm eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wird die Temperatur sukzessive erhöht und die vorliegende DNA aufgeschmolzen, wodurch SYBR-Green freigesetzt wird. Die dadurch entstehende Änderung der Fluoreszenz wird detektiert. Aufgrund der größeren Länge haben korrekte PCR-Produkte eine höhere Schmelztemperatur als Primer-Dimere; somit kann per Schmelzkurve die Länge der Produkte und damit die Spezifität des Ergebnisses ermittelt werden.

2.5 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism durchgeführt. Die longitudinal beobachteten Gruppen (vor und nach Behandlung ohne und mit MP) wurden mit einem gepaarten t-Test oder mit *repeated mesurements one-way ANOVA mit Newman-Keuls Multiple Comparison Test* verglichen, da es sich um dieselben Probanden und Patienten bzw. deren Zellen handelte. Beim Vergleich der Daten von Probanden und Patienten bzw. verschiedenen Patientengruppen wurde ein ungepaarter t-Test oder *one-way ANOVA mit Newman-Keuls Multiple Comparison Test* verwendet. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. P-Werte >0,05 wurden als nicht signifikant gewertet (n.s.). Signifikante Unterschiede sind mit * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$) oder *** ($p<0,001$) gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

Mithilfe der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente sollte untersucht werden, inwiefern MP als therapeutisch eingesetztes GC zu den antiinflammatorischen Eigenschaften von Monozyten beiträgt und ob dabei analog zu T-Zellen auch die Beeinflussung der Motilität von Monozyten eine Rolle spielt. Dabei wurde neben der *In-vitro*-Behandlung von Monozyten von gesunden Probanden und MS-Patienten der Zeitraum von 24 h nach einer intravenösen MP-Applikation bei MS-Patienten fokussiert, da eine klinische Verbesserung der Symptomatik meist schon in diesem Zeitraum eintritt. Monozyten wurden von gesunden Probanden und MS-Patienten, die sich zu einer regelmäßigen MP-Applikation bzw. mit akutem Schub vorstellten, isoliert und *in vitro* mit MP behandelt. 24 h nach der intravenösen Gabe von MP wurden von denselben Patienten erneut Monozyten isoliert.

Im Mittelpunkt der Arbeit stand die Chemotaxis der Monozyten gegen Chemokine, die in der Pathogenese der MS eine Rolle spielen. Des Weiteren legten wir den Fokus auf die Expression von Markern, die bei der Definition der Monozytensubpopulationen (CD14, CD16, CCR2, CX_3CR_1) verwendet werden, um einen Rückschluss auf pro- und antiinflammatorische sowie adhäsive Eigenschaften der Zellen zu gewinnen. Da vergleichbare Versuche in der Arbeitsgruppe bisher hauptsächlich mit T-Zellen durchgeführt worden waren, bestand der erste Teil der Arbeit im Etablieren der Experimentalparameter.

3.1 Etablierung der experimentellen Bedingungen des Transmigrationsassays

Für die Etablierung der Boyden-Chamber-Assays bedienten wir uns des Mausmodells. Verwendet wurden aus Milz und Blut von Wildtypmäusen des Stammes C57/Bl6 isolierte Monozyten.

3.1.1 Dauer des Migrationsassays

Für die Analyse der migratorischen Aktivität von Monozyten wurden Migrationsassays verwendet, bei denen Monozyten aus der oberen Kammer einer Transwell®-Platte durch ein Sieb in die untere, mit CCL2, CCL5 oder CX_3CL_1 versehene, Kammer wandern. Zur Optimierung der Experimentalbedingungen wurden zunächst verschiedene Laufzeiten getestet. Erfahrung in der Arbeitsgruppe bestand mit T-Zellen und Peritonealmakrophagen, mit denen Migrationsassays mit 3 h Dauer durchgeführt worden waren, sodass wir diese Dauer in die Etablierung einschlossen. Da die späteren Experimente mit Monozyten von humanen

Probanden mit CCL2 begonnen werden sollten, wurde für die Etablierung dieses Chemokin verwendet.

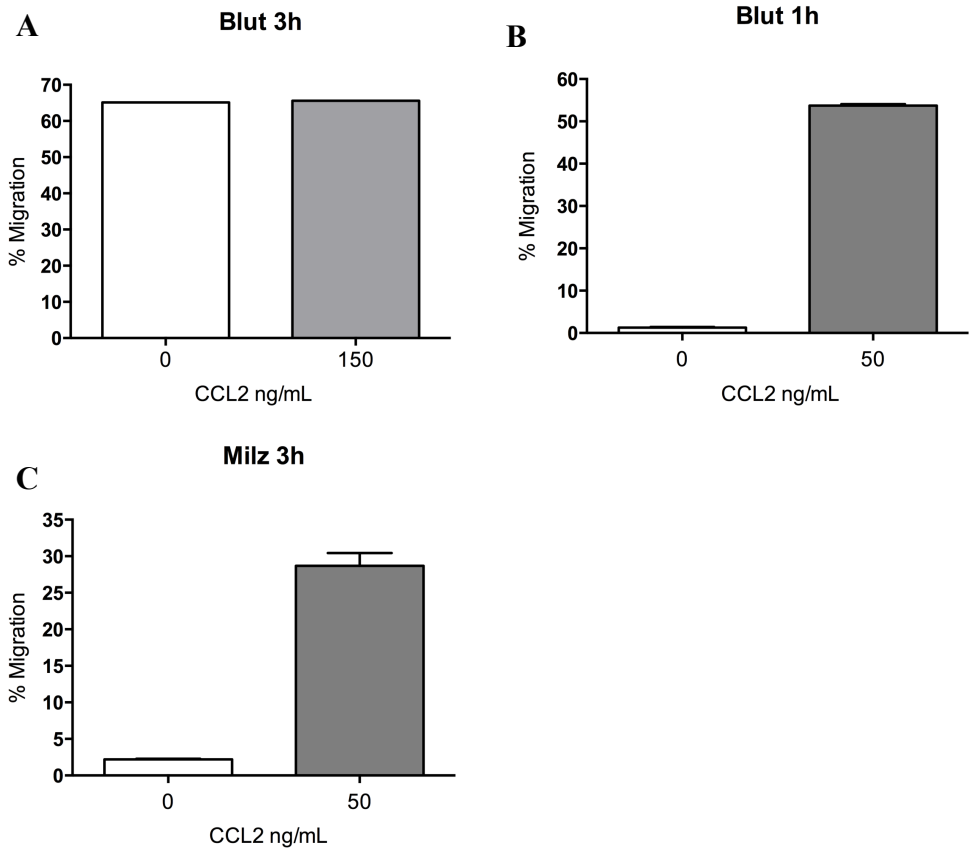


Abbildung 6: **Festlegung der Dauer der Migrationsassays** Monozyten aus Blut und Milz von Mäusen wurden isoliert. Im Anschluss wurde ein Migrationsassay gegen 50 und 150 ng/mL CCL2 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch durch Zählen der Zellen in Relation zu einer standardisierten Menge APC-positiver Beads. Die Daten werden als Anteil der gewanderten Monozyten an den pro Ansatz eingesetzten Monozyten dargestellt. N = 1.

Die ersten Migrationsassays zeigten, dass Monozyten aus dem Blut aktiver waren als Monozyten aus der Milz. Bei einer Assaylaufzeit von 3 h ergab sich im Gegensatz zu aus Milz isolierten Monozyten (Abb. 6 C) kein Unterschied zwischen spontaner und gerichteter Migration (Abb. 6 A). In einem Pilotversuch mit humanen Monozyten konnte die Annahme, dass 3 h zu lang für aus dem Blut isolierte Monozyten sei, bestätigt werden; hier wanderten ca. 90% der Zellen spontan durch das Sieb (Daten nicht gezeigt). Für weitere Versuche setzen wir daher für aus dem Blut isolierten Monozyten eine Laufzeit von 1 h und für Monozyten aus der Milz 3 h an (Abb. 6 B).

3.1.2 Zellzahl

Parallel zu oben genannten Versuch testeten wir verschiedene Zellkonzentrationen für die Migrationsassays. In der Fachliteratur wurden 250.000 Zellen pro Ansatz verwendet (Ramirez et al. 2008), sodass wir diese Zellzahl in die Versuchsetablierung einschlossen. Als Chemokin verwendeten wir CCL2 in einer Konzentration von 50 ng/mL (Ramirez et al. 2010), da wir eine eigene Titration noch nicht durchgeführt hatten.

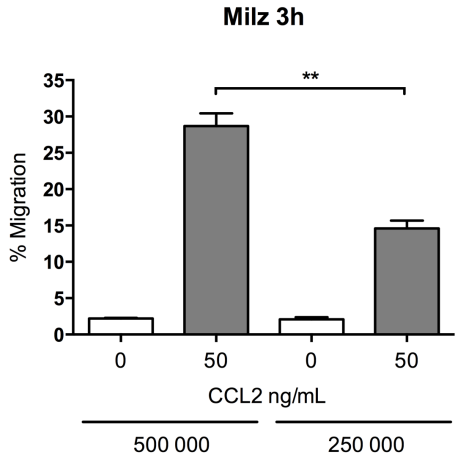


Abbildung 7: **Effekt der Zellzahl pro Ansatz auf die migratorische Kapazität muriner Monozyten** Die Isolierung der Monozyten erfolgte aus der Milz von Mäusen. Im Anschluss wurde ein Migrationsassay (Dauer 3 h) gegen 50 ng/mL CCL2 durchgeführt. Pro *well* wurden 250.000 Zellen oder 500.000 Zellen angesetzt. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch durch Zählen der Zellen in Relation zu einer standardisierten Menge APC-positiver Beads. Die Daten werden als Anteil der gewanderten Monozyten an den pro Ansatz eingesetzten Monozyten dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. N = 2. P-Werte über 0,05 wurden als nicht signifikant bewertet. Signifikante Unterschiede sind mit ** ($p<0,01$) gekennzeichnet.

In den Ansätzen mit 500.000 Zellen konnten wir eine signifikant stärkere Chemotaxis bei vergleichbarer Spontanmigration nachweisen (Abb. 7). So wurden für die kommenden Versuche entgegen den vorgeschlagenen 250.000 Monozyten pro Ansatz aus der Fachliteratur 500.000 Zellen verwendet.

3.1.3 Chemokinkonzentrationen

Zur Titration der Chemokinkonzentrationen für die Migrationsassays wurden Vorschläge aus der Literatur herangezogen. Für CCL2 fand sich 10 ng/mL (Mahad et al. 2006; Tei et al. 2013), für CCL5 2,5 ng/mL (Jalosinski et al. 2008) und für CX3CL1 10 ng/mL (Tei et al. 2013). Zur Optimierung der Experimentalbedingungen für unsere Assays wurden weite Konzentrationen getestet.

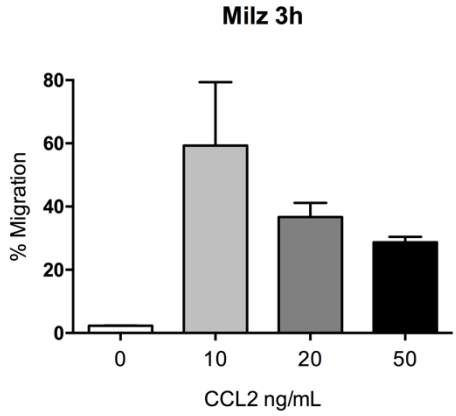


Abbildung 8: **Titration von CCL2 im murinen System** Die Isolierung der Monozyten erfolgte aus der Milz von Mäusen. Im Anschluss wurde ein Migrationsassay (Dauer 3 h) gegen 10, 20 und 50 ng/mL CCL2 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch durch Zählen der Zellen in Relation zu einer standardisierten Menge APC-positiver Beads. Die Daten werden als Anteil der gewanderten Monozyten an den pro Ansatz eingesetzten Monozyten dargestellt. N = 2-4.

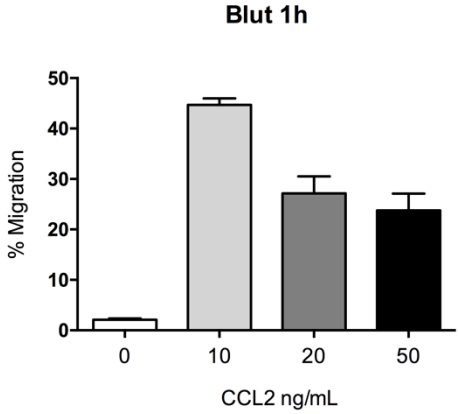


Abbildung 9: **Titration von CCL2 im humanen System** Monozyten wurden aus Vollblut eines gesunden Probanden isoliert. Im Anschluss wurde ein Migrationsassay (Dauer 1 h) gegen 10, 20 und 50 ng/mL CCL2 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch durch Zählen der Zellen in Relation zu einer standardisierten Menge APC-positiver Beads. Die Daten werden als Anteil der gewanderten Monozyten an den pro Ansatz eingesetzten Monozyten dargestellt. N = 2.

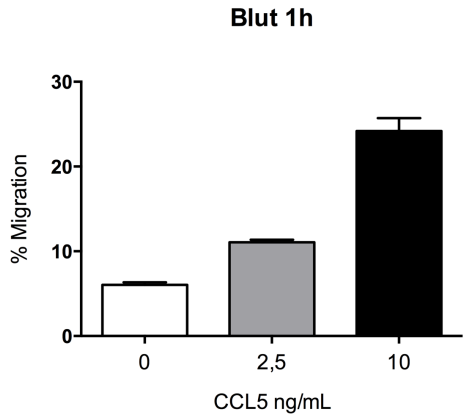


Abbildung 10: **Titration von CCL5 im humanen System** Monozyten wurden aus Vollblut eines gesunden Probanden isoliert. Im Anschluss wurde ein Migrationsassay gegen 0, 2,5 und 10 ng/mL CCL5 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch durch Zählen der Zellen in Relation zu einer standardisierten Menge APC-positiver Beads. Die Daten werden als Anteil der gewanderten Monozyten an den pro Ansatz eingesetzten Monozyten dargestellt. N = 1.

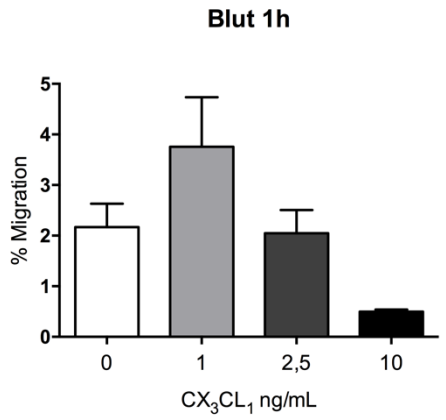


Abbildung 11: **Titration von CX_3CL_1 im humanen System** Monozyten wurden aus Vollblut von gesunden Probanden isoliert. Im Anschluss wurde ein Migrationsassay gegen 1, 2,5 und 10 ng/mL CX_3CL_1 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch durch Zählen der Zellen in Relation zu einer standardisierten Menge APC-positiver Beads. Die Daten werden als Anteil der gewanderten Monozyten an den pro Ansatz eingesetzten Monozyten dargestellt. N = 1-6.

Die schon von anderen Autoren verwendete Konzentration für CCL2 zeigte auch in unserem Experimentsetting sowohl für murine (Abb. 8) als auch humane Monozyten (Abb. 9) die besten Ergebnisse, sodass diese weiter verwendet wurden. Für CCL5 erreichten wir das optimale Ergebnis mit 10 ng/mL (Abb. 10), für CX_3CL_1 mit 1 ng/mL (Abb. 11), sodass mit diesen Konzentrationen weitergearbeitet wurde. Als endgültige Parameter für die Migrationsassays mit aus Blut isolierten Monozyten ergaben sich: 1 h Migration bei 37 °C mit 500.000 Zellen pro Ansatz und 10 ng/mL für CCL2 und CCL5 und 1 ng/mL für CX_3CL_1.

3.2 Gesunde Probanden

Nach der Festlegung der verschiedenen Experimentalparameter im Tiermodell und deren Verifizierung mit humanen Zellen wandten wir uns humanen Probanden zu, deren Monozyten weiter charakterisiert und später mit Monozyten von MS-Patienten verglichen werden sollten.

3.2.1 Der Einfluss von MP auf die Migration von Monozyten gesunder Probanden

In der folgenden Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob eine Behandlung von Monozyten mit MP einen Einfluss auf deren migratorische Aktivität hat. Hierzu wurden Monozyten aus dem Vollblut der Probanden isoliert und *in vitro* mit MP inkubiert.

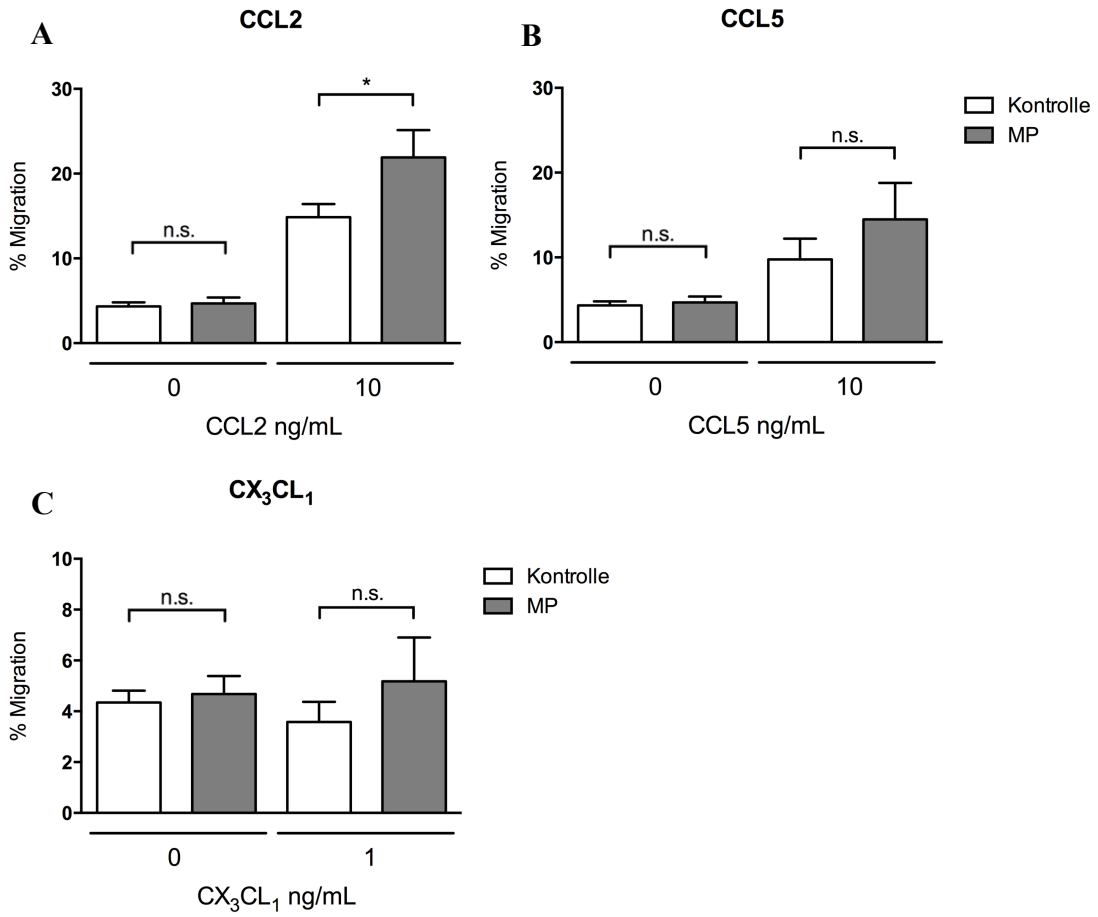


Abbildung 12: **Einfluss von MP auf die Migration von Monozyten gesunder Probanden gegen CCL2, CCL5 und CX_3CL_1** Von gesunden Probanden isolierte Monozyten wurden über 3 h bei 37 °C mit 10^{-6} M MP behandelt. Als Kontrolle wurde ein weiterer Ansatz Monozyten in Inkubationsmedium ohne MP über die gleiche Dauer inkubiert (Kontrolle). Im Anschluss wurde eine Migration gegen CCL2 (10 ng/mL), CCL5 (10ng/mL) oder CX_3CL_1 (1 ng/mL) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch durch Zählen der Zellen in Relation zu einer standardisierten Menge APC-positiver Beads. Die Daten werden als Anteil der gewanderten Monozyten an den pro Ansatz eingesetzten Monozyten dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels gepaartem t-Test. N = 7-27. P-Werte über 0.05 wurden als nicht signifikant bewertet (n.s.). Signifikante Unterschiede sind mit * ($p<0,05$) gekennzeichnet.

Die *In-vitro*-Behandlung mit 10^{-6} M MP für 3 h vor Durchführung des Migrationsassays führte zu einem signifikanten Anstieg der Chemotaxis gegen CCL2 (Abb. 12 A) und einem tendenziellen Anstieg der Chemotaxis gegen CCL5 und CX_3CL_1 (Abb. 12 B und C) gegenüber dem unbehandelten Kontrollansatz. Die Chemotaxis gegen CCL2 und CCL5 war stärker als die spontane Migration; die Chemotaxis gegen CX_3CL_1 war vergleichbar mit der Spontanmigration, welche durch die Behandlung mit MP nicht wesentlich beeinflusst wurde.

