

Aus der Abteilung Neuroimmunologie  
(Prof. Alexander Flügel)  
des Instituts für Multiple-Sklerose-Forschung  
der Universitätsmedizin Göttingen

**Vergleichende Analyse der Wirksamkeit synthetischer Glukokortikoide  
sowie des Wirkmechanismus von Liposomen-verpackten Kortikosteroiden  
bei der Therapie der Experimentellen Autoimmunen Enzephalitis (EAE)  
unter Berücksichtigung systemischer Nebenwirkungen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Axel Haine

aus  
Bremen

Göttingen 2011

Dekan:

Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. A. Flügel

II. Berichterstatter/in:

\_\_\_\_\_

III. Berichterstatter/in:

\_\_\_\_\_

Tag der mündlichen Prüfung:

\_\_\_\_\_

## Erklärung

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

Göttingen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Axel Haine

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Multiple Sklerose: Klinik, Pathogenese und Therapie.....	1
1.2 EAE – Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis .....	6
1.2.1 MOG-Modell & BL/6-Maus.....	7
1.2.2 Relevanz der EAE für die klinische Einführung von Therapeutika.....	8
1.3 Glukokortikoide.....	9
1.3.1 Strukturelle Besonderheiten und deren Auswirkung.....	10
auf das Wirkungsprofil der GC	
1.3.2 Endogene Kontrolle der GC-Homöostase.....	12
1.3.3 Wirkmechanismus der GC.....	13
1.3.3.1 Genomische Wirkungen.....	13
1.3.3.2 Spezifische nicht-genomische Wirkungen.....	14
1.3.3.3 Unspezifische nicht-genomische Wirkungen.....	14
1.3.4 GC und Immunmodulation.....	15
1.3.5 Nebenwirkungen der GC.....	16
1.4 Liposomen.....	17
1.4.1 Verlängert zirkulierende Liposomen.....	18
1.4.2 Liposomale GC in der Therapie der EAE.....	20
1.5 Zielsetzung.....	22
<b>2. Material und Methoden</b> .....	24
2.1 Medien, Puffer und Lösungen.....	24
2.2 Geräte.....	25
2.3 Antikörper und Chemikalien.....	26
2.4 Tiere.....	27
2.5 Aktive Induktion der EAE und klinische Verlaufsbeurteilung.....	28
2.5.1 Therapie der EAE.....	29
2.5.2 Gewebeaufbereitung und Immunhistochemie.....	30
2.5.3 Histologische Auswertung.....	32
2.6 Nebenwirkungen der Glukokortikoidtherapie.....	33
2.6.1 T-Zell-Depletion der Milz.....	33
2.6.1.1 Herstellen von Einzelzellsuspensionen der Milz.....	33
2.6.1.2 Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung (FACS).....	34
2.6.2 Blutzuckerspiegel.....	34
2.6.2.1 Blutzuckermessung.....	34
2.6.2.2 Datenerhebung.....	35
2.6.3 Leberenzymexpression.....	35
2.6.3.1 Gewinnung von Lebergewebe.....	35
2.6.3.2 Isolation von tRNA-Trizol-Methode .....	35
2.6.3.3 Reverse Transkription.....	36
2.6.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	37
2.6.4 Insulinkonzentraion.....	38
2.6.4.1 Serumgewinnung.....	38
2.7 Genotypisierung von GRN <sup>+/-</sup> - und LckCre/GR <sup>flox</sup> -Mäusen.....	38
2.7.1 Gewinnen von DNA.....	38
2.7.2 Amplifikation von DNA.....	39
2.8 Liposomen.....	40

---

2.9 Statistik.....	41
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>42</b>
3.1 Vergleich der Wirkung unterschiedlicher synthetischer GC auf den Krankheitsverlauf der MOG-EAE in BL/6-Mäusen.....	42
3.2 Therapeutische Wirkung der Liposomen.....	44
3.2.1 Vergleich von PLP mit DEX und PRED in der Therapie der EAE.....	45
3.2.2 Vergleich von verschiedenen GC verpackt in Liposomen .....	46
3.3 Histologische Untersuchungen zur GC-Wirkung auf Zellinfiltration und Axonschaden im Rückenmark .....	48
3.4 Analyse des Wirkmechanismus der Liposomen an GRN <sup>+/-</sup> -Tieren.....	52
3.5 Analyse des Wirkmechanismus der Liposomen an GR <sup>lckCre</sup> -Tieren.....	55
3.6 Nebenwirkungen.....	57
3.6.1 Periphere Depletion der T-Zellen.....	57
3.6.2 Leberenzymexpression.....	59
3.6.3 Blutzuckerspiegel.....	60
3.6.4 Insulinkonzentration.....	61
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>63</b>
4.1 Therapeutische Wirksamkeit der Glukokortikoide im Mausmodell der MOG-EAE ist abhängig von der Wahl des GC.....	63
4.1.1 Rolle der Struktur von GC für deren Wirkungsstärke .....	64
4.1.2 DEX als Alternative zu MPRED in der Therapie des akuten Schubes bei MS .....	65
4.2 Liposomales Prednisolon in der Therapie der MOG-EAE.....	66
4.2.1. Die Therapie der EAE mit PLP führt zu keiner signifikanten Reduktion der Zellinfiltrate in der frühen Entzündungsreaktion.....	67
4.2.2 Wirkungsmechanismus der Liposomen.....	69
4.2.2.1 Therapieschema, Dosis und Konzentration der GC beeinflusst zelluläres Milieu und dadurch GC-Wirkungen auf Makrophagen... 70	
4.2.2.2 PLP-Wirkungen auf T-Zellen .....	72
4.2.2.3 Ausblick Liposomen und GC-Therapie in Zukunft.....	74
4.3 Metabolische Nebenwirkungen werden durch PLP nicht reduziert.....	75
4.3.1 Insulin und Blutzucker.....	77
4.3.2 Leberenzyme.....	78
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>79</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>80</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

ACTH	Adreno-Kortikotropes Hormon
Ak	Antikörper
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Bovines Serumalbumin
BZ	Blutzuckerwert
CFA	Komplettes Freundesches Adjuvant
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
DA	Dark Agouti
DEX	Dexamethason
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
GC	Glukokortikoid
GR	Glukokortikoidrezeptor (im Zytosol)
GRE	Glukokortikoid-empfindlicher Bereich
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
MBP	Myelin-basisches Protein
mGR	membranspezifischer Glukokortikoidrezeptor
MOG	Myelinoligodendrozytenglykoprotein
MPLP	Methylprednisolon-Liposomen
MPRED	Methylprednisolon
MPS	Mononukleäres Phagozytose-System
MS	Multiple Sklerose
NW	Nebenwirkungen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Poly-Ethylen-Glykol
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Prednisolon-Liposomen
PRED	Prednisolon
RA	Rheumatoide Arthritis
RM	Rückenmark
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
TRIAM	Triamcinolon
ZNS	Zentrales Nervensystem



## 1. Einleitung

### 1.1 Multiple Sklerose: Klinik, Pathogenese und Therapie

Die Multiple Sklerose (MS) ist bekannt als die häufigste Autoimmunkrankheit des Zentralen Nervensystems (ZNS) in der westlichen Welt. Sie gehört zu einer größeren Gruppe entzündlich demyelinisierender Erkrankungen (Adams und Kubik 1952). Jean Marie Charcot erwähnte 1868 erstmals das Krankheitsbild, dessen histologische Morphologie er als „sclérose en plaques disseminées“ beschrieb (Charcot 1868). Ferner bemerkte Charcot eine perivaskuläre Ansammlung von Entzündungszellen im ZNS als histopathologisches Korrelat (Hafler 2004). Bei den Erkrankten stellte Charcot eine periodisch auftretende Symptomatik geprägt von typischen zentralnervösen Dysfunktionen fest.

Klinisch tritt die MS gehäuft bei jungen Erwachsenen im Alter von 20 bis 40 Jahren in unterschiedlichen Ausprägungen auf, die in drei Grundtypen unterteilt werden:

- 1) Schubförmig-remittierende MS
- 2) Primär chronisch-progrediente MS
- 3) Sekundär chronisch-progrediente MS.

Erste Symptome der MS können Sehstörungen und Schwindel sein, die sich später meist in Form von Lähmungserscheinungen einhergehend mit Gangataxien etablieren.

Die häufigste Form der MS (85-90%) ist die des einmalig bzw. in den anschließenden Jahren wiederholt auftretenden Schubes. Die sekundär chronisch-progrediente Form der MS tritt im weiteren Verlauf ein und ist durch eine stetige Zunahme der Behinderung ohne Schübe gekennzeichnet.

Demgegenüber manifestiert sich die primär chronisch-progrediente Form bei nur 10-15% aller MS-Patienten (Confavreux et al. 2000). Sie macht sich klinisch durch einen ununterbrochenen Prozess mit stetiger Zunahme der Symptomatik bemerkbar.

Frauen sind doppelt so häufig wie Männer von MS betroffen. Schwangere Patientinnen hingegen sind während ihrer Schwangerschaft einem geringeren Risiko ausgesetzt, einen neuen Schub zu erleiden (Runmarker und Andersen 1995).

Aus histopathologischer Sicht sind bevorzugt in der weißen Substanz die charakteristischen sklerotisch veränderten Herde multipel lokalisiert. Sie werden nach vier unterschiedlichen Erscheinungsbildern (I - IV) definiert (Brück et al. 2002), die sich jeweils entsprechenden Patientengruppen zuordnen lassen. Das histopathologische Erscheinungsbild korreliert dabei nicht zwingend mit der klinischen Symptomatik.

- I) Perivaskuläre und parenchymale Ansammlung von Makrophagen, T-Zellen und Mikroglia, sowie nachweislich proinflammatorische Zytokine und Radikale mit Demyelinisierung und Axonschaden.
- II) Wie I) mit zusätzlich vermehrter Beteiligung von B-Zellen sowie Ablagerungen von Komplementkomplexen und Immunglobulinen.
- III) Läsionen sind geprägt von geschädigten Oligodendrozyten. Selektiver Verlust des myelinassoziierten Glykoproteins. Eine gefäßentzündliche Komponente wird angenommen.
- IV) Diese Form tritt bevorzugt in primär chronisch-progredienter MS auf, definiert durch unabhängig von einer Apoptose entstandene Oligodendrozytenschäden, mit konsekutiver Demyelinisierung.

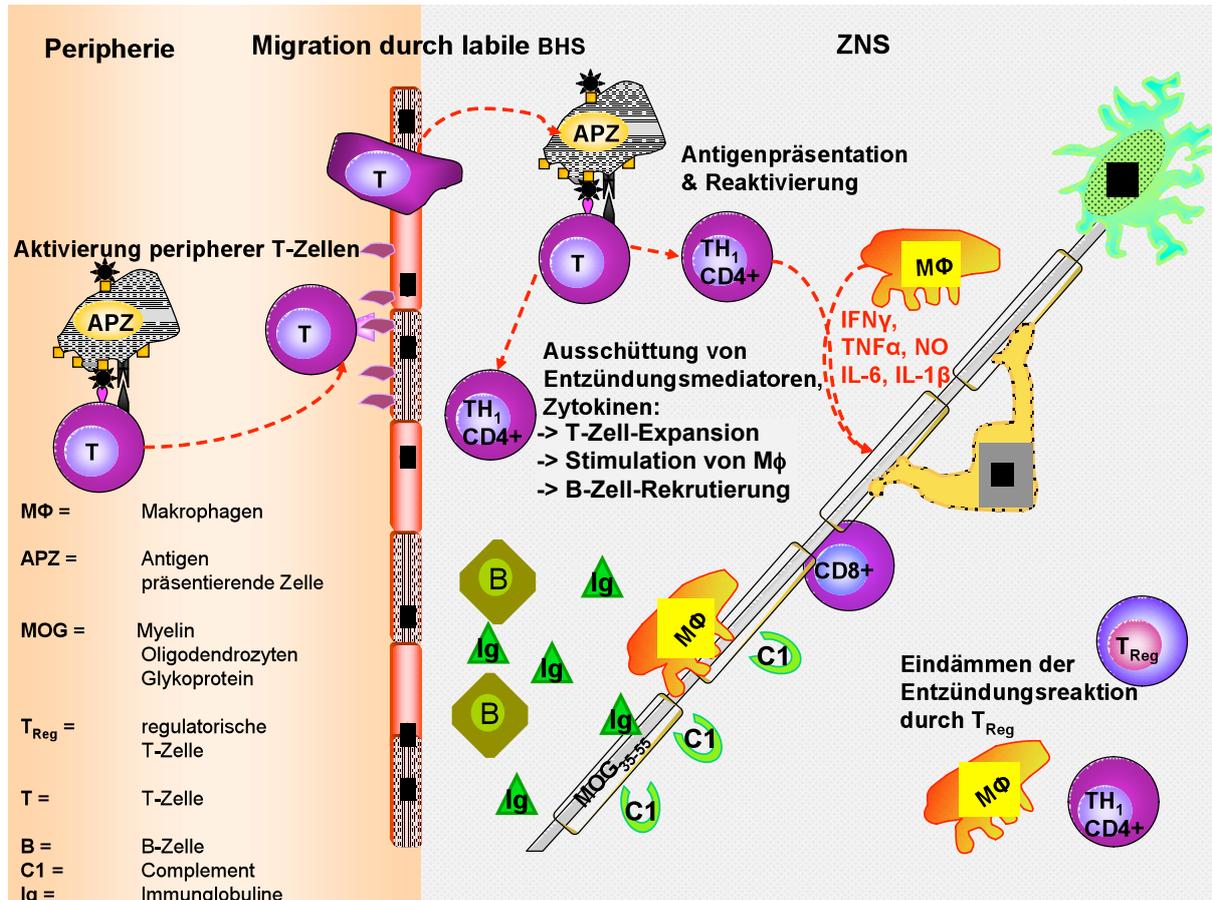
Einen gemeinsamen Pathomechanismus, der die klinisch zu beobachtende Heterogenität der Krankheit erklärt, gibt es nicht. Die Genetik des Einzelnen bestimmt in eingeschränktem Maße das relative Risiko für die Empfänglichkeit von MS. Bereits 1972 wurde der Zusammenhang zwischen MS und der genetischen Sequenz in der Region des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) erkannt. Dieser ist zur Bindung von Peptiden und deren Präsentation an Zellen des Immunsystems nötig. Für gewisse Bestandteile des Immunsystems konnten genetische Prädispositionen nachgewiesen werden, die eine Entstehung von MS beeinflussen können. Eine häufig vorkommende Gensequenz bei Patienten wurde u.a. für ein Allel des humanen Leukozyten Antigens (HLA), das HLA-DRB1<sup>1501</sup> auf Chromosom 6p21 beobachtet (Hafler et al. 2007). Für bestimmte Varianten der codierenden Sequenzen für die  $\alpha$ -Untereinheit des IL-2-Rezeptors (CD25) auf Chromosom 10p15 und für die  $\alpha$ -Untereinheit des IL-7-Rezeptors auf Chromosom 5p13 konnte eine Assoziation mit MS-Patienten nachgewiesen werden, so dass diese als Risikofaktoren bezeichnet werden (Gregory et al. 2007; Hafler et al. 2007; Lundmark et al. 2007,). CD25 übernimmt eine bedeutsame Rolle in der Kontrolle der T-Zell-gesteuerten Immunantworten, er wird beispielhaft auch im Rahmen der Pathogenese einer weiteren autoimmunen Erkrankung, wie Diabetes mellitus Typ I, erwähnt. Der IL-7-Rezeptor ist auch für die Homöostase der Gedächtnis-T-Zellen wichtig. Große Populationsstudien an MS-Patienten unter Zwillingen (Hafler et al. 2005) sowie molekulargenetische Studien zu Nukleotidpolymorphismen stellten dazu genetische Risikoprofile mit hoher Korrelation unter MS-Patienten fest. Die Bedeutsamkeit des genetischen Hintergrundes wird durch die Inzidenz der MS von 30% unter monozygotischen Zwillingen gegenüber der Inzidenz von 0,1% in der durchschnittlichen Bevölkerung Nordeuropas deutlich (Peltonen 2007).

Bemühungen, die Ätiologie der MS mit der Idee eines auslösenden infektiösen Agens zu erklären, scheiterten bisher mangels direkten Nachweises eines mit der Genese in engem Zusammenhang stehenden Virus einerseits und mangels indirekten Nachweises möglicher Virus-spezifischer Antikörper andererseits (Sospedra und Martin 2005). Dennoch stellen virale oder bakterielle Infektionen mögliche Faktoren dar, welche über den Mechanismus des „Molecular Mimicry“, den Ausbruch der MS begünstigen können. Dabei können körperfremde mikrobielle Antigene mit dem Rezeptor peripherer T-Zellen kreuzreagieren, der auch Peptide des Myelin basischen Proteins (MBP) oder anderer Myelinproteine erkennt. Entscheidend bei dieser Kreuzreaktivität ist, dass der T-Zellrezeptor eine geringere Affinität zu fremden Peptiden hat als zu den potenziell autoantigenen Peptiden des MBP, wodurch die Pathogenese der MS bedingt durch individuelle Infektionen erklärt werden kann (Harkiolaki et al. 2009). Ebenso ist ein anderer Mechanismus, bekannt als „Bystander Activation“, in der Lage eine Autoimmunreaktion auszulösen, wie an Tiermodellen untersucht wurde (Sospedra und Martin 2005). Autoreaktive T-Zellen werden entweder rezeptorunabhängig durch Zytokine oder Superantigene aktiviert. Alternativ führt eine Präsentation potentiell infektiöser Antigene an T-Zellrezeptoren nach deren Bindung zu einer Aktivierung der Immunzellen mit der Folge, dass die Entzündungsreaktion in eine Autoimmunreaktion übergehen kann.

In der Literatur werden ferner Umweltfaktoren, wie etwa die UV-Exposition (Hayes 2000) erwähnt, um die regional unterschiedliche Rate an Neuerkrankungen, zu erklären. Bezüglich des Prävalenzrisikos besteht ein signifikantes Nord-Süd-Gefälle in der nördlichen Hemisphäre mit einer geringen Inzidenz für Bevölkerungen in der Nähe des Äquators lebend, die einer vergleichsweise hohen UV-Strahlung ausgesetzt sind. Abhängig vom Alter kann nach Emigration in eine andere Region das lokal vorliegende geringere Prävalenzrisiko erworben werden, sofern diese Emigration vor dem 15. Lebensjahr geschieht. Bei einer Emigration nach dem 15. Lebensjahr bleibt das Risiko an MS zu erkranken unverändert gegenüber dem lokal zuvor bestehenden Risiko (Kurtzke 2005). Die verstärkten Maßnahmen in Industrieländern zur Einhaltung der Hygiene mit konsekutiv verminderter Keimexposition von Geburt an werden ebenso wie ein Zusammenhang mit dem Auftreten von Allergien und weiteren Autoimmunkrankheiten als ein weiterer Umweltfaktor diskutiert.

Die Diagnostik an MS-Patienten selbst hat wichtige Erkenntnisse über die Pathologie der MS ergeben. Nach wie vor steht das Immunsystem im Mittelpunkt der Forschung über die Pathogenese der MS. Bereits im Jahre 1868 wies Charcot histologisch Immunzellen, wie T-Zellen und Makrophagen, in pathologischen Korrelaten wie sklerösen Plaques nach (Charcot et al. 1868). Dieser Nachweis dient noch heute für die histopathologische Einteilung in Typ I und Typ II nach Brück (Brück et al. 2002). Neben den typischen Entzündungszellen

im Gewebe findet man oligoklonale Banden im Liquor von MS-Patienten. Die nachweislich verstärkte intrathekale Immunglobulinsynthese dient als erster laborchemischer Hinweis auf eine stattgefundene Entzündungsreaktion, was ein Kennzeichen für MS ist. Die verantwortlichen Mechanismen für die Initiierung und Aufrechterhaltung dieser Entzündungsreaktion sowie das Zusammenspiel der zahlreichen Akteure des zellulären und humoralen Immunsystems sind in vielen Details noch ungeklärt. Einen Überblick über die entscheidenden Schritte und die Rolle der relevanten Immunzellen im Rahmen des Entzündungsprozesses im ZNS ist in Abb.1 dargestellt:



**Abb.1 Pathogenese der MS:** Aktivierte T-Zellen (TH<sub>1</sub> und TH<sub>17</sub>) aus der Peripherie dringen durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) in das ZNS ein. Dort werden ihnen Autoantigene präsentiert, woraufhin unter Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine eine zelluläre Reaktivierung stattfindet. Im Rahmen der Entzündungsreaktion kommt es mit Hilfe der „Bystander Activation“ zu einer Rekrutierung weiterer lokaler Immunzellen mit Immunglobulinsynthese. Periphere Leukozyten, wie B-Zellen, Makrophagen, CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und T<sub>Reg</sub>-Zellen ergänzen das Zellinfiltrat. In dessen Folge kommt es zu demyelinisierenden Axonschäden, die das klinische Bild mit Lähmungserscheinungen prägen.

Anhand des Tiermodells der MS, der Experimentellen Autoimmunen Enzephalitis (EAE), konnten weitere Erkenntnisse gewonnen werden, die erheblich dazu beigetragen haben, das

komplexe Bild der Pathogenese zu ergänzen. Gleichzeitig wurde durch die Tierexperimente die Hypothese einer autoimmunen Genese der MS gestützt (siehe dazu Punkt 2).

Auch wird versucht aus den in tierpraktischen Versuchen gewonnenen Erkenntnissen eine Therapie für MS abzuleiten. Hierbei soll eine Milderung der Symptomatik akuter Schübe mit immunsupprimierenden und immunmodulatorischen Effekten auf das Immunsystem erreicht werden (Pender und Wolfe 2002).

Mit Natalizumab, einem monoklonalen Antikörper, liegt ein Medikament vor, das die Auswanderung der Immunzellen aus den Blutgefäßen in das ZNS vermindert. Das wird durch Blockade des für die Bindung auf Endothelzellen benötigten alpha-4-beta-1-Integrins auf T-Zellen erreicht (Yednock et al. 1992). Das marktreife Natalizumab wird bei der schubförmig remittierenden Form mit hoher Krankheitsaktivität trotz  $\beta$ -Interferon-Therapie eingesetzt. Eine Immunmodulation findet auch bei Anwendung des Polypeptids Glatiramer-Acetat (GA) statt (Johnson et al. 1998; Filippi et al. 2001). GA ist ein Copolymer basierend auf vier Aminosäuren, wie sie auch im MBP von Myelinscheiden vorkommen und das mit dem MHC-Molekül interagiert. Dabei konkurriert GA um die MHC-Bindung von MBP und induziert so eine Immunantwort von zuvor dominierenden TH1-Zellen hin zu TH2-Zellen mit konsekutiver Sekretion antiinflammatorischer Zytokine (Schrempf und Ziemssen 2007; Duda et al. 2000).

Bei akut auftretenden Schüben der MS ist eine immunsuppressive i.v. hoch dosierte Gabe von Methylprednisolon (MPRED) Therapie der Wahl. Hierbei steht das schnellere Abklingen der Schubsymptomatik im Focus der Therapieziele. Dadurch wird der Fortschritt von z.B. Lähmungserscheinungen vermindert. Als ein weiterer Ansatz wird neuerdings eine neuroprotektive Therapie beschrritten. Dieser stützt sich auf Erkenntnisse aus Experimenten, bei denen eine klinische Verwendung neuroprotektiver Substanzen, wie neurotrophischer Faktoren, Hoffnung für einen neuen Therapieansatz ergeben haben (Mirowska-Guzel D 2009; Aharoni und Arnon 2009).

Die Erfolge einer Studie zur MS-Therapie aus dem Jahr 1987 von Milligan und Compston bestimmen noch heute das Schema der Behandlung akuter Schübe mit intravenöser Gabe von hoch dosiertem MPRED (Milligan et al. 1987). Inzwischen ist sogar eine noch höher dosierte Gabe von bis zu 2g/Tag MPRED bei therapierefraktären Patienten indiziert (Oliveri et al. 1998), wenn die Symptomatik von deren akutem Schub eine Diagnose nach den von McDonald im Jahr 2001 aufgestellten Kriterien zulässt (McDonald et al. 2001).

Die Verwendung von Glukokortikoiden allgemein wird jedoch durch ihre Nebenwirkungen (NW) begrenzt, da die Einhaltung der sog. „Cushing Schwelle“ nur eine limitierte Dosisapplikation erlaubt.

Therapeutika für die Behandlung akuter Schübe fehlen bislang, alternative GC wurden bisher für keine vergleichende Analyse in der Therapie der MS herangezogen. Die in Liposomen transportierten GC, deren Wirksamkeit im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht wird, könnten jedoch eine therapeutische Alternative zu den konventionell applizierten GC sein.

## **1.2 EAE – Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis**

Die EAE beruht auf Beobachtungen von Lähmungserscheinungen, die anfänglich im Rahmen einer Tollwutimpfung an Rhesus-Affen gemacht wurden (Rivers et al. 1933). Dabei diente die EAE ursprünglich zum Verständnis der akuten disseminierten Enzephalomyelitis und nicht der MS (Steinman und Zamvil 2006). Bereits zuvor beobachtete man Entzündungen im ZNS von Kaninchen, denen menschliches Gewebe aus dem Rückenmark injiziert worden war (Koritschoner und Schweinburg 1925). Zunächst wurden akut eintretende Lähmungserscheinungen analysiert und erst später folgten Modelle der EAE, die einen chronischen oder schubförmigen Verlauf, wie er auch bei der MS beobachtet werden kann, widerspiegeln. Im Zuge der durchgeführten Versuche häuften sich Hinweise, dass es sich um eine autoimmune Entzündungsreaktion gegen körpereigene Bestandteile im ZNS handeln könnte. Nach mehr als 70 Jahren Forschung diente die EAE seit diesen neu gewonnenen Erkenntnissen nicht mehr nur der Erforschung von Pathogenese und Therapiemöglichkeiten der MS, sondern dem Verständnis der Immunologie insgesamt. Die EAE hat sich dadurch zu einem weltweit etablierten Tiermodell entwickelt (Gold et al. 2006).

Die EAE reflektiert wichtige Charakteristika der MS, wobei als histopathologische Merkmale Demyelinisierung, Axonschaden und nachweisbare Antikörper (Ak) zu nennen sind (Gold et al. 2000). Für deren Analyse sind mehrere Tierstämme sowie diverse Autoantigene zu untersuchen, da es nicht möglich ist, alle Aspekte der Klinik sowie der Histopathologie anhand eines einzigen Tiermodells zu analysieren (Steinman und Zamvil 2006). Ähnliches gilt auch für die Beobachtungen an Menschen, da sich deren pathologisches Korrelat ebenso wie deren klinische Symptomatik interindividuell unterscheidet. Da jedoch nur sehr eingeschränkt Material für histologische Analysen von MS-Patienten zur Verfügung steht, greift man auf die EAE zurück.

Die aktive Immunisierung zur Induktion der EAE gelingt heute mittels Injektion diverser Antigene, die als Strukturproteine die Myelinscheide mitbilden (Swanborg 2001). Diese sind u.a. das Proteolipidprotein, MBP und das auch im Rahmen dieser Arbeit verwendete Myelinoligodendrozyten-Glykoprotein (MOG). Sie werden jeweils in CFA, als immunologisches Adjuvans, zu einer Emulsion vermischt und injiziert.

Demgegenüber steht die passiv induzierte EAE mit der Methode des Transfers enzephalitogener T-Zellen aus Spendertieren (Ben Nun et al. 1981). Diese führte Paterson

bereits 1960 an Ratten durch, denen er Lymphozyten EAE-erkrankter Tiere injizierte, woraufhin die EAE übertragbar wurde (Paterson 1960). Ein Krankheitsausbruch ist in jedem Fall nur nach vorausgegangener T-Zell-Aktivierung gegen Autoantigene durch sog. enzephalitogene T-Zellen möglich. Der Transfer antigenspezifischer Ak allein ist nicht fähig, eine EAE auszulösen. Dies unterstreicht die Notwendigkeit enzephalitogener T-Zellen für die Generierung der EAE. Jedoch tritt in einigen Tiermodellen, wie der DA-Ratte und der Lewis-Ratte, eine starke Demyelinisierung erst nach Zugabe MOG-spezifischer Ak ein.

Das Verständnis für die pathologischen Prozesse hängt stark von den ausgewählten Tiermodellen ab (Steinman 1999), von denen das hier verwendete Modell im Folgenden beschrieben wird.

### **1.2.1 MOG-Modell & BL/6-Maus**

Die anhand von Tiermodellen gemachten Beobachtungen chronischer und schubförmiger Verläufe der EAE sowie die Erkenntnisse zu den bereits genannten histopathologischen Merkmalen weisen ebenso wie die bei Mäusen untersuchte EAE viele Parallelen zu der beim Menschen beobachteten MS auf.

Anhand des Tiermodells im Rahmen dieser Arbeit wird ausschließlich eine experimentelle Form, die chronische EAE mit Auftreten eines einmaligen Krankheitsschubes, untersucht, deren Pathologie dem Typ I nach Lassmann und Brück entspricht (Brück et al. 2002). MOG ist das krankheitsauslösende Autoantigen und befindet sich auf der Oberfläche des Myelins, wodurch es für Rezeptoren der T-Zellen sowie für Antikörper und Komplementfaktoren bindungsfähig ist. Es hat eine Größe von 218 Aminosäuren und trägt mit einem Anteil von nur 0,01-0,5% sehr wenig zur gesamten Proteinmenge des Myelin im ZNS bei (Bernard et al. 1997). Seit Entdeckung einiger Besonderheiten ist es als Schlüsselautoantigen für die EAE identifiziert worden (Lebar et al. 1986; Swanborg 2001). MOG ist das einzige Antigen, das eine Demyelinisierung sowohl durch eine von B-Zellen als auch von T-Zellen gesteuerte Immunantwort hervorruft (Hafler et al. 2005). Appliziert man MOG-spezifische Ak in T-Zell vermittelte EAE-Modelle, so tritt Demyelinisierung infolgedessen ein (Schluesener et al. 1987) und der klinische Verlauf verschlechtert sich.

Heute wird meist auf die Verwendung einer speziellen Aminosäuresequenz des Peptids '35-'55 (MOG<sub>35-55</sub>) zurückgegriffen, welches in der EAE mit der C57BL/6-Maus am besten untersucht ist (Mendel et al. 1995). Binden bestimmte Aminosäuresequenzen am HLA-Komplex der T-Zellen, werden diese aktiviert und schütten konsekutiv proinflammatorische Zytokine aus (Iglesias et al. 2001). Die Höhe der aktivierten myelin-spezifischen T-Zellzahlen ist von der Applikation ganz bestimmter Aminosäuresequenzen des MOG abhängig.

### 1.2.2 Relevanz der EAE für die klinische Einführung von Therapeutika

Bei der EAE handelt es sich um eine induzierbare Erkrankung, deren klinischer Verlauf von wenigen Tagen bis zu mehreren Wochen am Tiermodell studiert wird.

Im Gegensatz dazu ist die MS eine spontan auftretende Erkrankung, deren Erkrankungsprozess über Jahre hinweg anhält und sich in verschiedenen Formen manifestieren kann (siehe dazu Punkt 1). Dieser von vornherein gegebene, gravierende Unterschied im Krankheitsverlauf der EAE bzw. MS bedingt eine Einschränkung darin, die aus EAE-Experimenten gewonnenen Erkenntnisse für die MS geltend zu machen. Dies trifft insbesondere für therapieorientierte experimentell durchgeführte Ansätze zu, wie sie auch im Rahmen dieser Arbeit stattgefunden haben. Im Vergleich zu dem deutlichen Wissenszuwachs allein aufgrund der Ergebnisse von EAE-Experimenten ist der Zugewinn wegweisender Erkenntnisse für die Ätiologie, Pathologie, Diagnostik, Klinik und Therapie der MS deutlich reduziert. Trotz zusätzlicher bildgebender Verfahren des Materialgewinns aus Liquorpunktionen, Biopsien oder Autopsien des ZNS sowie laborchemischer Verfahren und klinischer Studien mit MS-Patienten kommt der Erkenntnisprozess für ein komplettes Verständnis dieser Erkrankung nur eingeschränkt voran. Die Durchführung von EAE-Experimenten bleibt daher weiterhin ein wichtiger Bestandteil für die klinische Zulassung von Medikamenten zur Therapie der MS.

Drei Medikamente, GA, Mitoxantrone und Natalizumab, erhielten eine Zulassung zur klinischen Verwendung für die Therapie der MS, nachdem sie zuvor ihre Wirksamkeit erfolgreich in EAE-Modellen bewiesen hatten. Die Entwicklung von GA und Natalizumab basiert allein auf EAE-Experimenten, wodurch entscheidende Pathomechanismen der MS erkannt und nachfolgend respektiert wurden. Demgegenüber ist Mitoxantrone ein Zytostatikum, dessen Erfolge in der Behandlung der EAE erst studiert wurden, nachdem Azathioprin, ein weiterer Vertreter der zytotoxischen Therapeutika für maligne Tumore, erfolgreich bei MS angewendet wurde (Ellison und Myers 1978).