3.2.2 Analyse der Expression von Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche und ihrer mRNA

Im Anschluss wurde die Frage adressiert, ob die in den vorangegangenen Versuchen beobachtete verstärkte Chemotaxis durch eine durch MP induzierte Veränderung der Chemokinrezeptorexpression bedingt wird. Hierfür erfolgte eine Isolation von Monozyten aus dem Vollblut von gesunden Probanden mit anschließender Inkubation mit MP und Analyse im Durchflusszytometer.

3.2.2.1 Die Behandlung von Monozyten gesunder Probanden mit MP *in vitro* hat keinen Einfluss auf die Subpopulationsverteilung oder Chemokinrezeptorexpression

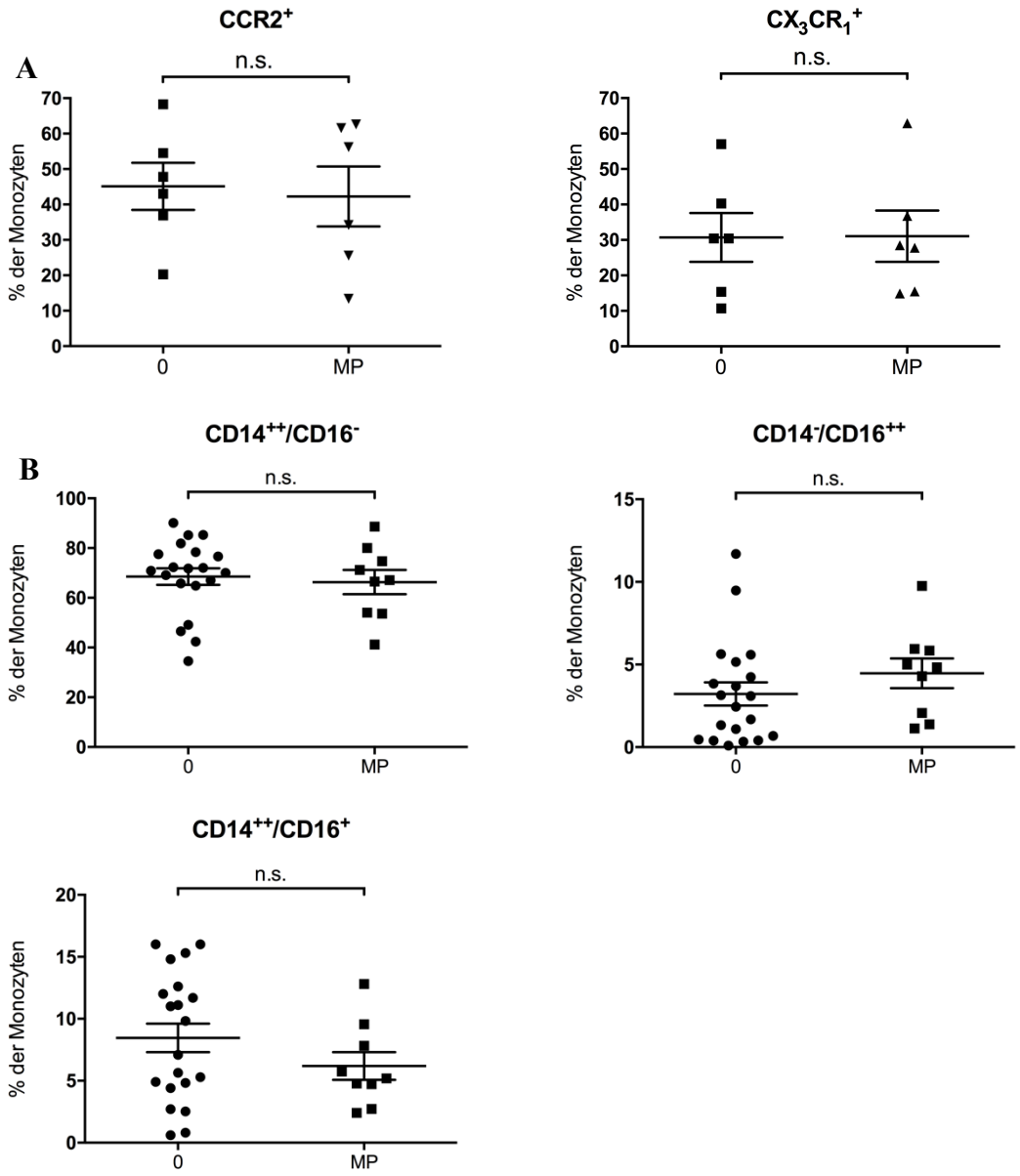


Abbildung 13: **Einfluss von MP auf die Subpopulationsverteilung von Monozyten gesunder Probanden** Monozyten wurden aus gesunden Probanden isoliert und über 3 h bei 37 °C mit 10^{-6} M MP behandelt. Als Kontrolle wurde ein weiterer Ansatz Monozyten in Inkubationsmedium ohne MP über die gleiche Dauer inkubiert. Im Anschluss wurde eine Analyse per Durchflusszytometer durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte mittels gepaartem t-Test. N = 6-20. Die Daten werden als Anteil der Marker-positiven Monozyten an der Gesamtzahl aller gezählten Monozyten dargestellt. P-Werte über 0,05 wurden als nicht signifikant bewertet (n.s.).

Die Monozytensubpopulationen wurden durch die *In-vitro*-Behandlung mit MP über 3 h nicht beeinflusst. Es war keine Zu- oder Abnahme der $CCR2^+$- oder $CX_3CR_1^+$-Monozytensubpopulationen (Abb. 13 A) bzw. der nach CD14 und CD16 definierten Subpopulationen (Abb. 13 B) zu verzeichnen. Bei beiden Gruppen war eine ähnliche Streuung der Ergebnisse zu beobachten. Auch die MFI als Maß für die Expressionsdichte der Chemokinrezeptoren CCR2 und CX_3CR_1 wurde durch die dreistündige *In-vitro*-Behandlung mit MP nicht beeinflusst. So änderte sich die Expression der Chemokinrezeptoren bei keiner der Monozytensubpopulationen (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt betrachtet induzierte die dreistündige *In-vitro*-Behandlung der Monozyten mit MP eine verstärkte Chemotaxis, die allerdings nicht auf einer verstärkten Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren basierte.

3.2.2.2 Die Behandlung von Monozyten gesunder Probanden mit MP hat keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der mRNA von den weiter untersuchten Chemokinrezeptoren

Um zu untersuchen, ob ein Einfluss auf die Rezeptorexpression vorhanden und die dreistündige Inkubation mit MP lediglich zu kurz war, um sich in Proteinform an der Zelloberfläche niederzuschlagen, wurde im nächsten Schritt durch mRNA-Analysen mittels qrtPCR untersucht. Als Zeitpunkte für die Isolation der mRNA legten wir 3 h und 20 h fest. So wurde die Vergleichbarkeit zu den Zellanalysen im Durchflusszytometer (Inkubation mit MP für 3 h) und die Einordnung in einen zeitlichen Zusammenhang gewährleistet.

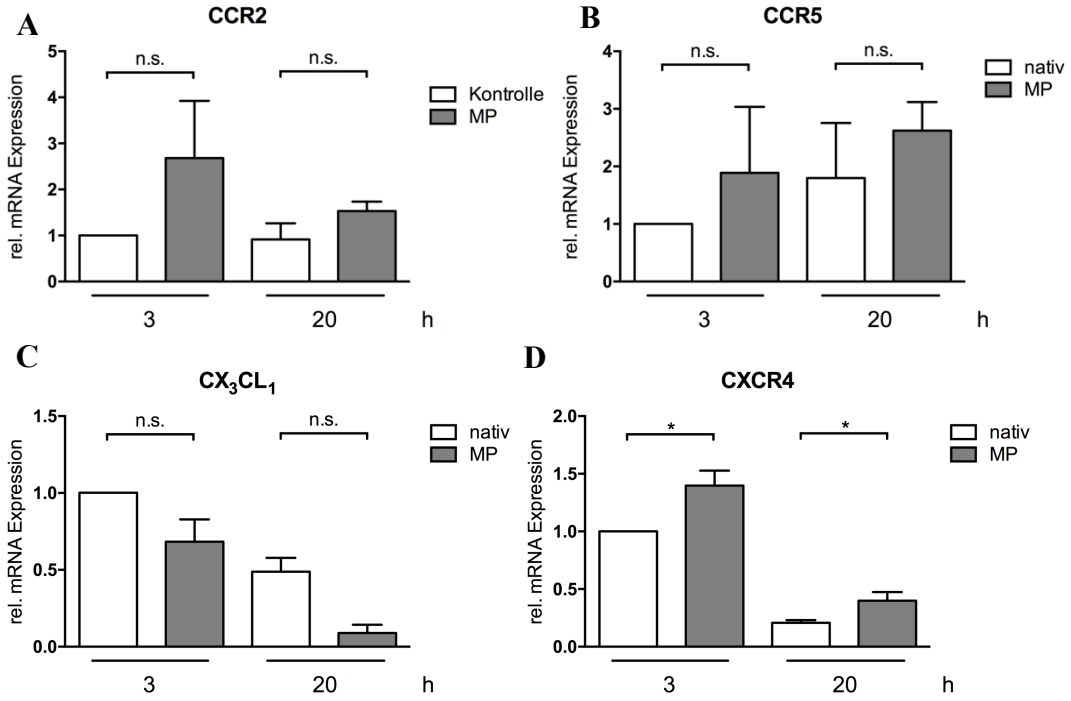


Abbildung 15: **Der Einfluss von MP auf die mRNA-Expression von Chemokinrezeptoren von Monozyten gesunder Probanden** Isolierte Monozyten von gesunden Probanden wurden über 3 h bzw. 20 h bei 37 °C mit 10^{-6} M MP behandelt. Als Kontrolle wurde ein weiterer Ansatz Monozyten in Inkubationsmedium ohne MP über die gleiche Dauer inkubiert. Im Anschluss wurde mRNA isoliert und eine qrtPCR durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte mittels gepaartem t-Test. N = 3-5. Die Daten werden als Vielfaches des Wertes bei 3 h Inkubation ohne MP dargestellt. P-Werte über 0,05 wurden als nicht signifikant bewertet (n.s.). Signifikante Unterschiede sind mit * ($p<0,05$) gekennzeichnet.

Tatsächlich ließ sich für die proinflammatorischen Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR5 (Abb. 15 A und B) die Tendenz zu einer verstärkten Expression durch die Inkubation mit MP an beiden gemessenen Zeitpunkten (3 und 20 h) feststellen. Umgekehrt zeigte sich für CX_3CR_1 (Abb. 15 C) die Tendenz zu einer Verringerung der mRNA-Expression. Auch die Inkubation selbst zeigte eine Wirkung: Während die Expression der mRNA für CCR2 in den unbehandelten Proben an den Zeitpunkten 3 h und 20 h vergleichbar war, wurde sie für CCR5 tendenziell verstärkt, für CX_3CR_1 vermindert. Eine Signifikanz wurde nicht erreicht. Die Expression des Rezeptors CXCR4 wurde durch die Dauer der Inkubation vermindert, an beiden Zeitpunkten zeigte sich aber eine signifikante Verstärkung der Expression durch MP (Abb. 15 D).

3.2.3 Weiterführende Analyse von Genexpression auf mRNA-Ebene

Neben der Chemotaxis haben Monozyten weitere Funktionen, die für die Erfüllung ihrer Aufgaben im Immunsystem eine wichtige Rolle spielen. Hierzu zählt unter anderem die Expression von Adhäsionsmolekülen, die für ihre Extravasation oder ihre Bindung zu anderen Zellen essentiell sind oder die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen. So untersuchten wir den Effekt von MP auf die Expression der monozytentypischen Adhäsionsmoleküle CD226 (DNAM-1), VLA-4 und LFA-1 (CD11a) und die Expression von TNFα und IL-1β. Weiterhin untersuchten wir die Expression von CSFR2A und ICAM-1. CSF2RA ist ein Teil des Rezeptors für GM-CSF, das eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von MS spielt. ICAM-1 wird von Endothelzellen, wo es der Adhäsion von Leukozyten dient sowie von Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert. Hier spielt es eine wichtige Rolle bei der Präsentation von prozessierten Antigenen, über die eine Reaktion von T-Zellen induziert wird.

3.2.3.1 Die *In-vitro*-Behandlung isolierter Monozyten von gesunden Probanden mit MP senkt die Expression von Adhäsionsmolekülen

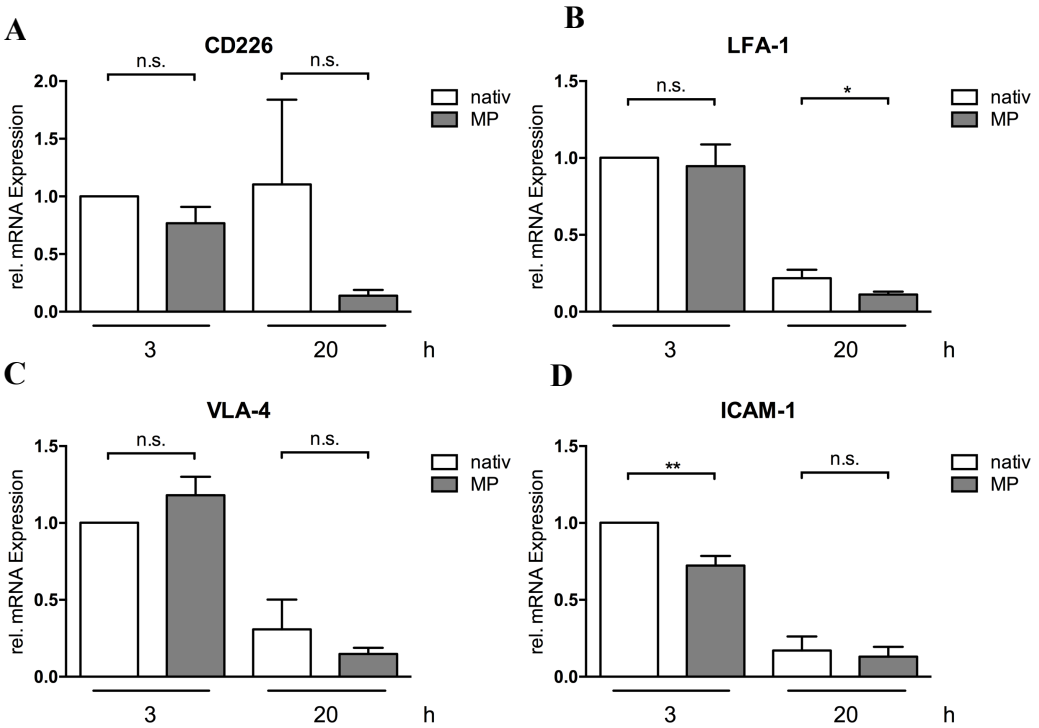


Abbildung 16: **Der Einfluss von MP auf die mRNA-Expression von Adhäsionsmolekülen von Monozyten gesunder Probanden** Isolierte Monozyten von gesunden Probanden wurden über 3 h bzw. 20 h bei 37 °C mit 10^{-6} M MP behandelt. Als Kontrolle wurde ein weiterer Ansatz Monozyten in Inkubationsmedium ohne MP über die gleiche Dauer inkubiert. Im Anschluss wurde mRNA isoliert und

eine qrtPCR durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte mittels gepaartem t-Test. N = 7-9. Die Daten werden als Vielfaches des Wertes bei 3 h Inkubation ohne MP dargestellt. P-Werte über 0,05 wurden als nicht signifikant bewertet (n.s.). Signifikante Unterschiede sind mit * ($p<0,05$) oder ** ($p<0,01$) gekennzeichnet.

Die PCR zeigte eine tendenzielle Verminderung der Expression von CD226 bei 3 h und 20 h im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Abb. 16 A), für LFA-1 eine tendenzielle nach 3 h und eine signifikante Verminderung nach 20 h in mit MP behandelten Monozyten (Abb. 16 B). Die Expression von VLA-4 wurde durch die Behandlung nach 3 h tendenziell verstärkt, nach 20 h jedoch tendenziell verringert (Abb. 16 C). Die Inkubationsdauer selbst führte zu einer Verringerung der Expression von LFA-1 und VLA-4. Für ICAM-1 zeigte die PCR eine Verminderung der Expression in mit MP behandelten Monozyten. Der Effekt war nach 3 h signifikant, nach 20 h nur tendenziell ausgeprägt. Die Inkubationsdauer führte zu einer insgesamt geringeren Expression von ICAM-1 nach 20 h (Abb. 16 D).

3.2.3.2 Die *In-vitro*-Behandlung isolierter Monozyten von gesunden Probanden mit MP hat einen Einfluss auf die Expression von proinflammatorischen Zytokinen

Die Produktion von IL-1β und TNFα zählt zu der inflammatorischen Aktivität von Monozyten, die zu Neurodegenration führen kann. GC supprimieren die Sekretion von IL-1β und TNFα in Monozyten und Makrophagen. CSF2RA ist Teil des Rezeptors für GM-CSF, ein proinflammatorisches Zytokin, das unter entzündlichen Bedingungen die Entwicklung von mononukleären Phagozyten fördert und eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von EAE und MS spielt. Dass GC in vielen Zellen die Expression von proinflammatorischen Zytokinen senken, ist bekannt. Hieran wurde angeknüpft und untersucht, ob das auch für humane Monozyten in unserem Experimentsetting galt.

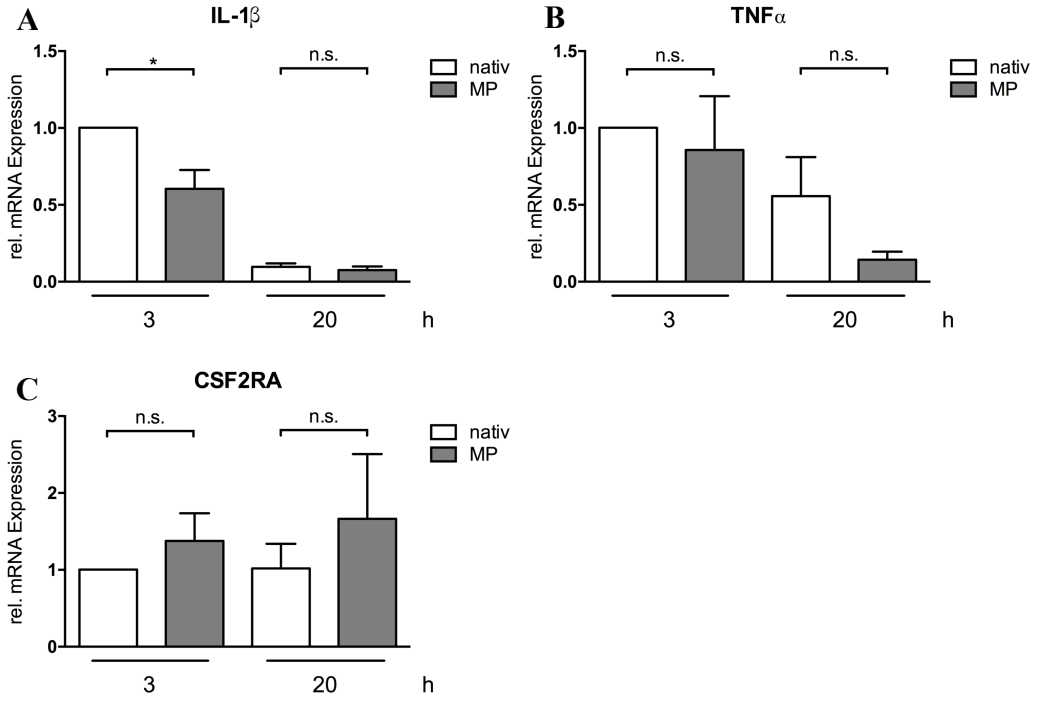


Abbildung 17: **Der Einfluss von MP auf die mRNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen von Monozyten gesunder Probanden** Isolierte Monozyten von gesunden Probanden wurden über 3 h bzw. 20 h bei 37 °C mit 10^{-6}M MP behandelt. Als Kontrolle wurde ein weiterer Ansatz Monozyten in Inkubationsmedium ohne MP über die gleiche Dauer inkubiert. Im Anschluss wurde mRNA isoliert und eine qrtPCR durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte mittels gepaartem t-Test. N = 7. Die Daten werden als Vielfaches des Wertes bei 3 h Inkubation ohne MP dargestellt. P-Werte über 0,05 wurden als nicht signifikant bewertet (n.s.). Signifikante Unterschiede sind mit * ($p<0,05$) gekennzeichnet.

Die PCR zeigte eine signifikante Verminderung der Expression von IL-1β nach 3 h Inkubation und eine tendenzielle Verminderung der Expression von IL-1β nach 20 h (Abb. 17 A), von TNFα nach 3 h und 20 h (Abb. 17 B) und eine tendenzielle Verstärkung der Expression von CSF2RA nach 3 h und 20 h in mit MP behandelten Monozyten (Abb. 17 C). Die Inkubation selbst führte zu einer Verringerung der Expression von IL-1β, von TNFα, während sie auf die Expression von CSF2RA keinen Einfluss hatte.

Zusammengefasst konnten wir bei Monozyten von gesunden Probanden eine signifikante Steigerung der Chemotaxis gegen CCL2 und eine tendenzielle Steigerung der Chemotaxis gegen CCL5 durch die *In-vitro*-Therapie mit MP feststellen. Diese beruhte allerdings weder auf einer verstärkten Oberflächenexpression von Chemokinrezeptoren, noch auf einer Änderung der Subpopulationsverteilung. Auf mRNA-Ebene konnten wir eine tendenzielle Verstärkung der Expression von CCR2 und CCR5, eine tendenzielle Suppression der Expression von CX_3CR_1, sowie einen geringen Einfluss auf Adhäsionsmoleküle, proinflammatorische Zytokine sowie CSF2RA beobachten.

3.3 Patienten

Monozyten von MS-Patienten vor (A-Probe) und 24 h nach einer intravenösen MP-Therapie (B-Probe) wurden isoliert. Die A-Probe wurde wie die Monozyten gesunder Probanden ohne und mit MP, die B-Probe ohne MP für je 3 h inkubiert und anschließend einem einstündigen Migrationsassay zugeführt bzw. durchflusszytometrisch analysiert. So sollten die Erkenntnisse aus den vorangegangenen Experimenten mit Monozyten gesunder Probanden auf MS-Patienten übertragen und mit diesen verglichen werden. Die Patienten wurden über die neurologische Ambulanz der Universitätsmedizin Göttingen rekrutiert und waren verschiedenen Alters, Geschlechts und unterschieden sich zum Teil in der Form der MS (RRMS, SPMS, PPMS), der Erkrankungsdauer und ihrer Therapie (siehe Tabelle 1). Patienten, die sich im Rahmen eines akuten Schubs präsentierten, erhielten das MP zur Kupierung des Schubes. An einer progressiven Form der MS erkrankte Patienten erhielten die MP-Therapie in einem regelmäßigen Intervall um die Progredienz der Symptome zu verlangsamen. Auf eine Analyse der mRNA-Expression zum Vergleich mit gesunden Probanden wurde im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von Probenmaterial von Patienten nach einigen Pilotversuchen verzichtet (Daten nicht gezeigt).

3.3.1 Vergleich von gesunden Probanden und Patienten

Analog zu gesunden Probanden untersuchten wir bei an MS erkrankten Patienten den Einfluss einer MP-Therapie auf die Chemotaxis ihrer Monozyten. Die Zellen wurden wie bei den Gesunden 3 h *in vitro* behandelt, um eine Vergleichbarkeit zu den Experimenten mit gesunden Probanden zu gewährleisten. Zusätzlich zu der A-Probe wurden die gleichen Versuche mit einer nach 24 h entnommenen B-Probe durchgeführt. So sollte der Effekt einer *In-vivo*-MP-Therapie nachvollzogen werden, welche häufig schon in den ersten 24 h eine deutliche Regredienz der Symptome bewirkt. Nach Erhebung der Daten verglichen wir in einem ersten Schritt die Ergebnisse der Transmigrationsassays der nicht mit MP behandelten Proben von gesunden Probanden und Patienten.

3.3.1.1 Monozyten von MS-Patienten zeigen eine stärkere Migration gegen CCL2, CCL5 und CX3CL1 als solche von gesunden Probanden

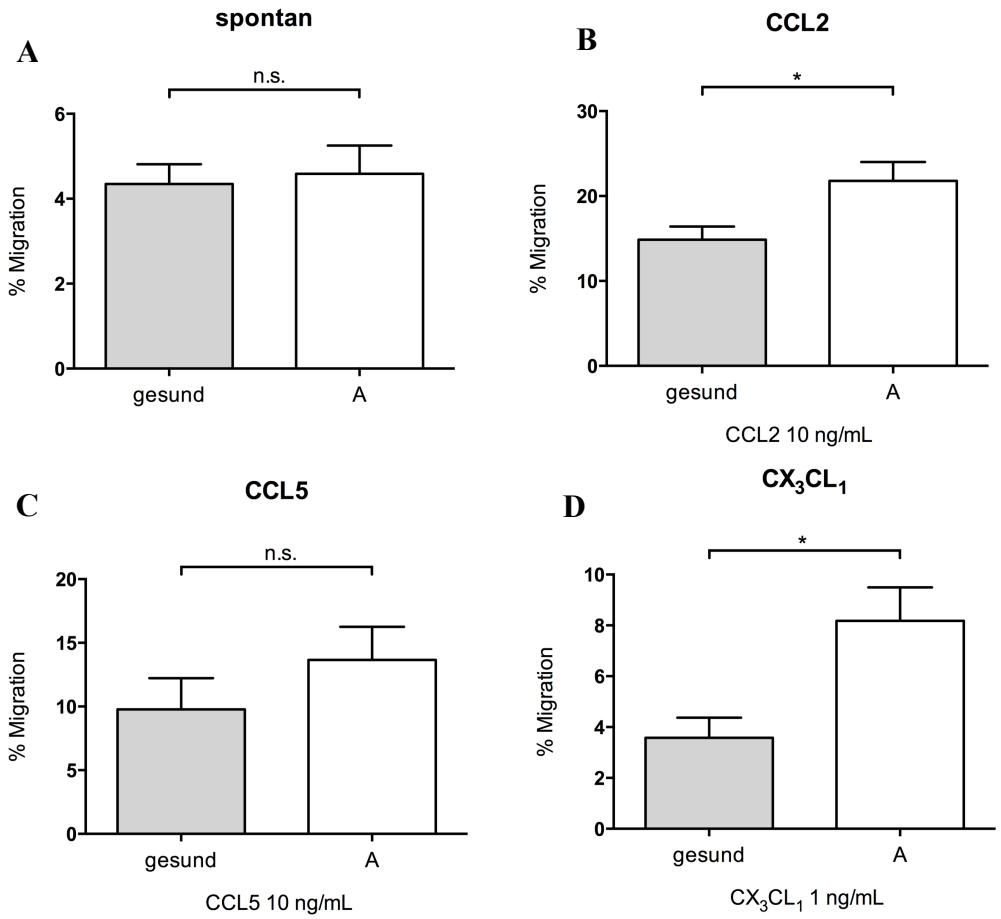


Abbildung 18: **Migrationsraten von unbehandelten Monozyten von Gesunden und MS-Patienten im Vergleich** Monozyten wurden aus gesunden Probanden und an MS erkrankten Patienten isoliert, aufgereinigt und 3 h kontrollinkubiert. Im Anschluss wurde je ein Migrationsassay (1 h) gegen CCL2 (10 ng/mL), CCL5 (10 ng/mL) und CX_3CL_1 (1 ng/mL) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch durch Zählen der Zellen in Relation zu einer standardisierten Menge APC-positiver Beads. Die Daten werden als Anteil der gewanderten Monozyten an den pro Ansatz eingesetzten Monozyten dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. N = 9-23. P-Werte über 0,05 wurden als nicht signifikant bewertet (n.s.). Signifikante Unterschiede sind mit * ($p<0,05$) gekennzeichnet.

Der Vergleich zeigte, dass Monozyten von MS-Patienten konstitutionell eine stärkere Chemotaxis aufweisen als solche von gesunden Probanden. Der Unterschied war signifikant für die Chemokine CCL2 und CX_3CL_1 (Abb. 18 B und D) und tendenziell für CCL5 (Abb. 18 C) ausgeprägt. Die spontane migratorische Aktivität der Monozyten der beiden Gruppen unterschied sich nicht (Abb. 18 A).

3.3.1.2 MS-Patienten und gesunde Probanden unterscheiden sich in den Monozytensubpopulationen

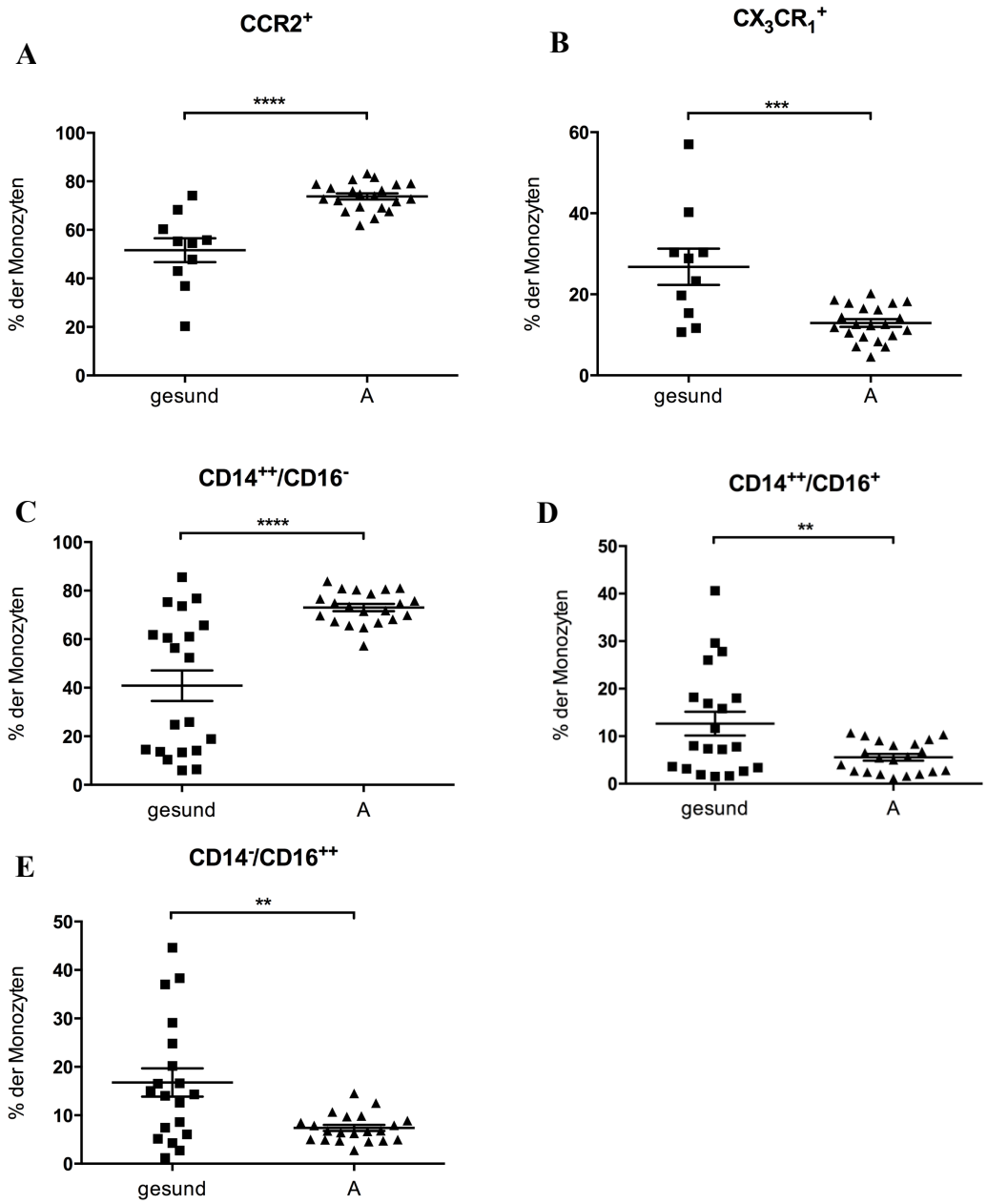


Abbildung 19: **Der Anteil der verschiedenen Subpopulationen an der Monozytengesamtpopulation bei unbehandelten Proben von gesunden Probanden und MS-Patienten** Monozyten wurden aus gesunden Probanden und an MS erkrankten Patienten isoliert, aufgereinigt und 3 h kontrollinkubiert. Im Anschluss erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse. Die Daten werden als Anteil der Marker-positiven Monozyten an der Gesamtzahl aller gezählten Monozyten dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. N = 10-21. Signifikante Unterschiede sind mit ** ($p<0,01$) oder **** ($p<0,0001$) gekennzeichnet.

Bei der Betrachtung der Subpopulationen fiel ein bei den Patienten größerer Anteil an $CCR2^+$- und an klassischen Monozyten auf (Abb. 19 A und C). Der Anteil von $CX3CR1^+$- sowie von intermediären und nicht-klassischen Monozyten fiel bei den Patienten geringer aus als bei den Gesunden (Abb. 19 B, D und E). Insgesamt zeigten die Monozyten der gesunden Probanden eine große interindividuelle Streuung in den Anteilen der verschiedenen Monozytensubpopulationen, die bei den Patienten nicht vorhanden war. In der Dichte der Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche (MFI) zeigten sich hingegen keine Unterschiede zwischen Gesunden und Patienten (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 Der Einfluss der MP-Therapie auf die Migration von Monozyten

Anschließend untersuchten wir analog zu gesunden Probanden die Auswirkung der *In-vitro*-MP-Therapie auf Monozyten von MS-Patienten. Im Rahmen der IVMP-Behandlung der Patienten wurde 24 h nach der Applikation des MP eine zweite Probe genommen und so die Auswirkung der *In-vivo*-Applikation von MP untersucht.

3.3.2.1 Die *In-vitro*-Behandlung von Monozyten von MS-Patienten mit MP und deren IVMP Therapie hat Auswirkungen auf die Chemotaxis von Monozyten

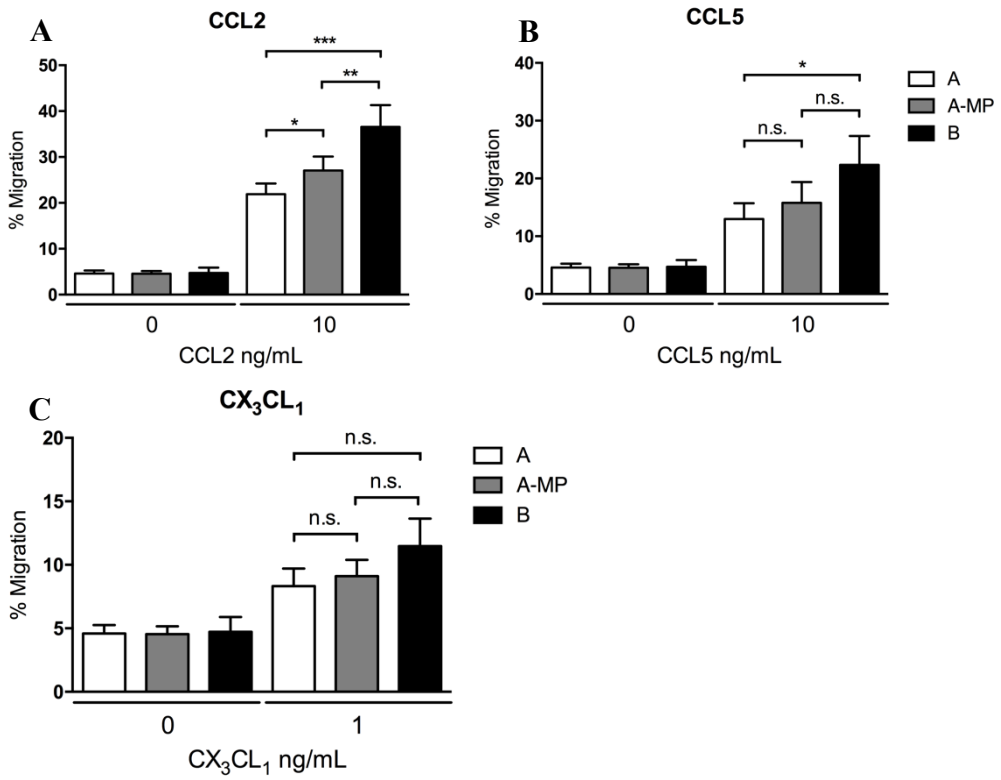


Abbildung 20: **Einfluss von MP auf die Migration von Monozyten an MS-Patienten gegen CCL2, CCL5 und CX_3CL_1** Monozyten wurden aus an MS erkrankten Patienten isoliert und über 3 h bei 37 °C ohne und mit 10^{-6} M MP behandelt (A und A-MP). Parallel erhielten die Patienten eine IVMP Therapie. Nach 24 h wurden erneut Monozyten isoliert und 3 h Inkubation kontrollinkubiert (B). Im Anschluss wurde je ein Migrationsassay (1 h) gegen CCL2 (10 ng/mL), CCL5 (10 ng/mL) und CX_3CL_1 (1 ng/mL) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch durch Zählen der Zellen in Relation zu einer standardisierten Menge APC-positiver Beads. Die Daten werden als Anteil der gewanderten Monozyten an den pro Ansatz eingesetzten Monozyten dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels *one-way A-NOVA* mit *Newman-Keuls Multiple Comparison Test*. N = 11–16. P-Werte über 0,05 wurden als nicht signifikant bewertet (n.s.). Signifikante Unterschiede sind mit * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$) oder *** ($p<0,001$) gekennzeichnet.

Die *In-vitro*-Behandlung der Monozyten von MS-Patienten führte – wie bei gesunden Probanden – zu einer Verstärkung der Chemotaxis. Der Effekt war signifikant für CCL2

(Abb. 20 A), für CCL5 (Abb. 20 B), tendenziell für CX_3CL_1 ausgeprägt (Abb. 20 C). Die bei Patienten durchgeführte intravenöse MP-Therapie verstärkte die Chemotaxis in einem größeren Ausmaß als die *In-vitro*-Behandlung. Die Spontanmigration wurde weder durch MP *in vitro* noch *in vivo* beeinflusst.

Um zu untersuchen, ob die Änderung der Migration durch MP auf sich in der Polarisierung der Monozyten oder in einer veränderten Chemokinrezeptorexpression niederschlug, schlüsselten wir erneut nach Subpopulationen auf. Des Weiteren analysierten wir die Expression von CCR2 und CX_3CR_1 Zelloberfläche unter MP.

3.3.2.2 Die Behandlung mit MP führt zu keiner Änderung der Subpopulationen oder der Chemokinrezeptorexpression

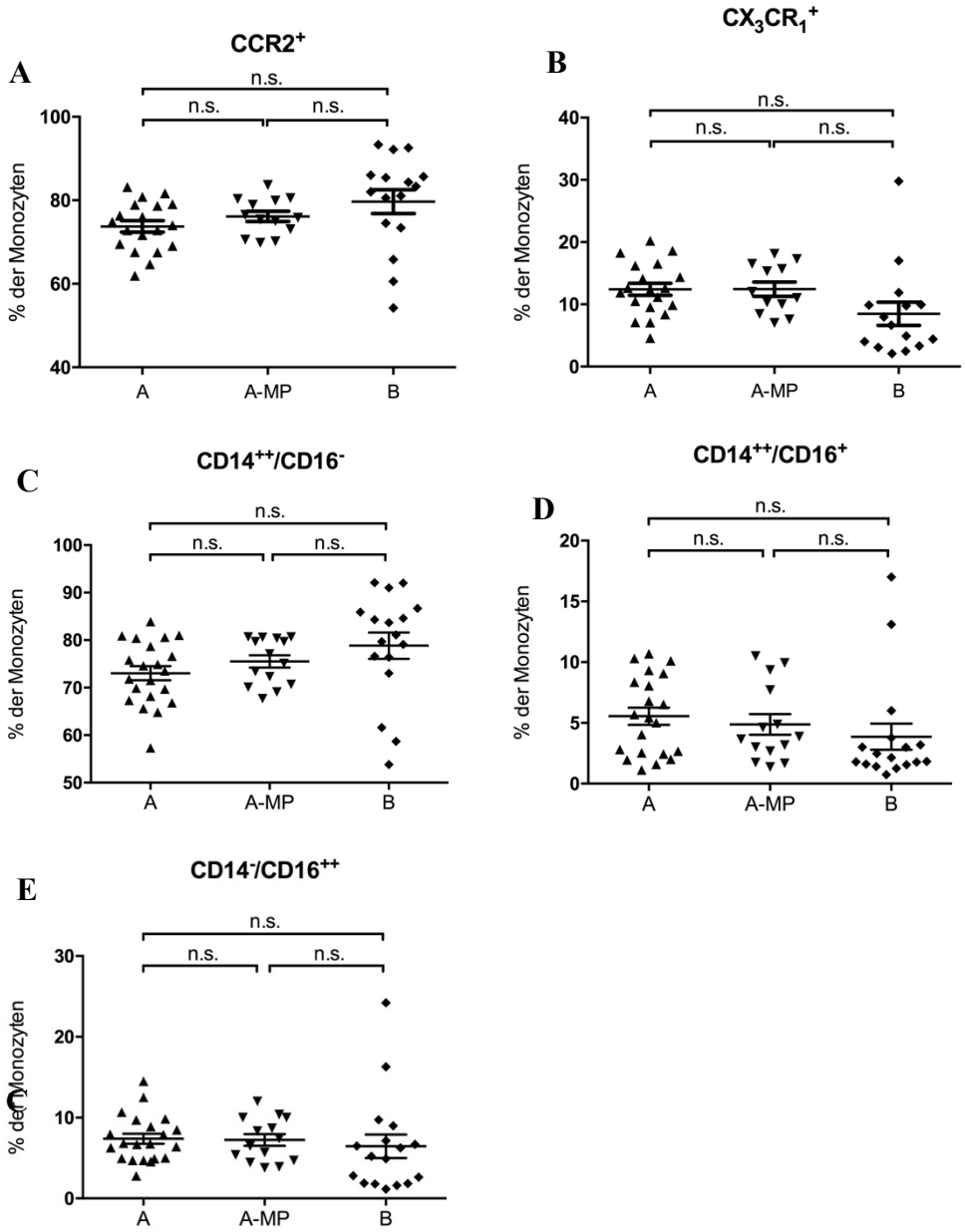


Abbildung 21: **Der Einfluss von MP *in vitro* und *in vivo* auf die Monozytensubpopulationen von MS-Patienten** Monozyten wurden aus an MS erkrankten Patienten isoliert und über 3 h bei 37 °C ohne und mit 10^{-6} M MP behandelt (A und A-MP). Die Patienten erhielten parallel eine IVMP Therapie. Nach 24 h wurden erneut Monozyten isoliert und diese für 3 h kontrollinkubiert (B). Im Anschluss erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse. Die Daten werden als Anteil der Marker-positiven Monozyten an der Gesamtzahl aller gezählten Monozyten dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels *one-way ANOVA* mit *Newman-Keuls Multiple Comparison Test*. N = 13-20. P-Werte über 0,05 wurden als nicht signifikant bewertet (n.s.).