Der EAE kommt bei der Erprobung neuer Medikamente für deren therapeutische Wirksamkeit bei MS dennoch nur ein geringer Prognosewert zu. Als Beispiel hierfür kann eine Therapie mit Peptidliganden genannt werden, deren Struktur einer löslichen Variante MBP-spezifischer Epitope entspricht, wodurch die Liganden im Antagonismus mit MBP für das Binden an T-Zellrezeptoren stehen. Deren Verwendung in präklinischen EAE-Experimenten führte zu verminderten Schubraten und rückläufigen Lähmungserscheinungen (Gaur et al. 1997). Trotz dieser viel versprechenden Effekte in der EAE traten hypersensitive, allergieartige Reaktionen erst während Therapieversuchen bei MS auf. Auch am Beispiel der Blockade bestimmter Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) wird deutlich, dass das EAE-Modell nicht ausreicht, einen Erfolg oder Misserfolg für diese Therapiestrategie bei MS-Patienten vorauszusagen. Heute weiß man von den ambivalenten Wirkungen, die TNF- $\alpha$

hervorrufen kann, weshalb auch hierfür keine Empfehlung zur Therapie von MS ausgesprochen wird.

Des Weiteren werden adverse Therapieeffekte erst im Rahmen klinischer Studien an MS-Patienten erkannt, was des Öfteren zum Abbruch der Studien geführt hat. Im Rückblick musste trotz Erreichens einer verminderten Schubfrequenz bei der klinischen Anwendung auf schwerwiegende NW manch einer etablierten Therapie hingewiesen werden. Diesbezüglich fiel Mitoxantrone bereits bei der Tumortherapie durch eine starke Kardiotoxizität negativ auf, was die im Verlauf eines Menschenlebens maximal applizierbare Dosis je nach Körperoberfläche individuell limitiert. Nach aktuellem Kenntnisstand kann Mitoxantrone bei der MS-Therapie mit einer erhöhten Inzidenz von Leukämien einhergehen (Pielen et al. 2008). Auch für Natalizumab wurde inzwischen das Spektrum möglicher NW im Zusammenhang mit dessen Applikation wegen beschriebener Fälle über das Auftreten von Progressiv Multifokaler Leukenzephalopathie erweitert (Hartung et al. 2009).

Künftige Untersuchungen umfassen auch synergistische Effekte verschiedener Therapeutika, um Therapiestrategien mit größerer Potenz in der Therapie der MS auszuloten, wodurch adverse Effekte minimiert oder gar vermieden werden sollen.

Die EAE stellt sowohl eine wichtige Säule zur Aufklärung des Pathomechanismus als auch zur Entwicklung wirkungsvoller Therapeutika dar.

### **1.3 Glukokortikoide**

Glukokortikoide (GC) sind physiologisch im Menschen vorkommende Hormone, deren Grundgerüst das Cholesterol bildet. Hieraus entsteht nach enzymatischer Einwirkung das Progesteron als biogenetisches Edukt für Nebennierenrindenhormone sowie Sexualhormone und Glukokortikoide. Letztere werden aufgrund ihrer Wirkungen auf den Glukosestoffwechsel als solche benannt. Funktion und Aufgaben der glukokortikoiden Hormone hängen direkt mit deren sterischer Konfiguration zusammen, was als eine Struktur-Wirkungs-Beziehung zu verstehen ist.

In den 1960er fanden die ersten Untersuchungen der GC-Wirkungen bei MS anhand von Tiermodellen statt. Damals verglich man in der EAE bei Ratten den Therapieerfolg durch Hydrocortison, zahlreiche synthetische GCs und nicht-steroidale Pharmaka untereinander (Komarek und Dietrich 1971). Seit langem sind GC in der Therapie autoimmun-entzündlicher Erkrankungen etabliert, am Beispiel der MS hat sich i.v. hoch dosiertes Methylprednisolon zur Behandlung eines akuten Schubes bewährt (Milligan et al. 1987). Triamcinolon (TRIAM) ist in der Langzeitbehandlung der progressiv verlaufenden MS mittels wiederholter intrathekaler Gaben indiziert. (Jonas et al. 2005). Des Weiteren sind GC in akuten Entzündungsreaktionen diverser Krankheiten, wie bei isolierter Optikusneuritis oder bei Exazerbation von M. Crohn und RA, indiziert, wo Prednisolon (PRED) hoch dosiert vergeben

wird (Hart et al. 1955; Thiele et al. 2005). Dexamethason (DEX) lindert die Symptomatik eines akuten Anfalls des entzündlichen Asthma bronchiale (Fiel und Vincken 2006) und wird notfallmäßig bei der inhalativen Intoxikation bevorzugt verwendet.

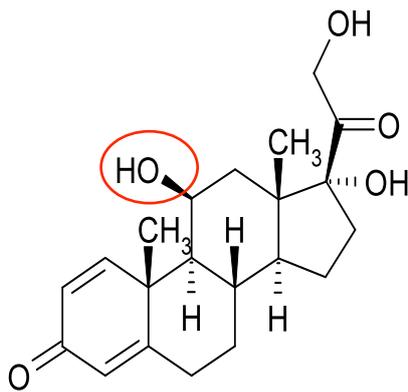
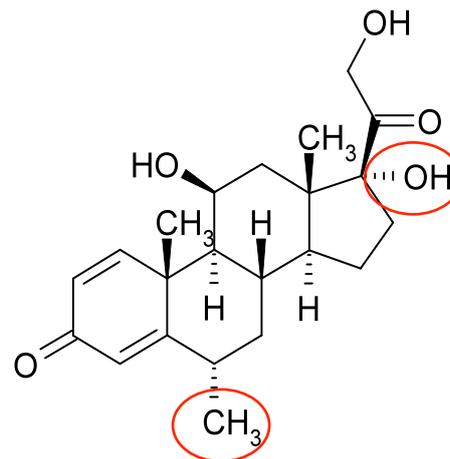
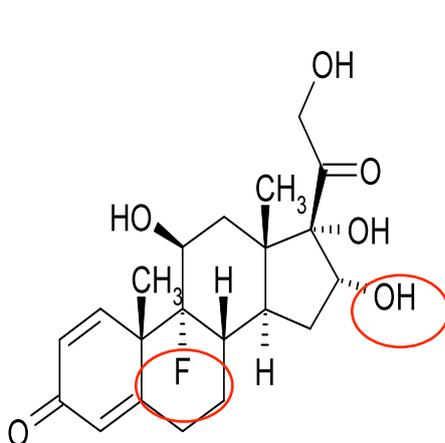
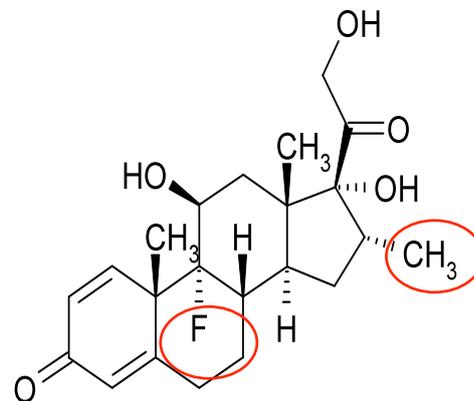
Vergleichende Studien zu einer Therapie des akuten Schubes der MS mit alternativen GC, die eine superiore Wirksamkeit eines spezifischen GC gegenüber anderer GC hervorheben, liegen nicht vor. Hingegen hat man in Tierversuchen der EAE, sowohl einen präventiven, als auch einen therapeutischen Ansatz in der Therapie der EAE mit der Gabe von DEX verfolgt und jeweils eine Milderung des Krankheitsprozesses erreicht. Initiale Versuche ergaben zudem eine überlegene Wirksamkeit des hoch dosiert applizierten DEX gegenüber MPRED (Wüst 2007, Lühder 2007).

Ausgehend von diesen ersten Ergebnissen zur unterschiedlichen Wirksamkeit von GC in der EAE wird deshalb eine systematische Untersuchung diverser GC wie DEX, PRED, TRIAM und MPRED mit therapeutischem Ansatz am Tiermodell für MS vorgenommen.

### **1.3.1 Strukturelle Besonderheiten und deren Auswirkung auf das Wirkungsprofil der GC**

Die verwendeten GC unterscheiden sich alle im Hinblick auf zusätzliche funktional relevante Molekülgruppen, welche die glukokortikoiden Eigenschaften in Pharmakokinetik und Potenz beeinflussen. Dies ist bei der Betrachtung glukokortikoider, mineralokortikoider und antiphlogistischer Wirkungen zu berücksichtigen.

Wesentlich von Bedeutung für eine forcierte antiphlogistische Wirkung sind Substitutionen durch funktional relevante Gruppen. Zu ihnen zählt eine Methyl-Gruppe wie bei MPRED, ein Fluor-Atom wie bei DEX und TRIAM sowie die OH-Gruppen an C-Atom 11 bzw. C-Atom 17, die für glukokortikoide Wirkungen verantwortlich gemacht und bei denen mineralokortikoide Wirkungen vollständig aufgehoben werden.

**Prednisolon****Methylprednisolon****Triamcinolon****Dexamethason**

**Abb.2: Strukturformeln von Prednisolon (oben links), Methylprednisolon (oben rechts), Triamcinolon (unten links) und Dexamethason (unten rechts).** Fluoratom in Position 9 $\alpha$  von Dexamethason und Triamcinolon, Methyl- bzw. Hydroxylgruppe in Position C 17 bzw. C 11. Die markierten Molekülgruppen entscheiden über eine unterschiedliche Potenz bzgl. Rezeptoraffinität, antiphlogistische bzw. mineralokortikoide Wirkungen, sowie auch über pharmakokinetische Eigenschaften.

GC können Wirkungen sowohl über genomische, als auch über nicht-genomische Wege hervorrufen (siehe Details dazu unter 1.3.3 ab Seite 13). Ferner wird für sog. „unspezifische nicht-genomische“ und „genomische“ Effekte eine unterschiedliche relative Wirkstoffpotenz der jeweiligen GC angegeben (Buttgereit et al. 1999). Dort wird für DEX im Vergleich zu

MPRED eine 5fach höhere Potenz der genomischen Effekte und eine um 20% gesteigerte Potenz nicht-genomischer Effekte festgestellt, wobei diesbezüglich Auswirkungen auf die Zellatmung in Thymozyten untersucht wurden. PRED erweist sich dabei als relativ schwach potentes GC, das im Vergleich zu MPRED sowohl eine um 60% geringere Potenz nicht-genomischer Effekte aufweist als auch eine um 20% verminderte Potenz genomischer Effekte besitzt.

### **1.3.2 Endogene Kontrolle der GC-Homöostase**

Die endogene GC-Synthese wird durch die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse gesteuert. Es handelt sich dabei um einen neuroendokrinen Kreislauf, der die Hormonspiegel im Serum reguliert (Webster et al. 2002). Aus immunologischer Sicht stellen Stress und erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine als externe Faktoren einen Reiz für die Sekretion des Corticotropin Releasing Hormons (CRH) im Hypothalamus dar, welches die Sekretion des Adreno-Kortikotropen Hormons (ACTH) im Hypophysenvorderlappen bewirkt. Über den Blutweg erreicht ACTH die Nebenniere (NN) und induziert dort die GC-Synthese sowie deren Sekretion. Eine endogene Rückkoppelung hemmt diesen Weg, sobald erhöhte GC-Konzentrationen erreicht werden.

Unter Ausschluss der genannten äußeren Faktoren unterliegt die CRH-Sekretion einem zirkadianen Rhythmus mit einem Anstieg in den frühen Morgenstunden. Dies hat zum Beispiel direkte Auswirkungen auf die physiologischen Schwankungen des Blutzuckerspiegels.

Obgleich bei Säugetieren die NN als primärer Ort der GC-Synthese gilt, existiert auch in anderem Gewebe ein GC-Synthesepotential, wie z.B. im Thymus als einem zum Immunsystem gehörigen Organ (Jondal et al. 2004). Auch dort lassen sich für die Biosynthese von GC notwendige Enzyme nachweisen als Hinweis auf glukokortikoide Einwirkungen, die dort bereits während der T-Zellreifung stattfinden (Pazirandeh et al. 1999).

### **Rolle endogener GC**

Seit längerem ist der Einfluss erhöhter endogener GC-Blutspiegel, wie z.B. unter chronischem Stress, auf das Immunsystem bekannt (Elenkov und Chrousos 1999). Die zelluläre Immunität wird dabei unterdrückt, während gleichzeitig die humorale Antwort des Immunsystems aktiviert wird. Hierdurch wird eine Einflussnahme endogener GC hin zu einer TH2 dominierenden Immunantwort vermutet (Reichardt et al. 2006). Die Selektion zwischen einer von TH1-Zellen oder einer von TH2-Zellen geprägten Immunantwort entscheidet den Verlauf von Autoimmunkrankheiten mit (Hill und Sarvetnick 2002) und scheint dabei von der Höhe des GC-Spiegels beeinflusst zu werden. So liegen bei Schwangeren im letzten

Schwangerschaftsdrittel erhöhte Konzentrationen von Cortisol vor. Damit einhergehend wird eine verminderte Schubrate von TH1-dominierten Autoimmunkrankheiten wie MS sowie eine erhöhte Schubrate von TH2-dominierten Erkrankungen wie Lupus erythematodes beobachtet (El Etr et al. 2005). Als Erklärung nennen die Autoren eine immunmodulatorische Komponente der GC mit Auswirkung auf das Zytokinprofil. Übereinstimmend mit dieser Beobachtung trat nach Entbindung der Frauen die erwartete Abnahme der erhöhten Cortisolspiegel ein und konsekutiv konnte eine gesteigerte Empfänglichkeit für TH1-vermittelte Autoimmunkrankheiten sowie eine erhöhte Schubrate bei MS festgestellt werden (Wilder 1995). Diese Erkenntnisse liefern deutliche Nachweise für die von endogenen Steroidhormonen ausgehende Einflussnahme auf das Immunsystem.

### **1.3.3. Wirkmechanismus der GC**

Genomische Wirkungen treten frühestens 30 Minuten nach Rezeptorbindung ein und sind zweifellos für die meisten der bekannten therapeutischen Effekte verantwortlich. Sie werden schon bei geringsten Dosen wirksam. Im Gegensatz dazu treten Effekte bei deutlich höheren Konzentrationen innerhalb von Sekunden bis Minuten in Erscheinung, die als sog. „nicht-genomische“ Wirkungen bezeichnet werden, die man ihrerseits in spezifische und nicht-spezifische Effekte unterteilt (Gold et al. 2001). Zudem wurden weitere noch nicht näher untersuchte Mechanismen beobachtet.

#### **1.3.3.1 Genomische Wirkungen**

Als Mitglied der Kernrezeptorfamilie ist der Glukokortikoidrezeptor (GR) mit zahlreichen funktionalen Domänen ausgestattet, die nach der Ligandenerkennung eine Transaktivierung des GR bewirken. In Abwesenheit der Liganden liegt der GR gebunden an Hitzeschockproteinen (HSP) inaktiv im Zytosol vor, welche Teil des Bindungskomplexes sind (Pratt et al. 1996). Die Lipophilie der GC ermöglicht eine Passage der GC in das Zytosol zum GR hin, eine Zellantwort findet aufgrund der moderaten Bindungsaffinität des GR nur bei entsprechend erhöhten GC-Serumkonzentrationen statt. Nach Dimerisierung des GR und dessen Translokalisierung in den Zellkern mit konsekutiver DNA-Bindung wird die direkte Einflussnahme auf eine Gentranskription ermöglicht (Tuckermann et al. 2005). Dort bindet er an spezielle Sequenzen der DNA, sog. „Glukokortikoid Response Elements“ (GRE) (siehe Abb. 3). Die Transkription von Genen wird abhängig von der Lokalisation der GRE's in der Enhancer oder Promoter Region der entsprechenden Zielgene im Sinne einer Transaktivierung initiiert.

Alternativ sind auch Interaktionen im Zytoplasma über weitere Signalmoleküle z.B. mit den Transkriptionsfaktoren *Activating Protein 1* (AP-1) (Göttlicher et al. 1998) *Nuclear factor kappa B* (NF-κB), *NF-AT*, *cyclic adenosinmonophosphate response element-binding* (CREB)

und *Stat-5* bekannt (Tuckermann et al. 2005). Dabei wird die Aktivität dieser Moleküle moduliert, worunter es im Sinne einer Transrepression zu einer gehemmten Zytokinexpression kommen kann (Buttgereit et al. 2004). Dieser Weg der GR-kontrollierten Gentranskription wird auch als „indirekter genomischer“ Weg bezeichnet.

### 1.3.3.2 Spezifische nicht-genomische Wirkungen

Spezifische nicht-genomische Wirkungen sind schnell eintretende Wirkungen, die sich gegenüber Transkriptioninhibitoren als unempfindlich erweisen. Im Vergleich zu genomischen Wirkungen sind sie bei höherer Dosis nachweisbar. Auch werden den nicht-genomischen Wirkungen spezifische Mechanismen zugeschrieben (Buttgereit et al. 1998). Beispielsweise sind Effekte für das Mineralokortikoid Aldosteron über diverse Second-Messenger-Systeme (z.B. Calcium  $[Ca^{2+}]$ , zyklisches Adenosinmonophosphat [cAMP] und Proteinkinase C [PKC]) bekannt, die u.a. auch bei humanen Lymphozyten auftreten (Wehling 1995).

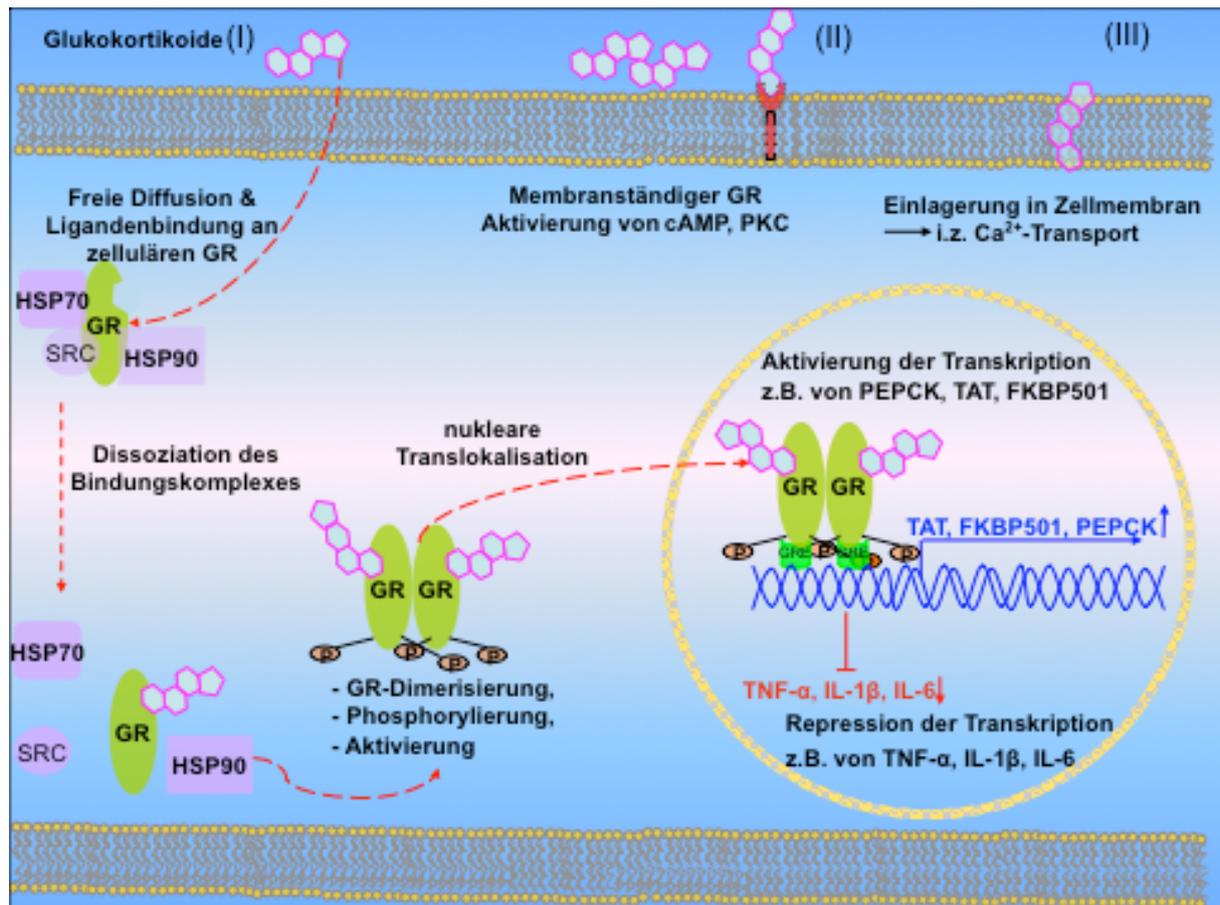
Der direkte Nachweis eines spezifischen membranständigen GR (mGR), über die diese Effekte erklärt werden können, besteht bisher nur für wenige Zelltypen. So gibt es Nachweise für dessen Existenz in Nervenzellen von Amphibien (Orchinik et al. 1991), in Maus-Lymphomzellen (Gametchu 1987) und in humanen Leukämiezellen (Gametchu et al. 1993). In humanen mononukleären Zellen konnte eine Existenz des mGR ebenfalls nachgewiesen werden (Bartholome et al. 2004).

### 1.3.3.3 Unspezifische nicht-genomische Wirkungen

Um sofort eintretende Effekte nach Gabe von GC zu erreichen, sind äußerst hohe Konzentrationen der GC an der Zellmembran notwendig, die als nicht-genomische Wirkungen vermerkt werden (Song und Buttgereit 2006). Solche Konzentrationen können in vivo bei Hoch-Dosis-Stoßtherapie oder direkter intraartikulärer Injektion erreicht werden. Eine direkte Einwirkung auf den transmembranösen Ionenfluss durch Interaktionen der GC mit der Zellmembran und den daraus folgenden Auswirkungen werden den unspezifischen nicht-genomischen Effekten zugeordnet (siehe Abb.3).

Weitere Beobachtungen von Signalmolekülen, die mit Molekülen des GR-Proteinkomplexes interagieren, lassen zusätzliche transkriptionsunabhängige Aktivierungen durch GC vermuten. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um eine Phosphorylierung des Lipocortin 1 (LC1) durch Src. Src ist als Kinase ein Teil des Multi-Protein-Komplexes, der den GR bindet und sich nach GC-Bindung ablöst. LC1 ist u.a. für die Freisetzung der Arachidonsäure aus der Membran zuständig (Croxtall et al. 2000). Andere Erkenntnisse weisen auf kardioprotektive Effekte der GC über eine Aktivierung endothelialer Stickstoffoxide nach

Stimulation der Phosphatidylinositol-3-kinase hin (Hafezi-Moghadam et al. 2002, Limbourg et al. 2002).



**Abb.3: Darstellung diverser GC-Wirkmechanismen** (I) Genomische GR-abhängige Wirkung der GC: GR-Aktivierung und Translokalisierung in den Zellkern zur dortigen Transaktivierung der Gentranskription über GRE im Sinne einer Hemmung (rot) oder Aktivierung (blau); (II) Nicht-genomische spezifische GC-Wirkung: Aktivierung des membranständigen GR mit schnell einsetzenden Effekten nach hoher GC-Konzentration; (III) Nicht-genomische unspezifische, rezeptorunabhängige GC-Wirkung durch Membraneinlagerung und Änderung des Ionenflusses.

### 1.3.4 GC und Immunmodulation

Bereits seit 1989 ist der GC-Effekt auf die Induktion von Apoptose in Lymphozyten des Thymus während deren Differenzierung bekannt (Screpanti et al. 1989). Durch das Potential der Apoptoseinduktion sowie durch veränderte Zytokinausschüttung, sowohl aus T-Zellen und dendritischen Zellen als auch aus neutrophilen Granulozyten, sind GC fähig, eine Immunantwort zu beenden (Tuckermann et al. 2005). Auch nehmen sie Einfluss auf die Antigenpräsentation, indem sie den dafür notwendigen HLA-II-Komplex Antigenpräsentierender Zellen (APZ) herunterregulieren (Moser et al. 1995). Das angeborene Immunsystem ist ebenfalls der Einwirkung durch GC ausgesetzt. Zelladhäsionsmoleküle wie das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül (VCAM-1) auf Endothelzellen und das Very Late Antigen (VLA-4) auf Leukozyten werden herunterreguliert (Pitzalis et al. 2002). Sie sind für

die Leukozytenadhäsion an Endothelien, wie sie an der BHS vorkommen, und die sich daran anschließende Extravasation in Entzündungsgebiete notwendig. Die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  wird unter GC-Applikation gehemmt (Almawi et al. 1996), was das Anlocken weiterer Entzündungszellen beeinträchtigt.

Zusammengefasst ergibt sich für die GC ein breites Spektrum antiinflammatorischer, immunsuppressiver Wirkungen, sodass sie für die Therapie von Autoimmun- und atopischen Krankheiten wesentlich von Bedeutung sind. Das Potential scheint noch lange nicht erschöpft und die Anwendung dieser Standardtherapeutika bedarf weiterer Optimierung – zumal erst in den letzten Jahren grundlegende Wirkungsmechanismen entdeckt wurden.

### **1.3.5 Nebenwirkungen der GC**

Den gewünschten Wirkungen auf die Funktion des Immunsystems stehen eine große Anzahl möglicher NW gegenüber. GC wirken u.a. über den GR, der von nahezu allen Zellen des Körpers exprimiert wird. Somit treten ubiquitär diverse Effekte nach Rezeptorbindung ein. Dies hat zur Folge, dass oft unerwünschte, nachteilige NW auftreten. Akute und chronische NW entstehen abhängig von der Dosis und Dauer der GC-Therapie (Huscher et al. 2008). Sie gilt es im Therapieschema, besonders unter Verwendung in Kombination mit weiteren Therapeutika, stets zu berücksichtigen und deren Auftreten zu kontrollieren. Dabei stehen metabolische, endokrine, psychische, gastroenterologische und ophthalmologische Effekte im Vordergrund. Die Osteoporose, die Katarakt, eine Gewichtszunahme und entgleiste Stoffwechsellagen, die z.B. eine Fettleber entstehen lassen oder einen Diabetes mellitus hervorrufen können, sind Risiken einer prolongiert erhöhten GC-Konzentration bei chronischer GC-Gabe (Pozzilli et al. 2004). Des Weiteren können eine Amenorrhoe, eine Steroidakne und auch neuropsychiatrische Komplikationen wie Insomnie, Dysphorie bis hin zur akuten Psychose als mögliche Komplikationen einer Therapie auftreten. Zudem wirken mineralokortikoide Effekte, die zu einer Mineralokortikoid-assoziierten Hypertonie führen können. Die zahlreichen NW schränken somit eine GC-Verwendung insbesondere bei Gabe an multimorbide Patienten ein, wie sie künftig den klinischen Alltag stärker dominieren.

Im Rahmen ihrer Verwendung bei Entzündungen des ZNS konnten in tierexperimentellen Untersuchungen sogar neurotoxische Effekte unter hoch dosierter Therapie mit MPRED beobachtet werden (Diem et al. 2003). Erst die Zugabe des neuroprotektiv wirksamen Erythropoetin verhinderte die GC-induzierte Neurotoxizität (Diem et al. 2005).

Es wird vermutet, dass viele NW infolge Transaktivierung unter GC-Therapie auftreten, wohingegen eine Transrepression auf der Ebene der DNA die gewünschten immunsuppressiven und immunmodulatorischen Wirkungen hervorruft (Rosen und Miner 2005).

## 1.4 Liposomen

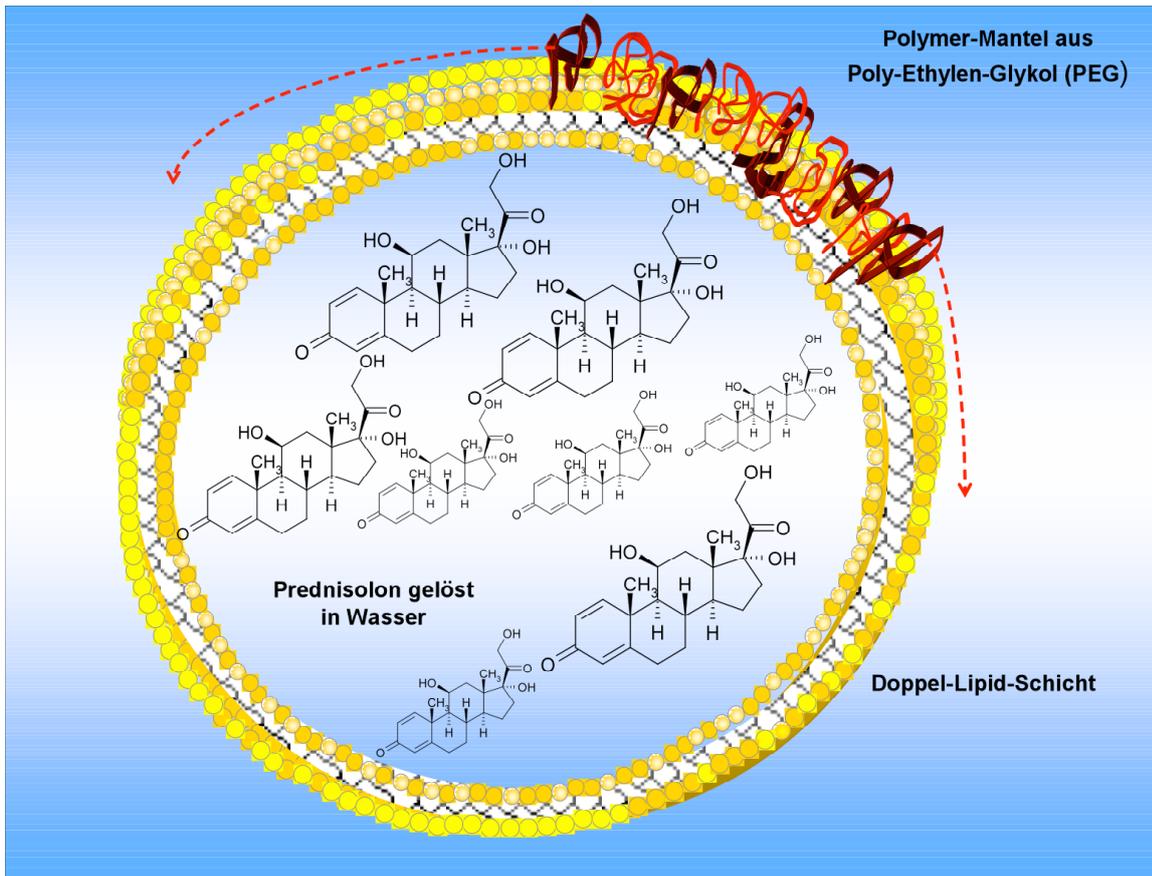
Die Behandlung chronisch entzündlicher Krankheiten, wie MS, RA oder Lupus erythematoses erfolgt insbesondere im akuten Schub mittels i.v. Therapie hoch dosierter Glukokortikoide. Wegen ihrer raschen Elimination und wegen des großen Verteilungsvolumens im Körper erreicht jedoch nur ein geringer Wirkstoffanteil die therapierelevanten Regionen, in denen sich der Entzündungsprozess abspielt. Die teilweise toxischen NW haben Einfluss auf das Therapieschema und limitieren sowohl eine langfristige Gabe als auch die tägliche Maximaldosis des zu verabreichenden Medikamentes.

Es besteht daher großes Interesse an einem selektiven, medikamentösen Transport des Medikamentes hin zum Ort des Krankheitsgeschehens. Dabei sollen NW ausserhalb des entzündeten Gewebes sowie zu hohe Dosisapplikationen vermieden werden. Vorteilhaft ist zudem, wenn das Medikament für einen längeren Zeitraum am Ort wirken kann, ohne frühzeitig eliminiert zu werden.

Hierfür bieten sich Liposomen als eine von mehreren möglichen „Medikamenten-Transporter-Systemen“ an, die in präklinischen und klinischen Studien ihren Einsatz als Vehikel für diverse Substanzen in der Therapie zahlreicher Krankheiten unter Beweis gestellt haben (Gregoriadis und Florence 1993). Ihre gute Kompatibilität, geringe Toxizität und inerte Stellung, ohne dass sie eine Aktivierung des Immunsystems herbeiführen, machen sie daher für ihre therapeutische Anwendung attraktiv. Diese Eigenschaften beruhen auf der strukturellen Ähnlichkeit der Form ihrer Doppel-Lipid-Membranschicht mit dem Aufbau körpereigener Zellen (siehe Abb.4).

Einen entscheidenden Vorteil zur herkömmlichen Applikation von Wirkstoffen brachte die Erkenntnis des „*passive targeting*“, worunter man eine selektive Lokalisation der Liposomen im pathologisch veränderten Zielgewebe versteht (Allen et al. 1991; Lasic und Papahadjopoulos 1995). Eine gestörte endotheliale Barrierefunktion wird als kausaler Mechanismus dafür angenommen, dass die Liposomen in das entzündete Gewebe passieren können (Rousseau et al. 1999). Diesen Vorgang versteht man allgemein auch als „spontan selektive Akkumulation“ an Orten erhöhter Gefäßpermeabilität, wie sie in Tumorgewebe und in entzündeten Geweben vorkommen (Metselaar et al. 2002).

Einen Schritt weiter ist man mit Liposomen gegangen, die sich mittels Zellrezeptor-spezifischer Liganden auf deren Membranoberfläche zu ganz bestimmten Zielzellen navigieren lassen, das sog. „*active targeting*“ (Gantert et al. 2009; Lasic und Papahadjopoulos 1995).



**Abb.4: Liposomen mit transmembranös eingebautem Poly-Ethylen-Glykol für eine verlängerte Blutzirkulation.** Liposomen transportieren Prednisolon oder auch Methylprednisolon gelöst in Wasser und finden Verwendung in der Therapie der EAE.

#### 1.4.1 Verlängert zirkulierende Liposomen

Ein bisher limitierender Faktor der Bioverfügbarkeit von Liposomen war die Eliminierung aus dem Kreislauf durch Makrophagen des Mononukleären-Phagozytose-Systems (MPS). Das Binden von Opsoninen und Antikörpern initiiert die Phagozytose durch Makrophagen (Gregoriadis 1989; Senior 1987). Als Meilenstein kann daher die Einführung verlängert zirkulierender Liposomen bezeichnet werden, die einer Phagozytose zunächst entkommen. Metselaar et al. beschreiben die des „*passive targeting*“ zugrunde liegenden Charakteristika wie folgt:

- 1) Verlängerte Zirkulation im Blut – sie ermöglicht eine größere Wahrscheinlichkeit, das betroffene Entzündungsgebiet zu erreichen
- 2) Zugang zum lokalen Entzündungsgeschehen und den dortigen Zielzellen
- 3) Fähigkeit der Liposomen, mit Zielzellen zu interagieren und den Transport des Medikaments in seiner aktiven Form zu gewährleisten.

ad 1)

Das verlängerte Verweilen der Liposomen im Kreislauf ist abhängig von einem späten Erkennen durch Opsonine und der sekundären Elimination durch Phagozytose. Als Lösungsansatz für diese Problematik hat sich das Prinzip der „sterischen Stabilisation“ durchgesetzt, um so eine frühe Eliminierung zu vermeiden, nachdem man sich anfänglich auf eine modifizierte Lipidzusammensetzung konzentriert hatte (Papahadjopoulos und Gabizon 1990). Bei dem Verfahren der „sterischen Stabilisation“ werden hydrophile Polymere, wie das Poly-Ethylen-Glykol (PEG), in der Lipidmembran verankert, sog. „*Stealth Liposomes*®“ (Allen und Chonn 1987). Man nimmt an, dass durch diese sterische Barriere die Lipidmembran vor frühzeitiger Opsonisierung bewahrt bleibt (Woodle et al. 1994). Ein wesentlicher Vorteil für die Therapie scheint die Möglichkeit zur variablen Dosierung innerhalb bestimmter Bandbreiten von PEG-Liposomen zu sein im Gegensatz zur dosisabhängigen Konzentration nicht pegylierter Liposomen (Allen und Hansen 1991). Ihre Halbwertszeit (HWZ) beträgt beim Menschen bis zu 45 Std. (Dams et al. 2000). Für Experimente mit Ratten wird die Pharmakokinetik von Liposomen beschrieben, wobei ein Zusammenhang zwischen absolut injizierter Lipiddosis pro Ratte (5 µmol/Ratte - 0.005 µmol/Ratte) und erzielter Blutkonzentration post injectionem gesehen wird (Hrynyk et al. 2003). Danach beträgt die Konzentration nach 25 Std. noch 30% bei einer Dosis von 5 µmol pro Ratte, während sie für eine Dosis von 0.005 µmol pro Ratte nicht mehr messbar ist.

ad 2)

Die endotheliale Barriere ist ein weiterer Faktor, der die Verfügbarkeit von i.v. applizierten Medikamenten im Zielgewebe limitiert. Eine Diskontinuität dieser einschichtigen Membran liegt insbesondere in entzündetem Gewebe sowie in tumorbedingt verändertem Gewebe vor. Dort ist häufig eine erhöhte Gefäßpermeabilität vorzufinden, die den Liposomen eine selektive Extravasation ermöglicht (Allen et al. 1991; Lasic und Papahadjopoulos 1995). Studien anhand von Liposomen mit radioaktivem Inhalt belegen eine selektiv erhöhte Extravasation am Endothel entzündeten Gewebes (Laverman et al. 1999). Daneben sind Liposomen in höheren Konzentrationen auch in Milz, Niere und Leber vorzufinden (Metselaar et al. 2003). Diese Organe besitzen physiologisch ein diskontinuierliches Endothel.

ad 3)

Eine lange Verweildauer und die selektive Auswanderung in das Entzündungsgebiet sind wichtige Punkte für den Transport zahlreicher Medikamente in Liposomen. Des Weiteren ist die Fähigkeit der Liposomen, ihren Inhalt während der langen Zirkulation in seiner pharmakologisch aktiven Form zurückzuhalten und diesen zum richtigen Zeitpunkt am Ort der Entzündung freizugeben, wesentlich für den Behandlungserfolg. Dabei ist es widersprüchlich, wenn einerseits das Design der Liposomen auf die Gewährleistung ihrer

Stabilität während der Blutzirkulation gerichtet ist und andererseits ein erleichtertes Freilassen des transportierten Wirkstoffes vor Ort ermöglicht werden soll.

Falls die liposomalen Transporteure an ihrem Zielort intakt bleiben, kann eine adäquat erhöhte, pharmakologisch lokal wirksame Konzentration nicht garantiert werden. Hier bewirken enzymale Einwirkungen im Entzündungsgebiet jedoch eine Freilassung des liposomalen Inhalts (Vermehren et al. 1999; Vermehren et al. 2001) Auch die phagozytäre Aufnahme von Liposomen und deren intrazelluläre Prozessierung in Zellen des MPS ist ein weiterer Vorgang, um den Inhalt der Liposomen freizusetzen (Ahsan et al. 2002). Dieses Konzept der „Makrophagen-vermittelten-Wirkstofffreilassung“ wurde für Doxorubicin beispielhaft gezeigt (Storm et al. 1988). Membrangängige lipophile Wirkstoffe wie GC könnten deshalb nach endosomaler Prozessierung extrazellulär permeieren und dort direkt auf lokale Zielzellen des Entzündungsgeschehens einwirken.

#### **1.4.2 Liposomale GC in der Therapie der EAE**

Der Vorteil des liposomalen Transports von GC wird anhand der EAE näher erläutert. Die relevanten Gründe für eine Verwendung von GC in der Therapie entzündlicher Krankheiten wurden bereits ausführlich dargestellt. Eine GC-Therapie per i.v. Injektion hat zahlreiche NW zur Folge, welche die Applikationsdauer und Maximaldosis einer systemischen Gabe limitieren. Im Gegensatz hierzu sind meist hoch dosierte und hoch frequentierte Gaben notwendig, um eine effiziente Wirkstoffkonzentration im Ort des Entzündungsgeschehens überhaupt zu erzielen. Zudem unterliegen GC einer effizienten Elimination (Snell 1976). Die Verwendung liposomaler GC erscheint daher unter Berücksichtigung ihrer vorteilhaften Pharmakokinetik sinnvoll.

In einem Mausmodell der Kollagen-Typ-II-Arthritis wurden bereits überlegene therapeutische Effekte von Prednisolon-Liposomen (PLP) gegenüber der konventionellen Applikationsform von PRED demonstriert (Metselaar et al. 2004). Dabei wurde die einmalige i.v. Gabe von 10mg/kg KG PLP mit der Injektion von 10mg/kg KG freien PRED an fünf aufeinander folgenden Tagen auf ihre therapeutische Wirksamkeit miteinander verglichen. Trotz des Unterschiedes in der absolut verabreichten Dosis (einmalig vs. fünfmalig) zeigte sich unter PLP-Therapie ein geringerer Knorpelschaden und eine länger anhaltende antiinflammatorische Wirkung. Außerdem konnten Liposomen mit Hilfe des Nachweises von liposomal transportiertem Gold insbesondere an der Grenze zur Synovia und um lokale Blutgefäße herum lokalisiert werden sowie die Affinität der Liposomen zu lokalen Makrophagen nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen betreffen ausschließlich solche Gelenke, die eine Infiltration von Entzündungszellen aufwiesen, so dass die Passage der PLP im Sinne des „*passive targeting*“ verstanden werden kann.

Eine weitere Überlegenheit der PLP konnte in der Therapie der EAE am Modell der Lewis-Ratte herausgearbeitet werden (Schmidt et al. 2003b). Dabei wurde der Therapieeffekt einer zweimaligen Dosisapplikation von 10 mg/kg KG PLP und von 50mg/kg freien MPREDs miteinander verglichen. Die mit PLP therapierten Tiere präsentierten geringere T-Zell- und Makrophageninfiltrationen sowie eine höhere Apoptoserate von T-Zellen im ZNS, was sich zuvor in einem deutlich milderen Krankheitsverlauf äußerte. Ferner ließen sich hohe Konzentrationen von PRED sowohl im Serum als auch im RM bis zu 42 Std. nach i.v. Injektion von 10 mg/kg KG PLP nachweisen. Freies PRED hingegen war bereits nach 6, 18 und 42 Std. post injectionem einer 10 mg/kg KG Dosis so gut wie nicht mehr messbar. Auch wurde die Verteilung von Gold-markierten Liposomen in diversen Geweben von Schmidt et al. untersucht. Ihr Nachweis in Mikroglia und Astrozyten zeugt dabei von einem Makrophagen-unabhängigen Prozess der Extravasation ins ZNS. Dabei konnten NW der GC in Form einer erhöhten Apoptoserate unter diesen neuronalen Zellen ausgeschlossen werden (Schmidt et al. 2003b).

Zuletzt zeigten Linker et al. in einem weiteren EAE-Modell an DA-Ratten, dass auch MPRED in Liposomen verpackt (MPLP) gegenüber der Therapie mit freiem MPRED überlegen ist (Linker et al. 2008). Geringere Zellinfiltrate, weniger Demyelinisierung und eine höhere Axondichte zeigten sich anhand immunhistochemischer Färbungen im RM der Ratten. Leere Liposomen haben in der Therapie der EAE hingegen keine Wirksamkeit bewiesen (Schmidt et al. 2003 a,b).

Freie Kortikosteroide zeigen im Mausmodell der EAE eine von der GC-Dosis abhängige therapeutische Wirksamkeit, wie anhand eines weniger stark ausgeprägten klinisch beobachtbaren Therapieeffektes parallel zur Dosisreduktion festgestellt wurde (Wüst et al. 2008) . Dieser Aspekt der dosisabhängigen Wirksamkeit zeigt sich auch für liposomales Prednisolon in der Therapie der EAE an Ratten, wie auch im Tiermodell der RA, wobei die therapeutische Gabe von 10 mg/kg KG PLP (PLP10) gegenüber einer Dosis von 1 mg/kg PLP (PLP1) überlegen war (Linker et al. 2008; Metselaar et al. 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit finden liposomale GC in einem Tiermodell der EAE Verwendung, die mit MOG<sub>35-55</sub> an C57BL/6-Mäusen induziert wurde. Dabei werden Liposomen unter Berücksichtigung ihrer metabolischen NW mit einer konventionell hoch dosierten Applikation diverser synthetischer GC verglichen.

## 1.5 Zielsetzung

Im Focus dieser Arbeit standen grundlagenorientierte Untersuchungen zum besseren Verständnis sowie zur Optimierung von Therapiemöglichkeiten mit diversen hoch dosierten Kortikosteroiden sowie den in Liposomen-verpackten Kortikosteroiden in einem Tiermodell der Multiplen Sklerose, der EAE. Im Rahmen ihrer therapeutischen Anwendung im Tierexperiment wurde ihr Wirkmechanismus und das Auftreten von NW analysiert.

Im experimentellen Mittelpunkt standen drei Komplexe:

### 1. Vergleich der Dosis-Wirkstärke von Liposomen-verpackten GC mit frei applizierten GC

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in dem bereits etablierten MOG<sub>35-55</sub> EAE-Modell der C57BL/6-Maus die Applikation von Liposomen-verpackten GC mit der therapeutischen Wirksamkeit von freien GC (Prednisolon, Methylprednisolon, Dexamethason, Triamcinolon) verglichen, wobei besonderes Augenmerk auf die für einen vergleichenden Therapieerfolg notwendigen Dosen gelegt wurde. Es kamen in einem Vergleich auch unterschiedliche Liposomen-verpackte GC zum Einsatz. Anhand des klinischen Verlaufes, histologischer Parameter, wie T-Zell und Makrophageninfiltration und Axonschaden wurden ihre Effekte näher analysiert.

### 2. Analyse des Wirkmechanismus von Liposomen-verpackten GC mit Hilfe von gentechnisch veränderten Mäusen

Nachdem im 1. Komplex die prinzipielle Wirksamkeit geklärt und die Dosis von Liposomen-verpackten GC definiert wurde, folgte in einem 2. Komplex die Analyse eines sich möglicherweise voneinander unterscheidenden Wirkmechanismus von Liposomen-verpackten GC und freien GC. In der Therapie mit freiem Dexamethason ist der Zytoplasmatische Glukokortikoidrezeptor in T-Zellen entscheidend für die Behandlung der EAE (Wüst et al. 2008).

Eine solche Analyse hat für PLP bisher nicht stattgefunden und soll anhand von konditionalen Glukokortikoidrezeptor-knock-out-Mäusen mit Fehlen des Rezeptors in allen Zellen sowie mit konditionalen Glukokortikoidrezeptor-knock-out-Mäusen mit Fehlen des Rezeptors in T-Zellen durchgeführt werden.

### 3. Vergleichende Analyse einiger Nebenwirkungen von Liposomen-verpackten GC mit freien GC

Nach der Analyse über den möglichen Wirkmechanismus der in Liposomen-verpackten GC wurde das Auftreten von NW unter der GC-Therapie untersucht. Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen dabei die Auswirkungen auf eine Expression von Leberenzymen

sowie den Blutzucker- und den Insulinspiegel im Serum. Des Weiteren wurde die Einwirkung liposomaler GC auf die periphere T-Zell-Depletion hin untersucht.

## 2. Material und Methoden

Das verwendete Material wird in einem alphabetisch geordneten Verzeichnis gesondert aufgelistet, sofern es nicht explizit im Methodenteil erwähnt wurde.

### 2.1 Medien, Puffer und Lösungen

<p><b>EH-Medium</b></p> <p>DMEM</p> <p>2,5mmol/l Hepes Puffer</p> <p>1% Penicillin/Streptomycin</p>	<p><b>POD-Block</b></p> <p>8,0 ml      Methanol</p> <p>1,2 ml      Natriumazid (2 M)</p> <p>2,0 ml      Wasserstoffperoxid (3%)</p>
<p><b>10x PBS (pH 6,7)</b></p> <p>400,0 g      Natriumchlorid</p> <p>10,0 g      Kaliumchlorid</p> <p>72,0 g      Dinatriumhydrogenphosphat</p> <p>69,0 g      Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat</p> <p>ad 5000,0 ml Wasser bidest.</p>	<p><b>1x TBS</b></p> <p>100,0 ml      TRIS-Lösung (1M)</p> <p>60,0 ml      Natriumchlorid-Lösung (5M)</p> <p>ad 2000,0 ml Wasser bidest.</p>
<p><b>4% PFA (pH 7,3)</b></p> <p>40,0 g      Paraformaldehyd</p> <p>100,0 ml      10 x PBS</p> <p>ad 1000,0 ml Wasser bidest.</p>	<p><b>Citratpuffer (pH 6,0)</b></p> <p>18,0 ml      Citronensäure-Lösung (0,1 M)</p> <p>82,0 ml      Natriumcitrat-Lösung (0,1 M)</p> <p>ad 1000,0 ml Wasser bidest.</p>
<p><b>EDTA-Lösung (pH 8,0)</b></p> <p>3,33 ml      EDTA-Lösung (0,3 M)</p> <p>0,79 ml      Natriumhydroxid-Lösung (1M)</p> <p>ad 1000,0 ml Wasser bidest.</p>	<p><b>Resuspensionspuffer</b></p> <p>0,1 g      Bovines Serumalbumin</p> <p>1,0 g      Glukose</p> <p>0,01 g      DNase I</p> <p>ad 100,0 ml      1x PBS</p>

**Hämalaun-Lösung**

1,0 g	Hämatoxylin
0,2g	Natriumjodat
50,0 g	Kalialaun
50,0g	Chloralhydrat
1,0g	Citronensäure
ad 1000,0 ml	Wasser bidest.

**Eosin-Lösung**

0,1 g	Eosin gelblich
3 gtt	Essigsäure (100%)
ad 100,0 ml	Ethanol (70%)

**Ketamin-Xylazin-Narkose**

1,00 ml	Ketanest [50 mg/ml]
0,25 ml	Rompun 2%
5,00 ml (0,9%)	Natriumchlorid-Lösung

**2.2 Geräte**

Analysenwaage  
Blutzuckermessgerät

Cyclcer

Entwässerer  
Einbettter  
FACS-Gerät

Häcksler

Kamera

Mikrotom

Mikroskope

Mikrowelle

Netzgerät für die Elektrophorese

NanoDrop -1000 Spectralphotometer

Objektträger SuperFrost®plus

pH-Meter

PCR – Gerät 7500 RealTime PCR

Rührplatte

Schüttler

Waage

Wasserbad für histologische Zwecke

Wasserbad für allgemeine Zwecke

Wärmeblock

Sartorius CP 124 S, Göttingen, Deutschland

Ascensia®, Contour® Bayer Vital GmbH,  
Leverkusen, Deutschland

Mastercycler eppgradient, Hamburg-Eppendorf,  
Deutschland

Leica TP 1020, Wetzlar, Deutschland

Leica EG 1160, Wetzlar, Deutschland

BD FACS Calibur, San Diego, USA

Ultra Turrax IKA T18basic, Staufen, Deutschland

Retiga 1300, Qimaging, Surrey, Canada

Leica SM 2000R, Wetzlar, Deutschland

Zeiss Axioskop 40, Wetzlar, Deutschland

Zeiss Axiovert 40C, Wetzlar, Deutschland

Zeiss Axiovert 200M, Wetzlar, Deutschland

Axiophot microscope Olympus BX5, Hamburg,  
Deutschland

Durabrand

Elite 300 Plus, Schütt Labortechnik, Göttingen,  
Deutschland

PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen,  
Deutschland

Menzel, Braunschweig, Deutschland

InoLab

Applied Biosystems Inc., Foster City, CA - USA

Heidolph MR 3001, Schwabach, Deutschland

Vortex-Genie 2, Scientific Industries

Sartorius BL 3100, Göttingen, Deutschland

Medax GmbH, Kiel, Deutschland

Leica HI 1220, Wetzlar, Deutschland

Bio TDB-100, Biosan

Zentrifugen	Centrifuge 5415 R, Eppendorf MiniSpin plus, Eppendorf Multifuge 1 S-R Heraeus, Thermo Scientific, Langensfeld, Deutschland
-------------	---

### 2.3 Antikörper und Chemikalien

5x First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Agarose Pulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Anchored Oligo-dT	ThermoScientific, Karlsruhe, Deutschland
Anti-CD8 bio	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Anti-CD4 (RM4-5)	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Anti-Rat IgG (H+L) biot. (1:200)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Substrate Kit IV	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Citronensäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DAB-Puffertabletten	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dexa-ratiopharm 100 mg/10ml	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat - 2H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMEM (4,5 g/l Glukose)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
DNAse I 10U/μl	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
EDTA-Dinatriumsalz – 2H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ELISA Insulin Mouse Ultrasensitive	DRG Instruments, Marburg, Deutschland
Entellan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin gelblich	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fluoromount – G	Southern Biotech, Birmingham, Al - USA
Glukose wasserfrei / -H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, Deutschland
Goat anti-mouse/rabbit IgG biot.(1:200)	Dako, Hamburg, Deutschland
Hämalaunlösung sauer nach Meyer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Incomplete Freund Adjuvant	Difco, Kansas, USA
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ketamin Inresa 50 mg/ml	Inresa, Freiburg, Deutschland
Ladepuffer	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Liposome	Institut für pharmazeutische Wissenschaften, Utrecht in Holland
2x MasterMix	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Mass-Ruler Low Range	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MOG <sub>35-55</sub> -Peptid	Charité, Berlin, Deutschland
Mouse anti - Alzheimer Precursor Protein (APP) A4 mAb (1:1000)	Chemicon International, Californien, USA
Mycobacterium tuberculosis H37RA	Difco, Kansas, USA
Natriumazid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat – H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Normal Rabbit Serum	Jackson Laboratories, Suffolk, UK
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Platinum qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland

Pertussistoxin	List Biological Laboratories, California, USA
Primer	Microsynth, Balgach, Schweiz
Proteinase K	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Purified rat anti-mouse Mac-3 mAb (1:200)	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Rat anti human CD3 (1:200)	Serotec, Düsseldorf, Deutschland
Reverse Transkriptase 200U/µl	Invitrogen, Karlsruhe Deutschland
RNeasy MiniKit®	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Rompun 2%	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Roti-Phenol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Prednisolut® 250mg/5ml	mibe, Jena, Deutschland
Strept AB Complex (AP) (1:100)	Dako, Hamburg, Deutschland
Superscript U	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Taq-Polymerase	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
TRIS – HCl / Ultra Qualität > 99%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS-Borat-EDTA-Puffer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizol-Reagent	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ultra Pure Distilled Water	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Urbason soluble 16 mg/ml	Aventis, Frankfurt, Deutschland
VolonA® 80mg/2ml	Dermapharm, Grünwald, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland

## 2.4 Tiere

Alle Experimente mit Tieren wurden unter Beachtung der gültigen Richtlinien zum gesetzlichen Tierschutz im Land Niedersachsen durchgeführt und unterlagen der ständigen Kontrolle durch die zuständigen Veterinärbehörden. Die Tierhaltung erfolgte in speziellen Räumen (klimatisiert; 12Std./12Std.-Hell-Dunkel-Rhythmus) unter Standardbedingungen (Makrolonkäfige ohne Gitterboden, mit pelletiertem Nagerfutter sowie Trinkwasser ad libitum). Ihre Haltung wurde in dem Institut für Multiple-Sklerose-Forschung von staatlich geprüften Versuchstierpflegern durchgängig betreut. Sowohl männliche als auch weibliche Mäuse des C57BL/6 Inzuchtstammes wurden mit einem durchschnittlichen Alter von 10-12 Wochen und einem Gewicht von 20g-30g verwendet. Die Tiere wurden entweder von Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen oder sie entstammten der Eigenzucht.

Heterozygote GR-Knock-out-Tiere ( $GR^{+/-}$ ) mit einer Deletion des Exons 3 im GR-Gen embryonaler Stammzellen, wurden vom Deutschen Krebsforschungszentrum, Heidelberg, zur Verfügung gestellt. Eine Genotypisierung neugeborener Mäuse wurde mit Hilfe der PCR-Analyse durchgeführt (siehe unter 2.7 auf Seite 39). Konditionale Knock-out Tiere, deren Expression des GR spezifisch in den T-Zellen ( $GR^{lckCre +/+}$ ) inaktiv ist, wurden aus dem Leibniz Institut für Altersforschung - Fritz-Lipmann Institut (Jena) bezogen (AG Tuckermann). Zur Generierung der  $LckCre/GR^{flox}$ -Tiere wurden  $GR^{flox}$ -Mäuse (Tronche et al. 1999) mit Tieren verpaart, die das Enzym Cre-Rekombinase als Transgen unter der Kontrolle des Lck Promotors exprimieren (Gu et al. 1994). Die Zucht der erstbezogenen Linie wurde eigenständig fortgeführt und mittels geeigneter PCR-Analyse (siehe unter 2.7 auf Seite 39)

genotypisiert. Diese Mauslinie wurde für mehr als 10 Generationen auf den C57BL/6 Hintergrund zurückgekreuzt.

## 2.5 Aktive Induktion der EAE und klinische Verlaufsbeurteilung

Die Tiere werden gewichtsbezogen durch intraperitoneale Injektion von 200 µl - 250 µl Volumen einer Ketamin-Xylazin-Lösung narkotisiert. Nach Sicherstellung einer tiefen Narkose wurden die Tiere mit einer Emulsion, die 50 µg MOG<sub>35-55</sub> gelöst in NaCl 0,9% [1 mg/ml] und 50 µg CFA [1 mg/ml] enthält, immunisiert. Neben dem absoluten Injektionsvolumen von 100 µl, das beidseits s.c. dorsal der Schwanzbasis platziert wurde, folgten zwei weitere Applikationen von jeweils 200 ng Pertussistoxin (gelöst in 200 µl PBS) systemisch per i.p. Injektion an Tag 0 und Tag 2. Die Versuchstiere wurden täglich gewogen und nach deren klinischem Verlauf mit Hilfe eines 10-Punkte Index bewertet. Lähmungserscheinungen traten in einer Bandbreite von 9-14 Tagen auf, wobei deren erstmaliges Auftreten bei den einzelnen Experimenten variierte.

<b>INDEX</b>	<b>KLINISCHER VERLAUF</b>
0	Gesund
1	Schwanzspitze hängend, Tonusminderung im Schwanz
2	Schlaffe Schwanzlähmung
3	Fehlen von ausgleichenden Reflexen im Gang
4	Gangataxie
5	Leichte, schlaffe Parese der Hinterläufe
6	Deutliche schlaffe Parese beider Hinterläufe oder Plegie eines der Hinterläufe
7	Plegie beider Hinterläufe
8	Tetraparese mit leichter Parese der Vorderläufe
9	Moribund mit erhöhter Atemfrequenz
10	Verstorben

Bei nicht eindeutiger Zuordnung der aktuell beobachteten Symptomatik zu einem Punkt des Index zwecks Beurteilung der EAE erfolgte die Punktvergabe nach dem Prinzip des überwiegenden Defizits.

Sobald ein Tier aus einem Käfig den Index von 4 erreichte, wurde diesem das Futter in einer Petrischale mit Wasser und Kölln<sup>®</sup> Haferflocken aufgefüllt und auf den Käfigboden platziert, um eine weitere Nahrungs- und Wasseraufnahme zu gewährleisten. Die Beobachtung der Versuche zur klinischen Verlaufsbeurteilung fand durch eine, hinsichtlich der Therapiegruppenuordnung verblindete Person statt.

Bei den Experimenten zur histologischen Aufbereitung und Untersuchung des Gewebes wurden die Versuchstiere am 3.Tag nach Therapiebeginn getötet.

### 2.5.1 Therapie der EAE

#### Therapeutika

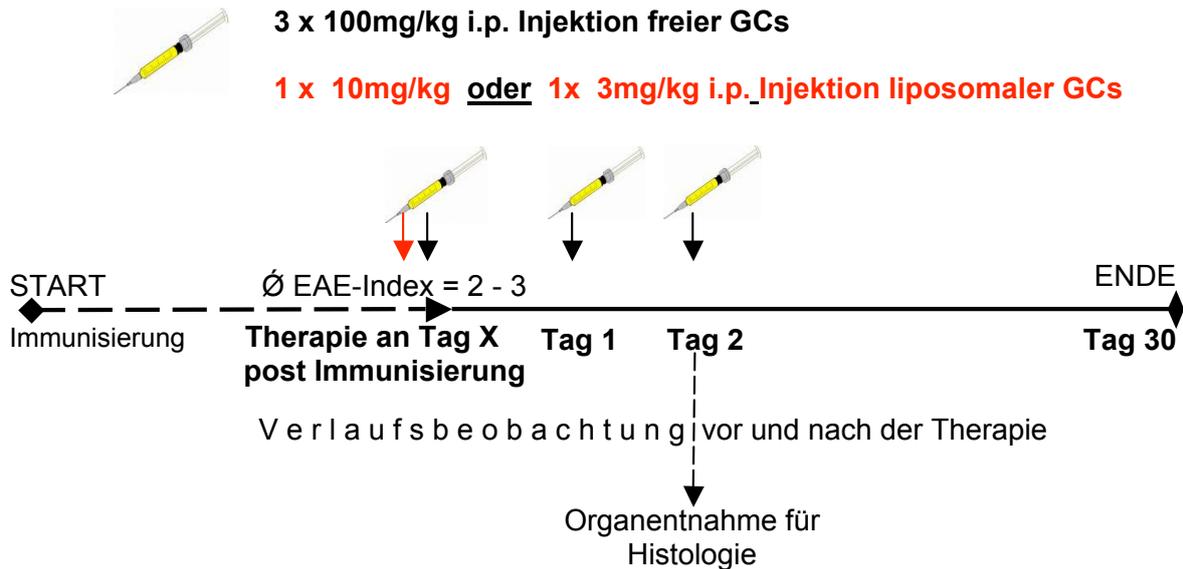
Vier verschiedene Glukokortikoide (DEX, PRED, MPRED, TRIAM) (s. Material) fanden Verwendung in der immunsuppressiven Therapie der EAE. Sie wurden stets in einer Dosis von 100 mg/kg Mausgewicht verdünnt in NaCl 0,9% mittels i.p. Injektion appliziert. Des Weiteren sind zwei verschiedene liposomale Lösungen eingesetzt worden. Die Liposomen wurden vom Institut für Pharmazie der Universität Utrecht in Holland zur Verfügung gestellt, um ihren Wirkmechanismus in der Therapie der EAE analysieren zu können. Die Liposomen, die nach der Film Extrusions Methode (Amselem et al. 1993) hergestellt wurden, enthielten entweder Prednisolon (PLP) oder Methylprednisolon (MPLP). Ihre verabreichte Dosis von 10 mg/kg oder 3 mg/kg wurde auf das Mausgewicht durch Verdünnung der Lösung mit PBS 1%ig angepasst. Unter sterilen Bedingungen wurde der Inhalt entnommen und bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Kontrolltiere erhielten äquivalente Volumina von NaCl 0,9% oder PBS.

#### Therapieschema

Grundlage jedes durchgeführten Experimentes zur Therapie der EAE waren jeweils mindestens fünf Tiere pro Gruppe.

Der Beginn der Therapie erfolgte meist zwischen dem 11. und 14. Tag nach Immunisierung der Mäuse. Dazu wurden die Teilnehmer einer Gruppe so ausgewählt, dass sich ein durchschnittlicher Index von 2-3 Punkten für eine Therapiegruppe ergab. Die Tiere wurden zusätzlich aus verschiedenen Käfigen den Therapiegruppen zugeteilt. Allen Tieren wurde das Therapeutikum i.p. bei Rückentiefelage in den linken unteren Quadranten des Abdomen injiziert, um so das Risiko von Weichteilverletzungen und Harnblaseninjektionen zu reduzieren. Entsprechend der klinisch angewandten hoch dosierten Therapie des akuten Schubes der MS wurde die therapeutische Behandlung mit konventionellen Glukokortikoiden an drei aufeinander folgenden Tagen mit einem zeitlichen Abstand von 24 Std. durchgeführt (siehe Abb.5).

Anders verhielt sich das Schema für die Liposomen-verpackten Glukokortikoide, die mit einer geringer dosierten Konzentration von 10 mg/kg oder 3 mg/kg Mausgewicht einmalig nur am 1. Therapietag injiziert wurden. Die Kontrollgruppe erhielt ein äquivalentes Injektionsvolumen von NaCl 0,9%.



**Abb.5: Therapieschema der EAE:** Die Therapie freier GC (schwarze Pfeile) erfolgt an drei Tagen hintereinander während die in Liposomen verpackten GC (roter Pfeil) einmalig am Tag des Therapiestarts injiziert werden. Für histologische Untersuchungen wurden die Tiere nach letzter Therapie getötet

Die graphische Darstellung bezieht sich bei einigen Experimenten auf absolute Versuchstage. Bei anderen Experimenten wurde die Zeitachse der graphischen Darstellung auf Tag „0“ als der Tag des Therapiebeginns standardisiert, sofern dem Experiment mehrere Versuche mit jeweils voneinander abweichendem zeitlichen Ablauf zu Grunde liegen.

## 2.5.2 Gewebeaufbereitung und Immunhistochemie

### Gewebeentnahme

Die Therapie mit freien GCs und den in Liposomen verpacktem Prednisolon wurde mittels histologischer Analyse der an EAE erkrankten Tieren bewertet. Nach sechs Stunden der letzten i.p. GC-Applikation wurden die Tiere mit CO<sub>2</sub> oder mit Ketamin-Xylazin-Lösung narkotisiert. Nach Feststellung von Apnoe und Erlöschen des Fußsohlenreflexes, bei dem die Maus im Falle einer inkompletten Narkose reflektorisch ihre Muskeln anspannt, wurde das Tier an seinen vier Extremitäten gestreckt, so dass die Bauchdecke für die erleichterte Schnittöffnung gespannt war. Für die Gewinnung von Gewebe, das der direkten Weiterverarbeitung dient, wurden anschließend Lebergewebestücke von etwa 30-50 mg herausgeschnitten bzw. die Milz auch im Ganzen entfernt.

Für die Perfusion über die linke Herzkammer wurde das Herz nach Eröffnen des Brustkorbes unter Wahrung großer Gefäße für einen einseharen Zugang einer Kanüle zur Infusion freigelegt. Der rechte Vorhof wurde per incisionem geöffnet; um die Entfernung des Blutes

aus dem Blutkreislauf zu gewährleisten. Zunächst wurde über die linke Herzkammer perfundiert mit 50–80 ml NaCl 0,9% für ca. 5 Min., darauf folgend wurde mit einem Volumen von 100 ml PFA 4% für 10 Min. die Fixation eingeleitet. Kennzeichen einer erfolgreichen Perfusion war dabei eine schnelle Entfärbung des Leberparenchyms. Nach ausreichender Fixation des Gewebes wurde das Gehirn verbunden mit dem gesamten Rückenmark dem Schädel bzw. der Wirbelsäule im Ganzen entnommen. Auch die Milz wurde von jedem Tier entfernt und mitsamt dem ZNS im Rahmen der Nachfixierung im selben Fixativ für ca. 3 Std. aufbewahrt. Nach der Waschung mit PBS Pufferlösung schloss sich das Schneiden von Milz und ZNS in 5 mm dicke Scheiben an. Die Scheiben wurden durch die Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe in die Paraffinphase überführt. Für die Färbungen wurden die in Paraffin eingebetteten Schnitte per Mikrotom 3 µm dünn geschnitten.