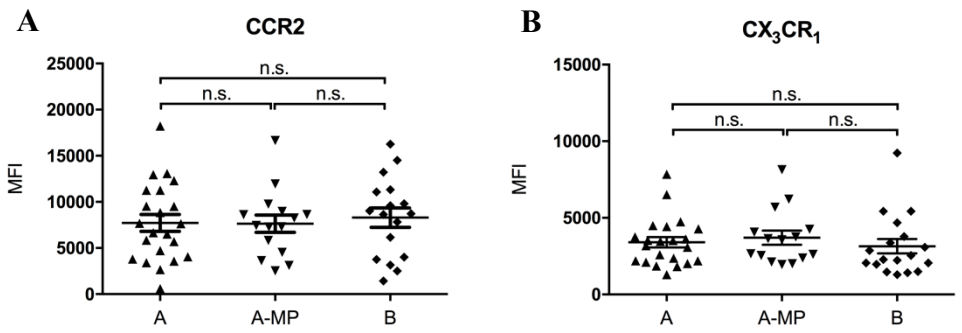


Abbildung 22: **Die Oberflächenexpression von CCR2 und CX_3CR_1 auf Monozyten der verschiedenen Subtypen bei gesunden Probanden und an MS-Patienten** Monozyten wurden aus an MS erkrankten Patienten isoliert und über 3 h bei 37 °C ohne und mit 10^{-6} M MP behandelt (A und A-MP). Die Patienten erhielten parallel eine IVMP Therapie. Nach 24 h wurden erneut Monozyten isoliert und diese für 3 h kontrollinkubiert (B). Im Anschluss erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse. Die Daten werden als Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels *one-way A-NOVA* mit *Newman-Keuls Multiple Comparison Test*. N = 15-22. P-Werte über 0,05 wurden als nicht signifikant bewertet (n.s.).

Die Therapie mit MP führte bei *In-vitro*- und *In-vivo*-Anwendung zu keiner signifikanten Änderung der nach CD14 und CD16 (Abb. 21 C, D, E) definierten Monozytensubpopulationen oder der Expression von CCR2 und CX_3CR_1 (Abb. 21 A und B, Abb. 22 A und B).
Für die Migration der Monozyten entlang eines CCL2-Gradienten, gegen das die Monozyten die eindeutigste Chemotaxis zeigten und das in entzündlichen Reaktionen eine Schlüsselrolle spielt, wurde zusätzlich das Verhalten von Monozyten von Patienten unter akutem Schub und ohne Schub aufgeschlüsselt. Hierdurch sollte tiefergehend untersucht werden, ob eventuelle Unterschiede zwischen Patientengruppen durch die gemeinsame Betrachtung verschleiert werden. Da inzwischen angenommen wird, dass RRMS, SPMS und PPMS keine separaten Krankheitsentitäten sind (Lassmann et al. 2012) und sich bei der Analyse der Daten von Migration und Subpopulationen nach Auftrennung in Formen der MS keine eindeutigen Erkenntnisse ergaben (Daten nicht gezeigt), nahmen wir eine Einteilung nach Aktivität der Krankheit (mit und ohne aktiven Schub) vor. In die Gruppe der Patienten mit Schub fielen alle Patienten, die der intravenösen MP-Therapie aufgrund einer akuten Verschlechterung der Symptome zugeführt worden waren. Diese waren alle an RRMS leidenden Patienten sowie solche, die an einer SPMS mit erneuten akuten Schüben litten. Die Gruppe der Patienten ohne akuten Schub wurde gebildet aus Patienten, die der intravenösen MP-Therapie in regelmäßigen Abständen zugeführt wurden (MP-Intervalltherapie), ohne dabei eine akute Verschlechterung der Symptome zu verspüren. Diese Gruppe schloss alle Patienten mit PPMS und SPMS ohne Schübe ein.

3.3.2.3 Monozyten von MS-Patienten, die an einem akuten Schub leiden, zeigen eine stärkere Chemotaxis als von solchen ohne Schub

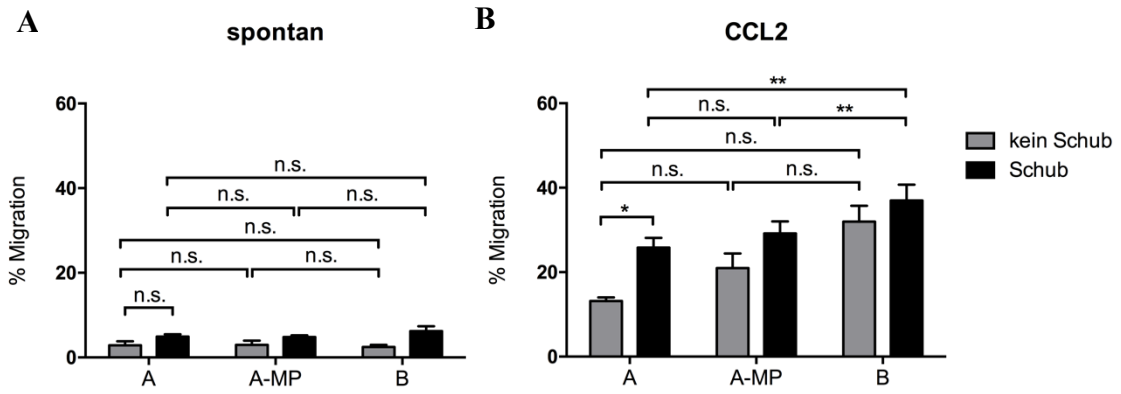


Abbildung 23: **Die migratorische Aktivität von Monozyten bei MS-Patienten mit und ohne akuten Schub** Monozyten wurden aus an MS erkrankten Patienten mit und ohne akuten Schub isoliert und über 3 h bei 37 °C ohne und mit 10^{-6} M MP behandelt (A und A-MP). Parallel erhielten die Patienten eine IVMP Therapie. Nach 24 h wurden erneut Monozyten isoliert und 3 h Inkubation kontrollinkubiert (B). Im Anschluss wurde je ein Migrationsassay gegen CCL2 (10 ng/mL) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch durch Zählen der Zellen in Relation zu einer standardisierten Menge APC-positiver Beads. Die Daten werden als Anteil der gewanderten Monozyten an den pro Ansatz eingesetzten Monozyten dargestellt. Die statistische Analyse der unbehandelten Proben erfolgte mittels ungepaartem t-Test, die der Patientenproben untereinander mittels *one-way ANOVA* mit *Newman-Keuls Multiple Comparison Test*. N = 6-12. P-Werte über 0,05 wurden als nicht signifikant bewertet (n.s.). Signifikante Unterschiede sind mit * ($p<0,05$) und ** ($p<0,01$) gekennzeichnet.

Monozyten von Patienten, die zum Zeitpunkt der Untersuchung an einem akuten Schub litten, zeigten eine stärkere Chemotaxis gegen CCL2 (Abb. 23 B) bei ähnlicher Spontanmigration (Abb. 23 A). Die Monozyten beider Gruppen reagierten auf die Behandlung mit MP gleichgerichtet mit einer Steigerung der Chemotaxis. Insgesamt war der Effekt *in vivo* ausgeprägter als der der *In-vitro*-Therapie. Der Unterschied war signifikant für die Zunahme der Chemotaxis gegen CCL2 von Monozyten von Schubpatienten. Die Spontanmigration wurde bei beiden Gruppen weder durch die *In-vitro*- noch die *In-vivo*-Therapie beeinflusst.

3.3.2.4 Monozyten von MS-Patienten mit oder ohne akuten Schub unterscheiden sich nicht in ihren Monozytensubpopulationen und die Therapie mit MP vergrößert den Anteil an klassischen Monozyten bei Patienten ohne akuten Schub stärker

Zusätzlich zu der Momentaufnahme bei Patienten mit und ohne akuten Schub sollte genauer betrachtet werden, wie sich Monozyten von Patienten beider Gruppen unter der Therapie mit MP verhalten, um zu analysieren, ob die Verstärkung der Chemotaxis mit einer Verschiebung der Monozytensubpopulationen oder der Chemokinrezeptorexpression zusammenhing.

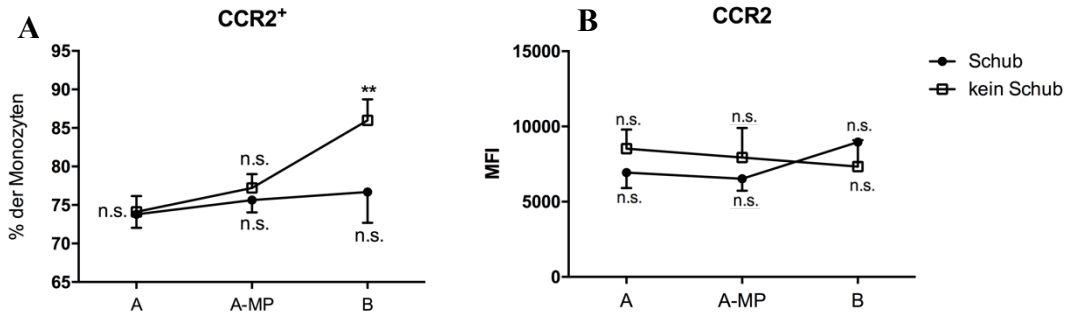


Abbildung 24: **Die Oberflächenexpression von CCR2 auf Monozyten von MS-Patienten** Monozyten wurden aus an MS erkrankten Patienten mit und ohne akuten Schub isoliert und über 3 h bei 37 °C ohne und mit 10^{-6} M MP behandelt (A und A-MP). Die Patienten erhielten parallel eine IVMP Therapie. Nach 24 h wurden erneut Monozyten isoliert und diese für 3 h kontrollinkubiert (B). Im Anschluss erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse. Die Daten werden als Anteil der Marker-positiven Monozyten an der Gesamtzahl aller gezählten Monozyten bzw. als Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels *one-way ANOVA* mit *Newman-Keuls Multiple Comparison Test*. N = 4-12. P-Werte über 0,05 wurden als nicht signifikant bewertet (n.s.). Signifikante Unterschiede sind ** ($p<0,01$) gekennzeichnet.

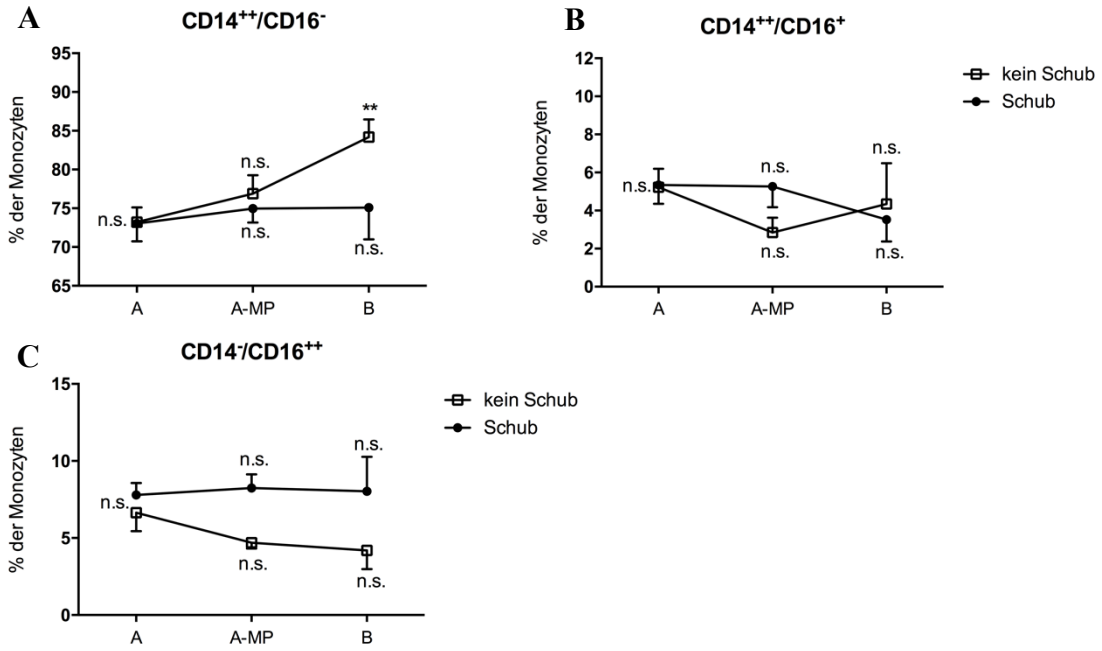


Abbildung 25: **Der Einfluss eines der IVMP-Therapie auf die Monozytensubpopulationen von MS-Patienten mit und ohne akuten Schub** Monozyten wurden aus an MS erkrankten Patienten mit und ohne akuten Schub isoliert und über 3 h bei 37 °C ohne und mit 10^{-6} M MP behandelt (A und A-MP). Die Patienten erhielten parallel eine IVMP Therapie. Nach 24 h wurden erneut Monozyten isoliert und diese für 3 h kontrollinkubiert (B). Im Anschluss erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse. Die Daten werden als Anteil der Marker-positiven Monozyten an der Gesamtzahl aller gezählten Monozyten dargestellt. Die statistische Analyse der Gruppen unter der Therapie mit MP erfolgte mittels *one-way ANOVA* mit *Newman-Keuls Multiple Comparison Test*, die der A-Proben der beiden Gruppen mittels ungepaartem t-Test. N = 4-12. P-Werte über 0,05 wurden als nicht signifikant bewertet (n.s.). Signifikante Unterschiede sind mit ** ($p<0,01$) gekennzeichnet.

Vor der Therapie mit MP unterschieden die beiden Patientengruppen sich nicht in ihren Subpopulationen oder der Expression von CCR2. Patienten, die an einer progressiven Form der MS erkrankt waren, reagierten passend zu der oben beobachteten stärker zunehmenden Chemotaxis auf die Therapie mit MP mit einer Zunahme der $CCR2^+$-Monozytenfraktion (Abb. 24 A). Bei Patienten, die zu Zeitpunkt der Untersuchung an einem akuten Schub litten, konnte eine solche Zunahme nicht beobachtet werden. Die MP-Therapie hatte bei beiden Gruppen kein Einfluss auf die Oberflächenexpression von CCR2 (Abb. 24 B). Passend zu der Entwicklung der $CCR2^+$-Subpopulation führte die MP-Therapie zu einer Zunahme der klassischen Subpopulation und einer nicht signifikanten Abnahme der nicht-klassichen Subpopulation bei Patienten, die an einer progressiven Form der MS erkrankt waren. Hierbei war der Effekt der *In-vivo*-Therapie stärker ausgeprägt als der der *In-vitro*-Therapie. Bei Patienten, die zum Zeitpunkt der Untersuchung an einem akuten Schub litten, kam es zu keiner signifikanten Veränderung der Subpopulationen (Abb. 25 A, B und C).

Zusammengefasst beobachteten wir bei Monozyten von unbehandelten MS-Patienten eine stärkere Chemotaxis gegen die Chemokine CCL2, CCL5 und CX_3CL_1 als bei gesunden Probanden bei vergleichbarer Spontanmigration. Weiterhin zeigten Patienten einen größeren Anteil an klassischen bzw. CCR2-positiven und einen geringeren an intermediären und nichtklassischen bzw. CX_3CR_1-positiven Monozyten. Während bei den gesunden Probanden eine große interindividuelle Streuung der Subpopulationsanteile zu beobachten war, war diese bei den Patienten weniger ausgeprägt. Wie bei den gesunden Probanden führte die Behandlung mit MP zu einer verstärkten Chemotaxis gegen die Chemokine CCL2, CCL5 und CX_3CL_1. Dabei war der Effekt der *In-vivo*-Therapie stärker ausgeprägt als der der *In-vitro*-Therapie.
Exemplarisch dargestellt für CCL2, das eine Schlüsselrolle bei der Chemotaxis im Rahmen von entzündlichen Prozessen spielt und für das der Effekt am eindeutigsten ausfiel, konnte gezeigt werden, dass Monozyten von MS-Patienten, die zum Zeitpunkt der Untersuchung an einem akuten Schub litten, eine ähnliche Spontanmigration, jedoch eine stärkere Chemotaxis aufwiesen als Monozyten von Patienten ohne akuten Schub. In beiden Gruppen wurde die Chemotaxis gegen CCL2 durch die Therapie mit MP verstärkt. Unter der Behandlung mit MP kam es bei Patienten, die an einer progressiven Form der MS litten, zu einer Vergrößerung der $CCR2^+$ bzw. $CD14^{++}/CD16^-$-Monozytenfraktion bei gleicher MFI. Diese Veränderung blieb bei Patienten, die zum Zeitpunkt der Untersuchung an einem akuten Schub litten aus. Dennoch zeigte diese Gruppe eine insgesamt stärkere Chemotaxis gegen CCL2, was den Einfluss anderer die Migration von Monozyten beeinflussender Faktoren neben der Chemokinrezeptorexpression impliziert.

4 Diskussion

4.1 Monozytensubpopulationen und -migration von gesunden Probanden und MS-Patienten im Vergleich

Unsere Experimente zeigten, dass sich Monozyten von unbehandelten MS-Patienten in der Spontanmigration nicht von Monozyten von gesunden Probanden unterscheiden. Allerdings fiel auf, dass die Chemotaxis der Monozyten von unbehandelten Patienten gegen die Chemokine CCL2 und CX_3CL_1 signifikant und gegen CCL5 tendenziell stärker war als die der unbehandelten Monozyten von gesunden Probanden. Weiterhin zeigten wir, dass Patienten einen größeren Anteil an klassischen bzw. $CCR2^+$-Monozyten, sowie einen kleineren Anteil an intermediären und nicht-klassischen bzw. $CX_3CR_1^+$-Monozyten als gesunde Probanden haben. Während sich die Monozytenaktivität von Patienten mit RRMS, SPMS und PPMS nicht eindeutig unterschied, konnten wir feststellen, dass Monozyten von Patienten, die zum Zeitpunkt der Untersuchung an einem akuten Schub litten (RRMS und SPMS mit Schüben) in ihrer Chemotaxis gegen CCL2 aktiver waren, als die von Patienten, die zum Zeitpunkt der Untersuchung schubfrei waren (PPMS und SPMS ohne Schübe). In ihrer Spontanmigration unterschieden sie sich nicht. Beim Vergleich der Subpopulationen und Rezeptorexpression von Monozyten von Patienten unter Schub und ohne Schub konnten wir keinen Unterschied beobachten, sodass die beobachtete verstärkte Chemotaxis von unbehandelten Monozyten von Patienten unter Schub nicht auf eine Verschiebung der Monozytensubpopulationen zurückzuführen war.

Verschiedene Mechanismen kommen als Ursache für die Unterschiede in den Monozytensubpopulationen zwischen Gesunden und Patienten in Frage. Zum einen könnte eine verstärkte Rekrutierung von Monozyten aus dem KM verantwortlich sein: Die Entwicklung von Monozyten beginnt im KM mit einem Pool von klassischen Monozyten, die auf einen Entzündungsreiz (CCL2 (Serbina und Pamer 2006; Shi und Pamer 2011; Patel et al. 2017) und GM-CSF (Gasson 1991; Serbina et al. 2008)) hin ins Blut rekrutiert werden und im Kreislauf einer stufenweisen Entwicklung von klassischen zu nicht-klassischen Monozyten unterliegen (Shi und Pamer 2011; Patel et al. 2017). Bei Nagern (Shi et al. 2011; Griseri et al. 2012; Heidt et al. 2014) sowie Menschen (Patel et al. 2017) ist bekannt, dass sich der Anteil an klassischen Monozyten unter akuten und chronischen (Serbina et al. 2008) peripher- oder systemisch-entzündlichen Bedingungen vergrößert. Der Grund hierfür ist nach den Autoren die erhöhte Freisetzung von „jungen“, $CCR2^+$- Monozyten aus dem KM.

Auch im Modell EAE konnte beobachtet werden, dass die Zahl an CCR2$^+$- und Ly6C$^+$-Monozyten nach einer Immunisierung von C57BL/6-Mäusen mit *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG) rapide ansteigt (Mishra et al. 2012). So ist es nachvollziehbar, dass MS-Patienten höhere Monozytenzahlen im Blut (Tombul et al. 2011) und einen höheren Anteil an klassischen, neu aus dem KM emigrierten Monozyten vorweisen. Die Annahme, dass bei MS ein erhöhter CCL2-Serumspiegel zu einer verstärkten Emigration von Monozyten aus dem KM führt, kann jedoch nicht ohne Weiteres gemacht werden. So zeigten verschiedene Studien erhöhte (Iarlori et al. 2002), erniedrigte (Scarpini et al. 2002) oder gleiche (Franciotta et al. 2001; Bartosik-Psujek und Stelmasiak 2005) CCL2-Serumspiegel bei MS-Patienten im Vergleich zu Gesunden.