### **Immunhistochemische Färbungen für T-Zellen, Makrophagen und APP**

Zur Beurteilung der Zellinfiltrate wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Mayer durchgeführt. Zunächst wurden die Schnitte in der absteigenden Alkoholreihe (2x Xylol, 2x Ethanol 99%, 2x Ethanol 96%, 2x Ethanol 70%, 1x Aqua dest.) entparaffiniert und für 10 Min. in Hämalaun-Lösung gefärbt (Anfärben der Zellkerne). Danach wurden diese kurz mit destilliertem Wasser gespült und anschließend für 10 Min. unter fließendem Leitungswasser gewässert. Die Schnitte wurden einmal mit destilliertem Wasser gespült und für weitere fünf Min. in Eosin-Lösung getaucht (Anfärben der Gewebe). Nach erneutem Spülen in destilliertem Wasser folgte die aufsteigende Alkoholreihe (2x Ethanol 70%, 2x Ethanol 96%, 2x Ethanol 99%, 2x Xylol) zur Entwässerung der Schnitte. Das abschließende Eindecken mit Entellan diente der Konservierung.

Im ersten Schritt der Durchführung immunhistochemischer Färbungen wurden die entparaffinierten Schnitte für 30 Min. einer Mikrowellenvorbehandlung unterzogen, wobei sie entweder in Citratpuffer (0,01 M, pH 6) oder in EDTA Puffer (1 mM, pH 8) bis zum Kochen erhitzt wurden. Durch dieses Verfahren wurden alle möglichen Bindungsstellen für folgende Färbungen freigelegt, da diese aufgrund der PFA-Fixierung vernetzt sein konnten. Nach Abwarten des Abkühlens wurden alle Schnitte erst in destilliertem Wasser, dann in PBS gewaschen. Im Folgenden verweilten die Schnitte bei Raumtemperatur für 30 Min. in 10%iger BSA/PBS Lösung, um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren. Es folgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper (siehe Tab.1) in 1%iger BSA/PBS-Lösung für mindestens 16 Min. bei 4°C. Nach gründlicher Waschung in PBS 10% wurde der Block der endogenen Peroxidase mittels POD-Block für 13 Min. durchgeführt. Anschließend wurde eine nochmalige Waschung mit PBS durchgeführt. Darauf wurden die Schnitte mit dem entsprechend biotinylierten Sekundärantikörper in 1%iger BSA/PBS-Lösung für 45 Min. bei

Raumtemperatur inkubiert und danach intensiv gewaschen. Mit dem ABC-System<sup>®</sup>, einem Peroxidase-gekoppelten (Strept)avidin-Biotin-Komplex, das für 35 Min. bei RT verweilt, wurde der Sekundärantikörper detektiert. Durch Reaktion mit Diaminobenzidin (DAB; Vorgehen nach Herstellerangaben) über 10 -14 Min. bei RT wurden die primär markierten Strukturen gefärbt. Nach Waschung mit destilliertem Wasser wurde mit Ausnahme der Färbung von APP eine Gegenfärbung mit Hämalaun für 15-25 sec. durchgeführt. Für die mikroskopische Begutachtung der Färbung wurden die Präparate in aufsteigender Alkoholreihe ( 2x 70%ig, 2x 90%ig, 2x 96%ig für jeweils 4 Min.) bis zu 2x Xylol je 10 Min. dehydriert sowie mit Entellan dauerhaft konserviert.

Primärantikörper (Verdünnung)	Sekundärantikörper (Verdünnung)	Färbung von:
Rat anti-mouse Mac-3 mAb (1:200)	Anti-Rat IgG (H+L) biot. (1:200)	Makrophagen
Rat anti human CD3 (1:200)	Anti-Rat IgG (H+L) biot. (1:200)	T-Zellen
Mouse anti - Alzheimer Precursor Protein (APP) A4 mAb (1:1000)	Goat anti-mouse/rabbit IgG biot.(1:200)	Axonschaden

**Tab.1: Verwendete Antikörper für immunhistochemische Färbungen des Rückenmark**

### 2.5.3 Histologische Auswertung

Grundlage jeder histologischen Auswertung war die durch eine verblindete Person vorgenommene Datenerhebung durch 400 fach Vergrößerung im Lichtmikroskop und mittels einer Zählkammer mit 10x10 Feldern der Kantenlänge 0,31 mm. Zur Vorgehensweise im Einzelnen:

- Jeweils 3 Querschnitte aus dem zervikalen, thorakalen und lumbalen Rückenmarksabschnitt eines Tieres wurden berücksichtigt.
- Zwei Infiltrationslokalisationen pro Querschnitt mit vergleichbarer Lokalisation in der Fläche wurden über die Fläche der gesamten Zählkammer ausgezählt und als Mittelwert notiert.

Als repräsentativer Wert für die Infiltrationsstärke in einem RM-Querschnitt eines bestimmten RM-Abschnittes wurde die Summe der Mittelwerte geteilt durch die Anzahl der jeweils ausgezählten RM-Querschnitte (= 3) ermittelt.

- Der so gebildete Mittelwert aus den gezählten Zellen wurde durch Multiplikation mit einem konstanten Faktor auf die Infiltratdichte [Zellen/mm<sup>2</sup>] umgerechnet.

Die graphische Darstellung der ausgezählten Zellinfiltrate erfolgte als Zellen/mm<sup>2</sup> +/- SEM.

## 2.6 Nebenwirkungen der Glukokortikoidtherapie

### 2.6.1 T-Zell-Depletion der Milz

Mindestens drei gesunde Tiere pro Gruppe standen für die FACS-Analyse der peripheren T-Zell-Depletion in der Milz zur Verfügung. Nach vorgängiger einmaliger und alternativer Injektion freier GC bzw. liposomaler GC zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten (2.5 Std., 6 Std., 10 Std. und 24 Std.; siehe Tab.2) wurde die Milz entnommen. Freie GC, von denen nur DEX und PRED zum Einsatz kamen, wurden einmalig mit der bekannten Dosis von 100 mg/kg KG injiziert. Liposomale GC wurden einmalig in einer Konzentration von 10 mg/kg KG injiziert. Die dieser Therapie unterzogenen Milzen wurden anschließend für die Weiterbearbeitung in ein Zellkulturmedium überführt. Ziel der unterschiedlich gewählten Zeitpunkte war es, die Pharmakokinetik und die pharmakologische Potenz von konventionellen und liposomalen Glukokortikoiden miteinander zu vergleichen.

Zeitpunkt der GC Injektion vor Organentnahme	100mg/kg i.p. DEX / PRED	10mg/kg i.p. PLP
2.5 Std.	X	X
6 Std.		X
10 Std.	X	X
24 Std.		X
ORGAN	MILZ T-Zell- Depletion	MILZ T-Zell Depletion

**Tab.2: Therapieschema zur Analyse der peripheren T-Zell-Depletion:** Gabe von je 100 mg/kg DEX bzw. PRED zu zwei Zeitpunkten vor Organentnahme. Liposomales Prednisolon in 10 mg/kg Dosis wird zu vier Zeitpunkten vor Milzentnahme injiziert.

#### 2.6.1.1 Herstellen von Einzelzellsuspensionen der Milz

Nach Milzentnahme folgten weitere Arbeitsschritte:

- 1) Durchstreichen der Milz durch ein Metallsieb in eine Petrischale, wobei mit dem Medium Reste von Zellen in das Falcon zurücküberführt wurden.
- 2) Die Zellen wurden bei 1200 rpm für 8 Min. abzentrifugiert, der Überstand wegkippt
- 3) Das Pellet wurde mit 10 ml Medium gewaschen und erneut bei 1200 rpm für 8 Min. zentrifugiert, so dass der Überstand danach verworfen wurde
- 4) Nun wurde das Milzpellet in 10 ml resuspendiert.
- 5) 10 µl Zellsuspension wurden mit Trypanblau 10 µl in einem Eppendorf Behälter gemischt, wovon wiederum 10 µl für das Auszählen der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer entnommen wurden
- 6) Mit dem Mikroskop wurden 16 Kleinquadrate ausgezählt

Die Zellzahl/ml errechnet sich aus:

Zellzahl x Verdünnungsfaktor x  $10^4$  (Faktor für 1000  $\mu\text{l}/\text{ml}$ )

### **2.6.1.2 Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung (FACS)**

Diese Methode bietet die Möglichkeit, Zellen nach ihrer Größe und Struktur voneinander zu unterscheiden. Mit Hilfe von Antikörpern und Proteinen, die gegen spezielle Strukturen gerichtet und ihrerseits direkt oder indirekt mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind, werden die Oberflächenmoleküle der Zellen markiert. Die Zellen werden im Durchflusszytometer einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet, wobei deren Lichtemission zur Detektion führt. Die dabei gestreute und reflektierte Strahlung des Lasers und das von den fluoreszenzmarkierten Antikörpern und Proteinen ermöglichten Aussagen über Granularität und Zellgröße. Somit konnten Aussagen über Zellsubpopulationen, die spezifische Antigene auf ihrer Zelloberfläche tragen, getroffen werden.

Für die FACS Analyse wurden 250.000 Zellen jeder Probe eingesetzt und mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen (5 Min., 1200 rpm, 4 °C). Die Antikörper wurden in vorher ausgetesteten Verdünnungen dazugegeben (siehe Tab.1). Die Proben wurden gut durchmischt und für 15 Min. bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Die Analyse wurde mit FACS Calibur (BD) durchgeführt.

### **2.6.2 Blutzuckerspiegel**

Neben der peripheren T-Zell-Depletion in der Milz, ist auch der Blutglukosespiegel (BZ) glukokortikoiden Einwirkungen ausgesetzt. Die Untersuchungen zur Analyse der unterschiedlichen Einflussnahme der verschiedenen GC auf den Blutglukosespiegel wurden sowohl an gesunden, als auch an EAE erkrankten BL/6-Mäusen durchgeführt. DEX und PRED wurden den jeweiligen Gruppentieren an jeweils drei aufeinander folgenden Tagen in bewährter Dosis von 100 mg/kg i.p. injiziert. Zwei andere Versuchstiergruppen erhielten nur am ersten Tag eine einmalige Injektion PLP entweder zu 10 mg/kg oder 3 mg/kg. Kontrolltiere erhielten äquivalente Volumeninjektionen von NaCl 0,9%.

#### **2.6.2.1 Blutzuckermessung**

Jeweils an drei aufeinander folgenden Tagen wurden nach o.g. Schema (Abb.5) die GC injiziert, der Blutglukosespiegel unter normalen Ernährungsbedingungen täglich um 18 Uhr täglich gemessen. Für die Gewinnung eines Blutropfens zur BZ-Bestimmung wurde mit einem scharfen Skalpell das Endstück der Schwanzspitze durchtrennt und mit einem BZ-Messgerät der Glukosespiegel im Verlauf gemessen.

### **2.6.2.2 Datenerhebung**

Die erstmalig gemessenen BZ-Werte entsprechen dem gruppenintern ermittelten Nullwert, da zuvor noch keine GC verabreicht worden sind. Die Einzelwerte der jeweiligen Gruppenteilnehmer bilden einen Mittelwert. Es wird die absolute Veränderung der Glukosekonzentration im Blut im Vergleich zu dem gruppenspezifisch erhobenen Nullwert angegeben, die auf der Veränderung der täglich ermittelten gruppenspezifischen Durchschnittswerte beruht.

### **2.6.3 Leberenzymexpression**

Glukokortikoide können die Expression von Enzymen regulieren. Darunter sind für den Stoffwechsel relevante Enzyme, wie die Phosphoenolpyruvatkinase (PEPCK) die Tyrosinaminotransferase (TAT) und das Enzym FKBP 501. Für die Bestimmung der quantitativen Expression von Leberenzymen mittels RT-PCR dienten mindestens drei gesunde Tiere pro Gruppe. Nach demselben Therapieschema wie es anhand der Analyse zur T-Zell-Depletion in der Milz nachvollzogen werden kann (siehe Tab.2), wurden sowohl alternativ und einmalig applizierte GC bzw. Liposomen injiziert. Gleichzeitig erhielten Kontrolltiere ein äquivalentes Volumen von NaCl 0,9%.

Die Expressionsrate wurde auf der Basis der gewonnen mRNA im Weiteren mit Hilfe der Methode der RT-PCR ermittelt (siehe 2.6.3.3)

#### **2.6.3.1 Gewinnung von Lebergewebe**

Zu den bereits vier festgelegten Zeitpunkten (siehe Tab. 2), in denen eine GC-Injektion der Organentnahme vorausging, wurden die Tiere durch rasche Diskonnektion des Gehirns vom Rückenmark getötet, um ihnen unmittelbar drei ca. 50 mg schwere Gewebestücke der Leber zu entnehmen. Bei -80 °C wurden weitere Proben in sterile Behälter Kryotubes (CryoTube™ Vials; Nunc; Roskilde, Dänemark) unmittelbar nach Entnahme in Flüssigstickstoff schockgefroren und konserviert. Ein Teil des Gewebes wurde immer sofort weiterverarbeitet.

#### **2.6.3.2 Isolation von tRNA-Trizol-Methode**

Nach vorausgegangener Lyse und Homogenisierung des Gewebestückes mit Hilfe eines Häckslers wurden diese in ein Röhrchen mit 1 ml Trizol überführt. Danach folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur (RT) für 5 Min.. Die Phasenseparation wurde nach Beifügen von 200 µl Chloroform (pro 1 ml Trizol in original Präparation) erreicht. Für 15 Min. wurde das Gemisch bei 13.000 rpm zentrifugiert, so dass die RNA in der oberen, wässrigen Phase in ein neues 1,5 µl Eppendorf Gefäß transferiert werden konnte. Das Ausfällen der RNA wird per Zugabe von 0,5 ml Isopropanol herbeigeführt. Für mindestens 10 Min. wurde das

Gemisch bei RT inkubiert und anschließend für 10 Min. bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ein kleines, weißes Pellet, das die RNA enthält, verworfen. Die Reinigung der gewonnenen RNA erfolgte in 1 ml Ethanol 70% (pro 1ml Trizol in original Präparation). Nach guter Durchmischung und Zentrifugation bei 4.000 rpm für 5 Min. wurde der Überstand verworfen und die Waschung wiederholt. Das Auf- und Abpipettieren der RNA in 89 µl Nuclease-freiem Wasser führt zur Auflösung des Pellets. Nach Zufügen von 10 µl DNase-Puffer und 1 µl DNase I wurde die Lösung bei 37 °C für 30 Min. inkubiert. Für die erneute Reinigung der gewonnenen total RNA wurde anschließend nach dem Protokoll aus dem RNeasy MiniKit® (Qiagen GmbH, Hilden) verfahren.

### 2.6.3.3 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription von RNA in DNA ist Voraussetzung für eine Amplifizierung der cDNA mit Hilfe der Taqman Polymerase Ketten Reaktion. Dafür wurden 200 ng RNA eingesetzt. Das dafür notwendige Volumen wurde nach Bestimmung der RNA Konzentration ermittelt. Mittels Verdünnung der gewonnen RNA mit Nuclease-freiem Wasser wurde die nötige Konzentration von 200 ng/µl für alle Proben erzielt.

Der 1. Ansatz enthielt:

- 200 ng RNA in Nuclease freiem Wasser gelöst
- 500 ng Oligo(dT)
- 10 nmol Trinukleotidphosphate (dTNP) Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).

Mit RNase-freiem Wasser wurde das fehlende Volumen auf ein Gesamtvolumen von 12 µl ergänzt. Für 5 Min. bei 65 °C wurde der 1. Ansatz inkubiert, so dass sich die RNA entfalten kann und Sekundärstrukturen aufbrechen. Die Synthese einer zur RNA komplementären cDNA übernimmt das Enzym Reverse Transkriptase.

Dieses ist im 2. Ansatz enthalten:

- 4 µl 5facher Reverse-Transkriptase-Puffer
- 1 µl Reverse-Transkriptase-Enzym
- 3 µl RNase freies Wasser.

Dieser wurde mit einem Gesamtvolumen von je 8 µl zu den einzelnen Proben hinzu pipettiert. Es folgten zunächst für 50 Min. bei 42 °C die Reverse Transkription, danach für 15 Min. bei 72 °C die Denaturierung. Die Proben wurden anschließend bei -20 °C konserviert bzw. nach einer Verdünnung (1:20) mit Nuclease-freiem Wasser auf Eis gestellt und für die folgende Polymerase-Kettenreaktion (PCR), siehe dazu Punkt 6.3.4, eingesetzt.

### 2.6.3.4 Polymerase-Kettenreaktion

Diese Methode ermöglicht die quantitative Bestimmung der Genexpression auf der Stufe der gemessenen Menge an exprimierter mRNA.

Hier wurden alle PCR Reaktionen gemäß der  $\Delta\Delta C_t$  Methode (Livak und Schmittgen 2001) ausgewertet, wobei als „endogene Kontrolle“ ein Referenzgen neben der eigentlichen Zielsequenz amplifiziert wird. Dieses sog. „Housekeeping Gene“ setzt die Menge der Ziel RNA in ein Verhältnis mit der in der Probe insgesamt vorkommenden RNA.

Es wurde die Expression von drei Leberenzymen

- Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK)
- Tyrosinaminotransferase (TAT)
- FK-Binding Protein 501 (FKBP501)

untersucht, von denen bekannt ist, dass GC deren Expression regulieren.

Als „Housekeeping Gene“ dient HP1 mRNA.

Das Gewebe entstammt den in Punkt 3.1 näher beschriebenen Prozess. Die verwendeten Primer sind:

TAT Forward Primer 5`-CCT CTG GAA GCT AAG GAT GTC ATT-3`

TAT Reverse Primer 5`-AAC ACG GCT AGA CAC AGC TCA A-3`

PEPCK Forward Primer 5`-AAA GCA TTC AAC GCC AgG TT-3`

PEPCK Reverse Primer 5`-TGC TGA ATG GGA TGA CAT ACA TG-3`

FKBP501 Forward Primer 5`-GAA CCT GGC CAT GTG CTA CCT-3`

FKBP501 Reverse Primer 5`-GTC CAG TCC AAG GGC CTT GT-3`

HP1 Forward Primer 5`-GCC CAA GAT GGA CGC AAT C-3`

HP1 Reverse Primer 5`-CCG AGG CGC CAG TCT TC-3`

Ein Ansatz von 25  $\mu$ l Gesamtvolumen für die RT-PCR der gewonnenen DNA wurde wie folgt zusammenpipettiert

<u>Mastermix</u>	<u>Cyclerprogramm</u>		
12,5 $\mu$ l 2x MasterMix (Invitrogen)	2 Min.	50 °C	} 40 Zyklen
10 $\mu$ l cDNA	1 Min.	95 °C	
1 $\mu$ l RNase freies Wasser	0.25 Min.	95 °C	
0,23 $\mu$ l Primer 3`	60 Min.	60 °C	
0,23 $\mu$ l Primer 5`			
0,05 $\mu$ l Rox			
1 $\mu$ l SYBR Green 1:1000			

## 2.6.4 Insulinkonzentration

Der Insulinspiegel im Serum ist ebenso glukokortikoiden Einwirkungen ausgesetzt, was nachfolgend näher analysiert wurde. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) zählt zu den quantitativen Immunoassays, mit denen man Antigenkonzentrationen durch Bestimmung des Substratumsatzes kolorimetrisch bestimmen kann (Engvall und Perlmann 1971).

### 2.6.4.1 Serumgewinnung

Für die Bestimmung des Insulinwertes war es wichtig das Blut unter geringer Stresseinwirkung auf die Tiere zu gewinnen, da der Insulinspiegel sensibel auf die Sekretion endogener Stresshormone reagiert. 20 µl Vollblut sind nötig, um mindestens 5 µl Serum zu gewinnen. Dafür wurden nach Schnittdurchtrennung des Schwanzendes ausreichend Bluttopfen in SST™ Tubes (BD Microtainer®) überführt. Die Proben wurden auf Eis gestellt und nach 30 Min. bei 9000 rpm für 2 Min. zentrifugiert. Das im Überstand vorhandene Serum wurde in kleinen Eppendorf Behältern bei -20 °C konserviert. Für die letzte Bestimmung des Insulinwertes wurden die Tiere getötet und nach Thoraxeröffnung wurde das Blut mittels Punktion des Herzens gewonnen.

## 2.7. Genotypisierung von GRN<sup>+/-</sup> - und LckCre/GR<sup>flox</sup>-Mäusen

### 2.7.1 Gewinnen von DNA

Für die Gewebeaufbereitung wurde auf 3-Wochen alte Mäuse zurückgegriffen. Ein 5 mm großes Gewebestück der Schwanzspitze wurde mit 500 µl Lysispuffer und 25 µl Proteinase K (10 mg/ml) bei 56 °C über Nacht zur Lyse und Homogenisierung gebracht. Am nächsten Tag wurde die Enzymaktivität in den Proben durch Aufkochen bei 90 °C für 5 Min. gestoppt. Nach Zentrifugieren für 5 Min. bei 14.000 rpm wurde der DNA enthaltende Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt.

Für die Ausfällung der DNA wurden 500 µl Isopropanol beigefügt und durchmischt, bevor erneut bei 14.000 rpm 5 Min. lang zentrifugiert wurde. Der Überstand mit Isopropanol wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet mit DNA mit Ethanol 70% gewaschen. Nach Zentrifugieren (5 Min. / 14.000 rpm) der Proben wurde das überschüssige Ethanol abgenommen und die Probe solange an der Luft getrocknet bis der Ethanol vollkommen verdunstet war. In dem zugegebenen Volumen von 100-200 µl DNase-freiem Wasser löste sich die DNA innerhalb von ca. 30 Min. bei 40 °C auf.

## 2.7.2. Amplifikation von DNA

### GRN<sup>+/-</sup>-Tiere

Durch die Methode der PCR wurden die DNA-Proben der Tiere amplifiziert, um einen Nachweis für das Vorliegen von Wildtyp- bzw. Knock-out Tieren erhalten zu können. Die DNA wurde im Agarosegel mittels elektrischem Feld aufgetrennt. Der Mastermix für die PCR pro

1 µl der gewonnenen DNA wurde wie folgt zusammenpipettiert:

<u>Mastermix</u>		<u>Cyclerprogramm</u>		
2,5 µl	10x Puffer (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	5 Min.	94 °C	} 35 Zyklen
1,0 µl	dNTPs (5mM)	1 Min.	94 °C	
0,5 µl	Primermix (10 µM)	1 Min.	60 °C	
1,0 µl	Taq-Polymerase (1U/µl)	1 Min.	72 °C	
19 µl	Wasser	10 Min.	72 °C	

Der Primermix bestand aus folgenden Primern/Sequenzen (Fa. Metabion):

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

Nach der PCR wurden mindestens 10 µl der Proben mit 2 µl eines sechsfach Ladepuffer vermischt und auf ein ethidiumbromidhaltiges Agarosegel (1,5 %) aufgetragen, wobei die erste Geltasche mit einem Standard des Molekulargewichts (Mass Ruler-Low Range) befüllt wurde. Mittels UV-Licht wurden die Banden nach einer Laufzeit von 60 Min. bei 80 Volt detektiert und auf ihre Intaktheit hin geprüft. GRN<sup>+/-</sup>-Tiere wiesen eine Bande bei ca. 225 Basenpaaren (bp) auf, die spezifisch für den GR ist. Nur bei den Knock-out-Tieren war eine zweite Bande bei 520 bp vorhanden.

### LckCre/GR<sup>flox</sup>-Tiere

Die Gewinnung der DNA verläuft nach selbem Prinzip wie für die GRN<sup>+/-</sup>-Tiere ( siehe 2.7.1). Folgende Primer/Sequenzen wurden eingesetzt, um das Gen der Cre-Rekombinase zu amplifizieren:

Primer 1084	5' GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC 3'
Primer 1085	5'GTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT 3'

Der 2. Ansatz enthielt pro 2 µl der gewonnenen DNA:

<u>Mastermix</u>		<u>Cyclerprogramm</u>		
3µl	dNTPs (2 mM)	5 Min.	94 °C	} 40 Zyklen
1 µl	Primer 1084 (25 pM)	0,5 Min.	94 °C	
1 µl	Primer 1085 (25 pM)	0,5 Min.	56 °C	
3 µl	10x Puffer	0,5 Min.	72 °C	
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub>	10 Min.	72 °C	
0,3 µl	Taq-Polymerase (5U/µl)			
18,2 µl	Wasser			

Nach Auftragen der DNA Proben auf einem Agarosegel bei 80 Volt für 60 Min. konnte bei Knock-out Tieren das Vorhandensein einer Bande bei ca. 100 bp detektiert werden, was die Expression der Cre-Rekombinase nachweist.

## 2.8 Liposomen

Alle Liposomen wurden durch J.M. Metselaar, Abteilung für Pharmazie, Institut für pharmazeutische Wissenschaften, Utrecht in Holland, zur Verfügung gestellt.

Die Herstellung der Liposomen erfolgte durch die Film Extrusions Methode nach Amselem (Amselem et al. 1993). Dabei wurden zunächst die Lipide in Ethanol mit Dipalmityl-Phosphatdiylcholin (Lipoid GmbH, Ludwigshafen), Poly-Ethylen-Glykol (PEG) 2000-Distearyl-Phosphatidylethanolamin und Cholesterin (Sigma Chemical Co., Poole, United Kingdom) gelöst. Das Verhältnis betrug 1,85 : 0,15 : 1. Anschließend wurde das Lösungsmittel in einem Rundkolben per Rotationsverdampfer abgezogen, so dass ein Lipidfilm übrig blieb. Die Rehydrierung folgte mit einer Lösung 100 mg/ml Prednisolon in sterilem Wasser. (Vorhandene Liposomen haben unterschiedliche Größen). Mit Hilfe der mehrfach durchgeführten Extrusion durch Filter bestehend aus Polycarbonatmembranen, wurden Liposomen auf ihre Größe hin normiert. Nicht-entkapsulierte Prednisolon-Lösung wurde per Dialyse gegen PBS entfernt. Die cut-off-Grenze der Dialyse Kassetten lag bei einem Molekulargewicht von 10.000 (Pierce, Rockford, IL, USA). Die normierte Größe der Liposomen lag bei einem Durchmesser von 90-100 nm, welcher mit Hilfe der Photonenkorrelationsspektroskopie (dynamic light scattering) (Malvern 4700 System) detektiert wurde.

Nach Extraktion der liposomalen Lösung mit Chloroform wurde im Anschluss daran in der organischen Phase der Inhalt an Phospholipiden mit einem Phosphat Assay nach Rouser et al. bestimmt. Der Prednisoloninhalt wurde in der wässrigen Phase bestimmt. Zuletzt wurde

der Gehalt an Prednisolon und Phosphatester mit der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, „*high performance liquid chromatography* (HPLC)“, gemessen. Dafür wurde die mobile Phase von Acetonitril-haltigem Wasser (pH 2), sowie ein UV Detector bei 254 nm, verwendet. Die liposomale Lösung enthielt 4,5 mg Prednisolon/ml und 60 µl/ml Phospholipid.

## **2.9. Statistik**

Die Statistik wurde mit der Software Graph Pad Prism Version 4, durchgeführt. Der Mann-Whitney-U Test wurde für den Vergleich zweier nicht normal verteilter und nicht gepaarter Gruppen mit kleinen Stichprobenumfängen angewendet. Der Unterschied im Krankheitsverlauf der EAE unter der jeweiligen Therapie wurde mit dem Vergleich des kompletten Verlaufs der Therapiegruppen bestimmt. Alle Daten wurden als Durchschnittswerte +/- Standardfehler angegeben. p-Werte > 0,05 wurden als nicht signifikant (n.s.) betrachtet; \*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01, \*\*\*p ≤ 0,001.

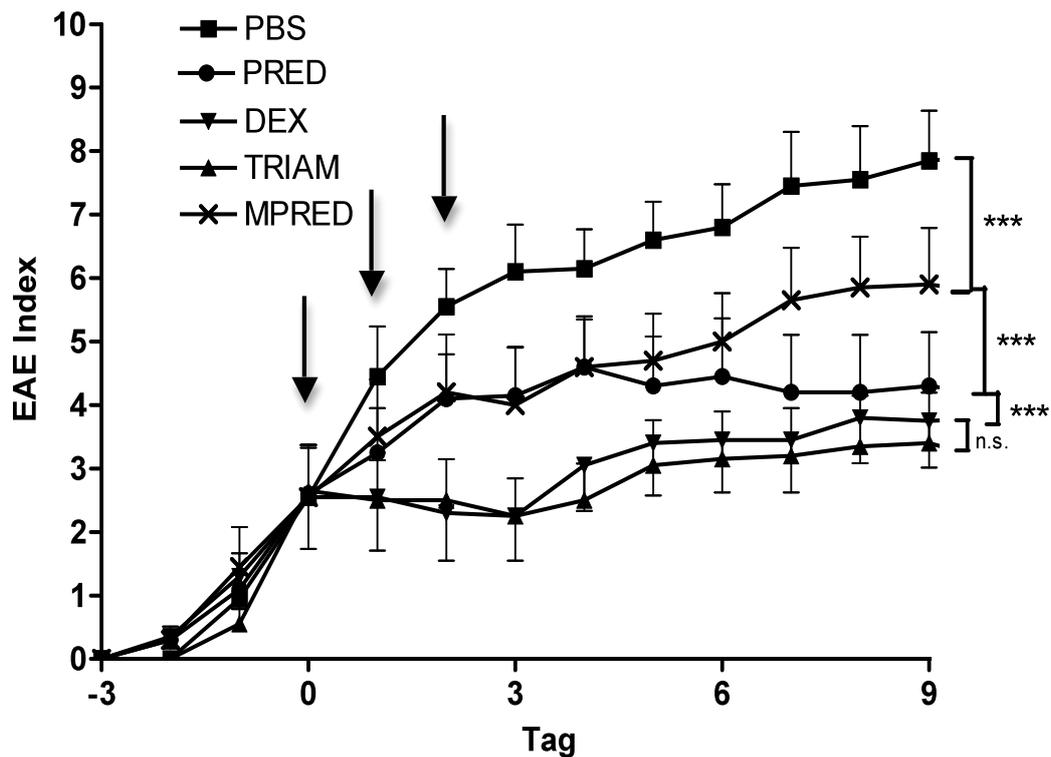
### 3. Ergebnisteil

#### 3.1 Vergleich der Wirkung unterschiedlicher synthetischer GC auf den Krankheitsverlauf der MOG-EAE in BL/6-Mäusen

Die Therapie war mit Injektionen des jeweiligen GC an drei aufeinander folgenden Tagen, Tag 0, 1 und 2 von je 100 mg/kg KG Mausgewicht i.p. hoch dosiert. Eine Kontrollgruppe erhielt i.p. ein äquivalentes Volumen von PBS. Die Behandlung der an EAE erkrankten Tiere wurde bei einem durchschnittlichen Krankheitsstadium mit einem EAE-Index von 2-3 begonnen (siehe Details zu EAE-Index unter Material und Methoden 2.5).

Der Verlauf der EAE bis zum 1. Therapietag war für alle fünf Gruppen gleich. Die Tiere, die erstmalig mit je 100 mg/kg KG DEX oder TRIAM behandelt wurden, zeigten sofort einen klinisch beobachtbaren Therapieeffekt, der sich in einer unterbrochenen Intensivierung der Symptomatik äußert. Diese Wirkung, wobei sich DEX und TRIAM nicht signifikant voneinander unterschieden ( $p = n.s.$ ), hielt zunächst für drei weitere Tage an und zum Ende der Beobachtungszeit konnte nur eine geringe Verschlechterung der Klinik registriert werden (Abb.6). Im Gegensatz dazu kann mit Beginn der Therapie mit MPRED und PRED das Fortschreiten der Krankheit nicht aufgehalten werden. Deren therapeutische Wirkung wird dennoch durch eine abgeschwächte Progression der EAE im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich, die stetig an Krankheitsschwere hinzugewannen (Abb.6). An Tag 5 post Therapiebeginn verhielt sich der EAE-Index der mit PRED therapierten Tiere auf einem konstanten Niveau, während die mit MPRED behandelte Tiergruppe bis zum Ende der Beobachtungszeit einen zunehmend schlechteren EAE-Index erreichte (Abb.6).

Die sterisch sehr ähnlich aufgebauten GC DEX und TRIAM (siehe Abb.2 auf Seite 11) erwiesen sich in der Therapie der EAE klar überlegen gegenüber der Verwendung von PRED und MPRED. Dabei stellte sich heraus, dass die Wahl synthetischer GC mehr oder weniger stark die Symptomatik des klinischen Verlaufes der MOG-EAE in der BL/6-Maus abschwächte.



**Abb.6: Therapeutische Gabe von DEX und TRIAM zeigt jeweils überlegenen Therapieeffekt auf den klinischen Verlauf gegenüber der Gabe von PRED oder MPRED.** Darstellung des EAE-Verlaufes bei männlichen BL/6-Mäusen immunisiert mit MOG<sub>35-55</sub>. Tage sind nicht absolut repräsentativ aufgrund einer Darstellung zwei unabhängig voneinander durchgeführter Experimente mit abweichendem Therapiebeginn; Tag 0 = Tag X nach Immunisierung (siehe Material und Methoden 5.1, Abb.1). Schwarze Pfeile: Therapie i.p. applizierter GC je 100 mg/kg KG, bzw. mit PBS für Kontrollgruppe, an Tag 0/1/2. \*\*\* =  $p < 0.001$ ;  $n = 10$

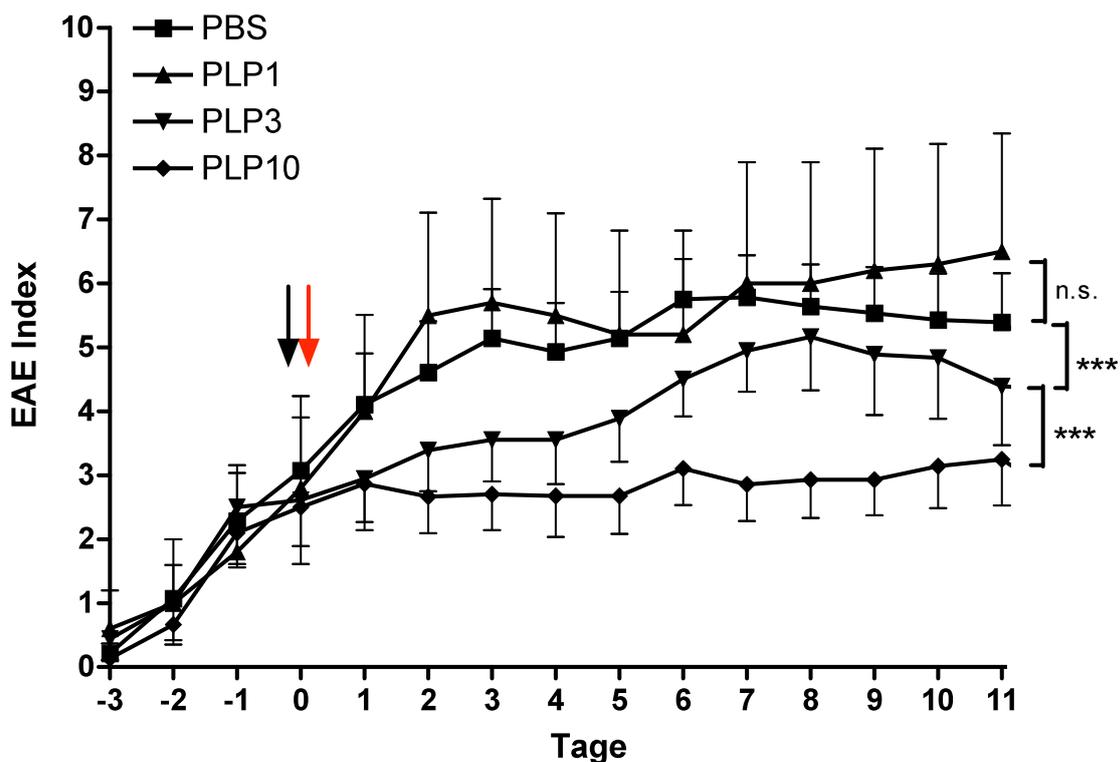
### 3.2. Therapeutische Wirkung der Liposomen

In den folgenden durchgeführten Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde die Therapie einer einmaligen Injektion unterschiedlicher Dosierung von PLP1, PLP3 und PLP10 bei der mit MOG<sub>35-55</sub> induzierten EAE in der Maus untereinander verglichen.

Der stärkste Wirkungseffekt trat in der mit PLP10 therapierten Gruppe in Form der unterbrochenen Progression der EAE ein (Abb.7) und hielt bis zum Ende der Beobachtungszeit an. Der Verlauf dieser Gruppe unterschied sich signifikant ( $p < 0,001$ ) von dem Verlauf der mit PLP3 therapierten Gruppe, bei welcher nur ein weniger stark ausgeprägter Zugewinn an Krankheitssymptomen nach Therapiestart an Tag 0 beobachtet wurde. Dennoch bleibt der EAE-Verlauf dieser Therapiegruppe signifikant ( $p < 0,001$ ) unter dem der mit PLP1 therapierten Gruppe. Im Vergleich der mit PLP1 therapierten Gruppe mit der Kontrollgruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Therapie der EAE.

Der Schub der durch MOG<sub>35-55</sub> induzierten EAE im Mausmodell konnte nach einmaliger Applikation von PLP abhängig von deren Dosis erfolgreich behandelt werden.

In folgenden Versuchen wurde fortan ausschließlich mit zwei Therapiedosen, 3 mg/kg KG und 10 mg/kg KG PLP gearbeitet.



**Abb.7: Dosisabhängige Verbesserung des klinischen EAE-Verlaufes nach therapeutischer Gabe von PLP.** Darstellung des EAE-Verlaufes entsprechend Abb.6. Roter Pfeil: Therapie mit PLP 1, PLP 3 oder PLP 10 an Tag 0. Schwarzer Pfeil: Gabe von PBS für Kontrollgruppe; \*\*\* =  $p < 0.001$ ;

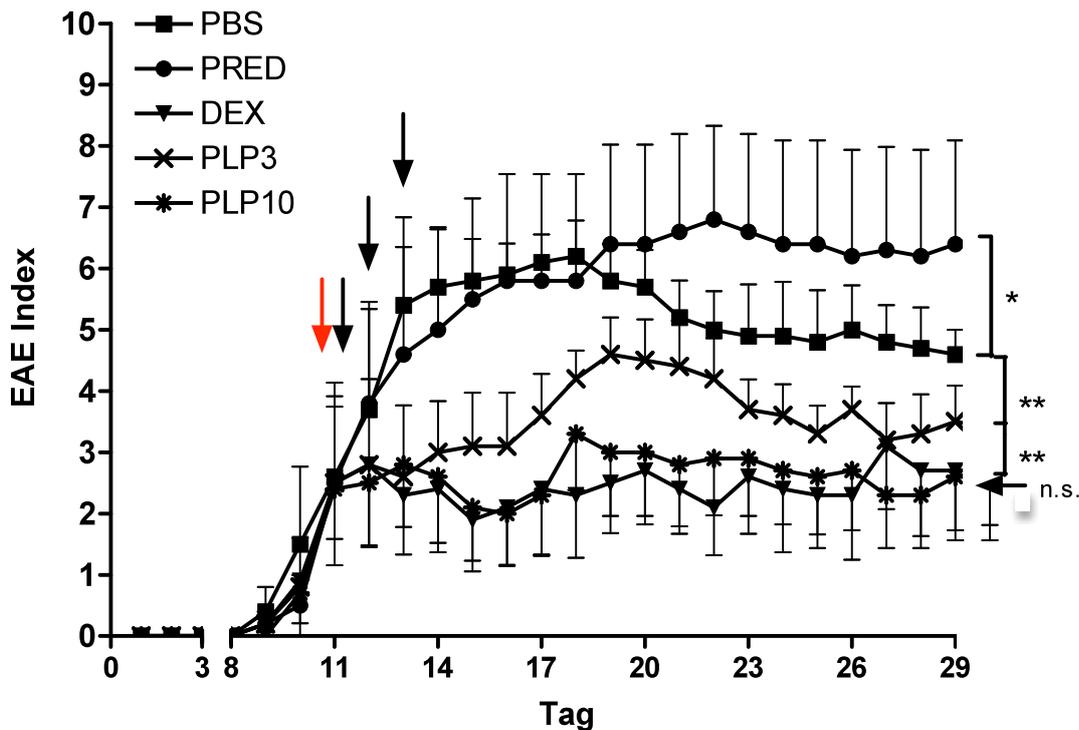
n = 5 - 15

### **3.2.1 Vergleich von PLP mit DEX und PRED in der Therapie der EAE**

Bisher wurde für die Untersuchungen in der Therapie der monophasischen EAE auf das Modell der Lewis-Ratte zurückgegriffen. Dort wurde die aktiv induzierte EAE erfolgreich mit einmaliger i.v. Injektion von PLP10 behandelt und erwies sich gegenüber freiem MPRED als überlegen (Schmidt et al. 2003). In den zuvor durchgeführten Experimenten konnte die Wirksamkeit dieser therapeutischen Dosis auch im Mausmodell bestätigt werden (Abb.7).

Die Wirksamkeit der PLP im Vergleich mit freiem DEX und freiem PRED wurde im beschriebenen Modell der C57BL/6-Maus neu beurteilt. In einem ersten Versuch wurde der Therapieeffekt der PLP-Applikation mit der Wirksamkeit einer konventionellen Applikation von PRED und DEX anhand der Beobachtung des klinischen Verlaufes der EAE beurteilt (Abb.8). Die Injektion der Liposomen für die Mäuse beider Therapiegruppen erfolgte i.p. in einer äußerst geringen Dosierung von nur 3 mg/kg KG bzw. 10 mg/kg KG einmalig an Tag 11. Stattdessen wurden die Tiere der Vergleichsgruppen mit der sehr hohen Dosis von 100 mg/kg KG DEX bzw. PRED an drei aufeinander folgenden Tagen, Tag 11, 12 und 13 therapiert. Im absoluten Vergleich wurden somit über den gesamten Therapieverlauf nur 1% (für 3 mg/kg KG PLP vs. 3x 100 mg/kg KG freie GC) bzw. 3,3% (für 10 mg/kg KG PLP vs. 3x 100 mg/kg KG freie GC) der GC-Dosis in Form von Liposomen gegenüber der konventionellen Applikationsform hoch dosierter, freier GC appliziert. Nach Therapiestart zeigte sich sowohl für DEX, wie auch für PLP10 eine initial eintretende Unterbrechung des sich klinisch verschlechternden EAE-Verlaufes im akuten Schub (Abb.8). Der Therapieeffekt durch PLP10 und DEX hielt bis zum Ende der Beobachtungszeit an Tag 29 an und resultierte in einem konstant niedrigen EAE-Index. Ein signifikanter Unterschied im Verlauf beider Therapiegruppen bestand nicht. Die Therapie unter PLP3 bewirkte bei den Tieren einen durchschnittlich mildereren Verlauf der EAE mit moderatem Zugewinn weiterer Symptome. Im Vergleich dazu zeigte in diesem Experiment der Verlauf unter hoch dosierter Therapie mit konventionellem PRED keinen therapeutischen Effekt.

Eine einzige Applikation des stark geringer dosierten PLP10 war gleich effektiv in der Therapie der EAE wie eine hoch dosierte Applikation von 100 mg/kg KG DEX an je drei Tagen.



**Abb.8 Vergleich der gering dosierten PLP mit hoch dosierten GC in der Therapie der MOG-EAE.**

Schwarze Pfeile: Therapie mit je 100 mg/kg KG DEX bzw. PRED oder PBS für die Kontrollgruppe an den Tagen 11, 12 und 13. Roter Pfeil: Therapie mit PLP 3 bzw. PLP 10 einmalig an Tag 11;

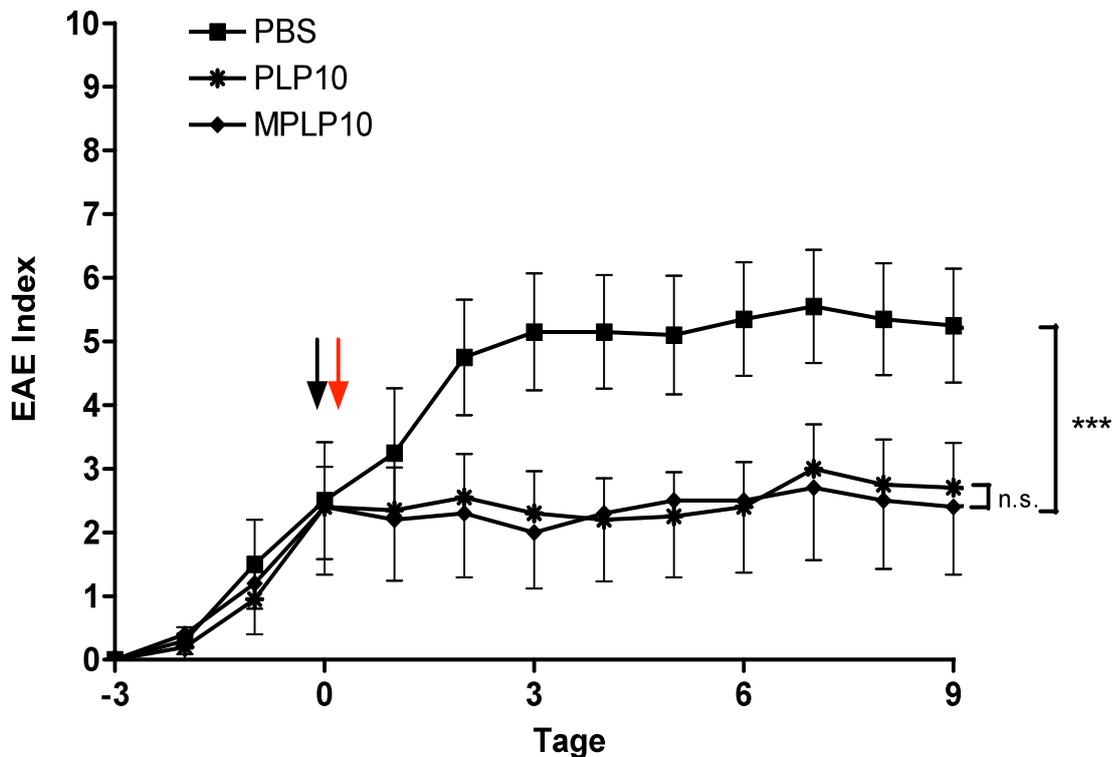
\*\* =  $p < 0.01$ , \* =  $p < 0.05$ ; Jeder Punkt steht für den Mittelwert aus 5 Tieren

Die Wirksamkeit von freiem PRED konnte in diesem Versuch nicht bestätigt werden. Im Vergleich dazu wurde die Diskrepanz in der wirkungsvollen Behandlung der EAE zu Gunsten der absolut geringeren Dosis von Prednisolon mittels PLP deutlich.

### 3.2.2 Vergleich von verschiedenen GC verpackt in Liposomen

In dem durchgeführten Vergleich freier GC konnte ein besserer Therapieeffekt von MPRED gegenüber PRED in der Therapie der EAE beobachtet werden. Daher ist es von großem Interesse zu erfahren, ob sich auch im Vergleich beider GC, jeweils verpackt und transportiert in Liposomen (PLP und Methylprednisolon in Liposomen (MPLP)), ebenfalls ein Unterschied in der Therapie der EAE beobachten lässt. Zuvor zeigte ein Vergleich von Liposomen mit MPLP mit PLP in der EAE-Therapie an Ratten einen besseren Effekt von MPLP auf den klinischen Verlauf der EAE unter Verwendung einer Dosis von je 10 mg/kg KG (Linker et al. 2008). Die Mäuse beider Therapiegruppen erhielten je eine einmalige i.p. Injektion von 10 mg/kg KG PLP bzw. 10 mg/kg KG MPLP (MPLP10) an Tag 0. Der progressive Verlauf der EAE konnte sowohl unter der Therapie mit PLP10 als auch mit

MPLP10 aufgehalten werden (Abb.9). Ein langwirksamer Therapieeffekt war bei konstantem EAE-Index am Tag 9 nach Behandlungsbeginn erkennbar. In der Untersuchung zur Wirksamkeit liposomaler GC auf den Krankheitsverlauf der EAE im Mausmodell wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt. Die Applikationsart der GC ist für den therapeutischen Effekt von größerer Relevanz als die Wahl des GC, welches in Form der Liposomen transportiert wird. Für einen Vergleich der liposomalen Therapie mit dem wesentlich stärker potenten DEX standen DEX-Liposomen leider nicht zur Verfügung.

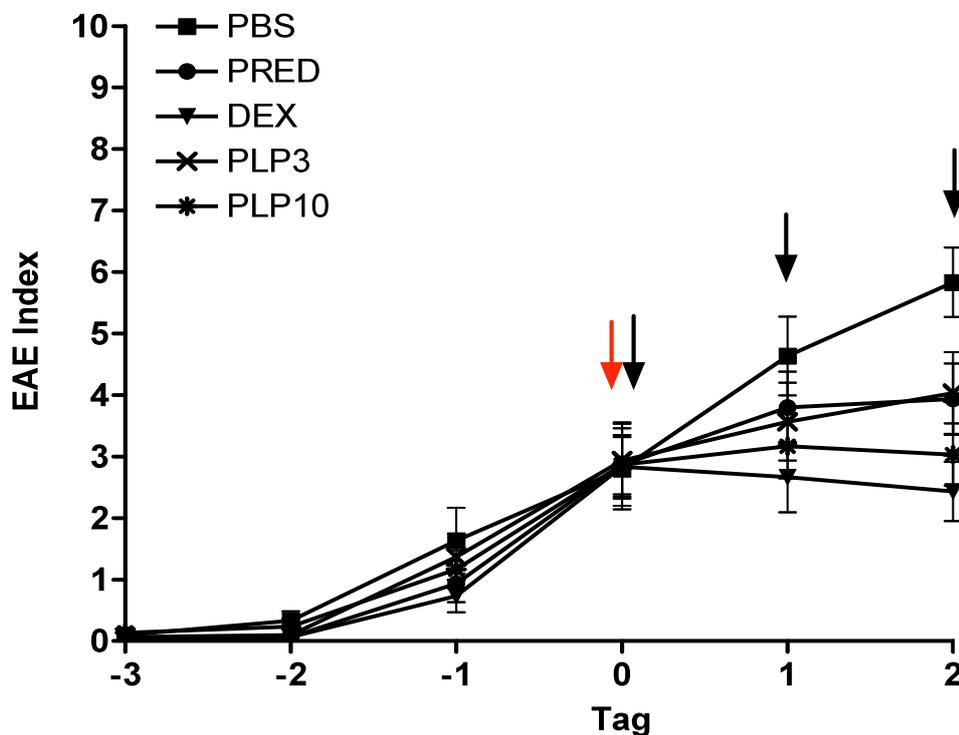


**Abb.9 Vergleich von zwei verschiedenen GC verpackt in Liposomen in der Therapie der MOG-EAE.** Darstellung des EAE-Verlaufes entsprechend Abb.6. Roter Pfeil: Einmalige Gabe von MPLP 10 oder PLP 10 an Tag 0. Schwarzer Pfeil: Gabe von PBS für die Kontrollgruppe an Tag 0. \*\*\* =  $p < 0.001$ ;  $n = 5 - 10$  ( $n$  PBS = 10,  $n$  PLP 10 = 10,  $n$  MPLP 10 = 5)

Gegenstand der nachfolgenden histopathologischen Untersuchungen ist es, nach dem bereits mehrfach klinisch bestätigten Therapieeffekt der PLP, eine mögliche Reduktion der Zellinfiltrationen in Läsionen des RM der Mäuse zu untersuchen.

### 3.3 Histologische Untersuchungen zur GC-Wirkung auf Zellinfiltration und Axonschaden im Rückenmark

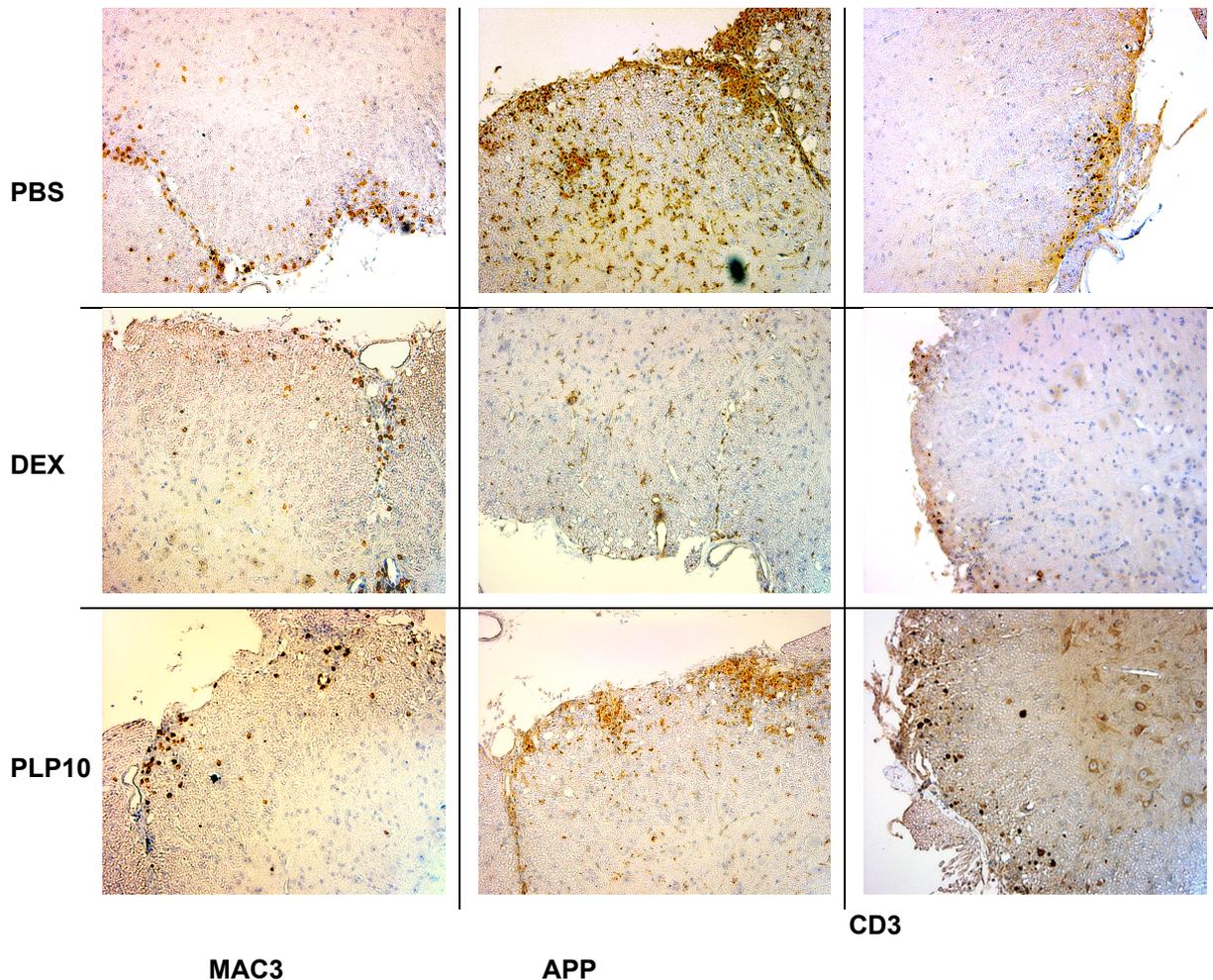
Um die klinisch beobachteten Therapieeffekte auch histologisch nachweisen zu können, wurden Rückenmarksquerschnitte auf Zellinfiltrationen von T-Zellen und Makrophagen hin untersucht. Diese Infiltrationen stellen das pathologische Korrelat des Entzündungsgeschehens dar (siehe Abb.1 auf Seite 4). Besonders im akuten Stadium der EAE wurden hohe Zellinfiltrate im ZNS nachgewiesen (Traugott, 1989). Deshalb wurde unmittelbar nach letzter GC-Therapie (= Tag 2) das Experiment für eine immunhistochemische Analyse des RM in diesem Krankheitsstadium beendet (siehe Material und Methoden 2.8.2). Während der kurzen Beobachtungszeit waren bereits die unterschiedlich starken Behandlungseffekte in den jeweiligen Therapiegruppen erkennbar (Abb.10, siehe vergleichend dazu Abb.8). In diesem Experiment konnte der zuvor in Abb.6 zu beobachtende therapeutische Effekt von PRED reproduziert und bestätigt werden.



**Abb.10: Vergleich des gering dosierten Prednisolons in Liposomen (PLP) mit hoch dosierten GC in der Therapie der MOG-EAE.** Darstellung des EAE-Verlaufes entsprechend Abb.6.

Schwarze Pfeile: Therapie mit je 100 mg/kg KG DEX bzw. PRED bzw. Gabe von PBS für die Kontrollgruppe an den Tagen 0, 1 und 2. Roter Pfeil: Therapie mit PLP3 bzw. mit PLP 10 einmalig an Tag 0. Abbruch der Experimente an Tag 2 für immunhistochemische Analysen; n = 15-16.

Abb.11 bildet beispielhaft das histopathologische Korrelat im RM nach Therapie des begonnenen akuten Schubes ab. Die Morphologie des RM ist unterschiedlich stark geprägt von dem Nachweis für T-Zellen, Makrophagen und Axonschaden. Die jeweilige Therapie mit hoch dosiertem DEX, niedrig dosierten PLP oder der Gabe von PBS in Kontrolltieren prägt dabei das Ausmaß der Zellinfiltrate unterschiedlich stark.

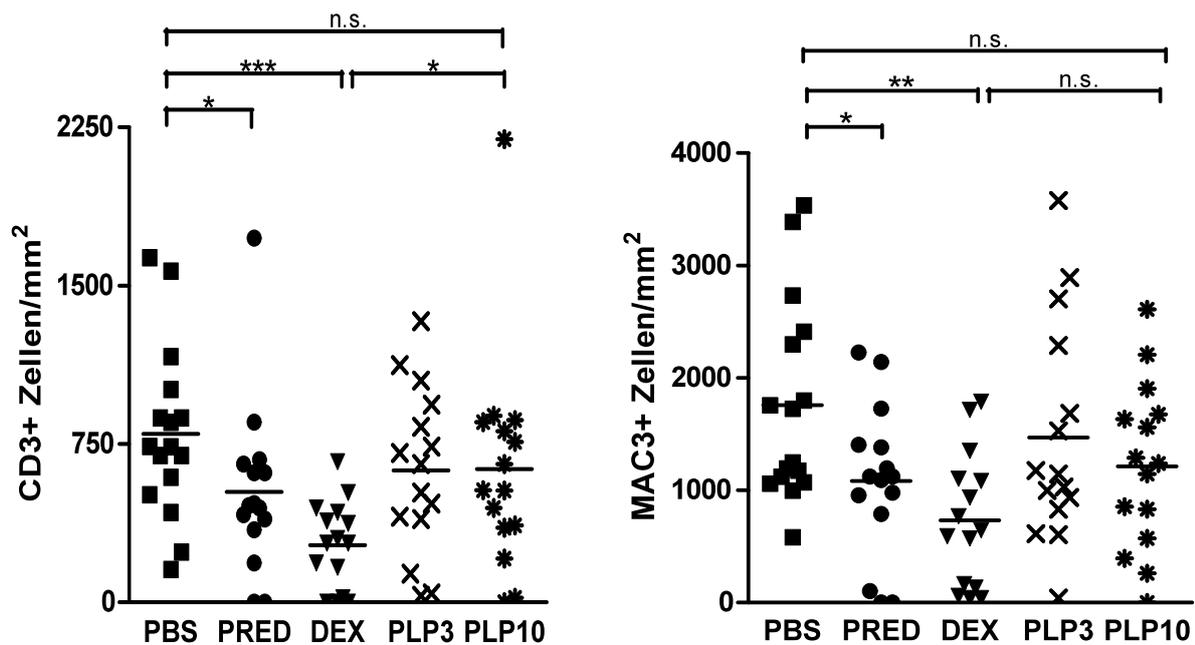


**Abb.11: Immunhistochemische Färbungen im lumbalen RM von Mäusen in der Therapie des akuten Schubes der MOG-EAE.** Spalte von links nach rechts: T-Zellen (CD3+), Makrophagen (MAC3+) und Amyloid-Precursor-Protein (APP); Zeile von oben nach unten: Histopathologisches Korrelat im RM nach Gabe von PBS bzw. Therapie mit 100 mg/kg KG DEX an je drei Tagen und einmalig mit PLP10; 200fache Vergrößerung im Lichtmikroskop

Die Daten der histologisch aufbereiteten Querschnitte des RM geben eine signifikant ( $p < 0,001$ ) reduzierte Anzahl an Infiltrationen von T-Zellen und Makrophagen im RM von DEX behandelten Tieren verglichen mit denen der PBS und PLP10 Gruppe an (Abb.12).

Eine Therapie mit PRED erwies sich hinsichtlich einer reduzierten Zellinfiltration als weniger effektiv im Vergleich mit DEX. Dennoch blieb die Zellzahl der PRED-Gruppe signifikant geringer ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu einer hohen Zahl an Zellinfiltraten im RM der mit PBS behandelten Kontrolltiere. Die Therapie mit PLP10, verglichen mit der Infiltrationsstärke der Kontrolltiere, führte nicht zu einer signifikant nachweisbar reduzierten Zahl an T-Zellinfiltrationen und Makrophagen.

Bei dem Vergleich der Infiltrationen durch Makrophagen zwischen der DEX-Gruppe und der PLP10-Gruppe zeigte sich eine Tendenz der stärker reduzierten Infiltration in der DEX-Gruppe, die aber keine statistische Signifikanz erreichte.



**Abb.12: Akute Zellinfiltrationen von Makrophagen (MAC3+) und T-Zellen (CD3+) in Rückenmarksquerschnitten von Mäusen nach Therapie im Schub einer mit MOG<sub>35-55</sub> induzierten EAE.** Immunhistochemische Färbungen 6 Std. nach letzter Therapie. Therapie an Tag 0/1/2 mit je 100 mg/kg KG DEX oder PRED bzw. 10 mg/kg KG PLP oder 3 mg/kg KG PLP jeweils an Tag 0; äquivalente Volumenapplikation von PBS für die Kontrolltiere. Jedes Symbol repräsentiert ein Versuchstier; \*\*\* =  $p < 0.001$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \* =  $p < 0.05$ ; n = 15-16

Ein klinischer Therapieeffekt bei den mit DEX behandelten Tieren resultierte in einer geringen Zellinfiltration von Makrophagen und T-Zellen im RM. Auch für die mit PRED therapierten Tiere konnten geringere Zellinfiltrationen demonstriert werden, sodass man insgesamt eine Korrelation zwischen dem ansteigenden EAE-Index und den jeweils unterschiedlich hohen Zellinfiltraten für die Versuchsgruppen von PBS, DEX und PRED behandelten Tieren berücksichtigen kann. Bei diesen drei Therapiegruppen ging eine ansteigende Zellzahl in untersuchten Infiltrationen des RM mit einem zunehmend schlechteren Verlauf der Klinik sowie mit einem höher bewerteten EAE-Index einher.

Hingegen ergaben immunhistochemische Analysen des RMs zu CD3+ -T-Zellen und MAC3+ -Makrophagen für die mit PLP10 therapierten Tiere im Vergleich mit der PBS-Gruppe, unter Berücksichtigung der Auswertung einer sehr frühzeitigen Entzündungsreaktion, keine signifikant geringeren Zellzahlen. Überraschenderweise entsprechen die nur sehr gering reduzierten Zellinfiltrate der PLP10-Gruppe in der akuten Phase des Entzündungsgeschehenes, nach dem wiederholt beobachtbaren positiven Therapieeffekt, nicht der Erwartung. Wie anhand von Abb.7 und auch Abb.8 nachvollzogen werden kann, bewies die Therapie mit PLP 10 jedoch eindrucksvoll ihre therapeutische Wirksamkeit in der Behandlung der EAE, worin jeweils der klinisch zu beobachtende sehr gute Therapieeffekt mit 1x 10 mg/kg KG PLP vergleichbar mit der Wirkung einer hoch dosierten DEX-Therapie war. Jedoch waren die Zellinfiltrationen unter PLP-Therapie zu dem gewählten Zeitpunkt der histologischen Untersuchungen nicht annähernd in dem Ausmaß reduziert, wie es nach Therapie mit hoch dosiertem DEX zu beobachten war.

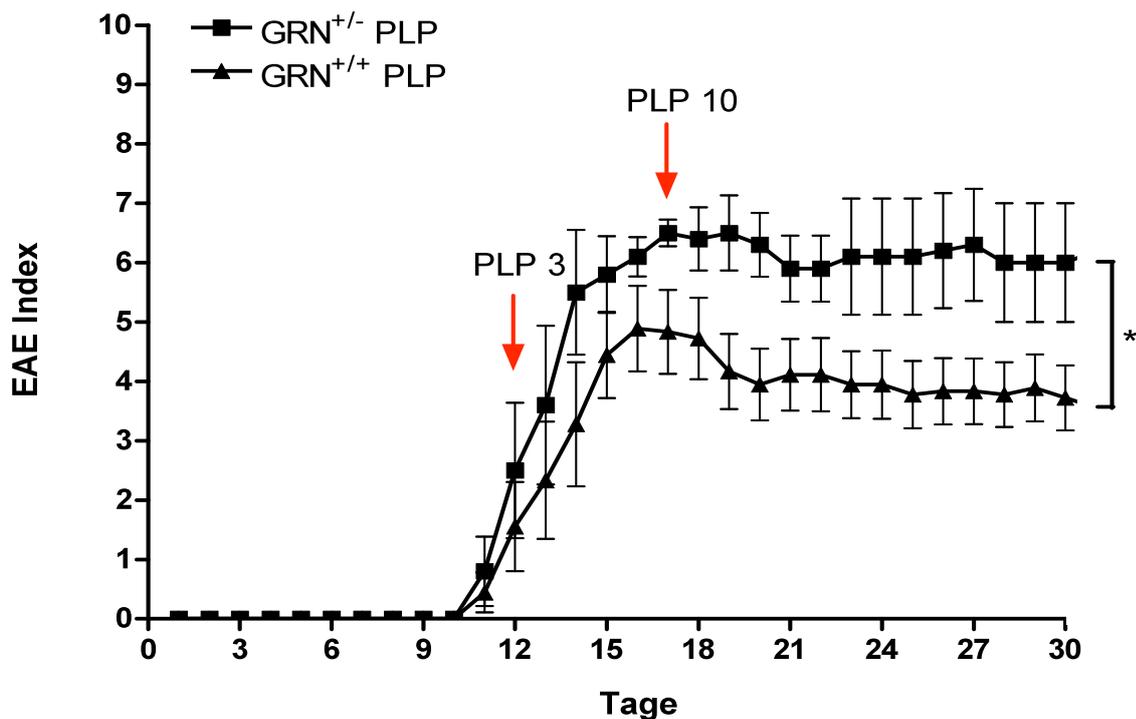
In den anschließenden Analysen soll nun geklärt werden, ob möglicherweise ein stark reduzierter Axonschaden besteht, der die positive Wirkung der PLP erklären kann. Dies wurde mit dem immunhistochemischen Nachweis für APP-Akkumulationen versucht zu klären.