Des Weiteren ist bekannt, dass an MS erkrankte Patienten höhere Level von GM-CSF im Liquor als Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen haben (Perrella et al. 1993; Mellergård et al. 2010). Erhöhte *cerebrospinal fluid*-(CSF)-Level von GM-CSF wurden auch bei Patienten unter Schub im Vergleich zu stabilen Patienten beobachtet (Carrieri et al. 1998). GM-CSF als proinflammatorisches Zytokin fördert den Austritt von Monozyten aus dem KM (Gasson 1991), die Expression von CCR2 auf Monozyten (Däbritz et al. 2015) und führt zu einer Verstärkung der Spontanmigration und Chemotaxis gegen CCL2 von Monozyten *in vitro* (Vogel et al. 2015). So könnte GM-CSF zu den Unterschieden in Subpopulationen und Chemotaxis zwischen gesunden Probanden und Patienten sowie zur verstärkten Chemotaxis bei Patienten mit Schub gegenüber Patienten ohne Schub beigetragen haben. Die von uns beobachtete tendenziell vermehrte Expression des GM-CSF-Rezeptors in Monozyten von Gesunden unter MP fügt sich hier ein und könnte die gesteigerte Migrationsfähigkeit von mit MP behandelten Monozyten mitbegründen. Vogel et al. (2015) nehmen als Grund für die durch GM-CSF verstärkte Migration eine gesteigerte Produktion von TNFα an. Bei MS-Patienten konnten erhöhte Level von TNFα im Vergleich zu gesunden Probanden nachgewiesen werden (Uysal et al. 2014). Dieses stört die Integrität der BBB (Wiggins-Dohlvik et al. 2014) und führt zu einer verstärkten Expression von endothelialem ICAM-1 und VCAM-1, welche essentielle Rezeptoren für die Transmigration von Monozyten sind. Die Rolle von TNFα ist jedoch kontrovers diskutiert. So wurde auch eine Inhibition der Chemotaxis von Monozyten gegen CCL2 beobachtet, die auf einer Reduktion der Expression von CCR2 beruhte (Weber et al. 1999). Vogel et al. (2015) machen vor allem Veränderungen im Endothel als Ursache für die verstärkte Migration der Monozyten verantwortlich. In unseren Migrationsassays wurden Transwell-Siebe ohne *endothelial coating* verwendet, sodass der Vergleich der Ergebnisse schwerfällt. Jedoch konnte die Steigerung der Migration durch GM-CSF in einer weiteren Studie auch in Migrationsassays ohne Endothelbeschichtung nachgewiesen werden

(Däbritz et al. 2015), sodass wie oben angedeutet auch Charakteristika der Monozyten selbst zu Unterschieden in der Migration beitragen müssen. Infrage kommen hier neben der Expression von Chemokinrezeptoren zum Beispiel auch Unterschiede im Zytoskelett der Monozyten.

In einer zwischenzeitlich erschienenen Publikation (Waschbisch et al. 2016) wurde gezeigt, dass es sich bei den in einem Migrationsassay gewanderten Monozyten fast ausschließlich um klassische Monozyten handelt. In der vorliegenden Arbeit wurde in den Assays nicht nach Subpopulationen unterschieden, sodass die bei MS-Patienten beobachtete stärkere Chemotaxis in den Transmigrationsassays durch die größere klassische, $CCR2^+$-Subpopulation hervorgerufen worden sein könnte. Einschränkend muss dabei erwähnt werden, dass die Unterschiede zwischen den Monozytensubpopulationen von gesunden Probanden und Patienten nicht so ausgeprägt waren, dass sie als einzige Erklärung für die Unterschiede in der Chemotaxis ausreichten, zumal die Monozyten keine Differenzen in der Intensität der Oberflächenexpression (MFI) der Chemokinrezeptoren zeigten. Dass die Chemotaxis von Monozyten also nicht mit der Rezeptordichte auf ihrer Oberfläche korreliert, suggeriert, dass dies nicht die einzige Größe ist, die Chemotaxis bedingt. Die Beobachtung, dass Monozyten von MS-Patienten stärker gegen CX_3CL_1 wanderten, obwohl ihre $CX_3CR_1^+$-Subpopulation kleiner war als bei den gesunden Probanden und sich die Gruppen nicht in der MFI von CX_3CR_1 unterschieden, stützt diese These weiter.

Eine weitere Erklärung für die bei MS-Patienten größere Fraktion an $CD14^+$- und damit geringere Fraktion von $CD16^+$-Monozyten liefert die Beobachtung, dass bei Mäusen bis zu ein Drittel der zirkulierenden $Ly6C^{lo}$ -Monozyten, die den humanen nicht-klassischen Monozyten entsprechen, aus an Endothel adhärenten Monozyten bestehen (Carlin et al. 2013). Dieser Anteil wird durch inflammatorische Konditionen noch vergrößert (Ancuta et al. 2004). Auch in Migrationsassays machen $CD16^+$-Monozyten den Großteil der am Sieb adhärenten Monozyten (Waschbisch et al. 2016) aus. So könnten die konstitutionellen entzündlichen Bedingungen der MS-Patienten dazu geführt haben, dass weniger $CD16^+$-Monozyten im Blut flottierten und dementsprechend bei der Blutentnahme nicht erfasst wurden.

Waschbisch et al. (2016) zeigten zusätzlich, dass die bei Patienten kleinere $CD16^+$-Subpopulation nicht nur relativ durch ein größere klassische $CD16^-$-Subpopulation zustande kommt, sondern auch die absolute Zahl von $CD16^+$-Monozyten bei den unbehandelten Patienten im Blut geringer ist, als bei Gesunden. Die Autoren nehmen als Grund hierfür eine Translokation dieser Monozyten in das ZNS an, deren Aufgabe dort die Orchestrierung immunologischer Prozesse sei. Zu erwähnen ist hierbei, dass intermediäre Monozyten auch im CSF von gesunden Probanden zu finden sind, wo sie mehr als 50% der Monozyten ausmachen. Dies

unterstreicht ihre Rolle in der immunologischen Überwachung des ZNS. Waschbisch et al. zeigten weiterhin, dass die Behandlung der MS-Patienten einen Einfluss auf den Anteil an $CD16^+$-Monozyten hat. So beobachteten sie eine geringere Fraktion bei unbehandelte Patienten, während behandelte Patienten je nach Therapieoption einen normalen (Natalizumab, Fingolimod) bis erhöhten (IFNβ) Anteil an $CD16^+$-Monozyten aufwiesen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Patienten parallel zu der Therapie mit MP mit Copaxone, Glatirameracetat, Rituximab, IFNβ, Fingolimod, Teriflunomid oder Dimethylfumarat behandelt. Aufgrund zu geringer Fallzahlen konnten wir die Ergebnisse für die einzelnen Medikamentengruppen nicht reproduzieren, jedoch eine geringere $CD16^+$-Fraktion über alle Patienten gemittelt beobachten.

Zu erwähnen ist, dass der Anteil der $CD16^+$-Monozyten bei MS-Patienten ambivalent diskutiert wird. Andere Autoren (Gjelstrup et al. 2018) berichten von einem größeren Anteil von $CD16^+$-Monozyten bei MS-Patienten als bei Gesunden, was unseren Ergebnissen und denen von Waschbisch et al. widerspricht. Die Autoren beziehen sich ebenfalls auf Waschbisch et al. und machen Unterschiede im Patienten- und Kontrollkollektiv für die Abweichung verantwortlich. So betrachteten Waschbisch et al. neu diagnostizierte, tatsächlich unbehandelte MS-Patienten als „unbehandelt", während Gjelstrup et al. Patienten, die seit mindestens einem Monat keine MP-Therapie und im Rahmen der Probenentnahme keine weitere Therapie bekommen haben, als „unbehandelt" einstuften. Des Weiteren betrachteten Waschbisch et al. ausschließlich RRMS-Patienten, Gjelstrup et al. RRMS und PPMS Patienten. In der vorliegenden Arbeit bestand das Patientenkollektiv aus Patienten, die an RRMS, SPMS oder PPMS erkrankt waren und zum Teil neben ihrer MP-Therapie anderweitig behandelt wurden (siehe oben).

Im Vergleich mit weiteren Arbeiten sowie innerhalb der vorliegenden Arbeit gilt es auch, den möglichen Einfluss des Alters und der Erkrankungsdauer der Patienten und der gesunden Probanden zu erwähnen: Einer SPMS geht definitionsgemäß eine RRMS voraus. In der vorliegenden Arbeit war damit die Erkrankungsdauer der SPMS im Mittel länger (Median = 24,5 Jahre) als bei PPMS (Median = 12,5 Jahre) oder RRMS (Median = 4 Jahre), während sie bei Waschbisch et al. für die unbehandelten Patienten 0,5 Jahre (Median) und bei den behandelten Patienten 6–7 Jahre (Median) betrug. In der vorliegenden Arbeit litten MS-Patienten, die sich mit Schub präsentierten, im Mittel kürzer (Median = 4 Jahre) unter der Erkrankung als Patienten, die an einer progressiven, schubfreien Form der MS litten (Median = 14 Jahre). Auch das Lebensalter der Patienten und der gesunden Probanden könnte eine Rolle gespielt haben. Das der Patienten mit Schüben lag im Mittel (Median) bei 44 Jahren, das der Patienten ohne Schübe im Mittel (Median) bei 58 Jahren und das der gesunden Probanden im

Mittel (Median) bei 28 Jahren. Insgesamt lässt sich nicht ausschließen, dass die Heterogenität des Patienten- bzw. Probandenkollektivs auch im Vergleich mit dem bei Waschbisch et al. nicht näher definierten Kontrollkollektivs Auswirkungen auf die Ergebnisse hatte, die wir im Rahmen dieser Arbeit nicht in Gänze nachvollziehen konnten.

4.2 Der Einfluss von MP auf Monozyten

Im Rahmen der der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer *In-vitro*- und *In-vivo*-Behandlung mit MP auf Monozyten untersucht. Dabei stand die Charakterisierung der Monozytensubpopulationen und ihrer Eigenschaften im Fokus. In unseren Experimenten führte MP (3 h *in vitro)* bei gesunden Probanden zu einer signifikanten Verstärkung der Chemotaxis gegen CCL2 und zu einer tendenziellen Verstärkung der Chemotaxis gegen CCL5 und CX_3CL_1, die spontane migratorische Aktivität wurde hingegen nicht beeinflusst. Bei Patienten führte MP (3 h *in vitro* und 24 h *in vivo*) zu einer signifikant verstärkten Chemotaxis gegen CCL2, CCL5 und einer tendenziell verstärkten Chemotaxis gegen CX_3CL_1. Auch hier wurde die Spontanmigration der Monozyten durch MP nicht beeinflusst. Während die dreistündige *In-vitro*-MP-Therapie keinen Einfluss auf die Subpopulationen und die Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren hatte, konnten wir eine Tendenz zur verstärkten Expression der mRNA von CCR2 und zur verminderten Expression der mRNA von CX_3CR_1 unter MP feststellen. Dies bedeutet, dass MP auch die Synthese dieser Proteine beeinflussen könnte. In der durchflusszytometrischen Analyse der Monozyten von Patienten konnte allerdings weder nach 3 h *In-vitro*- und 24 h *In-vivo*-MP-Therapie ein Unterschied in Rezeptorexpression (MFI und Fraktion) und Subpopulationen festgestellt werden. Hier könnte in weiteren Studien ein späterer Zeitpunkt zur durchflusszytometrischen Analyse ergänzt werden, um den Einfluss vom MP auf die Rezeptorexpression weiter zu verifizieren.
Zur detaillierten Betrachtung wurde das Patientenkollektiv in der Auswertung der Migrationsassays und der Durchflusszytometrie am Beispiel CCL2 nach Aktivität der MS aufgeteilt. Hier fiel auf, dass die Monozyten von Patienten, die an einer progressiven Form der MS litten, mit einer Vergrößerung der $CD14^{++}/CD16^{-}$-, $CCR2^{+}$-Subpopulation auf die *In-vivo*-MP-Therapie reagierten. Bei Patienten, die zum Zeitpunkt der Untersuchung an einem akuten Schub litten, hatte die MP-Therapie keinen Einfluss. Die Monozyten von Patienten beider Gruppen reagierten auf die Therapie mit MP mit einer Zunahme der Chemotaxis; dabei blieb die der Patienten mit progressiver MS stets geringer als die der Patienten mit akutem Schub. Welche Ursachen dies hat, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht eruiert werden. Bei kleiner Stichprobe und bisher fehlender Bestätigung durch weitere Studien sind hier Folgeexperimente notwendig.

Neben der funktionellen Messung der Chemotaxis und der Analyse von CD14 und CD16 als Einteilungskriterien für Monozytensubpopulationen untersuchten wir weitere Marker auf mRNA-Ebene: CXCR4 ist als Rezeptor für CXCL12 (SDF-1) an der Navigation von T-Zellen und Monozyten durch Gewebe unter homöostatischen als auch unter entzündlichen Bedingungen beteiligt (Nagasawa et al. 1994; Bleul et al. 1996). Die dreistündige *In-vitro*-Therapie mit MP führte zu einer Erhöhung der mRNA-Level von CXCR4, was für $CD4^+$-T-Zellen (Wang et al. 1998) aber auch Monozyten (Caulfield et al. 2002) schon bekannt war, sodass sich unsere Ergebnisse hier gut anschließen. Die Verstärkung der Expression von CXCR4 und der abhängigen Signalkaskaden unter GC wird von einigen Autoren als wichtiger Prozess in der Homöostase des Immunsystems sowie in der therapeutischen Anwendung von GC angesehen. Sie führt dazu, dass T-Zellen im perivaskulären Raum fixiert werden, ihre Rekrutierung verhindert wird und die verstärkte Expression von CXCR4 somit dazu beiträgt, die Immunantwort zu terminieren (Müller et al. 2013). In der qrtPCR zeigten sich unter *In-vitro*-Behandlung mit MP außerdem die Tendenz zur verstärkten mRNA-Expression von CSF2RA. Der Rezeptor für GM-CSF wird u. a. von myeloiden Zellen exprimiert, spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von EAE und MS und wird als therapeutisches Ziel diskutiert (Rasouli et al. 2015; Ifergan et al. 2017). Die expressionsfördernde Wirkung durch GC (Dex) wurde schon 1994 (Hawrylowicz et al. 1994) beschrieben. Unter Berücksichtigung der therapeutischen Wirkung von GC in MS und der Indizien aus Tierversuchen, die eine zentrale Rolle der GM-CSF/CSF-Rezeptor-Interaktion in der Pathogenese von EAE und MS vorschlagen (Rasouli et al. 2015; Ifergan et al. 2017), erscheint die Verstärkung der Expression von CSF2RA durch MP zunächst kontraintuitiv. Jedoch ist die migrationsfördernde Wirkung von GM-CSF bekannt (Vogel et al. 2015), sodass eine Induktion seines Rezeptors zu einer erhöhten Empfänglichkeit gegenüber GM-CSF führen, damit die Motilität von Monozyten steigern könnte und sich die Ergebnisse dieser Arbeit gut einreihen. Fest steht in jedem Falle, dass eine Blockade von GM-CSF oder CSF2RA in der Therapie von MS in der Zukunft therapeutische Möglichkeiten, zum Beispiel mit dem monoklonalen anti-GM-CSF Antikörper MOR103/GSK3196165, bietet (Klinische Studie NCT01517282 durch MorphoSys AG, Constantinescu et al. 2015). Die mRNA-Analyse von Adhäsionsmolekülen auf Monozyten, die bei der Anheftung an der Gefäßwand und bei der Diapese durch diese beteiligt sind, zeigte keine eindeutige Änderung unter der *In-vitro*-Behandlung mit MP. Um Aussagen zur tatsächlichen Funktion dieser Adhäsionsmoleküle treffen zu können, könnte in weiterführenden Studien neben der hier untersuchten mRNA-Expression auch eine durchflusszytometrische Analyse ihrer Oberflächenexpression durchgeführt werden.

Die Expression von ICAM-1, das auf Zellen des Immunsystems eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der immunologischen Synapse hat (Möst et al. 1992), wird durch die *In-vitro*-Therapie mit MP vermindert. Es ist bekannt, dass der Kontakt mit Plastikoberflächen in Monozyten zu einer verstärkten Expression von ICAM-1 führt (idem), was auch in der im Rahmen der Arbeit durchgeführten qrtPCR zu erkennen ist. Eine Behandlung der Monozyten mit MP lässt diese Verstärkung der Expression allerdings geringer ausfallen, was im Tierversuch schon beobachtet wurde (Tailor et al. 1997). Die relative Reduktion der Expression von ICAM-1 durch MP könnte ein Indiz für eine herabgesetzte Kapazität der Monozyten zur Antigenpräsentation und somit eine entzündungshemmende Komponente darstellen. Ein Einfluss von GC auf weitere Marker, die inflammatorische Eigenschaften von Monozyten anzeigen, ist bekannt und wurde auch in unserem Experimentalsetting bestätigt. So zeigte die qrtPCR eine Suppression der Expression von IL-1β durch MP in Monozyten von gesunden Probanden. Ein vergleichbarer Effekt durch eine *In-vitro*- Behandlung mit Dex wurde schon 1992 beschrieben (Amano et al. 1993). Auch im vorliegenden Patientenkollektiv wurde die die Expression von IL-1β hemmende Wirkung von MP nachgewiesen (Fischer et al. 2019). Weiterhin ist auch die Verringerung der mRNA-Level von TNFα unter MP-Behandlung sind bekannt (Joyce et al. 1997; Steer et al. 1997; Reichardt et al. 2001). Zu beachten ist, dass alle Analysen von mRNA im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur bei gesunden Probanden durchgeführt worden sind; dies erschwert den Vergleich mit Patienten und lässt keine eindeutige Aussage zu, ob sich die entsprechenden Parameter bei Patienten unter einer Therapie mit MP gleich verhalten.

Für CCR2 unter Kortisoleinfluss wurde bei gesunden Probanden eine erhöhte Expression von mRNA in *peripheral blood mononuclear cells* (PBMNC) 12 h nach der Behandlung beschrieben (Yeager et al. 2016). Yaeger et al. konnten allerdings auch eine verstärkte mRNA-Expression von CX_3CR_1 nachweisen, die in unseren Versuchen durch MP eher vermindert wurde. Zu beachten ist hierbei, dass die Autoren die mRNA von PBMNC analysierten und sich erst bei der Oberflächenexpression auf Monozyten fokussierten. Hier konnte eine verstärkte Expression von CCR2, jedoch keine von CX_3CR_1 nachgewiesen werden. Dass die Wirkung sich bei unseren Versuchen auf die mRNA-Ebene beschränkt und sich nicht auf der Zelloberfläche niederschlägt, könnte der kurzen Dauer der Inkubation (3 h) vor der durchflusszytometrischen Analyse geschuldet sein, wofür die Ergebnisse der über 24 h *in vivo* behandelten Patienten sprechen.

GC induzieren einen anti-inflammatorischen Monozytenphänotyp bei Mäusen und Menschen (Ehrchen et al. 2007; Varga et al. 2008), der in der Lage ist, nach einem Transfer in

erkrankte Mäuse unter Beibehaltung dieses Phänotyps eine schon aktive Entzündungsreaktion zu bremsen (Varga et al. 2014). Es konnte gezeigt werden, dass dieser anti-inflammatorische Monozytentyp Charakteristika der M2-Polarisierung aufweist, die für den therapeutischen Erfolg von entscheidender Bedeutung ist (Schweingruber et al. 2011; Montes-Cobos et al. 2017). Auch im vorliegenden Patientenkollektiv wurde die M2-polarisierende Wirkung von GC nachgewiesen. Typische M2-assoziierte Gene wie Arginase 1 (ARG1), IL-10, CD163 und CD206 wurden unter der Therapie mit MP vermehrt exprimiert, während M1-assoziierte Gene wie IL-1β wie auch bei gesunden Probanden vermindert exprimiert wurden (Fischer et al. 2019).

Die Therapie eines akuten Schubes mit MP zeichnet der schnelle Wirkungseintritt aus. Schon innerhalb von 24 h wird häufig eine Besserung der Symptomatik bemerkt, sodass kurzfristige Effekte auf die o.g. Polarisierung oder Motilität von Monozyten eine entscheidende Rolle spielen könnten. Studien, die diesen Zeitraum auf zellulärer Ebene untersuchten, gibt es nur wenige. So wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der intravenösen Therapie mit MP auf Monozyten innerhalb von 24 h beobachtet. Ziel war es zu untersuchen, ob die in diesem Zeitraum erreichte Remission der Symptome im Zusammenhang mit einem Einfluss der Therapie mit einer veränderten Motilität von Monozyten steht. Vorangegangene Arbeiten hatten gezeigt, dass GC T-Zellen in ihrer Migrationsfähigkeit beeinflussen. Eine Verstärkung der Expression und der Signalwege der CXCR4-CXCL12-Achse durch GC in T-Zellen führt zu einer Fixierung der Zellen im perivaskulären Raum im ZNS und somit zu einer Ablenkung der Zellen vom Ort der Entzündung (Schweingruber et al. 2014). Weiterhin wurde gezeigt, dass Monozyten eine wichtige Rolle in der Pathogenese der MS spielen (Makhlouf et al. 2001; Mildner et al. 2009; Ajami et al. 2011; Mishra et al. 2012) und dass liposomal verkapselte, vor allem in Phagozyten wirkende GC in der Lage sind, den Verlauf einer EAE zu attenuieren (Schweingruber et al. 2011). Zusammengenommen mit der Beobachtung, dass verkapselte GC freie GC in ihrer Wirksamkeit übertreffen (Lee et al. 2014), führte dies zu der Frage, ob GC analog zur Motilität von T-Zellen auch die von Monozyten beeinflussen und dies in dem Zeitraum von 24 h, in dem die Wirkung der Therapie eintritt.