DEX bewirkte eine signifikant ( $p < 0,01$ ) geringere APP-Akkumulation im RM verglichen mit den Tieren der Kontrollgruppe (Abb.13). Dieses Ergebnis war nach Beobachtung des klinischen Verlaufes (siehe Abb.6 und Abb.8) und den reduzierten Zellinfiltraten (siehe Abb.11) zu erwarten. Die Tiere mit dem höchsten EAE-Index (= Tiere der PBS-Gruppe) in der klinischen Verlaufsbeobachtung wiesen neben den größten Zellinfiltraten auch die größte Akkumulation an APP im RM auf. Nach Therapie mit hoch dosiertem PRED konnte kein signifikant geringerer Axonschaden als bei den Mäusen der Kontrollgruppe festgestellt werden. Ein Trend zur absolut verminderten Zahl an APP-Akkumulationen war für die PRED-Gruppe dennoch erkennbar. Dies war durch den Nachweis reduzierter Zellinfiltrate (siehe oben) und abgeschwächter Klinik der EAE ebenfalls zu erwarten.

Im RM von Tieren nach Therapie mit PLP konnte ebenso nur ein Trend für weniger APP-Akkumulationen im RM berücksichtigt werden. Die Therapie mit PLP reduzierte das Auftreten von spontanen Axonschäden in der akuten Phase der EAE nicht signifikant. Das Verhindern des Auftretens eines akuten Axonschadens kann als Wirkmechanismus für den milden Verlauf der EAE durch Therapie mit PLP ausgeschlossen werden.



nächsten fünf Tagen deutete sich keine Verbesserung des EAE-Verlaufs an, sodass eine einmalige i.p. Injektion von PLP10 an Tag 17 erfolgte. Seit dem Tag dieser zweiten Therapieintervention wichen die beiden Kurven deutlich auseinander und nahmen einen signifikant ( $p < 0,05$ ) unterschiedlichen Verlauf an. Dieser Verlauf entspricht einem einsetzenden Therapieeffekt in der Gruppe der  $GRN^{+/-}$ -Tiere durch die zusätzliche Applikation von PLP10. Im Gegensatz dazu behielten die heterozygoten  $GRN^{+/-}$  im Durchschnitt einen konstant hohen EAE-Index bei (Abb.14). Tiere des Wildtyps verbesserten sich in ihrem EAE-Index innerhalb von vier Tagen (= Tag 17 – Tag 21), wobei sie diesen Indexwert in den anschließenden zwei Wochen bis Tag 30 post EAE-Induktion noch gering unterschritten (Abb.14), was als eine lang anhaltende Wirkung der PLP10-Gabe gedeutet wird.



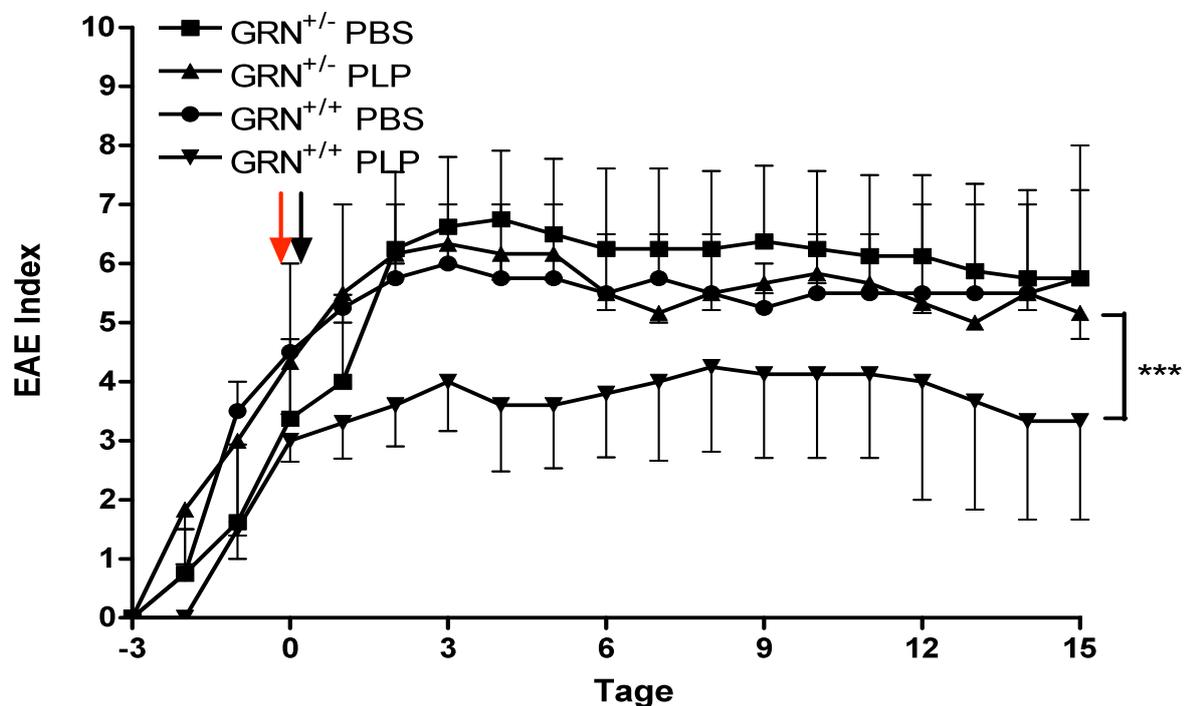
**Abb.14: EAE-Progression heterozygoter Glukokortikoidrezeptor (GR) defizienter Mäuse ( $GRN^{+/-}$ ) und deren Vergleichsgruppe ( $GRN^{+/+}$ ) in der Therapie der MOG-EAE mit PLP.** Rote Pfeile: Therapie mit PLP 3 einmalig an Tag 12 bzw. PLP 10 einmalig an Tag 17; \* =  $p < 0,05$ ; Jeder Punkt steht für den Mittelwert von 5-9 Tieren;  $n = 5 - 9$

Mit PLP3 ließ sich der anfangs leicht voneinander abweichende Krankheitsverlauf der EAE beider Gruppen nicht therapieren. Erst eine weitere Applikation von PLP10, die sich schon im BL/6-Mausmodell der EAE als überlegen gegenüber PLP3 in der Behandlung erwies (Abb.7), führte zu einem weniger stark progressiven Verlauf der EAE und zu einer geringen Verbesserung der Klinik. Dieses Experiment weist auf die mögliche Relevanz des Zytosolischen GR, der in den  $GRN^{+/-}$ -Tieren exprimiert wird, für einen Therapieeffekt der

EAE auch mit PLP hin, wie dies zuvor für konventionelle GC demonstriert wurde (Wüst et al. 2008). Aufgrund des suboptimalen Verlaufes wurde dieses Experiment wiederholt, um die Annahme dieses Wirkmechanismus für PLP zu stützen (Abb.15).

In dem wiederholten Experiment wurde zusätzlich die PLP-Therapie mit einer PBS-Behandlung in  $GRN^{+/-}$ - und  $GRN^{+/+}$ -Tieren verglichen. Die einmalige Applikation von PLP10 bei  $GRN^{+/+}$ -Tieren an Tag 0 bewirkte entscheidend einen milderen Verlauf der EAE verglichen mit derselben Therapie an heterozygoten  $GRN^{+/-}$ -Tieren (Abb.15). Ohne Therapie mit PLP nahmen beide PBS-Gruppen einen unterschiedlichen Verlauf ab Tag 2 an, wobei die  $GRN^{+/+}$ -Tiere kontinuierlich bis zum Ende der Beobachtungszeit eine durchschnittlich mildere Symptomatik präsentierten als dies für  $GRN^{+/-}$ -Tiere zu beobachten war. Dieses Verhalten, dass  $GRN^{+/+}$ -Mäuse einen etwas späteren und milderen Krankheitsverlauf zeigen, wurde bereits publiziert und mit einer möglichen Einwirkung endogener GC diskutiert (Wüst et al. 2008).

Basierend auf den Verläufen beider Experimente (Abb.14 und Abb.15) kann gesagt werden, dass ein therapeutischer Effekt auf den Verlauf der MOG-EAE durch PLP über den Zytosolischen GR vermittelt wird.



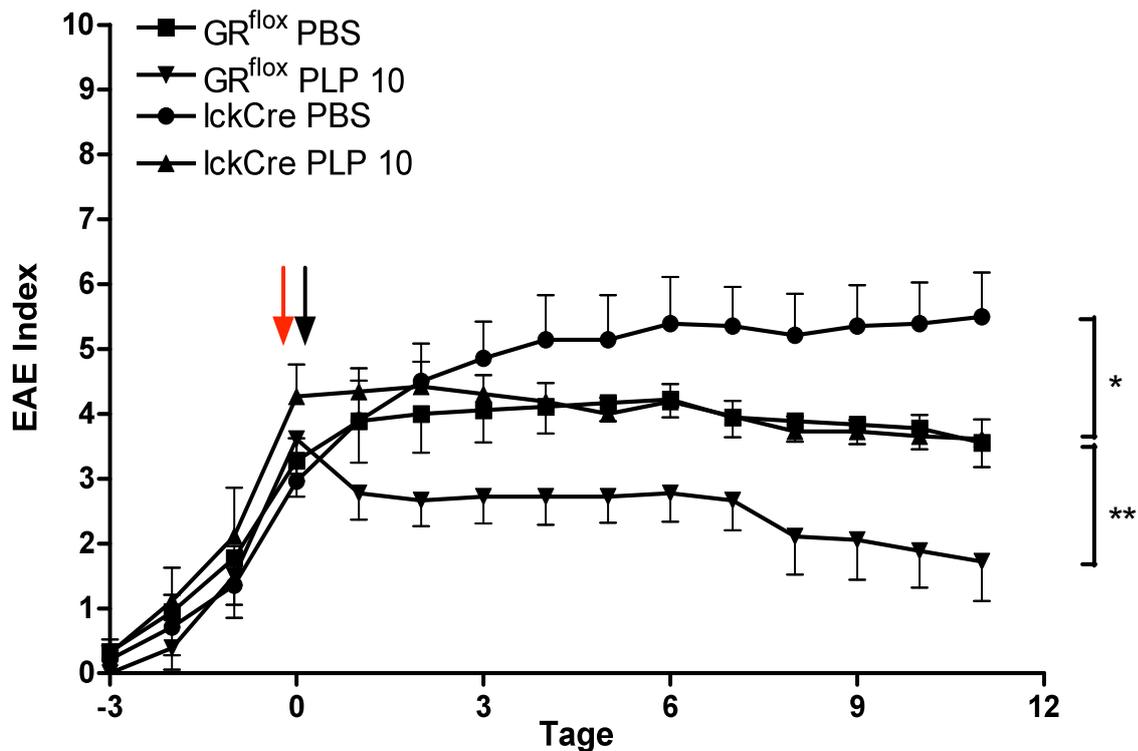
**Abb.15: EAE-Progression heterozygoter Glukokortikoidrezeptor (GR) defizienter Mäuse ( $GRN^{+/-}$ ) und deren Vergleichsgruppe ( $GRN^{+/+}$ ) in der Therapie der MOG-EAE mit PLP.** Darstellung des EAE-Verlaufes entsprechend Abb.6. Roter Pfeil: Therapie mit PLP 10 einmalig an Tag 0. Schwarzer Pfeil: Gabe von PBS für Vergleichsgruppe einmalig an Tag 0. \*\*\* =  $p < 0.001$ ;  $n = 2-5$

### 3.5 Analyse des Wirkmechanismus der Liposomen an GR<sup>lckCre</sup>-Tieren

T-Zellen gelten als die Hauptakteure in der Pathogenese der MS, akute Schübe gehen mit erhöhten Infiltraten von T-Zellen einher (Hafler et al. 2005). Erst kürzlich fand man heraus, dass T-Zellen die primären Zielzellen einer hoch dosierten Therapie mit DEX im MOG<sub>35-55</sub> BL/6-Mausmodell der EAE sind (Wüst et al. 2008).

Ziel des nächsten Experimentes ist es herauszufinden, ob therapeutische Effekte der PLP, ebenso wie für konventionelles DEX gezeigt (Wüst et al. 2008), primär über deren Einwirkung speziell auf T-Zellen vermittelt werden. Für diesen Nachweis wurden sowohl Kontrollmäuse (GR<sup>fllox</sup>) deren T-Zellen zur Expression des GR fähig sind, als auch konditionale knock-out-Tiere deren Gen des GR ausschließlich in den T-Zellen mittels des Cre/loxP-System ausgeknockt wurde (GR<sup>lckCre</sup>), verwendet.

In einem relativ fortgeschrittenen Stadium der EAE, wurden die Tiere an Tag 0 bei einem durchschnittlich erreichten EAE-Index von 3 - 4 behandelt (Abb.16). Ein Behandlungseffekt mit konsekutiver Abnahme der klinisch beobachtbaren Symptomatik der EAE war in der mit PLP10 therapierten Gruppe der GR<sup>fllox</sup>-Tiere zu erkennen. Bei der entsprechenden Vergleichsgruppe, den GR<sup>lckCre</sup>-Tieren, konnte trotz weitest fortgeschrittenem Krankheitsstadium bei Therapiebeginn ebenso ein therapeutisch wirksamer, wenn auch nicht gleichwertiger Einfluss auf den klinischen Verlauf nach der Gabe von PLP10 beobachtet werden (Abb.16). Der Therapieeffekt von PLP 10 in GR<sup>lckCre</sup>-Mäusen wurde im Vergleich mit dem Verlauf von PBS behandelten GR<sup>lckCre</sup> deutlich. Die Klinik der mit PBS behandelten GR<sup>lckCre</sup>-Tiere wies eine signifikant stärkere Symptomatik der EAE auf als dies für den durchschnittlichen Verlauf der GR<sup>lckCre</sup>-Mäuse nach Applikation von PLP10 zutrifft.



**Abb.16: EAE-Progression in konditionalen T-Zell-spezifischen GR-knock-out-Mäusen (GR<sup>lckCre</sup>) und deren Vergleichsgruppe (GR<sup>flox</sup>) in der Therapie der MOG-EAE mit PLP10.** Darstellung des EAE-Verlaufes entsprechend Abb.6. Roter Pfeil: Therapie mit PLP10 einmalig an Tag 0. Schwarzer Pfeil: Gabe von PBS für Vergleichsgruppe einmalig an Tag 0.

\*\* =  $p < 0.01$ , \* =  $p < 0.05$ ;  $n = 9-14$

Mit Hilfe konditionaler Zelltyp-spezifischer knock-out-Tiere, GR<sup>lckCre</sup>, wurde demonstriert, dass eine Expression des Zytoplasmatischen GR speziell in T-Zellen für eine erfolgreiche Therapie der MOG-EAE mit PLP nicht absolut notwendig ist. Im Gegensatz dazu zeigten Wüst et al. für die Therapie mit hoch dosiertem DEX, dass die EAE in GR<sup>lckCre</sup>-Mäusen nicht therapierbar ist (Wüst et al. 2008). Ein besserer Behandlungseffekt mit PLP wurde durchaus bei den Kontrolltieren, den GR<sup>flox</sup>-Mäusen mit uneingeschränkter Expression des GR in T-Zellen erreicht, sodass hier eine therapeutische Relevanz des exprimierten GR in T-Zellen bestätigt werden kann.

### 3.6 Nebenwirkungen

Ein wichtiges Ziel des Designs alternativer Transportmöglichkeiten von Medikamenten ist es, einen Wirkstoff gezielt an den Ort der gewünschten Wirkung navigieren zu können. Dadurch können ubiquitäre Wirkungen umgangen werden und absolut niedrigere Wirkstoffmengen sind nötig, um die erwünschten Effekte zu erzielen. Ein Wirkstoff, wie die GC, führt meist an mehreren Organen Veränderungen herbei, die nicht im Focus der Therapie stehen. Dies sind NW, die eine Dosis von Pharmaka insbesondere in der Therapie chronisch, rezidivierender Krankheiten sowie Autoimmunkrankheiten wie die MS, limitieren.

Am Beispiel der PLP als alternative Transportmöglichkeit für GC war eine Applikation von nur 10 mg/kg KG PLP in der Therapie der EAE im Modell der MOG<sub>35-55</sub> BL/6-Maus vergleichbar effektiv wie eine dreimalig hoch dosierte Applikation von 100 mg/kg KG DEX (siehe Abb.8).

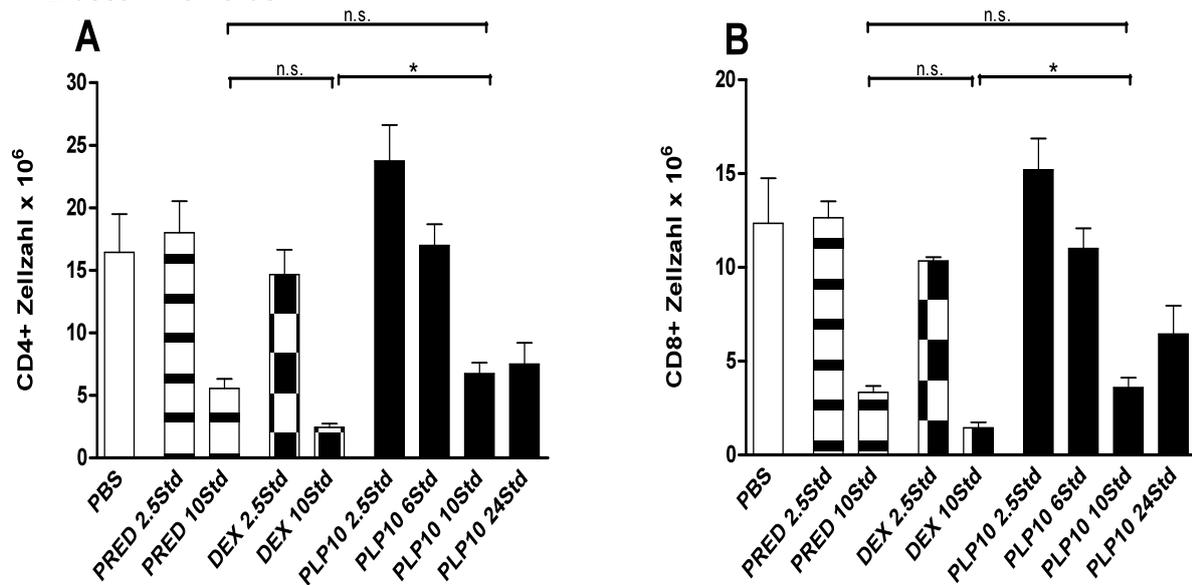
Die Pharmakokinetik liposomaler GC unterscheidet sich grundlegend von der konventioneller GC. Die verlängerte Zirkulation der Liposomen hat eine länger andauernde Bioverfügbarkeit des in Liposomen transportierten Prednisolons zur Folge (Hrynyk et al. 2003, Allen und Hansen 1991). Daher wurde nachfolgend erstmalig anhand einiger Parameter untersucht, ob eine reduzierte GC-Gabe in Form von Liposomen im Vergleich zur alternativ hohen GC-Gabe in ihrer herkömmlich gelösten Form zu geringeren systemischen NW führt.

#### 3.6.1 Periphere Depletion der T-Zellen

Im folgenden Experiment wurde das Ausmaß einer peripheren Depletion von T-Zellen in der Milz durch PLP und konventionelle GC miteinander verglichen. Des Weiteren sollte auch die Pharmakodynamik für PLP anhand dieses Parameters nachvollzogen werden. Dabei wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einmaliger Applikation hoch dosierter (1x 100 mg/kg KG) konventioneller GC oder niedrig dosierter (1x 10 mg/kg KG) PLP das T-Zellkompartiment der Milz mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb.17). Ein 24 Std.-Wert wurde für konventionelle GC unter Berücksichtigung ihrer geringen Halbwertszeit nicht erhoben.

Nach vorausgegangener Injektion, sowohl von hoch dosierten GC, als auch von PLP, wurde die Zellzahl sowohl für CD4<sup>+</sup> -, als auch für CD8<sup>+</sup> -T-Zellen in der Milz 10 Std. später auf ein Minimum im Vergleich zu den mit PBS behandelten Kontrolltieren reduziert (Abb.17 A, B). Es besteht dabei kein signifikanter Unterschied für den 10 Std.-Wert in der absoluten T-Zell-Depletion zwischen der Gabe von 100 mg/kg KG PRED oder 10 mg/kg KG PLP. 24 Std. nach einmaliger Gabe werden keine weiteren Reduktionen von peripheren T-Zellen nachgewiesen. Anders hingegen verhält sich das Ausmass der peripheren T-Zell-Depletion

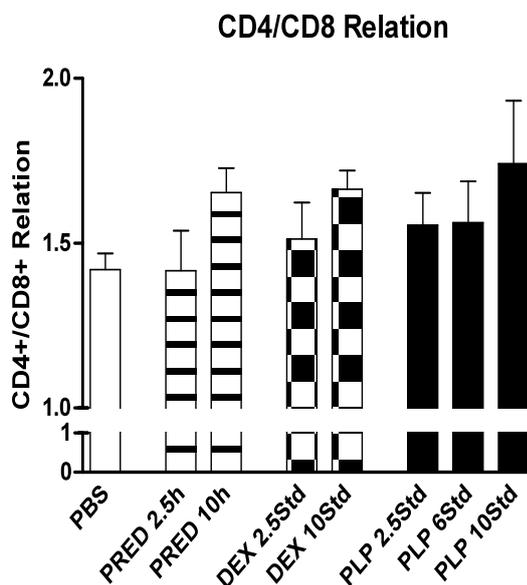
im Vergleich mit DEX, wobei nach 10 Std. signifikant ( $p < 0,05$ ) geringere T-Zellzahlen in der Milz bestimmt werden.



**Abb.17: Analyse der peripheren T-Zell-Depletion in der Milz nach vorausgegangener GC-Gabe**

**A:** CD4+ -T-Zellen; **B:** CD8+ -T-Zellen; Jeweils einmalige Gabe von 100mg/kg KG DEX oder 100mg/kg KG PRED oder PLP 10; Organ: Milzen von 10 Wochen alten BL/6-Mäusen . n = 3 – 6

Das CD4+/CD8+ Verhältnis innerhalb des T-Zell-Kompartiments der Milz gesunder Lewis-Ratten erhöhte sich 48 Std. nach i.v. liposomaler Prednisolon Injektion signifikant (Linker et al. 2008). Im hier verwendeten Mausmodell deutete sich bereits nach 10 Std. ebenfalls eine Tendenz der veränderten Relation zugunsten von CD4+ -T-Zellen bei allen Therapiegruppen an (Abb.18).



**Abb.18: Änderung des CD4+/CD8+ T-Zell-Verhältnis in der Milz.**

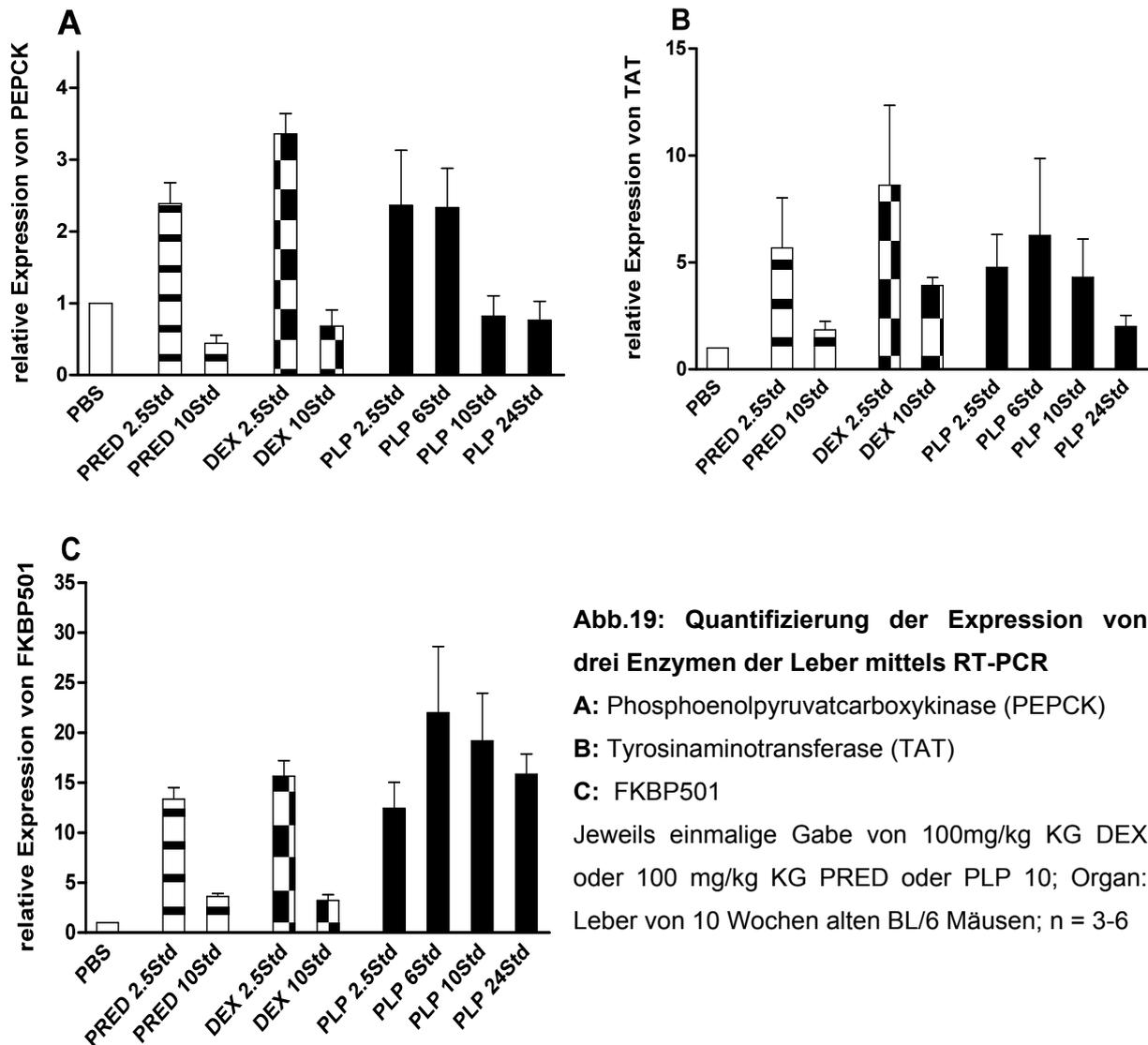
Applikation je 100mg/kg KG DEX bzw. PRED oder 10 mg/kg KG PLP an zwei bzw. vier vorausgehenden Zeitpunkten.

n = 3 – 6. BL/6 Mäuse ohne EAE

### 3.6.2 Leberenzymexpression

Den gewünschten Modulationen des Immunsystems steht das Auftreten nachteiliger NW der GC gegenüber. Im Vordergrund stehen metabolische, endokrine, psychische, gastroenterologische und ophthalmologische NW. Im Folgenden wurden ausschließlich metabolische Parameter untersucht. Zunächst wurde die Expression von drei Leberenzymen auf der Ebene der mRNA gemessen. Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK), FK-bindendes Protein 501 (FKBP501) und Transaminotransferase (TAT) sind Enzyme, von denen bekannt ist, dass sie durch GC reguliert werden (Schmid et al. 1987; Hanson und Reshef 1997).

Nach Applikation der GC an gesunden BL/6-Mäusen zeigte sich eine zu verschiedenen Zeitpunkten voneinander abweichende Expressionsrate der Enzyme unter der jeweiligen Behandlung (Abb.19). Für alle drei Enzyme bestand 2.5 Std. nach Gabe von je 100 mg/kg KG DEX oder PRED eine stark erhöhte Expressionsrate, die sich nach 10 Std. auf ein normales, mit der Kontrollgruppe vergleichbares Niveau, reduzierte. Dieses Expressionsmuster zeigt sich im Fall von PEPCK auch unter Gabe von PLP10 (Abb.19 A). Das Enzym TAT wurde maximal ebenso 2.5 Std. nach Applikation von DEX oder PRED exprimiert, während die Gabe von PLP das Maximum nach 6 Std. erreicht (Abb.19 B). 24 Std. nach PLP-Gabe normalisierte sich auch hier die Expression von TAT. Das Maximum an Expression für FKBP501 durch PLP trat, verglichen mit der bereits nach 2.5 Std. erreichten Expression durch DEX und PRED, ebenso 6 Std. nach Applikation verzögert ein (Abb.19C). Nach 24 Std. war die Expressionsrate noch gleich stark wie die maximale Expression nach 2.5 Std. nach Applikation von DEX.



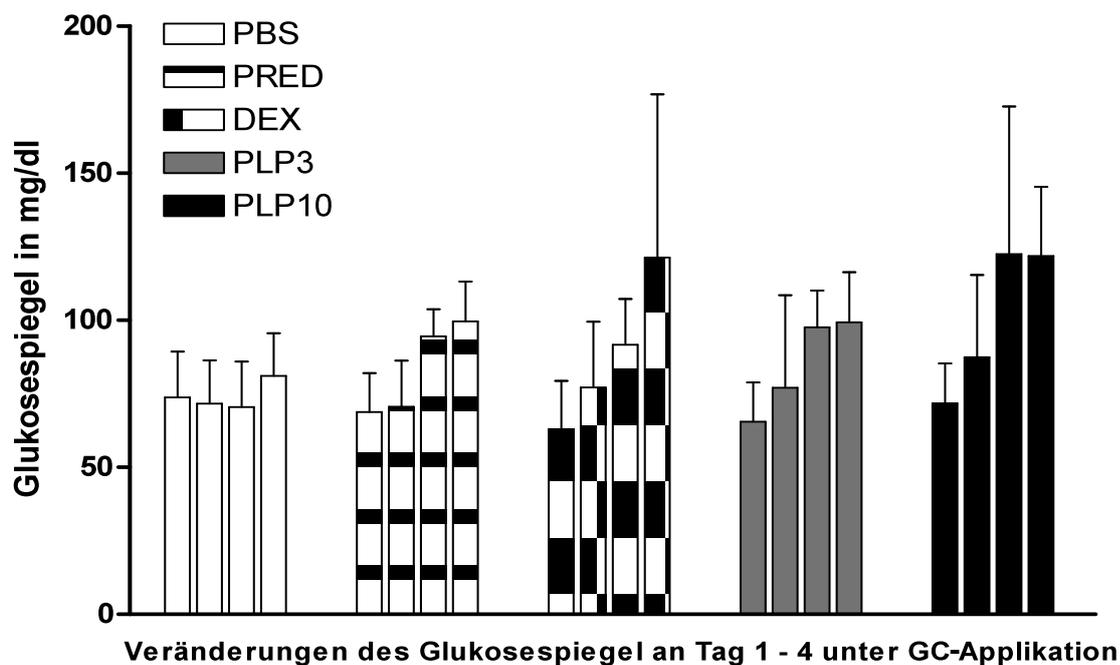
Die Wirkung von PLP10 war bzgl. der maximal gemessenen Expression auf der Ebene der mRNA dieser drei Leberenzyme im Vergleich mit einer 10fach höheren Dosis konventionell verabreichter GC nicht geringer. Eine NW in Form der gemessenen Expression der Leberenzyme konnte durch PLP im Vergleich mit DEX und PRED trotz stark voneinander abweichender Absolutdosis nicht reduziert werden. Das maximal erreichbare Expressionsniveau war bei beiden Applikationsformen der GC annähernd gleich.

### 3.6.3 Blutzuckerspiegel

GC beeinflussen den Blutglukosespiegel (BZ) und können eine hyperglykämische Stoffwechsellage herbeiführen (Clare und Thurby-Hay 2009), weshalb sie insbesondere an Patienten mit der Stoffwechselerkrankung Diabetes mellitus unter strenger Kontrolle des BZ vergeben werden. Sie führen in Zellen zu einer gesteigerten Insulinresistenz und hemmen u.a. die Translokation des muskulären Glukosetransporters GLUT4 hin zur Plasmamembran,

wodurch die Glukoseaufnahme auch in Muskelzellen durch GLUT4 eingeschränkt ist (Dimitriadis et al. 1997).

Im folgenden Versuch wurden die diabetogenen NW der GC bei Tieren untersucht, die an einer EAE erkrankt waren (Abb.20). Wie bei den Versuchen zur EAE wurde das bekannte Therapieschema mit hoch dosierter GC-Gabe und gering dosierter PLP-Gabe angewendet. Der BZ wurde vor Beginn der Therapie und an jedem einzelnen Therapietag gemessen. Der BZ stieg bis zum Ende der Therapie deutlich an, wobei dieser unter Gabe von DEX die höchsten Durchschnittswerte erreichte und zwei Mäuse mit einem gemessenen BZ über 200mg/dl auffielen. Trotz einmaliger Applikation von PLP3 oder PLP10 bewirkte deren Applikation im Durchschnitt annähernd hohe BZ-Werte wie sie nach Gabe hoch dosierter konventioneller GC gemessen wurden. In allen Therapiegruppen stieg der BZ täglich an, obwohl die PLP nur einmalig appliziert wurden.



**Abb.20: Kontrolle des Blutzuckerspiegels unter GC-Therapie an EAE erkrankten BL/6-Mäusen.** Therapie mit jeweils 100 mg/kg KG DEX bzw. PRED jeweils an drei aufeinanderfolgenden Tagen, sowie einmalige Applikation von PLP3 bzw. PLP10; n = 9-14

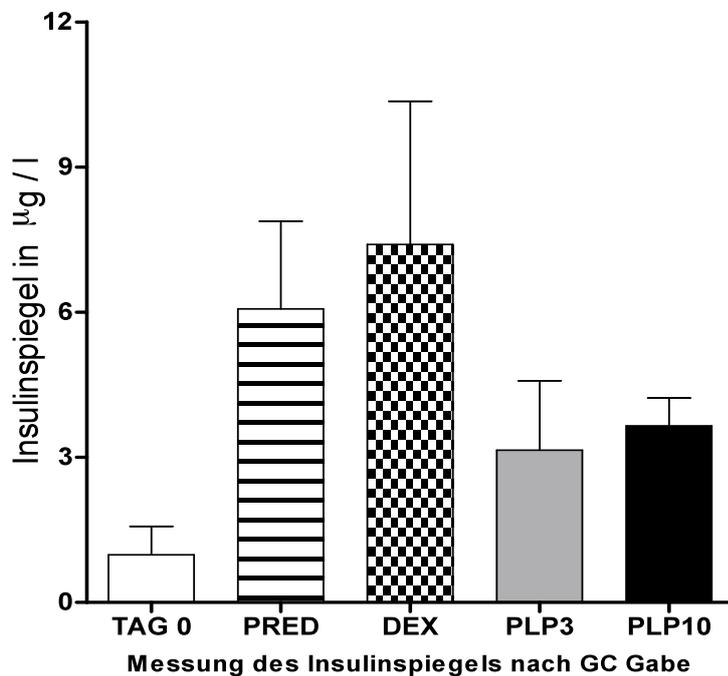
### 3.6.4 Insulinkonzentration

Die diabetogenen NW durch GC-Gabe bewirken Veränderungen des Insulinspiegels im Blut als Konsequenz einer stimulierten Insulinsekretion aus Pankreaszellen.

Diese Einflussnahme wurde im nachfolgenden Experiment an gesunden Mäusen untersucht, wobei der Effekt von PLP10 mit hoch dosiertem DEX bzw. PRED verglichen wurde. Hierbei wurde die Konzentration an Insulin im Serum vor erstmaliger GC- bzw. einmaliger PLP3- oder PLP10-Applikation (= Tag 0) an unbehandelten Mäusen mittels ELISA bestimmt. Für

einen Vergleich wurde nach dritter GC-Applikation (= Tag 2) von 100 mg/kg KG DEX oder PRED ein zweites Mal die Insulinkonzentration im Serum gemessen.

Der nach durchgeführter Behandlung ermittelte Insulinspiegel war in allen Gruppen im Vergleich zum Ausgangswert (Tag 0) signifikant ( $p < 0,01$ ) erhöht. Für die mit DEX therapierte Gruppe wurde der höchste Durchschnittswert der Insulinkonzentration ermittelt, während nach Gabe von PLP die geringsten Durchschnittswerte gemessen wurden.



**Abb.21: Kontrolle des Insulinspiegels im Serum vor und nach GC-Therapie an gesunden BL/6-Mäusen mittels ELISA.**

Gabe von jeweils 100 mg/kg KG DEX bzw. PRED jeweils an drei aufeinanderfolgenden Tagen, sowie einmalige Applikation von PLP3 bzw. PLP10.

Tag 0 = Normalwert vor GC-Therapie  
n = 7 - 10

In Bezug auf die untersuchten Parameter, wie die Leberenzymexpression und den Blutglukosespiegel, konnte durch eine Therapie mit PLP ein Auftreten von NW in geringerem Ausmaß, als dies durch konventionelle GC gemessen wurde, nicht beobachtet werden. Die Dosisreduktion der GC-Gaben durch Verwendung von PLP hat nicht zu einer Reduktion dieser untersuchten NW beigetragen. Der Insulinspiegel ist als einziger Parameter nach PLP-Gabe durchschnittlich weniger stark angestiegen als dies für die Therapie mit hoch dosiertem DEX oder PRED zutrifft. Ferner kann unter PLP-Applikation ein im Vergleich zur DEX-Gabe geringeres Ausmass der Depletion peripherer T-Zellen bemerkt werden. DEX bewirkte hier im Vergleich mit PLP eine signifikant stärkere Reduktion der in der Milz gezählten T-Zellen.

## 4. Diskussion

### 4.1 Therapeutische Wirksamkeit der Glukokortikoide im Mausmodell der MOG-EAE ist abhängig von der Wahl des GC

Glukokortikoide sind potente Pharmaka, die aufgrund ihrer immunsupprimierenden Wirkung in der Therapie akut oder chronisch entzündlicher Erkrankungen wie Asthma bronchiale, Atopische Dermatitis, als Bestandteil von Tumortherapiekonzepten sowie bei Autoimmunkrankheiten wie RA und MS standardmäßig verwendet werden. Als ein Nachteil muss dabei stets das Auftreten schwerwiegender, systemischer NW wie eine durch GC-induzierte Osteoporose oder das Auftreten eines Diabetes mellitus beachtet werden. Diese NW können im Rahmen der Behandlung den Heilungsprozess der behandelten Grunderkrankung limitieren.

In der Therapie des akuten Schubes der MS wird standardmäßig i.v. 500-1000 mg MPRED für drei bis fünf Tage appliziert (Milligan und Compston 1987). Trotz langjähriger Erfahrung und Erfolgen mit diesem Schema ist der zugrunde liegende Wirkungsmechanismus der GC sowohl auf molekularer, als auch auf zellulärer Ebene bisher unvollständig aufgeklärt.

Grundlage der therapeutischen Wirkung der GC in der EAE wie auch der MS sind zahlreiche immunsuppressive Effekte auf zellulärer Ebene. Von wesentlicher Bedeutung konnte die Induktion der Apoptose in T-Zellen, die verminderte Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle auf T-Zellen und Endothelzellen unter Einfluss der GC sowie die Wiederherstellung der Integrität der BHS nachgewiesen werden (Wüst et al. 2008; Tischner und Reichardt 2007). Letzteres hat eine reduzierte Infiltration von neurotoxisch aktiven Makrophagen und T-Zellen zur Folge (Paul und Bolton 1995), wobei auch ein reduzierter Axonschaden und eine verminderte Demyelinisierung beobachtet wurden.

Heute hat man für eine Therapie mit GC neben MPRED die Auswahl zwischen weiteren synthetisch hergestellten GC. Dennoch wurde bisher keinem anderen GC die Möglichkeit geboten, seine Wirksamkeit in der Therapie der MS zu belegen.

Im Gegensatz dazu wurde im Tiermodell auf verschiedene GC zurückgegriffen, womit eine EAE erfolgreich behandelt wurde. MPRED bestätigte dabei seine dosisabhängige Wirksamkeit auch in der Therapie der monophasischen EAE von MBP immunisierten Lewis-Ratten sowie im chronischen EAE-Verlauf des MOG-Modells der BL/6-Maus (Schmidt et al. 2000; Chan et al. 2008). Auch DEX bewies seine Wirksamkeit im MOG-Modell der BL/6-Maus und ebenso im Modell der mit MBP immunisierten Lewis-Ratte (Nguyen et al. 1997; Wüst et al. 2008). Eine vergleichende Analyse mehrerer GC untereinander hat weder bei MS noch für die EAE unter gleichen Bedingungen stattgefunden.

Im Rahmen dieser Arbeit wird daher die therapeutische Wirksamkeit im Vergleich verschiedener GC wie PRED, MPRED, DEX und TRIAM im akuten Schub der MOG-EAE bei

der BL/6-Maus untersucht. Dabei zeigt sich eine überlegene Wirksamkeit von TRIAM und DEX gegenüber PRED und MPRED im klinisch beobachteten Verlauf der EAE (siehe Abb.6 auf Seite 43). Vergleichende histopathologische Analysen in den zentralen Läsionen verweisen ebenso auf unterschiedlich stark reduzierte Infiltrate von T-Zellen und Makrophagen unter dem jeweils applizierten GC (siehe Abb.12 auf Seite 50).

#### **4.1.1 Rolle der Struktur von GC für deren Wirkungsstärke**

DEX und TRIAM waren in der Therapie der MOG-EAE einer Behandlung mit PRED oder MPRED überlegen. TRIAM und DEX haben jeweils im zweiten aromatischen Ring ein Fluor Atom in  $\alpha$ - Position des C-9 Atoms, was sie strukturell von MPRED und PRED unterscheidet (siehe Abb.2 auf Seite 11). Die chemische Struktur sowie deren Modifikation stehen in einem unmittelbaren Zusammenhang mit der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik eines Wirkstoffes. In-vitro Analysen haben Strukturveränderungen in Form von Kohlenstoff-Doppelbindungen, zusätzlichen Halogen-, Hydroxyl- und Methylgruppen spezifisch für einzelne GC auf ihre pharmakologische Relevanz hin untersucht (Lutsky et al. 1979; Brattsand et al. 1982; Grossmann et al. 2004). Dabei zeigten sich mehr oder weniger starke mineralo- und glukokortikoide Effekte und Affinitäten zu entsprechenden Rezeptoren je nach Substituent der C-Atome 6, 9, 16 und 17. GC, wie DEX und TRIAM, mit einer Halogenierung in  $\alpha$ -Position an C9 führten zu stärkeren systemischen glukokortikoiden Wirkungen. Zudem wird dadurch die Affinität dieser GC zu dem GR deutlich erhöht, der für genomische Wirkungen verantwortlich ist (Buchwald und Bodor 2004). So wird für DEX im Vergleich mit MPRED eine 5fach höhere Potenz genomischer Effekte angegeben (Buttgereit et al. 1999).

In der Beurteilung zu Grunde liegender Wirkungsmechanismen für GC-Effekte müssen nicht-genomische GC-Wirkungen grundsätzlich berücksichtigt werden (siehe Abb.3 auf Seite 15). Rasch eintretende Wirkungen können dabei beobachtet werden, die sich nicht mit genomischen Wirkungen erklären lassen. Sie werden neben den klassischen genomischen Effekten v.a. bei Vorliegen hoher GC-Konzentrationen zunehmend relevant und können ferner in spezifische und nicht-spezifische Effekte unterteilt werden (Buttgereit et al. 1998, Buttgereit und Song 2006).

Die hier verwendete Dosis der zur Therapie des akuten Schubes im chronischen Verlauf der mit MOG induzierten EAE ist mit 100 mg/kg KG an drei aufeinander folgenden Tagen sehr hoch. Im selben Modell zeigte eine Dosis von nur 0,8 mg/kg KG bereits signifikante Therapieeffekte. Auch dabei konnte mit einer therapeutischen Dosis von 100 mg/kg KG die stärkste Wirkung auf den klinischen Verlauf der EAE erzielt werden, sodass insgesamt von einer Dosisabhängigkeit für den klinischen Verlauf ausgegangen werden kann (Wüst et al.

2008). Am Beispiel der RA beim Menschen wird bei schwerer Klinik sogar eine Therapie von mehr als 250 mg Prednisolon-Äquivalent (PÄ) bis zu mehreren Tagen andauernd angewendet (Thiele et al. 2005; Buttgereit et al. 2002). Eine beinahe totale Sättigung des Zytosolischen GR wird dabei bereits bei einer täglich verabreichten Dosis von 100 mg PÄ, entsprechend 15 mg DEX, erreicht. Darüber hinausgehende Dosierungen sind nicht mehr exklusiv für den im Zytosol vorliegenden GR wirkungsspezifisch (Buttgereit et al. 2004), sodass zusätzliche Effekte nicht-genomischer Wirkungen nicht ausgeschlossen werden können und einen weiteren Beitrag zum positiven Behandlungseffekt leisten mögen (Buttgereit et al. 1998).

Diese Erkenntnisse von nicht-genomischen Wirkungen bei hoher Dosierung sind neben der Struktur-Wirkungs-Beziehung zu berücksichtigen, wenn die Wirkung einzelner GC in der Therapie der EAE beurteilt werden soll.

Jedoch konnte für die therapeutische Wirksamkeit konventioneller GC in der EAE im Mausmodell beispielhaft für DEX die Relevanz des im Zytosol vorliegenden GR demonstriert werden. Damit wurde der vorrangig auf genomischen Wirkungen beruhenden Behandlungseffekt der GC nachgewiesen (Wüst et al. 2008). Nicht-genomische Wirkungen konventioneller GC stehen daher im Hinblick auf die beobachteten Unterschiede in der Milderung des EAE-Verlaufes zumindest durch konventionelle GC nicht zur Diskussion.

Es scheint vielmehr so zu sein, dass die Wirkungsstärke von der sterischen Konfiguration des gewählten GC und seinen Komponenten abhängt. Dies nimmt in Bezug auf die Interaktion des GC mit dem GR im Zytosol eine größere Rolle an als bisher angenommen werden durfte. Die Wirkungsstärke der GC im therapeutischen Ansatz der EAE im Modell der BL/6-Maus entspricht daher primär der genomischen Potenz des entsprechenden Glukokortikoids.

#### **4.1.2 DEX als Alternative zu MPRED in der Therapie des akuten Schubes bei MS**

Nach Erkenntnis des Zusammenhangs zwischen chemischer Struktur der einzelnen GC und den untereinander stark unterschiedlich ausgeprägten Behandlungseffekten im Maus-Modell der EAE, stellt sich die Frage nach einer Möglichkeit für eine verbesserte Therapie akuter Schübe der MS bei Gabe von DEX oder TRIAM anstelle des bisher indizierten i.v. applizierten MPRED. Eine im Jahr 1994 veröffentlichte Doppel-Blind-Studie mit 31 MS-Patienten verwies auf einen gleichen Therapieerfolg von hoch dosiertem DEX wie mit hoch dosiertem MPRED (La Mantia et al. 1994). Vor zehn Jahren konnte eine weitere klinische Studie mit 28 MS-Patienten, die einen erneuten Schub erlitten, eine hohe Erfolgsquote einer oralen Behandlung mit 16 mg DEX pro Tag für fünf Tage demonstrieren (De Keyser et al. 1999). Die Annahme von vermehrt unter DEX einsetzenden NW hemmt die Durchführung

weiterer klinischer Studien. Insbesondere das Auftreten von Osteoporose durch eine primär hemmende Wirkung des DEX auf Osteoklasten mit sekundär vermindertem reaktiven Knochenanbau (Kim et al. 2007) ist eine der unerwünschten NW. Bis heute bedarf es noch immer einer umfangreichen, randomisiert vergleichenden klinischen Studie mit selektiven GC, deren Ergebnisse eine noch bessere Therapieoption bei der Wahl des GC belegen.

#### **4.2 Liposomales Prednisolon in der Therapie der MOG-EAE**

Liposomale GC ermöglichen gute Therapieeffekte in Tiermodellen der RA und MS trotz einer geringer applizierten Absolutdosis der GC verglichen mit einer höheren Dosierung konventioneller GC (Metselaar et al. 2003; Schmidt et al. 2003). Mit Applikation dieser liposomalen Lösung sollen im Vergleich mit der konventionellen Gabe von GC sehr hohe Konzentrationen der GC im entzündeten Gewebe bei verminderter Eliminationsrate und gleichzeitig sehr viel geringeren systemischen Konzentrationen mit reduziertem Auftreten ungewollter NW erreicht werden (Metselaar et al. 2002).

Diese Möglichkeit der GC-Applikation wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig am Modell der MOG-EAE in der BL/6-Maus näher analysiert. Zunächst zeigte sich eine dosisabhängige Potenz der PLP in der Abschwächung klinischer Symptome der EAE. Metselaar et al. konnten diese Dosisabhängigkeit der PLP zuvor in der Therapie der RA in Ratten zeigen (Metselaar et al. 2003). Leere Liposomen erwiesen sich in der Therapie der EAE an Lewis-Ratten als ineffektiv, weshalb sie hier keine weitere Verwendung fanden (Schmidt et al. 2003). Für freie GC ist ebenso die Korrelation zwischen Dosierung und Therapieeffekt der Immunsupprimierung in diversen Modellen der EAE beschrieben worden (Bolton und Flower, 1989; Schmidt et al. 2000; Wüst et al. 2008). Die Wirksamkeit von 1 mg/kg PLP konnte auch im Modell der MOG-EAE an Mäusen, wie schon im Modell der MBP-EAE an Lewis-Ratten (Schmidt et al. 2003) nicht bestätigt werden (siehe Abb.8 auf Seite 46). In Tierversuchen zur Therapie der RA erwies sich die einmalige Gabe dieser sehr geringen Dosis dennoch als gleichwertig im Vergleich mit der an fünf aufeinander folgenden Tagen erfolgten Gabe von jeweils 10 mg/kg KG PRED (Metselaar et al. 2004).

Die einmalige Gabe von PLP10 demonstrierte bzgl. der Milderung des EAE-Verlaufes eine Überlegenheit im direkten Vergleich mit jeweils 100 mg/kg KG hoch dosiertem PRED an drei aufeinander folgenden Tagen sowie eine gleiche Wirksamkeit im Vergleich mit hoch dosiertem DEX. Im chronisch-schubförmigen EAE-Modell der DA-Ratte konnte die Dosis von PLP10 ihre deutliche Überlegenheit gegenüber der Therapie mit 10 mg/kg KG MPRED an drei aufeinander folgenden Tagen ebenfalls demonstrieren (Linker et al. 2008). Die Behandlung der Ratten mit PLP10 konnte im Gegensatz zu den mit MPRED oder mit PBS behandelten

Ratten einem erneuten Schub der EAE vorbeugen, so dass ihre Verwendung dort sogar einen präventiven Charakter besitzt.

Die Wahl des GC, wenn sie in Liposomen transportiert werden, scheint im Mausmodell weniger stark einen Einfluss auf die Therapie des akuten Schubes zu nehmen. Es kann zumindest bei Betrachtung des klinischen Verlaufes kein signifikanter Unterschied nach Therapie mit PLP10 oder MPLP10 festgestellt werden. Bei Betrachtung der Ergebnisse zu Untersuchungen histopathologischer Entzündungscharakteristika, wie Infiltration von Makrophagen, Demyelinisierung und Axondichte, erwies sich jedoch MPLP10 in der Therapie der DA-Ratte als überlegen gegenüber PLP10 (Linker et al. 2008). Als eine Erklärung dafür kann auf die von Buttgerit et al. erhobenen Daten bzgl. der größeren relativen Wirkstoffpotenz von MPRED gegenüber PRED verwiesen werden (Buttgerit et al. 1999; Buttgerit 2000).

Auch bei freien GC, MPRED und PRED (siehe Ergebnisteil Abb.8 auf Seite 46) besteht kein signifikanter Unterschied im Verlauf der EAE bis Tag 9 nach Therapiebeginn.

Ob das therapeutische Potential von PLP allein auf den Liposomen als Vehikel für die GC mit deren vorteilhaften pharmakokinetischen Eigenschaften beruht bedarf weiterer Untersuchungen. Für einen Vergleich der liposomalen Therapie mit DEX standen leider keine DEX-Liposomen zur Verfügung. DEX konnte als einziges frei appliziertes GC, bei höherer Dosis, eine gleiche Wirksamkeit in der Therapie der EAE wie unter Therapie mit PLP10 demonstrieren.

#### **4.2.1 Die Therapie der EAE mit PLP führt zu keiner signifikanten Reduktion der Zellinfiltrate in der frühen Entzündungsreaktion**

Neben den rein klinisch beobachteten Versuchen wurden histologische Untersuchungen zur Infiltration von CD3<sup>+</sup> -T-Zellen und MAC3<sup>+</sup> -Makrophagen durchgeführt. Als ein weiteres Merkmal der autoimmunen Entzündungsreaktion der durch MOG<sub>35-55</sub> induzierten aktiven EAE dient der Nachweis von Schäden neuronaler Axone im RM. Dies wurde anhand von Akkumulationen des Alzheimer-Precursor-Proteins (APP<sup>+</sup>) im RM-Querschnitt nach Therapiebeginn des akuten Schubes zusätzlich untersucht. Bei vermehrtem Axonschaden treten Lähmungserscheinungen auf, die den Verlauf der EAE verschlechtern. Im Material von ZNS-Biopsien bei MS-Patienten zeigte sich eine Korrelation von Axonschaden mit der Infiltration neurotoxischer Makrophagen und T-Zellen (Ferguson et al. 1997; Bitsch et al. 2000). In Studien über ischämische Hirnschäden und Hirntrauma konnte gezeigt werden, dass sich der Nachweis des akkumulierten APP<sup>+</sup> im proximalen Ende durchtrennter Axone für den Nachweis eines akuten Axonschadens eignet (Yam et al. 1997; Pierce et al. 1996).

Die Akkumulation von APP tritt im Mausmodell mit MOG<sub>35-55</sub> bereits frühzeitig ein (Herrero-Herranz et al. 2008).

Es zeigte sich für die mit PLP behandelten Tiere kein pathologisches Korrelat im RM-Querschnitt, welches der gemilderten Klinik der EAE entspricht. Trotz des positiven Effektes auf den klinischen Verlauf der EAE wurden hohe Zellinfiltrate unter einer Therapie mit PLP10 und PLP3 sowie auch vermehrter Axonschaden festgestellt.

Hingegen werden die zuvor klinisch beobachteten Unterschiede in der Milderung des EAE-Verlaufes durch das jeweilige GC in den reduzierten Zellinfiltraten und geringerer Axonschaden der mit PRED behandelten Tieren und noch stärkere Reduktionen der mit DEX behandelten Mäuse bestätigt. Entsprechend ihrer unterschiedlichen Potenz für glukokortikoide Wirkungen, lassen sich weniger Zellinfiltrate und Axonschaden bei den mit DEX behandelten Mäusen als für die mit PRED therapierten Mäusen nachweisen.

In anderen Tiermodellen der EAE demonstrierten die Liposomen nicht nur klinisch, sondern auch im histologischen Korrelat mit reduzierten Zellinfiltraten sogar ihre Überlegenheit gegenüber der konventionellen Applikation höher dosierter GC. Im monophasischen EAE-Modell der Lewis-Ratte konnten durch PLP10 mehr apoptotische T-Zellen, weniger Infiltrate jeweils von T-Zellen und Makrophagen sowie eine größere Integrität der BHS nachgewiesen werden als bei den Tieren unter Therapie mit konventionellem MPRED (Schmidt et al. 2003). Der Anteil TNF- $\alpha$  positiver T-Zellen und Makrophagen konnte bei geringerer Absolutdosis von PLP10 gegenüber 2 x 50 mg/kg KG MPRED in gleichem Ausmaße reduziert werden. Höhere Raten apoptotischer Makrophagen waren dagegen nicht nachzuweisen. Auch im chronisch-schubförmigen EAE-Modell der DA-Ratte führte PLP10 im Vergleich mit MPRED zu signifikant reduzierten Infiltrationen von T-Zellen und Makrophagen im RM. Ebenso konnte eine höhere Integrität der BHS durch Therapie mit PLP10, zudem weniger Demyelinisierung und der Erhalt einer höheren Dichte an Axonen nachgewiesen werden als dies für die mit dreifach höher dosiertem MPRED therapierten Ratten gezeigt wurde (Linker et al. 2008). Linker et al. bestätigte zudem die klinischen und immunhistochemischen Ergebnisse der Therapie mit PLP10 durch geringere zentrale Läsionen mittels in-vivo Aufnahmen anhand von Magnet-Resonanz-Tomographien.

Ein Grund dafür, warum sich in den durchgeführten Experimenten zur akuten Entzündungsreaktion der EAE erstmalig höhere Zellinfiltrate bei verbesserter Klinik nach Therapie mit PLP beobachten lassen kann vorerst nicht genannt werden. Es wird vermutet, dass der beobachteten Diskrepanz von positiven Effekten auf den klinischen Verlauf einerseits und hohen Zellinfiltraten im histopathologischen Korrelat andererseits, weitere relevante Wirkungen sowie noch unbekannte Wirkmechanismen zu Grunde liegen, die eine Therapiefähigkeit der EAE insbesondere mit PLP im Mausmodell erklären. Inwiefern PLP

insbesondere das zelluläre Milieu der Makrophagen und T-Zellen beeinflussen wird im Folgenden diskutiert (siehe 4.2.2.1 und 4.2.2.2).

Die Idee, dass die Therapie mit PLP über einen verminderten akuten Axonschaden die Progression der EAE mildert, kann aufgrund hoher APP-Akkumulationen im RM ausgeschlossen werden. Langfristige Auswirkungen auf das Ausmaß der Axonschäden sowie auch auf eine reduzierte Entzündungsreaktion zu einem späteren Zeitpunkt des Erkrankungsprozesses sind nicht ausgeschlossen. Hierbei gilt es jedoch zu berücksichtigen, dass in Korrelation mit der Zeit nach einem akuten Erkrankungsbeginn weniger Entzündungszellen sowie APP<sup>+</sup>-Axone nachzuweisen sind und der Nachweis von APP ein transientes Phänomen ist (Kuhlmann et al. 2002).

In Zukunft bedarf es der Durchführung weiterer Experimente, die vergleichend auch Unterschiede im Ausmass auf eine Demyelinisierung und Axondichte berücksichtigen. In chronischen Stadien der schubförmigen EAE im Modell der DA-Ratte korreliert insbesondere das Ausmass des Verlustes von Axonen signifikant mit dem klinischen Erscheinungsbild der Erkrankung (Papadopoulos et al. 2006).

#### **4.2.2 Wirkungsmechanismus der Liposomen**

Die Wirkungsweise hoch dosierter GC bei akuten Schüben wurde durch neu gewonnene Erkenntnisse anhand der Therapie der EAE mit DEX näher erläutert. Dabei konnte zunächst die Notwendigkeit des Zytosolischen GR in hämatopoetischen Zellen für eine erfolgreiche Therapie demonstriert werden. Ferner wurde in weiterführenden Experimenten speziell der GR in T-Zellen, als Zielzellen innerhalb des hämatopoetischen Zellsystems, identifiziert (Wüst et al. 2008).

Ungewiss ist es, ob für GC verpackt in Liposomen derselbe Wirkmechanismus zu Grunde liegt, wie dies für konventionelle GC diskutiert wird. Liposomen verhindern zunächst die freie Verfügbarkeit der GC nach systemischer Applikation. Wie der Vergleich von heterozygoten GRN<sup>+/-</sup>-Mäusen mit den entsprechenden Kontrolltieren zeigt, werden PLP-Wirkungen auch über den im Zytosol vorliegenden GR in der Therapie der EAE vermittelt. In einem weiteren vergleichenden Experiment mit Tieren deren GR speziell in T-Zellen ausgeknockt ist, GR<sup>lckCre</sup>-Mäuse, beobachtet man unabhängig von der Expression des GR einen signifikant milderen Verlauf der mit PLP10 therapierten EAE als nach Gabe von PBS. Für die Therapie mit konventionell appliziertem DEX in einem gleich aufgebauten Experiment konnte diesbezüglich jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Wüst et al. 2008). Therapeutische Wirkungen des DEX sind von einer Expression des GR in T-Zellen abhängig. Hingegen ist die Expression des GR in T-Zellen nicht absolut notwendig, um die an EAE erkrankten BL/6 Mäuse der GR<sup>lckCre</sup>-Gruppe mit PLP zu therapieren. Demnach sind

T-Zellen in der Therapie der MOG-EAE mit PLP nicht die einzigen entscheidenden Zielzellen.

#### **4.2.2.1 Therapieschema, Dosis und Konzentration der GC beeinflusst zelluläres Milieu und dadurch GC-Wirkungen auf Makrophagen**

In Tiermodellen zur Analyse anderer entzündlicher Prozesse, wie Kontakthypersensitivität (KHS) oder Septischer Schock (Bhattacharyya et al. 2007), wurden v.a. Makrophagen und Neutrophile Granulozyten als Zielzellen der glukokortikoiden Wirkungen identifiziert.

Am Beispiel der T-Zell vermittelten Immunreaktion bei der KHS konnte die Relevanz des GR in Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten für antiinflammatorische GC-Effekte hervorgehoben werden. Während im Modell für KHS bei Fehlen des GR in Makrophagen und Neutrophilen die zuvor beobachteten reduzierten inflammatorischen Immunreaktionen ausblieben, wurden die therapeutischen Effekte der GC dagegen nach Inaktivierung des GR in T-Zellen nicht beeinflusst (Tuckermann et al. 2007).

Demnach scheinen die Zellen, auf welche die antiinflammatorischen Eigenschaften der GC einwirken, innerhalb des Entzündungsereignisses zu variieren und dem Einfluss des zellulären Milieus sowie des vorliegenden Zytokinprofils zu unterliegen.

Wie im Modell der KHS sind auch im EAE-Modell die Makrophagen wichtige Zellen des Entzündungsgeschehens, die neben der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine an der Entstehung von Axonschaden und Demyelinisierung beteiligt sind und im Rahmen der Rekrutierung das entzündete Gewebe infiltrieren (Hendriks et al. 2005).

Der Verlauf der EAE ließ sich zumindest mit hoch dosierten Gaben von konventionellem DEX unabhängig von einem knock-out des GR in myeloiden Zellen therapieren (Wüst et al. 2008), sodass den Makrophagen im Rahmen des Entzündungsgeschehens der EAE keine wesentliche Rolle als Zielzellen für eine Therapie insbesondere mit konventionellen GC zugeordnet werden kann.

Voreilig sollte jedoch nicht auf gleiche Ergebnisse bzgl. der Rolle der Makrophagen für eine Therapie mit PLP geschlossen werden. Die T-Zellen liessen sich anders als bei einer Therapie mit DEX nicht als die exklusiven Zielzellen für eine Therapie mit PLP bestätigen. Wegen dieses klaren Unterschiedes ist es durchaus möglich, dass GC, wie im Modell für KHS auch auf Makrophagen einwirken, wenn sie, wie im Rahmen dieser Arbeit demonstriert, mittels Liposomen appliziert werden.

Eine Erklärung dieser Möglichkeit ist ein Mechanismus der für die Wirksamkeit in der Vergabe von Liposomen als Vehikel für Wirkstoffe eine bedeutende Rolle spielt, die „Makrophagen-vermittelte-Wirkstofffreilassung“ (Storm et al. 1988). In diesem Falle wirken die phagozytierten GC unmittelbar auf Makrophagen ein. Weitere Experimente zur Analyse des Wirkmechanismus unter Verwendung von Zelltyp-spezifischer knock-out-Tiere, deren

GR in Makrophagen nicht exprimiert werden kann, sog. GR<sup>lysMCre</sup>-Tiere, konnten nicht mehr im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden. Vorläufige, bisher noch unveröffentlichte Ergebnisse weisen jedoch daraufhin, dass PLP neben den T-Zellen zusätzlich auch auf Makrophagen in einem Ausmass einwirken, wie es für konventionelle GC zuvor nicht nachgewiesen werden konnte (Lühder, 2009).

Die Frage nach der Rolle der Makrophagen bei einer Therapie der EAE mit PLP ist insofern auch von Relevanz, da GC dosisabhängig gegenteilige Effekte bei Makrophagen bewirken, wie ex-vivo Analysen an peritonealen Makrophagen bei Ratten ergaben. Dort führte eine hohe GC-Konzentration von  $10^{-6}$  M, wie sie bei Applikation von PLP über einen langen Zeitraum erreicht werden kann (Schmidt et al. 2003b), zu einer verminderten mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine im Sinne einer Immunsupprimierung (Lim et al. 2007). Eine geringere Konzentration von  $10^{-10}$  M, die eher der Konzentration nach systemischer Gabe konventioneller GC entspricht, ergab eine höhere mRNA Expression dieser Zytokine, wie sie bei Aktivierung eines Entzündungsgeschehens gemessen werden kann. Es ist daher durchaus möglich eine therapeutisch günstige Einflussnahme liposomaler GC auf das Zytokinprofil zu berücksichtigen, welches durch höher erreichbare GC-Konzentrationen bei Applikation von PLP erklärt werden kann. Diese Ergebnisse mögen zudem auch dazu dienen den Nachweis verminderter TNF- $\alpha$  positiver T-Zellen und Makrophagen im RM von an EAE erkrankten Ratten nach Therapie mit PLP10 zu erklären (Schmidt et al. 2003a). GC-Effekte sind demnach abhängig von der vorliegenden GC-Konzentration und können bei erhöhten GC-Spiegeln neben einer Supprimierung auch modulierend auf das Immunsystem einwirken. Zukünftig sollten daher auch Proliferationsparameter der Makrophagen, wie MHCII-Expression, IL-1, iNOS und Chemokine unter Einwirkung von PLP untersucht werden.