In der Literatur ist sowohl für Mäuse (Varga et al. 2008) als auch Menschen (Ehrchen et al. 2007) beschrieben, dass GC die spontane migratorische Kapazität von Monozyten verstärken, was in unseren Versuchen nicht reproduziert werden konnte. Allerdings behandelten die Autoren die isolierten Monozyten über zwei Tage mit GC (Dex bzw. Fluticason) und arbeiteten mit einer Versuchsdauer von 4 h für die Migrationsassays. Bei unseren Titrationsversuchen zur Dauer der Migration im Vorfeld hatte sich gezeigt, dass schon 3 h zu lang sind, um bei aus dem Blut isolierten Monozyten einen Unterschied zwischen spontaner und

chemotaktischer Migration zu sehen. So wurden die Zellen in der vorliegenden Arbeit über 3 h *in vitro* mit MP bzw. 24 h *in vivo* behandelt und nur 1 h im Migrationsassay belassen. Die von uns beobachtete Chemotaxis fördernde Wirkung von GC wurde inzwischen auch von anderen Arbeitsgruppen belegt: so wurde nachgewiesen, dass humane Monozyten unter erhöhten Kortisolspiegeln eine stärkere Chemotaxis gegen CCL2 aufweisen (Yeager et al. 2016). Die Autoren berichten unter anderem von erhöhten mRNA-Leveln von CCR2 und CX_3CR_1 und einer erhöhten Oberflächenexpression von CCR2, nicht aber von CX_3CR_1; allerdings traten diese Veränderungen erst nach 12 h Behandlung auf und die Zellmotilität wurde 18 h nach der Behandlung gemessen. In unseren Experimenten war eine verstärkte Chemotaxis schon festzustellen, als es noch keine messbare Verstärkung der Oberflächenexpression von Chemokinrezeptoren gab (nach 3 h MP *in vitro*). Dies könnte darauf hindeuten, dass MP Effekte hat, die ihre Wirkung unmittelbarer entfalten. Weiterhin wurde die Chemotaxis bei Patienten mit und ohne akuten Schub nach 24 h verstärkt, obwohl eine Zunahme der $CCR2^+$-Fraktion nur bei Patienten ohne akuten Schub zu beobachten war, sodass die gesteigerte Motilität auch einen anderen Hintergrund haben könnte.

Es wurde nachgewiesen, dass Dex die Motilität von T-Zellen herabsetzt (Müller et al. 2013). Die Effekte schlugen sich schneller als durch *De-novo*-Genexpression möglich und auch nach Hemmung von Transaktivierung und -repression in den Eigenschaften der Zellen nieder, was einen direkten Einfluss von Dex auf das intrazelluläre *signalling* bzw. das Zytoskelett nahelegt. Dass GC durch eine Wirkung auf das Zytoskelett jedoch auch mobilisierend wirken können, wurde in einer weiteren Studie beobachtet. Die Autoren zeigten, dass Dex die Motilität und damit die Metastasierungsfähigkeit von Melanomzellen durch eine Förderung der Aktivität der Rho-associated protein kinase (ROCK) 1 und 2 verstärkt (Huang et al. 2017). Weiterhin wurde beobachtet, dass M2-Makrophagen auf die Aktivierung mit CCL2 im Gegensatz zu M1-Makrophagen mit der Bildung von Filopodia reagieren und eine stärkere Chemotaxis gegenüber inflammatorischen Chemokinen zeigen (Vogel et al. 2014). Da wie bereits aufgeführt, GC zur Induktion eines Subtyps von Makrophagen führen, der M2-Charakteristika innehat, könnte dies eine weitere Erklärung für die Verstärkung der Chemotaxis durch MP darstellen. Insgesamt betrachtet scheinen GC die Expression bzw. die Aktivität von Proteinen zu beeinflussen, die mit dem Zytoskelett assoziiert sind. Auf diese Weise könnten GC eine verstärkende Wirkung auf die Motilität von Monozyten haben, ohne dass ein direkter Zusammenhang mit einer vermehrten Expression von Chemokinrezeptoren besteht.

Ins ZNS rekrutierte Monozyten haben unter anderem eine neuroprotektive Funktion. Bellavance et al. zeigten im Mausmodell, dass $CX_3CR_1^+$-Monozyten bei durch ins Gehirn applizierte Kainsäure ausgelöster Exitotoxizität in Lage sind, die Degeneration der Neurone zu begrenzen. Bei CX_3CR_1-defizienten Mäusen war dieser Effekt nicht zu beobachten (Bellavance et al. 2015). Man nimmt inzwischen an, dass $CD16^+$- bzw. $CX_3CR_1^+$-Monozyten in ihren Charakteristika M2-polarisierten, immunregulatorischen Makrophagen nahestehen, bzw. nach Extravasation zu diesen differenzieren (Auffray et al. 2007; Italiani und Boraschi 2014; Olingy et al. 2017). CCL2 stimuliert in M2-Makrophagen das Zytoskelett und führt zu verstärkter Motilität (Vogel et al. 2014). GC induzieren einen Monozytentyp, der antiinflammatorische und immunregulatorische Eigenschaften und M2-Charakteristika aufweist (Ehrchen et al. 2007; Varga et al. 2008). Zusammengenommen mit unseren Erkenntnissen zur Chemotaxis von Monozyten unter MP könnten GC also eine immunregulatorische Polarisierung von Monozyten mit nachfolgender verstärkter Rekrutierung dieser Monozyten ins das ZNS und Limitierung der entzündlichen Reaktion verursachen. Dass, wie von Vogel et al. beobachtet, ein proinflammatorisches Chemokin die Chemotaxis von immunregulatorischen Zellen fördert, könnte ein körpereigen vorgesehenes Feedback zur Terminierung einer Entzündungsreaktion darstellen. Insgesamt betrachtet scheinen GC diese evolutionär vorgesehene „Bremse“ von Entzündungsreaktionen zu verstärken und somit mehr immunmodulatorisch als nur -suppressiv im klassischen Sinne zu wirken.

4.3 Allgemeines

Bergh et al. sowie Waschbisch et al. zeigten, dass der Monozytenpool von MS-Patienten sich je nach Therapie verschieden zusammensetzen kann (Bergh et al. 2004; Waschbisch et al. 2016). Die Patienten, die an den Studien zu dieser Arbeit teilnahmen, wurden außerhalb ihrer Schübe mit MP im dreimonatigen Intervall, Fingolimod, IFNβ, Glatirameracetat, Dimethylfumarat, Teriflunomid oder Rituximab behandelt. Die Auswertung unserer Daten gruppiert nach Therapien (Daten nicht gezeigt) ließ aufgrund zu kleiner Probandenzahlen pro Gruppe keine eindeutigen Aussagen zu. Es wurde beobachtet, dass der Kontakt mit verschiedenen Plastikoberflächen bei der Inkubation von Makrophagen Auswirkungen auf deren Polarisierung hat (Rostam et al. 2016). Analog könnte es bei der Inkubation von Monozyten ähnliche Effekte geben. Da während der gesamten Versuche die gleichen Gefäße für alle Zellen verwendet wurden, kann allerdings davon ausgegangen werden, dass diese Auswirkung bei allen untersuchten Zellen vergleichbar ist. Selbiges gilt für die Isolation von Monozyten aus Vollblut. In einigen Reviews wird die Möglichkeit besprochen, dass verschiedene Isolationstechniken zu Verschiebungen der Subpopulationen führen könnten (Wong et al. 2012; Italiani

und Boraschi 2014). Mukherjee et al. zeigten, dass die Isolierung via Dichtegradient zu einer Verminderung von klassischen und einer Zunahme von nicht-klassischen Monozyten und zu einer verstärkten Expression von CD14 und CD16 auf klassischen Monozyten führt (Mukherjee et al. 2015). Auch hier gilt, dass die Isolation der Monozyten in allen Fällen mit der gleichen Technik durchgeführt wurde, sodass davon auszugehen ist, dass die Ergebnisse in sich konsistent sind.

Die Rolle von Monozyten wird aktuell revidiert. Während man lange davon ausgegangen ist, dass Monozyten die Vorläufer der in den Geweben ansässigen Makrophagen sind, nimmt man inzwischen an, dass die Makrophagenpools der Gewebe sich schon embryonal bilden (Ginhoux et al. 2010) und – mit minimalem Input von Monozyten – autonom bestehen bleiben (Soucie et al. 2016), sodass Monozyten eine selbstständigere Aufgabe im Immunsystem übernehmen. Viele Veröffentlichungen aus den letzten Jahren nehmen diese Unterscheidung noch nicht vor und fassen beide Zellgruppen und Versuchsergebnisse zusammen, sodass eine Differenzierung von Erkenntnissen nicht immer eindeutig möglich und die Folge der Unterschiede zwischen Gesunden und Probanden, sowie der Einfluss von MP auf Monozyten, ihre Abkömmlinge und deren Differenzierung (z.B. M1- und M2-Makrophagen) nicht genauer zu erfassen war. Ein ähnliches Problem bringt die Nomenklatur: während manche Publikationen Monozyten und Makrophagen getrennt betrachten, definieren andere Monozyten, die in Gewebe einwandern *per se* schon als Makrophagen (Ziegler-Heitbrock 2015). Ein weiteres Problem stellte die Verfügbarkeit von Probanden- und Patientenmaterial dar. Bei zum Teil geringer Monozytenausbeute aus den Blutentnahmen konnten nicht in jedem Versuchsdurchlauf alle Versuchansätze, insbesondere in den Migrationsassays, bestückt werden. Vornehmlich im Falle der Patienten konnte bisweilen nur die A- oder die B-Probe verwertet werden. Durch die bei vielen Prozessschritten fragile Methode mussten nicht selten Werte exkludiert werden. Zusammen resultierte dies in differierenden Probenzahlen und einer Verkleinerung der Stichprobe. So ist in Teilen der Auswertung eine Tendenz erkennbar, zum Erlangen einer Signifikanz wäre allerdings eine Ausweitung der Probenzahl nötig.

In einer Folgearbeit könnte an die erhobenen Ergebnisse angeknüpft und Migrationsassays mit Monozyten aus (un-)behandelten MS-Patienten durch mit Endothel beschichtete Transwell-Siebchen durchgeführt werden. In diesem Rahmen könnten die oben besprochenen Adhäsionsmoleküle neben der Analyse der Expression ihrer mRNA auch durchflusszytometrisch und funktionell untersucht werden. Ein weiterer Anknüpfungspunkt wäre die durchflusszytometrische Analyse von CXCR4 nach *In-vitro*- und *In-vivo*-Behandlung mit MP, um hier die Parallelen zum Einfluss von MP auf T-Zellen zu ziehen. In unseren Analysen

der mRNA-Expression sowie den Transmigrationsassays wurde nicht nach Monozytensubpopulationen unterschieden. Inzwischen zeichnet sich ab, dass die verschiedenen Gruppen von Monozyten unterschiedlich auf die Behandlung mit MP reagieren. Daher sollten Analysen der Migration und der mRNA-Expression verbunden mit einer Sortierung der Monozyten nach Subpopulationen vorgenommen werden. Weiterhin erfordert die Rolle von GM-CSF weitere Forschung, dessen Einfluss auf Monozyten noch nicht befriedigend geklärt ist. Denkbar wäre eine *In-vitro*-Stimulation mit GM-CSF mit anschließender Migration gegen die in unserer Arbeit verwendeten Chemokine in einem Vergleich mit unbehandelten Zellen. So könnte die sich derzeit abzeichnende wichtige Rolle von GM-CSF in der Pathogenese von MS weiter untersucht werden. Vorangegangene Versuche von anderen Autoren hatten gezeigt, dass verkapselte GC, zu deren Aufnahme Phagozytose notwendig ist, einen vielfach höheren Effekt auf Monozyten und Makrophagen hat als freie GC. Weiterführend könnte ein Vergleich der in dieser Arbeit erhobenen Daten aus Migration, Chemokinrezeptor- und Adhäsionsmolekülexpression sowie Subpopulationsverteilung unter der Behandlung mit verkapselten GC erfolgen, welche bis heute allerdings nicht im humanen Setting zugelassen sind und man somit auf *In-vitro*-Versuche mit humanen Zellen limitiert wäre. Ein weitergehend interessanter Ansatz wäre eine Liquorpunktion von MS-Patienten vor und 24 h nach einer Applikation von MP, die die von Waschbisch et al. beobachtete Translokation von Monozyten in das ZNS bei MS-Patienten in einen Zusammenhang mit der MP-Therapie bringen würde. Mit einer entsprechenden Analyse M2-typischer Marker könnte unsere These, dass MP zu einer verstärkten Migration von anti-inflammatorischen Monozyten in das ZNS verstärkt wird, überprüft werden.

5 Zusammenfassung

Glukokortikoide (GC) als Therapeutika der Multiplen Sklerose (MS) werden schon seit langem erfolgreich angewandt; dennoch ist ihre Auswirkung auf verschiedene Zelltypen weiterhin nicht erschöpfend untersucht. Weitere Grundlagenforschung ist notwendig, um die Wirkstoffe weiter zu entwickeln und die klinische Anwendung zu optimieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Monozytensubpopulationen von gesunden Probanden und MS-Patienten im unbehandelten und mit Methylprednisolon (MP) behandelten Zustand analysiert. Wir fokussierten uns dabei auf die Chemotaxis, die Chemokinrezeptorexpression der Monozyten und die Verteilung ihrer Subpopulationen. Diese Faktoren stellen wichtige Charakteristika von Monozyten bei der Erfüllung ihrer Aufgabe dar und erlauben Rückschlüsse auf die pathogenetische Rolle von Monozyten in der MS und die Funktionsweise von MP als Therapeutikum. GC führen zu einer Reduktion von inflammatorischen Eigenschaften in Monozyten und zu einer Induktion des bekannten regulatorischen Zellphänotyps M2. Zu Beginn kontraintuitiv war unsere Beobachtung, dass MP die Chemotaxis gegen proinflammatorische Chemokine steigert. Zwar kam es zu einer signifikanten Zunahme der klassischen und $CCR2^{+}$-Subpopulation bei Patienten, die an einer progressiven Form der MS litten. Insgesamt reichte diese jedoch nicht aus, um den Effekt zu erklären. Eine Verschiebung der nach CD14 und CD16 bzw. CCR2 und CX3CR1 definierten Subpopulationen Richtung regulatorischer Monozyten konnten wir nicht beobachten; die M2-Polarisierung zeigte sich jedoch in dem von uns betrachteten Zeitraum anhand der Expression anderer typischer Marker in späteren Analysen unserer Arbeitsgruppe. So ist es wahrscheinlich, dass GC weitere Einflüsse auf Monozyten haben, die zu der gesteigerten Chemotaxis führen. Infrage hierbei kommen Effekte auf Signalkaskaden oder das Zytoskelett. Im Vorfeld wurde gezeigt, dass M2-polarisierte Makrophagen gegen CCL2 motiler sind, als M1- oder M0-Makrophagen. Zusammengenommen mit der Beobachtung, dass die CCL2-Level im Liquor in Remission höher sind als im akuten Schub, könnte dies bedeuten, dass M2-polarisierte Makrophagen und Monozyten in Phasen der Remission zum Ort der Entzündung gelenkt werden, wo sie den Heilungsprozess unterstützen. Die außerdem beobachtete Erhöhung des CCL2-Levels unter der Therapie mit MP sowie unsere neu erhobenen Daten deuten darauf hin, dass dieser evolutionär angelegte Vorgang durch MP unterstützt wird, indem zum einen die inflammatorischen Eigenschaften von myeloiden Zellen im Rahmen einer M2-Polarisierung reduziert werden und zum anderen die zielgerichtete Chemotaxis gegen CCL2 gefördert wird. So wird die Terminierung einer Entzündungsreaktion bzw. eine Verstärkung von Heilungsprozessen z.B. im Rahmen einer MS begünstigt.

6 Literaturverzeichnis

Absinta M, Nair G, Sati P, Cortese ICM, Filippi M, Reich DS (2015): Direct MRI detection of impending plaque development in multiple sclerosis. Neurol - Neuroimmunol Neuroinflammation 2, e145

Ajami B, Bennett JL, Krieger C, McNagny KM, Rossi FMV (2011): Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. Nat Neurosci 14, 1142–1149

Allen IV, McQuaid S, Mirakhur M, Nevin G (2001): Pathological abnormalities in the normal-appearing white matter in multiple sclerosis. Neurol Sci 22, 141–144

Amano Y, Lee SW, Allison AC (1993): Inhibition by glucocorticoids of the formation of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6: mediation by decreased mRNA stability. Mol Pharmacol 43, 176–182

Ancuta P, Moses A, Gabuzda D (2004): Transendothelial migration of CD16+ monocytes in response to fractalkine under constitutive and inflammatory conditions. Immunobiology 209, 11–20

Ascherio A, Munger KL (2016): Epidemiology of Multiple Sclerosis: From risk factors to prevention - an update. Semin Neurol 36, 103–114

Ascherio Alberto, Munger Kassandra L. (2007): Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: noninfectious factors. Ann Neurol 61, 504–513

Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F (2007): Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. Science 317, 666–670

Bäärnhielm M, Olsson T, Alfredsson L (2014): Fatty fish intake is associated with decreased occurrence of multiple sclerosis. Mult Scler J 20, 726–732

Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schröder R, Deckert M, Schmidt S, et al. (2000): Clonal expansions of CD8+ T cells dominate the T cell infiltrate in active Multiple Sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. J Exp Med 192, 393–404

Bach JF (2002): The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. N Engl J Med 347, 911–920

Bain CC, Bravo-Blas A, Scott CL, Gomez Perdiguero E, Geissmann F, Henri S, Malissen

B, Osborne LC, Artis D, Mowat AM (2014): Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. Nat Immunol 15, 929–937

Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, Hancock WW (1999): CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 6873–6878

Barnes PJ, Adcock IM (2009): Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. Lancet 373, 1905–1917

Barnett MH, Prineas JW (2004): Relapsing and remitting multiple sclerosis: Pathology of the newly forming lesion. Ann Neurol 55, 458–468

Bartosik-Psujek H, Stelmasiak Z (2005): The levels of chemokines CXCL8, CCL2 and CCL5 in multiple sclerosis patients are linked to the activity of the disease. Eur J Neurol 12, 49–54

Bashir S, Sharma Y, Elahi A, Khan F (2016): Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases. Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al 65, 1–11

Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ (1997): A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. Nature 385, 640–644

Belgiovine C, Chiesa G, Chiodi I, Frapolli R, Bonezzi K, Taraboletti G, D'Incalci M, Mondello C (2016): Snail levels control the migration mechanism of mesenchymal tumor cells. Oncol Lett 12, 767–771

Berer K, Krishnamoorthy G (2014): Microbial view of central nervous system autoimmunity. FEBS Lett 588, 4207–4213

Berer K, Mues M, Koutrolos M, Rasbi ZA, Boziki M, Johner C, Wekerle H, Krishnamoorthy G (2011): Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. Nature 479, 538–541

Bergh FT, Dayyani F, Ziegler-Heitbrock L (2004): Impact of type-I-interferon on monocyte subsets and their differentiation to dendritic cells: An in vivo and ex vivo study in multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. J Neuroimmunol 146, 176–188

Berkovich R (2013): Treatment of acute relapses in Multiple Sclerosis. Neurotherapeutics 10, 97–105

Biswas SK, Chittezhath M, Shalova IN, Lim J-Y (2012): Macrophage polarization and plasticity in health and disease. Immunol Res 53, 11–24

Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA (1996): A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). J Exp Med 184, 1101–1109

Böyum A (1968): Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. Scand J Clin Lab Investig Suppl 97, 7

Braga TT, Agudelo JSH, Camara NOS (2015): Macrophages during the fibrotic process: M2 as friend and foe. Front Immunol 6, 602

Breij ECW, Brink BP, Veerhuis R, van den Berg C, Vloet R, Yan R, Dijkstra CD, van der Valk P, Bö L (2008): Homogeneity of active demyelinating lesions in established Multiple Sclerosis. Ann Neurol 63, 16–25

Bufford JD, Gern JE (2005): The Hygiene Hypothesis Revisited. Immunol Allergy Clin North Am 25, 247–262

Burgess AW, Metcalf D (1980): The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. Blood 56, 947–958

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

Cannella B, Raine CS (1995): The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. Ann Neurol 37, 424–435

Caplan A, Fett N, Rosenbach M, Werth VP, Micheletti RG (2017): Prevention and management of glucocorticoid-induced side effects: A comprehensive review: Ocular, cardiovascular, muscular, and psychiatric side effects and issues unique to pediatric patients. Acad Dermatol 76, 201–207

Carlin LM, Stamatiades EG, Auffray C, Hanna RN, Glover L, Vizcay-Barrena G, Hedrick CC, Cook HT, Diebold S, Geissmann F (2013): Nr4a1-dependent Ly6Clow monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. Cell 153, 362–375

Carrieri PB, Provitera V, Rosa TD, Tartaglia G, Gorga F, Perrella O (1998): Profile of cerebrospinal fluid and serum cytokines in patients with relapsing-remitting Multiple Sclerosis. A correlation with clinical activity. Immunopharmacol Immunotoxicol 20, 373–382

Cassetta L, Cassol E, Poli G (2011): Macrophage polarization in health and disease. Sci World J 11, 2391–2402

Caulfield J, Fernandez M, Snetkov V, Lee T, Hawrylowicz C (2002): CXCR4 expression on monocytes is up-regulated by dexamethasone and is modulated by autologous CD3+ T cells. Immunology 105, 155–162

Cekanaviciute E, Yoo BB, Runia TF, Debelius JW, Singh S, Nelson CA, Kanner R, Bencosme Y, Lee YK, Hauser SL, et al. (2017): Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. Proc Natl Acad Sci 114, 10713–10718

Chen J, Chia N, Kalari KR, Yao JZ, Novotna M, Soldan MMP, Luckey DH, Marietta EV, Jeraldo PR, Chen X, et al. (2016): Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. Sci Rep 6, 28484

Codarri L, Greter M, Becher B (2013): Communication between pathogenic T cells and myeloid cells in neuroinflammatory disease. Trends Immunol 34, 114–119

Compston A (1988): The 150th anniversary of the first depiction of the lesions of multiple sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 51, 1249–1252

Compston A, Coles A (2008): Multiple Sclerosis. Lancet Lond Engl 372, 1502–1517

Confavreux C, Vukusic S (2006): Age at disability milestones in multiple sclerosis. Brain 129, 595–605

Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P (2000): Relapses and progression of disability in Multiple Sclerosis. N Engl J Med 343, 1430–1438

Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P (2003): Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. Brain 126, 770–782

Constantinescu CS, Asher A, Fryze W, Kozubski W, Wagner F, Aram J, Tanasescu R, Korolkiewicz RP, Dirnberger-Hertweck M, Steidl S, et al. (2015): Randomized phase 1b trial of MOR103, a human antibody to GM-CSF, in Multiple Sclerosis. Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation 2, e117

Cortese M, Riise T, Bjørnevik K, Holmøy T, Kampman MT, Magalhaes S, Pugliatti M, Wolfson C, Myhr KM (2015): Timing of use of cod liver oil, a vitamin D source, and multiple sclerosis risk: The EnvIMS study. Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl 21, 1856–1864

Däbritz J, Weinhage T, Varga G, Wirth T, Walscheid K, Brockhausen A, Schwarzmaier D, Brückner M, Ross M, Bettenworth D, et al. (2015): Reprogramming of monocytes by GM-CSF contributes to regulatory immune functions during intestinal inflammation. J Immunol 194, 2424–2438

Dal-Secco D, Wang J, Zeng Z, Kolaczkowska E, Wong CHY, Petri B, Ransohoff RM, Charo IF, Jenne CN, Kubes P (2015): A dynamic spectrum of monocytes arising from the in situ reprogramming of CCR2 $^{+}$ monocytes at a site of sterile injury. J Exp Med 212, 447–456

Daltrozzo T, Hapfelmeier A, Donnachie E, Schneider A, Hemmer B (2018): A Systematic Assessment of Prevalence, Incidence and Regional Distribution of Multiple Sclerosis in Bavaria From 2006 to 2015. Front Neurol 9, 871

D'Ambrosio D, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F (2003): Chemokine receptors in inflammation: an overview. J Immunol Methods 273, 3–13

Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR (2013): Tissue-resident macrophages. Nat Immunol 14, 986–995

Dendrou CA, Fugger L, Friese MA (2015): Immunopathology of multiple sclerosis. Nat Rev Immunol 15, 545–558

Dhib-Jalbut S, Marks S (2010): Interferon - mechanisms of action in multiple sclerosis. Neurology 74, 17–24

Ehrchen J, Steinmüller L, Barczyk K, Tenbrock K, Nacken W, Eisenacher M, Nordhues U, Sorg C, Sunderkötter C, Roth J (2007): Glucocorticoids induce differentiation of a specifically activated, anti-inflammatory subtype of human monocytes. Blood 109, 1265–1274

Elian M, Dean G (1987): Multiple sclerosis among the United Kingdom - born children of immigrants from the West Indies. J Neurol Neurosurg Psychiatry 50, 327–332

Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler ME, Lobb RR (1990): VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. Cell 60, 577–584

Elovaara I, Lalla M, Spare E, Lehtimaki T, Dastidar P (1998): Methylprednisolone reduces adhesion molecules in blood and cerebrospinal fluid in patients with MS. Neurology 51, 1703–1708

Elovaara I, Ukkonen M, Leppäkynnäs M, Lehtimäki T, Luomala M, Peltola J, Dastidar P

(2000): Adhesion molecules in multiple sclerosis: relation to subtypes of disease and methylprednisolone therapy. Arch Neurol 57, 546–551

Elovaara I, Kuusisto H, Paalavuo R, Sarkijarvi S, Lehtimaki T, Huhtala H, Vilpo J (2006): Effect of high-dose methylprednisolone treatment on CCR5 expression on blood cells in MS exacerbation. Acta Neurol Scand 113, 163–166

Fischer HJ, Finck TLK, Pellkofer HL, Reichardt HM, Lühder F (2019): Glucocorticoid Therapy of Multiple Sclerosis Patients Induces Anti-inflammatory Polarization and Increased Chemotaxis of Monocytes. Front Immunol 10, 1200

Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD (2007): Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (CSF) and Macrophage CSF-Dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. J Immunol 178, 5245–5252

Franciotta D, Martino G, Zardini E, Furlan R, Bergamaschi R, Andreoni L, Cosi V (2001): Serum and CSF levels of MCP-1 and IP-10 in multiple sclerosis patients with acute and stable disease and undergoing immunomodulatory therapies. J Neuroimmunol 115, 192–198

Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H (2009): The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. Brain 132, 1175–1189

Frisullo G, Nociti V, Iorio R, Patanella AK, Marti A, Caggiula M, Mirabella M, Tonali PA, Batocchi AP (2008): IL17 and IFNγ production by peripheral blood mononuclear cells from clinically isolated syndrome to secondary progressive multiple sclerosis. Cytokine 44, 22–25

Gasson JC (1991): Molecular physiology of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. Blood 77, 1131–1145

Geissmann F, Jung S, Littman DR (2003): Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. Immunity 19, 71–82

Ginhoux F, Jung S (2014): Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. Nat Rev Immunol 14, 392–404

Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, et al. (2010): Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. Science 330, 841–845

Gjelstrup MC, Stilund M, Petersen T, Møller HJ, Petersen EL, Christensen T (2018): Subsets of activated monocytes and markers of inflammation in incipient and progressed multiple sclerosis. Immunol Cell Biol 96, 160–174

Goda S, Imai T, Yoshie O, Yoneda O, Inoue H, Nagano Y, Okazaki T, Imai H, Bloom ET, Domae N, Umehara H (2000): CX3C-Chemokine, Fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and -independent mechanisms. J Immunol 164, 4313–4320

Graf J, Albrecht P, Goebels N, Aktas O, Hartung H-P (2020): Ocrelizumab zur Behandlung der Multiplen Sklerose. Nervenarzt 1–13

Granner DK, Wang J-C, Yamamoto KR: Regulatory actions of glucocorticoid hormones: From organisms to mechanisms. In: Wang J-C, Harris C (Hrsg.): Glucocorticoid Signaling: From Molecules to Mice to Man (Advances in Experimental Medicine and Biology). Springer, NY, New York, NY 2015, 3–31

Griseri T, McKenzie BS, Schiering C, Powrie F (2012): Dysregulated hematopoietic stem and progenitor cell activity promotes interleukin-23-driven chronic intestinal inflammation. Immunity 37, 1116–1129

Guerau-de-Arellano M, Alder H, Ozer HG, Lovett-Racke A, Racke MK (2012): miRNA profiling for biomarker discovery in Multiple Sclerosis: from microarray to deep sequencing. J Neuroimmunol 248, 32–39

Guilliams M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, Segura E, Tussiwand R, Yona S (2014): Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. Nat Rev Immunol 14, 571–578

Hamilton JA (2008): Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. Nat Rev Immunol 8, 533–544

Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, Becker CD, See P, Price J, Lucas D, et al. (2013): Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. Immunity 38, 792–804

Hawrylowicz CM, Guida L, Paleolog E (1994): Dexamethasone up-regulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor expression on human monocytes. Immunology 83, 274–280

Healy BC, Ali E, Guttmann CRG, Chitnis T, Glanz BI, Buckle G, Houtchens M, Stazzone L, Moodie J, Berger AM, et al. (2009): Smoking and Disease Progression in Multiple Sclerosis. Arch Neurol 66, 858–864

Hedström AK, Olsson T, Alfredsson L (2012): High body mass index before age 20 is associated with increased risk for multiple sclerosis in both men and women. Mult Scler 18, 1334–1336

Heidt T, Courties G, Dutta P, Sager HB, Sebas M, Iwamoto Y, Sun Y, Da Silva N, Panizzi P, van der Laan AM, et al. (2014): Differential contribution of monocytes to heart macrophages in steady-state and after myocardial infarction. Circ Res 115, 284–295

Hemmer B (2021): Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen und MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen, S2k-Leitlinie, in: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Online: www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 19.05.2021).

Henderson APD, Barnett MH, Parratt JDE, Prineas JW (2009): Multiple sclerosis: Distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. Ann Neurol 66, 739–753

Hernán MA, Oleky MJ, Ascherio A (2001): Cigarette smoking and incidence of Multiple Sclerosis. Am J Epidemiol 154, 69–74

Hernán MA, Jick SS, Logroscino G, Olek MJ, Ascherio A, Jick H (2005): Cigarette smoking and the progression of multiple sclerosis. Brain 128, 1461–1465

Hmama Z, Knutson KL, Herrera-Velit P, Nandan D, Reiner NE (1999): Monocyte adherence induced by lipopolysaccharide involves CD14, LFA-1, and Cytohesin-1 regulation by Rho and Phophatidylinositol 3-kinase. J Biol Chem 274, 1050–1057

Hohlfeld R (2010): Review: 'Gimme five': future challenges in multiple sclerosis. ECTRIMS Lecture 2009. Mult Scler 16, 3–14

Hohlfeld R, Wekerle H (2004): Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: From pipe dreams to (therapeutic) pipelines. Proc Natl Acad Sci USA 101, 14599–14606

Holick MF (2004): Sunlight and Vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. Am J Clin Nutr 80, 1678S-1688S

Holstiege J, Steffen A, Goffrier B, Bätzing J (2017): Epidemiologie der Multiplen Sklerose – Eine populationsbasierte deutschlandweite Studie. Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung in Deutschland (Zi). Versorgungsatlas-Bericht Nr. 17/09. Berlin, 2017

Housley WJ, Pitt D, Hafler DA (2015): Biomarkers in multiple sclerosis. Clin Immunol 161, 51–58

Hsi ED, Remick DG (1995): Monocytes are the major producers of Interleukin-1β in an *Ex Vivo* model of local cytokine production. J Interferon Cytokine Res 15, 89–94

Huang G, Wang Y, Su J, Zhou P, Li B, Yin L, Lu J (2017): Up-regulation of Rho-associated kinase 1/2 by glucocorticoids promotes migration, invasion and metastasis of melanoma. Cancer Lett 410, 1–11

Iarlori C, Reale M, De Luca G, Di Iorio A, Feliciani C, Tulli A, Conti P, Gambi D, Lugaresi A (2002): Interferon β-1b modulates MCP-1 expression and production in relapsing–remitting multiple sclerosis. J Neuroimmunol 123, 170–179

Ifergan I, Davidson TS, Kebir H, Xu D, Palacios-Macapagal D, Cann J, Rodgers JM, Hunter ZN, Pittet CL, Beddow S, et al. (2017): Targeting the GM-CSF receptor for the treatment of CNS autoimmunity. J Autoimmun 84, 1–11

Italiani P, Boraschi D (2014): From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. Front Immunol 5, 514

Jalonen TO, Pulkkinen K, Ukkonen M, Saarela M, Elovaara I (2002): Differential intracellular expression of CCR5 and chemokines in multiple sclerosis subtypes. J Neurol 249, 576–583

Jalosinski M, Karolczak K, Mazurek A, Glabinski A (2008): The effects of methylprednisolone and mitoxantrone on CCL5-induced migration of lymphocytes in multiple sclerosis. Acta Neurol Scand 118, 120–125

Jetten N, Verbruggen S, Gijbels MJ, Post MJ, De Winther MPJ, Donners MMPC (2014): Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. Angiogenesis 17, 109–118

Joyce DA, Steer JH, Abraham LJ (1997): Glucocorticoid modulation of human monocyte/macrophage function: Control of TNF-α secretion. Inflamm Res 46, 447–451

Kermode AG, Thompson AJ, Tofts P, MacManus DG, Kendall BE, Kingsley DP, Moseley

IF, Rudge P, McDonald WI (1990): Breakdown of the blood-brain barrier precedes symptoms and other MRI signs of new lesions in multiple sclerosis. Pathogenetic and clinical implications. Brain J Neurol 113, 1477–1489

King IL, Dickendesher TL, Segal BM (2009): Circulating Ly-6C$^+$ myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. Blood 113, 3190–3197

Koch-Henriksen N, Sorensen PS (2011): Why does the north–south gradient of incidence of multiple sclerosis seem to have disappeared on the northern hemisphere? J Neurol Sci 311, 58–63

Kouwenhoven M, Teleshova N, Özenci V, Press R, Link H (2001): Monocytes in multiple sclerosis: phenotype and cytokine profile. J Neuroimmunol 112, 197–205

Kuhle J, Barro C, Disanto G, Mathias A, Soneson C, Bonnier G, Yaldizli Ö, Regeniter A, Derfuss T, Canales M, et al. (2016): Serum neurofilament light chain in early relapsing remitting MS is increased and correlates with CSF levels and with MRI measures of disease severity. Mult Scler 22, 1550–1559

Kumar DR, Aslinia F, Yale SH, Mazza JJ (2011): Jean-Martin Charcot: The father of neurology. Clin Med Res 9, 46–49

Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, Pitman N, Mirchandani A, Rana B, van Rooijen N, et al. (2009): IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. J Immunol 183, 6469–6477

Kurtzke JF (1995): MS epidemiology world wide. One view of current status. Acta Neurol Scand 91, 23–33

Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, Schmidbauer M, Parisi JE, Lassmann H (2005): Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. Brain 128, 2705–2712

Landsman L, Bar-On L, Zernecke A, Kim KW, Krauthgamer R, Shagdarsuren E, Lira SA, Weissman IL, Weber C, Jung S (2009): CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. Blood 113, 963–972

Langer-Gould A, Brara SM, Beaber BE, Zhang JL (2013): Incidence of multiple sclerosis in multiple racial and ethnic groups. Neurology 80, 1734–1739

Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF (2007): The Immunopathology of Multiple Sclerosis: An overview. Brain Pathol 17, 210–218

Lassmann H, van Horssen J, Mahad D (2012): Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. Nat Rev Immunol 8, 647–656

Lee DH, Rötger C, Appeldoorn CCM, Reijerkerk A, Gladdines W, Gaillard PJ, Linker RA (2014): Glutathione PEGylated liposomal methylprednisolone (2B3-201) attenuates CNS inflammation and degeneration in murine myelin oligodendrocyte glycoprotein induced experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neuroimmunol 274, 96–101

Leray E, Yaouanq J, Le Page E, Coustans M, Laplaud D, Oger J, Edan G (2010): Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis. Brain 133, 1900–1913

Lévesque SA, Paré A, Mailhot B, Bellver-Landete V, Kébir H, Lécuyer MA, Alvarez JI, Prat A, Vaccari JP de R, Keane RW, Lacroix S (2016): Myeloid cell transmigration across the CNS vasculature triggers IL-1β–driven neuroinflammation during autoimmune encephalomyelitis in mice. J Exp Med 213, 929–949

Levin LI, Munger KL, O'Reilly EJ, Falk KI, Ascherio A (2010): Primary infection with the epstein-barr virus and risk of multiple sclerosis. Ann Neurol 67, 824–830

Lin CC, Edelson BT (2017): New insights into the role of IL-1β in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. J Immunol 198, 4553–4560

Locati M, Mantovani A, Sica A: Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. In: Advances in Immunology. Band 120; Elsevier 2013, 163–184

Loetscher M, Geiser T, O'Reilly T, Zwahlen R, Baggiolini M, Moser B (1994): Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. J Biol Chem 269, 232–237

Lublin FD (2014): New multiple sclerosis phenotypic classification. Eur Neurol 72 Suppl 1, 1–5

Lublin FD, Reingold SC, National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis (1996): Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey. Neurology 46, 907–911

Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000): Heterogeneity of Multiple Sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination.

Ann Neurol 47, 707–717

Lühder F, Reichardt HM (2017): Novel drug delivery systems tailored for improved administration of glucocorticoids. Int J Mol Sci 18, 1836

MacMicking J, Xie QW, Nathan C (1997): Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol 15, 323–350

Mahad DJ, Ransohoff RM (2003): The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). Semin Immunol 15, 23–32

Mahad DJ, Howell SJL, Woodroofe MN (2002): Expression of chemokines in the CSF and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 72, 498–502

Mahad DJ, Callahan MK, Williams KA, Ubogu EE, Kivisäkk P, Tucky B, Kidd G, Kingsbury GA, Chang A, Fox RJ, et al. (2006): Modulating CCR2 and CCL2 at the blood–brain barrier: relevance for multiple sclerosis pathogenesis. Brain 129, 212–223

Makhlouf K, Weiner HL, Khoury SJ (2001): Increased percentage of IL-12+ monocytes in the blood correlates with the presence of active MRI lesions in MS. J Neuroimmunol 119, 145–149

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002): Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. Trends Immunol 23, 549–555

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004): The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol 25, 677–686

Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M (2013): Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling: Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. J Pathol 229, 176–185

Marik C, Felts PA, Bauer J, Lassmann H, Smith KJ (2007): Lesion genesis in a subset of patients with multiple sclerosis: A role for innate immunity? Brain J Neurol 130, 2800–2815

Mass E, Ballesteros I, Farlik M, Halbritter F, Günther P, Crozet L, Jacome-Galarza CE, Händler K, Klughammer J, Kobayashi Y, et al. (2016): Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. Science 353, 6304

McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland

HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, et al. (2001): Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of Multiple Sclerosis. Ann Neurol 50, 121–127

McQualter JL, Darwiche R, Ewing C, Onuki M, Kay TW, Hamilton JA, Reid HH, Bernard CCA (2001): Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. J Exp Med 194, 873–882

Meerschaert J, Furie MB (1994): Monocytes use either CD11/CD18 or VLA-4 to migrate across human endothelium in vitro. J Immunol 152, 1915–1926

Mellergård J, Edström M, Vrethem M, Ernerudh J, Dahle C (2010): Natalizumab treatment in multiple sclerosis: marked decline of chemokines and cytokines in cerebrospinal fluid. Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl 16, 208–217

Michel L, Touil H, Pikor NB, Gommerman JL, Prat A, Bar-Or A (2015): B Cells in the Multiple Sclerosis Central Nervous System: Trafficking and Contribution to CNS-Compartmentalized Inflammation. Front Immunol 6, 636

Mikita J, Dubourdieu-Cassagno N, Deloire MS, Vekris A, Biran M, Raffard G, Brochet B, Canron MH, Franconi JM, Boiziau C, Petry KG (2011): Altered M1/M2 activation patterns of monocytes in severe relapsing experimental rat model of multiple sclerosis. Amelioration of clinical status by M2 activated monocyte administration. Mult Scler 17, 2–15

Mildner A, Mack M, Schmidt H, Brück W, Djukic M, Zabel MD, Hille A, Priller J, Prinz M (2009): CCR2+Ly-6Chi monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system. Brain 132, 2487–2500

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

Milo R, Kahana E (2010): Multiple sclerosis: Geoepidemiology, genetics and the environment. Autoimmun Rev 9, A387–A394

Milo R, Miller A (2014): Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. Autoimmun Rev 13, 518–524

Miron VE, Boyd A, Zhao JW, Yuen TJ, Ruckh JM, Shadrach JL, van Wijngaarden P, Wagers AJ, Williams A, Franklin RJM, ffrench-Constant C (2013): M2 microglia/macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. Nat Neurosci 16, 1211–

1218

Mishra MK, Yong VW (2016): Myeloid cells — targets of medication in multiple sclerosis. Nat Rev Neurol 12, 539–551

Mishra MK, Wang J, Silva C, Mack M, Yong VW (2012): Kinetics of proinflammatory monocytes in a model of Multiple Sclerosis and its perturbation by laquinimod. Am J Pathol 181, 642–651

Montalban X, Hauser SL, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G, de Seze J, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B, et al. (2017): Ocrelizumab versus Placebo in primary progressive Multiple Sclerosis. N Engl J Med 376, 209–220

Montes-Cobos E, Schweingruber N, Li X, Fischer HJ, Reichardt HM, Lühder F (2017): Deletion of the Mineralocorticoid Receptor in myeloid cells attenuates central nervous system autoimmunity. Front Immunol 8, 1319

Mori F, Nisticò R, Nicoletti CG, Zagaglia S, Mandolesi G, Piccinin S, Martino G, Finardi A, Rossini PM, Marfia GA, et al. (2016): RANTES correlates with inflammatory activity and synaptic excitability in multiple sclerosis. Mult Scler 22, 1405–1412

Möst J, Schwaeble W, Drach J, Sommerauer A, Dierich MP (1992): Regulation of the expression of ICAM-1 on human monocytes and monocytic tumor cell lines. J Immunol 148, 1635–1642

Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B (2015): Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in sepsis and systemic Lupus Erythematous. Sci Rep 5, 13886

Müller N, Fischer HJ, Tischner D, van den Brandt J, Reichardt HM (2013): Glucocorticoids induce effector T Cell depolarization via ERM proteins, thereby impeding migration and APC conjugation. J Immunol 190, 4360–4370

Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, Hernan MA, Olek MJ, Willett WC, Ascherio A (2004): Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. Neurology 62, 60–65

Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A (2006): Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels and Risk of Multiple Sclerosis. JAMA 296, 2832–2838

Munger KL, Bentzen J, Laursen B, Stenager E, Koch-Henriksen N, Sørensen TIA, Baker J (2013): Childhood body mass index and multiple sclerosis risk: a long-term cohort study. Mult Scler 19, 1323–1329

Munger KLL, Chitnis T, Ascherio A (2009): Body size and risk of MS in two cohorts of US women. Neurology 73, 1543–1550

Muraro PA, Martin R, Mancardi GL, Nicholas R, Sormani MP, Saccardi R (2017): Autologous haematopoietic stem cell transplantation for treatment of multiple sclerosis. Nat Rev Neurol 13, 391–405

Murray PJ (2017): Immune regulation by monocytes. Semin Immunol 35, 12–18

Murray PJ, Wynn TA (2011): Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. Nat Rev Immunol 11, 723–737

Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, et al. (2014): Macrophage activation and polarization: Nomenclature and experimental guidelines. Immunity 41, 14–20

Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T (1994): Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. Proc Natl Acad Sci USA 91, 2305–2309

O'Connor P, Canadian Multiple Sclerosis Working Group (2002): Key issues in the diagnosis and treatment of multiple sclerosis. An overview. Neurology 59, S1-33

Okuda DT, Mowry EM, Beheshtian A, Waubant E, Baranzini SE, Goodin DS, Hauser SL, Pelletier D (2009): Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis: the radiologically isolated syndrome. Neurology 72, 800–805

Olingy CE, Emeterio CLS, Ogle ME, Krieger JR, Bruce AC, Pfau DD, Jordan BT, Peirce SM, Botchwey EA (2017): Non-classical monocytes are biased progenitors of wound healing macrophages during soft tissue injury. Sci Rep 7, 447

Palanichamy A, Apeltsin L, Kuo TC, Sirota M, Wang S, Pitts SJ, Sundar PD, Telman D, Zhao LZ, Derstine M, et al. (2014): Immunoglobulin class-switched B cells provide an active immune axis between CNS and periphery in multiple sclerosis. Sci Transl Med 6, 248

Patel AA, Zhang Y, Fullerton JN, Boelen L, Rongvaux A, Maini AA, Bigley V, Flavell RA, Gilroy DW, Asquith B, et al. (2017): The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. J Exp Med 214, 1913–1923

Pauli FD, Reindl M, Ehling R, Schautzer F, Gneiss C, Lutterotti A, O'Reilly EJ, Munger KL, Deisenhammer F, Ascherio A, Berger T (2008): Smoking is a risk factor for early conversion to clinically definite multiple sclerosis. Mult Scler 14, 1026–1030

Perrella O, Carrieri PB, Mercato RD, Buscaino GA (1993): Markers of activated T lymphocytes and T cell receptor gamma/delta+ in patients with Multiple Sclerosis. Eur Neurol 33, 152–155

Petersen G, Wittmann R, Arndt V, Göpffarth D (2014): Epidemiologie der Multiplen Sklerose in Deutschland: Regionale Unterschiede und Versorgungsstruktur in Abrechnungsdaten der gesetzlichen Krankenversicherung. Nervenarzt 85, 990–998

Porta C, Riboldi E, Ippolito A, Sica A (2015): Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation. Semin Immunol 27, 237–248

Prinz M, Priller J, Sisodia SS, Ransohoff RM (2011): Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. Nat Neurosci 14, 1227–1235

Pröbstel AK, Baranzini SE (2018): The role of the gut microbiome in Multiple Sclerosis risk and Ppogression: Towards characterization of the "MS Microbiome". Neurotherapeutics 15, 126–134

Qian BZ, Pollard JW (2010): Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. Cell 141, 39–51

Raine CS (1994): Multiple sclerosis: immune system molecule expression in the central nervous system. J Neuropathol Exp Neurol 53, 328–337

Ramirez SH, Fan S, Zhang M, Papugani A, Reichenbach N, Dykstra H, Mercer AJ, Tuma RF, Persidsky Y (2010): Inhibition of Glycogen Synthase Kinase 3β (GSK3β) decreases inflammatory responses in brain endothelial cells. Am J Pathol 176, 881–892

Rasouli J, Ciric B, Imitola J, Gonnella P, Hwang D, Mahajan K, Mari ER, Safavi F, Leist TP, Zhang GX, Rostami A (2015): Expression of GM-CSF in T cells is increased in Multiple Sclerosis and suppressed by IFN-β therapy. J Immunol 194, 5085–5093

Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA (2018): Multiple Sclerosis. N Engl J Med 378, 169–180

Reichardt HM, Tuckermann JP, Göttlicher M, Vujic M, Weih F, Angel P, Herrlich P, Schütz G (2001): Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. EMBO J 20, 7168–7173

Reijerkerk A, Kooij G, Pol SMA van der, Leyen T, Hof B van het, Couraud P-O, Vivien D, Dijkstra CD, Vries HE de (2008): Tissue-type Plasminogen Activator is a regulator of monocyte diapedesis through the Brain Endothelial Barrier. J Immunol 181, 3567–3574

Rentzos M, Nikolaou C, Rombos A, Evangelopoulos ME, Dimitrakopoulos A, Kararizou E, Koutsis G, Zoga M, Tsoutsou A, Sfangos K (2010): Circulating interleukin-15 and RANTES chemokine in MS patients: effect of treatment with methylprednisolone in patients with relapse. Neurol Res 32, 684–689

Reymond N, Imbert A-M, Devilard E, Fabre S, Chabannon C, Xerri L, Farnarier C, Cantoni C, Bottino C, Moretta A, et al. (2004): DNAM-1 and PVR regulate monocyte migration through endothelial junctions. J Exp Med 199, 1331–1341

Rhen T, Cidlowski JA (2005): Antiinflammatory action of glucocorticoids — New mechanisms for old Drugs. N Engl J Med 353, 1711–1723

Rossi S, Motta C, Studer V, Macchiarulo G, Volpe E, Barbieri F, Ruocco G, Buttari F, Finardi A, Mancino R (2014): Interleukin-1β causes excitotoxic neurodegeneration and multiple sclerosis disease progression by activating the apoptotic protein p53. Mol Neurodegener 9, 56

Rostam HM, Singh S, Salazar F, Magennis P, Hook A, Singh T, Vrana NE, Alexander MR, Ghaemmaghami AM (2016): The impact of surface chemistry modification on macrophage polarisation. Immunobiology 221, 1237–1246

Ruckh JM, Zhao JW, Shadrach JL, van Wijngaarden P, Rao TN, Wagers AJ, Franklin RJM (2012): Rejuvenation of regeneration in the aging central nervous system. Cell Stem Cell 10, 96–103

Ruffell B, Affara NI, Coussens LM (2012): Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. Trends Immunol 33, 119–126

Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR (1998): Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. Immunol Today 19, 568–574

Salvini S, Hunter DJ, Sampson L, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner B, Willett WC (1989): Food-based validation of a Ddetary questionnaire: The effects of week-to-week variation in food consumption. Int J Epidemiol 18, 858–867

Salzer J, Hallmans G, Nystrom M, Stenlund H, Wadell G, Sundstrom P (2012): Vitamin D as a protective factor in multiple sclerosis. Neurology 79, 2140–2145

Sawcer S, Franklin RJM, Ban M (2014): Multiple Sclerosis genetics. Lancet Neurol 13, 700–709

Scarpini E, Galimberti D, Baron P, Clerici R, Ronzoni M, Conti G, Scarlato G (2002): IP-

10 and MCP-1 levels in CSF and serum from multiple sclerosis patients with different clinical subtypes of the disease. J Neurol Sci 195, 41–46

Schiffenbauer J, Streit WJ, Butfiloski E, LaBow M, Edwards C, Moldawer LL (2000): The induction of EAE is only partially dependent on TNF receptor signaling but requires the IL-1 type I receptor. Clin Immunol 95, 117–123

Schultze JL, Schmidt SV (2015): Molecular features of macrophage activation. Semin Immunol 27, 416–423

Schweingruber N, Haine A, Tiede K, Karabinskaya A, van den Brandt J, Wüst S, Metselaar JM, Gold R, Tuckermann JP, Reichardt HM, Lühder F (2011): Liposomal encapsulation of glucocorticoids alters their mode of action in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 187, 4310–4318

Schweingruber N, Reichardt SD, Lühder F, Reichardt HM (2012): Mechanisms of Glucocorticoids in the Control of Neuroinflammation: GCs in neuroinflammation. J Neuroendocr 24, 174–182

Schweingruber N, Fischer HJ, Fischer L, van den Brandt J, Karabinskaya A, Labi V, Villunger A, Kretzschmar B, Huppke P, Simons M, et al. (2014): Chemokine-mediated redirection of T cells constitutes a critical mechanism of glucocorticoid therapy in autoimmune CNS responses. Acta Neuropathol 127, 713–729

Serbina NV, Pamer EG (2006): Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. Nat Immunol 7, 311–317

Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG (2008): Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. Annu Rev Immunol 26, 421–452

Sewell DL, Reinke EK, Hogan LH, Sandor M, Fabry Z (2002): Immunoregulation of CNS autoimmunity by helminth and mycobacterial infections. Immunol Lett 82, 101–110

Shi C, Pamer EG (2011): Monocyte recruitment during infection and inflammation. Nat Rev Immunol 11, 762–774

Shi C, Jia T, Mendez-Ferrer S, Hohl TM, Serbina NV, Lipuma L, Leiner I, Li MO, Frenette PS, Pamer EG (2011): Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands. Immunity 34, 590–601

Sica A, Mantovani A (2012): Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. J Clin

Invest 122, 787–795

Simpson J, Rezaie P, Newcombe J, Cuzner ML, Male D, Woodroofe MN (2000): Expression of the beta-chemokine receptors CCR2, CCR3 and CCR5 in Multiple Sclerosis central nervous system tissue. J Neuroimmunol 108, 192–200

Sørensen TL, Tani M, Jensen J, Pierce V, Lucchinetti C, Folcik VA, Qin S, Rottman J, Sellebjerg F, Strieter RM, et al. (1999): Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. J Clin Invest 103, 807–815

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

Soucie EL, Weng Z, Geirsdóttir L, Molawi K, Maurizio J, Fenouil R, Mossadegh-Keller N, Gimenez G, VanHille L, Beniazza M, et al. (2016): Lineage-specific enhancers activate self-renewal genes in macrophages and embryonic stem cells. Science 351, 6274

Steer JH, Vuong Q, Joyce DA (1997): Suppression of human monocyte Tumour Necrosis Factor α release by glucocorticoid therapy: Relationship to systemic monocytopaenia and cortisol suppression. Br J Clin Pharmacol 43, 383–389

Sunderkötter C, Nikolic T, Dillon MJ, Rooijen N van, Stehling M, Drevets DA, Leenen PJM (2004): Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. J Immunol 172, 4410–4417

Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KHG, Lavelle EC (2006): A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17–producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. J Exp Med 203, 1685–1691

Szczuciński A, Losy J (2011): CCL5, CXCL10 and CXCL11 chemokines in patients with active and stable relapsing-remitting Multiple Sclerosis. Neuroimmunomodulation 18, 67–72

Tailor A, Das AM, Getting SJ, Flower RJ, Perretti M (1997): Subacute treatment of rats with Dexamethasone reduces ICAM-1 levels on circulating monocytes. Biochem Biophys Res Commun 231, 675–678

Tamoutounour S, Guilliams M, Montanana Sanchis F, Liu H, Terhorst D, Malosse C, Pollet E, Ardouin L, Luche H, Sanchez C, et al. (2013): Origins and functional specialization

of macrophages and of conventional and monocyte-derived Dendritic Cells in mouse skin. Immunity 39, 925–938

Tei N, Tanaka J, Sugimoto K, Nishihara T, Nishioka R, Takahashi H, Yano H, Matsumoto S, Ohue S, Watanabe H, et al. (2013): Expression of MCP-1 and fractalkine on endothelial cells and astrocytes may contribute to the invasion and migration of brain macrophages in ischemic rat brain lesions. J Neurosci Res 91, 681–693

Thomas GD, Hanna RN, Vasudevan NT, Hamers AA, Romanoski CE, McArdle S, Ross KD, Blatchley A, Yoakum D, Hamilton BA, et al. (2016): Deleting an Nr4a1 super-enhancer subdomain ablates Ly6C-low monocytes while preserving macrophage gene function. Immunity 45, 975–987

Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS, et al. (2018): Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. Lancet Neurol 17, 162–173

Thorogood Margaret, Hannaford Philip C. (2005): The influence of oral contraceptives on the risk of multiple sclerosis. Br J Obstet Gynaecol 105, 1296–1299

Tombul T, Anlar O, Akdeniz H (2011): Peripheral blood monocytes in multiple sclerosis exacerbations. Pak J Med Sci 27, 73–76

Trebst C, Lykke Sørensen T, Kivisäkk P, Cathcart MK, Hesselgesser J, Horuk R, Sellebjerg F, Lassmann H, Ransohoff RM (2001): CCR1+/CCR5+ mononuclear phagocytes accumulate in the Central Nervous System of patients with Multiple Sclerosis. Am J Pathol 159, 1701–1710

Tremlett H, Waubant E (2017): The multiple sclerosis microbiome? Ann Transl Med 5, 53

Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M, Charo IF (2007): Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. J Clin Invest 117, 902–909

Tsunoda I, Fujinami RS (2002): Inside-out versus outside-in models for virus induced demyelination: Axonal damage triggering demyelination. Springer Semin Immunopathol 24, 105–125

Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, Fugger L (2008): Interleukin-17 production in Central Nervous System-infiltrating T cells and Glial Cells is associated with active disease in Multiple Sclerosis. Am J Pathol 172, 146–155

Uysal S, Meriç Yilmaz F, Boğdaycioğlu N, Mungan Öztürk S, Ak F (2014): Increased serum levels of some inflammatory markers in patients with multiple sclerosis. Minerva Med 105, 229–235

Varga G, Ehrchen J, Tsianakas A, Tenbrock K, Rattenholl A, Seeliger S, Mack M, Roth J, Sunderkoetter C (2008): Glucocorticoids induce an activated, anti-inflammatory monocyte subset in mice that resembles myeloid-derived suppressor cells. J Leukoc Biol 84, 644–650

Varga G, Ehrchen J, Brockhausen A, Weinhage T, Nippe N, Belz M, Tsianakas A, Ross M, Bettenworth D, Spieker T, et al. (2014): Immune Suppression via Glucocorticoid-Stimulated Monocytes: A Novel Mechanism To Cope with Inflammation. J Immunol 193, 1090–1099

Varol C, Landsman L, Fogg DK, Greenshtein L, Gildor B, Margalit R, Kalchenko V, Geissmann F, Jung S (2007): Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. J Exp Med 204, 171–180

Varol C, Vallon-Eberhard A, Elinav E, Aychek T, Shapira Y, Luche H, Fehling HJ, Hardt WD, Shakhar G, Jung S (2009): Intestinal lamina propria Dendritic Cell subsets have different origin and functions. Immunity 31, 502–512

Villard-Mackintosh L, Vessey MP (1993): Oral contraceptives and reproductive factors in multiple sclerosis incidence. Contraception 47, 161–168

Vo AV, Takenaka E, Shibuya A, Shibuya K (2016): Expression of DNAM-1 (CD226) on inflammatory monocytes. Mol Immunol 69, 70–76

Vogel DYS, Vereyken EJ, Glim JE, Heijnen PD, Moeton M, van der Valk P, Amor S, Teunissen CE, van Horssen J, Dijkstra CD (2013): Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. J Neuroinflammation 10, 35

Vogel DYS, Heijnen PD, Breur M, de Vries HE, Tool AT, Amor S, Dijkstra CD (2014): Macrophages migrate in an activation-dependent manner to chemokines involved in neuroinflammation. J Neuroinflammation 11, 23

Vogel DYS, Kooij G, Heijnen PDAM, Breur M, Peferoen LAN, van der Valk P, de Vries HE, Amor S, Dijkstra CD (2015): GM-CSF promotes migration of human monocytes across the blood brain barrier: Molecular immunology. Eur J Immunol 45, 1808–1819

Vukusic S, Van Bockstael V, Gosselin S, Confavreux C (2007): Regional variations in the prevalence of multiple sclerosis in french farmers. J Neurol Neurosurg Psychiatry 78, 707–

709

Wallin MT, Culpepper WJ, Coffman P, Pulaski S, Maloni H, Mahan CM, Haselkorn JK, Kurtzke JF (2012): The Gulf War era multiple sclerosis cohort: age and incidence rates by race, sex and service. Brain 135, 1778–1785

Wang J, Harada A, Matsushita S, Matsumi S, Zhang Y, Shioda T, Nagai Y, Matsushima K (1998): IL-4 and a glucocorticoid up-regulate CXCR4 expression on human CD4+ T lymphocytes and enhance HIV-1 replication. J Leukoc Biol 64, 642–649

Warner HB, Carp RI (1981): Multiple Sclerosis and Epstein-Barr Virus. Lancet 318, 1290

Waschbisch A, Schröder S, Schraudner D, Sammet L, Weksler B, Melms A, Pfeifenbring S, Stadelmann C, Schwab S, Linker RA (2016): Pivotal role for CD16 $^{+}$ monocytes in immune surveillance of the Central Nervous System. J Immunol 196, 1558–1567

Weber C, Draude G, Weber KSC, Wübert J, Lorenz RL, Weber PC (1999): Downregulation by tumor necrosis factor-α of monocyte CCR2 expression and monocyte chemotactic protein-1-induced transendothelial migration is antagonized by oxidized low-density lipoprotein: A potential mechanism of monocyte retention in atherosclerotic lesions. Atherosclerosis 145, 115–123

Wegner C, Esiri MM, Chance SA, Palace J, Matthews PM (2006): Neocortical neuronal, synaptic, and glial loss in multiple sclerosis. Neurology 67, 960–967

Wekerle H (2017): B cells in multiple sclerosis. Autoimmunity 50, 57–60

Wiendl H, Hohlfeld R (2009): Multiple sclerosis therapeutics: Unexpected outcomes clouding undisputed successes. Neurology 72, 1008–1015

Wiggins-Dohlvik K, Merriman M, Shaji CA, Alluri H, Grimsley M, Davis ML, Smith RW, Tharakan B (2014): Tumor necrosis factor-α disruption of brain endothelial cell barrier is mediated through matrix metalloproteinase-9. Am J Surg 208, 954–960

Wingerchuk DM (2012): Smoking: effects on multiple sclerosis susceptibility and disease progression. Ther Adv Neurol Disord 5, 13–22

Wong KL, Yeap WH, Tai JJY, Ong SM, Dang TM, Wong SC (2012): The three human monocyte subsets: implications for health and disease. Immunol Res 53, 41–57

Wynn TA, Chawla A, Pollard JW (2013): Macrophage biology in development, homeostasis and disease. Nature 496, 445–455

Yamamura T, Miyake S: Diet, gut flora and Multiple Sclerosis: Current research and future perspectives. In: Yamamura T, Gran B (Hrsg.): Multiple Sclerosis Immunology. Springer, New York, NY 2013, 115–126

Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, Ohno N, Rietsch AM, Cialic R, Wu PM, Doykan CE, Lin J, Cotleur AC, et al. (2014): Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. J Exp Med 211, 1533–1549

Yeager MP, Pioli PA, Collins J, Barr F, Metzler S, Sites BD, Guyre PM (2016): Glucocorticoids enhance the in vivo migratory response of human monocytes. Brain Behav Immun 54, 86–94

Yona S, Gordon S (2015): From the Reticuloendothelial to Mononuclear Phagocyte System – The unaccounted years. Front Immunol 6, 328

Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, Strauss-Ayali D, Viukov S, Guilliams M, Misharin A, et al. (2013): Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. Immunity 38, 79–91

Yrlid U, Jenkins CD, MacPherson GG (2006): Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions. J Immunol 176, 4155–4162

Ziegler-Heitbrock L (2015): Blood Monocytes and Their Subsets: Established Features and Open Questions. Front Immunol 6, 423

Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJM, Liu Y-J, MacPherson G, Randolph GJ, et al. (2010): Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. Blood 116, 74–80

Zilber N, Kahana E (1996): Risk factors for multiple sclerosis: a case-control study in Israel. Acta Neurol Scand 94, 395–403