Des Weiteren muss in zukünftigen Experimenten die unterschiedliche Funktion von Subtypen z.B. der infiltrierenden Makrophagen und auch der T-Zellen berücksichtigt werden, um eine präzise Aussage zu den entscheidenden Akteuren der Entzündungsreaktion treffen zu können. Man unterscheidet heute zwischen zwei Typen von Makrophagen. Zum Einen die durch IFN- $\gamma$  „klassisch aktivierten“ Makrophagen, auch als „M1-Makrophagen“ bekannt und zum Anderen die durch IL-4 und IL-13 „alternativ aktivierten“ Makrophagen, sog „M2-Makrophagen“ (Mantovani et al. 2004). IL-4 und IL-13 sind anerkannt, eine Suppression proinflammatorischer Zytokine zu vermitteln und ein entzündungshemmendes Milieu zu induzieren (Martinez et al. 2008), weshalb sie von Bedeutung sind eine TH1-Zellantwort zu unterdrücken. Auch wenn nur wenig von den primär im Tiermodell untersuchten „alternativ aktivierten“ Makrophagen bekannt ist, so bestehen Unterschiede zu den klassisch aktivierten Makrophagen. Sie exprimieren unterschiedliche Rezeptoren für Phagozytose, besitzen

andere Fähigkeiten der Pino- und Endocytose und sie nehmen eine Schlüsselrolle beim Anlocken anderer Immunzellen hin zum Entzündungsherd ein sowie bei der Suppression der TH1-Zellantwort und auch im Rahmen der Wundheilung (Martinez et al. 2009). IL-4 und IL-13 werden u.a. von CD4+ -TH2-Zellen (Paliard et al. 1988) und CD8+ -T-Zellen (Seder et al. 1992) produziert und haben vergleichsweise bisher keine herausragende Rolle im Rahmen chronisch-entzündlicher Krankheitsmodelle, wie der EAE, eingenommen. Auch GC und IL-10 werden als Stimuli für eine alternative Aktivierung der Makrophagen hinzugezählt (Martinez et al. 2009).

Um die Wirksamkeit der PLP auf zellulärer Ebene besser erklären zu können, sollte in zukünftigen Experimenten die Möglichkeit berücksichtigt werden, dass PLP zur Generierung eines spezifischen zellulären Milieus wie z.B. primär eine alternative Aktivierung von „M2-Makrophagen“ beitragen, wodurch Einfluss auf zelluläre Interaktionen im Rahmen des Entzündungsgeschehens genommen wird. In Mäusen gilt Arginase 1 als spezifischer Aktivierungsmarker einer alternativen Aktivierung von Makrophagen (Raes et al. 2005), der für eine zukünftige differenzierende Analyse herangezogen werden sollte.

#### **4.2.2.2 PLP-Wirkungen auf T-Zellen**

Chronisch erhöhte GC-Spiegel mildern die Krankheitssymptome der von TH1-Zellen dominierten MS, während sich darunter die von TH2-Zellen abhängigen Krankheiten klinisch verschlechtern (Elenkov und Chrousos 1999).

Es besteht die Hypothese, dass GC über Einflussnahme auf das Zytokinprofil auch von T-Zellen, das Gleichgewicht zwischen TH1- und TH2-Zellen modulieren, was in einer selektiven Suppression TH1-Zell-vermittelter Immunantworten resultiert. Ferner wird angenommen, dass durch chronisch erhöhte GC-Spiegel die Suszeptibilität für Infektionen, Allergien und Autoimmunkrankheiten beeinflusst wird (Elenkov 2004).

Heute ist es noch rein spekulativ, inwiefern die veränderte Pharmakokinetik der GC in Liposomen gegenüber der kurzen HWZ konventioneller GC, einen andersartigen Einfluss auf die Homöostase des systemischen und lokalen Entzündungsgeschehens nimmt. Die Konsequenz daraus für molekulare Effekte in Bezug auf die Therapie der EAE mit PLP über einen Zeitraum von mehreren Tagen bedarf weitergehender Experimente.

Einen Ansatz zur Auswirkung der verlängert zirkulierenden liposomalen GC bieten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur peripheren T-Zell-Depletion unter Therapie mit PLP. T-Zellen werden im Zusammenhang mit der lokalen Entzündungsreaktion im ZNS aus der Peripherie rekrutiert (Targoni et al. 2001). Für konventionelle GC konnte gezeigt werden, dass auch periphere T-Zellen je nach Wahl des GC in unterschiedlichem Ausmaß von einer Depletion betroffen sind. Die Zahlen peripherer T-Zellen waren 24 Std.

nach Applikation von DEX auf 20% reduziert. Nach Gabe von MPRED wurde die Zellzahl hingegen nur auf 80% innerhalb von 24 Std. reduziert (Wüst 2007).

Auch PLP bewiesen ihre Potenz bzgl. einer peripheren Depletion der T-Zellen in der Milz. Im Vergleich mit DEX war der Einfluss der PLP auf die T-Zell-Depletion jedoch unterlegen. (siehe Abb.17 auf Seite 58) Untersuchungen dazu im Modell der MBP-EAE an Lewis-Ratten zeigten hingegen einen stärkeren Effekt der PLP auf eine Depletion der T-Zellen in Milz als durch konventionelles MPRED (Linker et al. 2008).

In den Untersuchungen dieser Arbeit war im Vergleich mit DEX oder PRED die Tendenz eines veränderten Verhältnisses von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in den ersten 10 Std. unter Wirkung von PLP am stärksten ausgeprägt. Im EAE-Modell mit Ratten konnte dies signifikant 48 Std. nach Applikation nachgewiesen werden, was einem noch längeren Zeitraum der liposomalen Einwirkung bis zur unternommenen Analyse entspricht (Linker et al. 2008).

Neben dieser immunmodulierenden Einflussnahme konnten protektive Effekte durch Gabe von PLP demonstriert werden, so dass, anders als nach Gabe von PBS oder sogar konventionellem MPRED, die mit PLP therapierten Tiere keinen 2.Schub der EAE erlitten haben (Linker et al. 2008). In der EAE an Lewis-Ratten konnte eine kontinuierliche Therapie mit DEX den Ausbruch der EAE hemmen, während sich bei den Tieren, nachdem die Applikation von DEX abrupt gestoppt wurde, klinisch und histologisch ein akutes Aufflammen der Entzündungsreaktion zeigte (Reder et al. 1994). Diese Beobachtungen können ebenso als ein Vorteil langanhaltend einwirkender GC gewertet werden, wie sie eher durch die Pharmakokinetik der PLP als durch konventionelle GC erreicht werden.

Konventionelle GC beenden eine Immunantwort akut mit Hilfe der Apoptoseinduktion (Tuckermann et al. 2005, Herold et al. 2006). Sie beeinflussen die Produktion diverser Zytokine sowie den prozentualen Anteil bestimmter Immunzellen am Entzündungsgeschehen und nehmen direkt Einfluss auf die Funktion enzephalitogener T-Zellen (Lühder und Reichardt 2009).

Die GC-induzierte Apoptose von T-Zellen im ZNS EAE-erkrankter Ratten, dessen maximales Ausmaß in der Erholungsphase nach einem Erkrankungsschub gemessen werden kann, wird mit für die Terminierung der Entzündungsreaktion verantwortlich gemacht (Schmidt et al. 2000, Gold et al. 1997). Eine Analyse, die den Anteil der in Apoptose getriebenen T-Zellen ermittelt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen. Jedoch konnten im Vergleich mit konventioneller GC-Therapie auch nach Therapie mit PLP10 signifikant höhere Anteile apoptotischer T-Zellen innerhalb des Zellinfiltrates im RM von EAE erkrankten Ratten nachgewiesen werden (Schmidt et al. 2003b).

Bei den T-Zellen können diverse Subtypen, wie regulatorische T-Zellen (T-Reg), TH1-, TH2-, TH17-Zellen unterschieden werden, denen in der EAE eine eigene Rolle innerhalb des immunologischen Geschehens zugeordnet wird (Hafler et al. 2005; Zamvil und Steinman 1990; Komiyama et al. 2006). Die meisten der proinflammatorischen Zytokine werden von TH1- und TH17- Zellen produziert und durch GC herunterreguliert. Im Gegensatz dazu werden die für T-Reg spezifischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  durch GC hochreguliert (Correale et al. 1998; Gayo et al. 1998). Neben der Einflussnahme auf die Differenzierung der T-Zellen hin zu TH2-Zellen durch GC, wird ferner angenommen, dass sie auch die Expansion von T-Reg bewirken und somit die Empfänglichkeit für EAE und MS beeinflussen. Ihre Aktivierung und Expansion konnte im Modell der EAE die Infiltration pathogener T-Zellen in das ZNS hemmen und die Sekretion TH2-spezifischer Zytokine erhöhen, wohingegen die Sekretion von IFN- $\gamma$  reduziert werden konnte (Tischner et al. 2006). Hohe GC-Dosen erhöhten den Anteil CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> -T-Reg in naiven Mäusen (Chen et al. 2004), deren Akkumulation im ZNS mit einem milderem EAE-Verlauf korreliert (McGeachy et al. 2005). Therapie mit GC führte ebenso in humanen Studien zu einer gesteigerten Anzahl von T-Reg sowie einem verbesserten Krankheitsverlauf der Patienten (Navarro et al. 2006; Aristimuño et al. 2008)

Der hier verwendete Ak zur Detektion der T-Zellen in den immunhistochemischen Untersuchungen ist gegen eine Komponente des TCR gerichtet, wie er von diversen T-Zellen exprimiert wird. Eine Aussage über die Zusammensetzung des T-Zellinfiltrates aus spezifischen Subtypen im RM kann daher nicht getroffen werden kann.

Eine weitere Möglichkeit für die Wirkung von PLP ist es, eine verstärkte Rekrutierung speziell von T-Reg Zellen zu bewirken, die in der Summe einerseits zu einer verbesserten Klinik führen und andererseits ein höheres Zellinfiltrat bedingen. Zumindest die Tendenz eines steigenden Anteils von T-Reg Zellen in peripheren Organen, in der Milz und in Lymphknoten, konnte im Modell der DA-Ratte nach PLP-Gabe nachgewiesen werden (Linker et al. 2008). Zukünftige Experimente mit PLP in der Therapie der EAE sollten insbesondere sowohl die Expression proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise IL-1, IL-6, IL-17, IL-23 und IFN- $\gamma$ , als auch antiinflammatorisch wirkender Zytokine wie IL-10 und IL-13 im Vergleich mit konventionellen GC untersuchen, um mögliche Unterschiede in den Auswirkungen einer prolongierten GC-Wirkung zu demonstrieren.

#### **4.2.2.3 Ausblick Liposomen und GC-Therapie in Zukunft**

Liposomen als Transporter für Medikamente sind nach wie vor interessant für eine Therapie der EAE. Zuletzt konnte bezüglich der Pharmakokinetik der Liposomen deren Akkumulation in endoneuralen Gefäßen bereits vor klinischer Manifestation der Entzündung speziell für positiv geladene Liposomen nachgewiesen werden (Cavaletti et al. 2009). Auch die

niederfrequente Applikation von liposomal transportiertem Minocycline in der Behandlung der EAE konnte die therapeutische Wirksamkeit der Liposomen als Vehikel demonstrieren (Hu et al. 2009). Ausserdem zeigten in-vitro Experimente, dass Liposomen mit Hilfe von verankerten Antikörpern in ihrer Lipidmembran ligandenspezifisch an Zielzellen binden. (Gantert et al. 2009). Liposomen könnten dadurch noch spezifischer in das entzündete Gewebe navigiert werden.

Weiteres Potential, das auf den pharmakologischen Eigenschaften der Liposomen beruht, wird in Zukunft noch bessere Therapieoptionen für die Applikation u.a. von GC in der EAE und nachfolgend in der MS ermöglichen.

Um ein vermindertes Auftreten von glukokortikoiden NW zu erreichen macht man sich heute strukturelle Modifikationen bei der Entwicklung selektiver GR-Agonisten zu nutze. Mineralokortikoide Effekte der GC können damit umgangen werden, die Potenz der GC verstärkt und ihre HWZ verlängert werden (Löwenberg et al. 2008).

Das Auftreten von NW, die meist durch Transaktivierung von solchen Genen hervorgerufen werden, die in metabolische Prozesse involviert sind (Schacke et al. 2002), können auch reduziert werden, indem neue GC selektiv primär eine Transrepression induzieren und primär antiinflammatorische Effekte bewirken (Schacke et al. 2007). Nitrosteroiden sind neue, modifizierte GC, die bereits verstärkt antiinflammatorische Effekte zeigten, wobei NW, wie die begünstigende Entstehung von Osteoporose durch glukokortikoide Einwirkung auf Osteoklasten, reduziert wurden (Perretti M et al. 2002).

21-Aminosteroiden sind eine weitere Gruppe von GC-Analoga, die nicht-genomische Effekte ohne mineralo- oder glukokortikoide Wirkungen hervorrufen und dadurch weniger Komplikationen in der GC-Therapie provozieren (Buttgereit et al. 2004). Ferner existiert mit Compound A ein Vertreter nicht-steroidaler GR-Liganden, der in der Therapie der MOG-EAE erfolgreich angewendet wurde und in peripheren T-Zellen GR-abhängig eine Reduktion von LFA-1, CD44 und IL-17 -Produktion bewirkte (Wüst et al. 2009).

#### **4.3 Metabolische Nebenwirkungen werden durch PLP nicht reduziert**

Glukokortikoide rufen ubiquitär NW hervor, die metabolische, endokrine, psychische, gastroenterologische und ophthalmologische Effekte verursachen. Diese begünstigen u.a. das Auftreten einer Osteoporose, der Katarakt, einer Ödembildung, einer Gewichtszunahme, einer Fettleber und eines Diabetes mellitus. Abhängig von Dosis und Therapiedauer sind viele NW reversibel. Entgleiste Stoffwechsellagen stellen insbesondere ein Risiko unter prolongiert erhöhten GC-Konzentrationen dar, wie sie unter chronischer GC-Gabe vorkommen. (Pozzilli et al. 2004).

In Bezug auf die liposomale Applikation von GC in der Therapie der EAE oder RA wird angenommen, dass Ihre klinische Verwendung neben ihrer therapeutischen Überlegenheit auch das Auftreten systemischer NW vermindern kann (Metselaar et al. 2003, Schmidt et al. 2003). In der Tumorthherapie traten unter Verwendung von liposomalem Doxorubicine weniger kardiotoxische Nebenwirkungen auf und liposomales Amphotericine-B führte zu einer geringeren nephrotoxischen Aktivität (Rahman et al. 2007; Hachem et al. 2008).

Systemische NW werden erstmals im Rahmen dieser Arbeit mit PLP an gesunden Mäusen sowie an EAE erkrankten Tieren untersucht. Die Dosisabhängigkeit der beschriebenen immunsupprimierenden GC-Effekte in der EAE oder der MS kann auch für das Auftreten von NW geltend gemacht werden. Zum einen wird parallel zur steigenden GC-Dosis ein lineares Ansteigen für das Auftreten von Beinödemen, Mykosen, einem cushingoiden Phänotyp, Kurzatmigkeit und Schlafstörungen genannt. Zum anderen wird das Überschreiten der täglichen Dosis von 7,5 mg mit einer höheren Frequenz für ansteigende Blutdruckwerte, Depressionen und Entstehung eines Glaukoms angegeben (Huscher et al. 2008).

Die Dosis des PRED in PLP ist mit 10 mg/kg KG bzw. 3 mg/kg KG deutlich geringer als die Dosis der konventionell applizierten GC, von jeweils 100 mg/kg KG. Zudem werden PLP einmalig, konventionelle GC jedoch an drei aufeinanderfolgenden Tagen appliziert, weswegen durchaus ein geringeres Auftreten von NW erwartet werden darf.

Zudem besteht die Annahme der selektiven Lokalisation der PLP im entzündeten Gewebe und einer konsekutiv verminderten Exposition im gesamten gesunden Gewebe, sodass daher ein reduziertes Auftreten von NW erwartet wird (Metselaar et al. 2003).

Die Extravasation der Liposomen ist jedoch auch in gesunden Organen, die physiologisch ein diskontinuierliches oder fenestriertes Endothel aufweisen, wie der Milz oder der Leber möglich. Diesbezüglich beschreiben Hrynyk et al. für Experimente mit Ratten ein sog. „Kompartiment-Model“ zur Evaluierung der Pharmakokinetik nach i.v. Injektion von PLP (Hrynyk et al. 2003). Die vier Kompartimente sind die Leber, die Milz, das zirkulierende Blutvolumen und das Zielgewebe, worin die Liposomen akkumulieren.

Am Beispiel der peripheren Depletion von T-Zellen in der Milz gesunder Tiere kann kein signifikanter Unterschied zwischen PRED und PLP festgestellt werden. Das kann man mit einer Lokalisation im Milz Kompartiment erklären, so dass die lokale GC-Konzentration in der Milz durch Extravasation der PLP erhöht wird.

### 4.3.1 Insulin und Blutzucker

Die Auswirkungen der GC-Therapie auf den BZ-Spiegel zeigen trotz der geringen GC-Dosis durch Gabe von PLP3 oder PLP10 keine signifikante Reduktion der ansteigenden Glukosekonzentration im Vergleich mit der Gabe von 100mg/kg KG PRED oder DEX an drei aufeinander folgenden Tagen.

Insulin bewirkt einen Abfall des hohen Glukosespiegels und umgekehrt stimuliert ein hoher Glukosespiegel die Insulinsekretion aus Pankreaszellen. Kahn et al. erwähnten bereits 1978, dass erhöhte GC-Spiegel eine Insulinresistenz in Leberzellen bewirken, wobei sie nach Entnahme der Nebennieren, dem Syntheseort für GC, eine erhöhte Sensitivität und Bindung von Insulin an den Rezeptor auf Leberzellemembranen bemerkten. Sie erklärten Ihre Beobachtungen mit einer veränderten Affinität der Rezeptoren für Insulin, die von der GC-Konzentration abhängig ist (Kahn CR et al. 1978). In Ratten schränken GC die muskuläre Glukoseaufnahme ein indem GC u.a. die Translokation des muskulären Glukosetransporters GLUT4 hin zur Plasmamembran hemmen (Dimitriadis et al. 1997). Bereits eine geringe DEX-Applikation von 0.5 mg / 100 g KG hatte in Ratten eine ansteigende Insulinkonzentration zur Folge, die mit einer verminderten Bindung an Insulinrezeptoren in Leberzellen assoziiert ist (Koricnac et al. 2006). Für die dort gemessenen maximalen Insulinspiegel 18 Std. und 42 Std. post Applikation wird im Gegensatz zur veränderten Bindungsaffinität v.a. eine reduzierte Anzahl von Bindungsstellen auf den Zelloberflächen verantwortlich gemacht. Auch induzieren GC die Expression metabolisch wirksamer Enzyme, wie im Fall von PEPCK (Hanson und Reshef 1997), das den 1.Schritt der Glukoneogenese katalysiert. Die dadurch induzierte Glukoneogenese kann als ein weiterer Grund, neben der veränderten Affinität für Insulinrezeptoren sowie einer verminderten Anzahl an Bindungsstellen, für den ansteigenden BZ-Spiegel nach GC-Gabe beachtet werden darf.

Wie diese Erkenntnisse nahe legen reagiert der Glukosestoffwechsel äußerst sensibel und über mehrere Wege auf Veränderungen der GC-Konzentration, die wiederum den Insulinspiegel beeinflussen.

Mit Hilfe der ELISA-Technik wurde der Seruminsulinspiegel in gesunden Mäusen gemessen. Dieser weist, anders als in Bezug auf die Auswirkungen des BZ-Spiegels, die Tendenz eines verminderten Anstiegs im Serum nach PLP-Gabe im Vergleich mit DEX oder PRED auf. Hier führt die Applikation von 100 mg/kg KG DEX über drei Tage deutlich zu dem am höchsten gemessenen durchschnittlichen Insulinspiegel.

### 4.3.2 Leberenzyme

Des Weiteren wurde die Auswirkung auf die Expression von drei Leberenzymen mittels PCR analysiert. Die Expression von TAT, PEPCK und FKBP501 wird von GC reguliert (Schmid et al. 1987; Hanson und Reshef 1997). Ein signifikanter Unterschied in dem Ausmaß auf die Expression der Enzyme besteht nicht.

Trotz der deutlich geringen Dosis der PLP kann eine vergleichbar starke Expressionsrate wie mit der 10fach höheren Dosis konventioneller GC gemessen werden. Auch dieses Ergebnis mag mit der Pharmakokinetik der Liposomen erklärbar sein. Für diese wird einerseits eine gewisse Affinität zu Makrophagen angegeben (Ahsan et al. 2002), andererseits wird von einer selektiven Lokalisierung in den Geweben ausgegangen, die ein durchlässiges Endothel aufweisen (Metselaar et al. 2003). Die Leber bietet sich daher als Organ mit einem diskontinuierlichen Endothel gut für eine Akkumulation der Liposomen an. Auch im bereits erwähnten „Kompartiment-Modell“ wird die Leber als ein Ort für die Akkumulation der Liposomen erwähnt (Hrynyk et al. 2003). Dort können sie von Kupffer-Zellen phagozytiert werden, sodass die GC lokal in Leberzellen permeieren und dort ihre genomischen Wirkungen entfalten. Dies erklärt die gleich hohe Expression der Enzyme in der Leber durch PLP, wie sie unter hoch dosierter konventioneller GC-Therapie gemessen wurde.

In den ersten Untersuchungen zu systemischen NW von PLP überhaupt, können bei verminderter Absolutdosis zumindest für die im Rahmen dieser Arbeit berücksichtigten metabolischen Effekte nicht weniger NW als im Vergleich mit einer hoch dosierten Gabe konventioneller GC festgestellt werden. Bis heute liegen keine weiteren Daten zu den postulierten Vorteilen einer PLP-Therapie bezüglich des Auftretens verminderter systemischer NW vor. In Zukunft bedarf es der Durchführung weiterer Experimente in der Hoffnung, dass Nebenwirkungen unabhängig des Lebermetabolismus, wie Osteoporose, Bluthochdruck oder Muskelatrophie (Schakman et al. 2008; Lidofsky und Smith 2009; Dodt et al. 2009) nach Applikation liposomaler GC weniger stark auftreten.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirksamkeit einer modifizierten GC-Therapie in einem Tiermodell der MS, EAE in C57BL/6 Mäusen, nach deren Induktion durch Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub>, untersucht. Die Wirksamkeit diverser synthetisch hergestellter GC einerseits und von PLP andererseits wurde in der Therapie der EAE und unter Berücksichtigung für das Auftreten systemischer NW analysiert. In GR-defizienten Mäusen wurde versucht den Wirkmechanismus der PLP aufzuklären

Zunächst konnte ein Unterschied in der therapeutischen Potenz der GC untereinander auf den Verlauf der EAE demonstriert werden. Triamcinolon und Dexamethason (DEX) schwächten die Klinik der EAE im akuten Schub stärker ab als dies unter Therapie mit Predinsolon (PRED) oder Methylprednisolon (MPRED) beobachtet wurde.

Der Vergleich einer hoch dosierten Therapie konventioneller GC mit geringer dosierten liposomalen GC ergab eine verbesserte Wirksamkeit dieser PLP gegenüber der Therapie mit konventionellem PRED. Bei Beobachtung des klinischen Verlaufes konnte ein Unterschied in der Therapie von 1x10 mg/kg KG PLP und 3x100 mg/kg KG DEX festgestellt werden. Sowohl eine Therapie mit PRED als auch mit MPRED, jeweils verpackt in Liposomen, führte zu einer gleich starken Milderung der EAE im akuten Schub.

Aufgrund der immunhistochemischen Ergebnisse beruht der therapeutische Effekt von PLP im sehr frühen Entzündungsgeschehen des ZNS nicht auf einer stärkeren Reduktion pathologischer Zellinfiltrate oder auf vermindertem Axonschaden.

Die Untersuchung zur Analyse des Wirkmechanismus von PLP mit heterozygoten GRN<sup>+/-</sup> (Knock-out) -Mäusen macht die Relevanz des im Zytosol vorliegenden GR für die Therapie mit PLP deutlich. In weiteren Experimenten stellte sich die Expression des GR in T-Zellen der Kontrollmäuse, GR<sup>fllox</sup>, als vorteilhaft gegenüber zelltyp-spezifischen GR-defizienten Mäusen, GR<sup>lckCre</sup>, dar. Dessen Expression ist jedoch nicht absolut notwendig, um die EAE in ihrem Verlauf zu mildern.

Ferner konnte das Ausmaß systemischer NW unter Applikation trotz der gering dosierten PLP (10 mg/kg KG PRED) im Vergleich mit einer höheren Absolutdosis konventioneller GC (100 mg/kg KG) nicht vermindert werden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Adams RD, Kubik CS (1952): The morbid anatomy of the demyelinating disease. *Am J Med* 12, 510-546.
2. Aharoni R, Arnon R (2009): Linkage between immunomodulation, neuroprotection and neurogenesis. *Drug News Perspect* 22(6) 301-12
3. Ahsan F, Rivas IP, Khan MA, Torres Suarez AI (2002): Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers--liposomes and microspheres--on the phagocytosis by macrophages. *J Control Release* 79, 29-40.
4. Allen TM, Chonn A (1987): Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Lett* 223, 42-46.
5. Allen TM, Hansen C (1991): Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. *Biochim Biophys Acta* 1068, 133-141.
6. Allen TM, Hansen C, Martin F, Redemann C, Yau-Young A (1991): Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1066, 29-36.
7. Almawi WY, Beyhum HN, Rahme AA, Rieder MJ (1996): Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. *J Leukoc Biol* 60, 563-572.
8. Amselem S, Gabizon A and Barenholz Y: A large-scale method for the preparation of sterile and non pyrogenic liposomal formulations of defined size distributions for clinical use. *Liposome Technology 2nd Edition*, Gregoriadis G; CRC Press, Boca Raton 1993, 501-525
9. Aristimuño C, Navarro J, de Andrés C, Martínez-Ginés L, Giménez-Roldán S, Fernández-Cruz E, Sánchez-Ramón S.(2008): Expansion of regulatory CD8+ T-lymphocytes and fall of activated CD8+ T-lymphocytes after i.v. methyl-prednisolone for multiple sclerosis relapse. *J Neuroimmunol* 204(1-2), 131-5
10. Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, Bienert M, Radbruch A, Burmester GR, Lauster R, Scheffold A, Buttgereit F (2004): Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J* 18, 70-80.
11. Ben Nun A, Wekerle H, Cohen IR (1981): The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 11, 195-199.
12. Bernard C. C., Johns, T. G., Slavin, A., Ichikawa, M., Ewing, C., Liu, J., Bettadapura, J. (1997): Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Mol Med* 75, 77-88.
13. Bhattacharyya S, Brown DE, Brewer JA, Vogt SK, Muglia LJ (2007): Macrophage glucocorticoid receptor regulate Toll-like receptor 4-mediated inflammatory responses by selective inhibition of p38 MAP kinase. *Blood* 1009(10), 4313-19
14. Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Brück W (2000): Acute axonal injury in multiple sclerosis Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 123, 1174-1183
15. Bolton C und Flower RJ (1989): The effects of the anti-glucocorticoid RU 38486 on steroid-mediated suppression of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in the Lewis rat. *Life Sci* 45, 97-104
16. Brattsand R., Thalen A., Roempke K., Kallstrom L., Gruvstad E (1982): Influence of 16-Alpha, 17-Alpha-Acetal Substitution and Steroid Nucleus Fluorination on the Topical to Systemic Activity Ratio of Glucocorticoids. *J Steroid Biochem* 16, 779-86
17. Brück W, Lucchinetti C, Lassmann H (2002): The pathology of primary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 8, 93-97.
18. Buchwald P, Bodor N (2004): Soft glucocorticoid design: structural elements and physicochemical parameters determining receptor-binding affinity. *Pharmazie* 59(5), 396-404

19. Buttgereit F (2000): Mechanisms and clinical relevance of nongenomic glucocorticoid actions. *Z Rheumatol* 59(2:II), 119-23
20. Buttgereit F, Wehling M, Burmester GR (1998): A new hypothesis of modular glucocorticoid actions: steroid treatment of rheumatic diseases revisited. *Arthritis Rheum* 41, 761-767.
21. Buttgereit F, Brand MD, Burmester GR (1999): Equivalent doses and relative drug potencies for non-genomic glucocorticoid effects: a novel glucocorticoid hierarchy. *Biochem Pharmacol* 58, 363-368.
22. Buttgereit F, da Silva JA, Boers M, Burmester GR, Cutolo M, Jacobs J, Kirwan J, Köhler L, Van Riel P, Vischer T, Bijlsma JW (2002): Standardised nomenclature for glucocorticoid dosages and glucocorticoid treatment regimens: current questions and tentative answers in rheumatology. *Ann Rheum Dis* 61, 718-22
23. Buttgereit F, Straub RH, Wehling M, Burmester GR (2004): Glucocorticoids in the Treatment of Rheumatic Diseases: An Update on the mechanism of action. *Arthritis Rheum* 50(11), 3408-17
24. Cavaletti G, Cassetti A, Canta A, Galbiati S, Gilardini A, Oggioni N, Rodriguez-Menendez V, Fasano A, Liuzzi GM, Fattler U, Ries S, Nieland J, Riccio P, Haas H (2009): Cationic Liposomes Target Sites of Acute Neuroinflammation in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Mol Pharmacol* 30(2), 99-106
25. Charcot J (1868): Histologie de la sclérose en plaque. *Gazette des Hopitaux* 41, 554-566
26. Chen X, Murakami T, Oppenheim JJ, Howard OM (2004): Differential response of murine CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells to dexamethasone induced cell death. *Eur J Immunol* 114(6), 1425-1433
27. Clore JN, Thurby-Hay L (2009): Glucocorticoid-Induced Hyperglycemia. *Endocr Pract* 15, 469-474
28. Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P (2000): Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343, 1430-1438
29. Correale J, Arias M, Gilmore W (1998): Steroid hormone regulation of cytokine secretion by proteolipid protein-specific CD4+ T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subject. *J Immunol* 161(7), 3365-74
30. Croxtall JD, Choudhury Q, Flower RJ (2000): Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. *Br J Pharmacol* 130, 289-98
31. Dams ET, Oyen WJ, Boerman OC, Storm G, Laverman P, Kok PJ, Buijs WC, Bakker H, van der Meer JW, Corstens FH (2000): 99mTc-PEG liposomes for the scintigraphic detection of infection and inflammation: clinical evaluation. *J Nucl Med* 41, 622-630
32. De Keyser J, Zwanikken CM, Zorgdrager A, Oenema D, Boon M (1999): Treatment of acute relapses in multiple sclerosis at home with oral dexamethasone: a pilot study. *J Clin Neurosci* 6(5), 382-384
33. Diem R, Hobom M, Maier K, Weissert R, Storch MK, Meyer R, Bähr M (2003): Methylprednisolone increases neuronal apoptosis during autoimmune CNS inflammation by inhibition of an endogenous neuroprotective pathway. *J Neurosci* 23, 6993-7000
34. Diem R, Sättler MB, Merkler D, Demmer I, Maier K, Stadelmann C, Ehrenreich H, Bähr M (2005): Combined therapy with methylprednisolone and erythropoietin in a model of multiple sclerosis. *Brain* 128, 375-385
35. Dimitriadis G, Leighton B., Parry-Billings M., Sasson S., Young M., Krause ., Bevan SS., Piva T. Wegener G, Newsholme EA (1997): Effects of glucocorticoid excess on the sensibility of glucose transport and metabolism to insulin in rat skeletal muscle. *Biochem J* 321, 707-712
36. Dodt C, Wellhoner JP, Schutt M, Sayk F (2009): Glucocorticoids and hypertension. *Internist* 50, 36-41
37. Duda PW, Schmied MC, Cook SL et al. (2000): Glatiramer acetate (Copaxone) induces degenerate, TH2-polarized immune responses in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest* 105, 967-976
38. Elenkov IJ (2004): Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. *Ann N Y Acad Sci* 1024, 138-146

39. Elenkov IJ, Chrousos GP (1999): Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. *Trends Endocrinol Metab* 10, 359-368
40. El Etr M, Vukusic S, Gignoux L, Durand-Dubief F, Achiti I, Baulieu EE, Confavreux C (2005): Steroid hormones in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 233, 49-54
41. Ellison GW, Myers LW (1978): A review of systemic nonspecific immunosuppressive treatment of multiple sclerosis. *Neurology* 28, 132-139
42. Engvall E, Perlmann P (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8(9), 871-4
43. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH, (1997): Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 121, 1469-1477
44. Fiel SB, Vincken W (2006): Systemic corticosteroid therapy for acute asthma exacerbations. *J Asthma* 43, 321-31
45. Filippi M, Rovaris M, Rocca MA, Sormani MP, Wolinsky JS, Comi G (2001): Glatiramer acetate reduces the proportion of new MS lesions evolving into "black holes". *Neurology* 57, 731-733.
46. Freund J, Lipton MM, Morrison LR (1950): Demyelination in the guinea pig in chronic allergic encephalomyelitis produced by injecting guinea pig brain in oil emulsion containing a variant of mycobacterium butyricum. *Arch Pathol (Chic)* 50, 108-121.
47. Gametchu B (1987): Glucocorticoid receptor-like antigen in lymphoma cell membranes: correlation to cell lysis. *Science* 236, 456-461.
48. Gametchu B, Watson CS, Wu S (1993): Use of receptor antibodies to demonstrate membrane glucocorticoid receptor in cells from human leukemic patients. *FASEB J* 7, 1283-1292.
49. Gantert M, Lewrick F, Adrian JE, Rössler J, Steenpass T, Schubert R, Peschka-Süss R (2009): Receptor-specific targeting with liposomes in vitro based on sterol-PEG(1300) anchors. *Pharm Res*. 26(3), 529-38
50. Gaur A, Boehme SA, Chalmers D et al. (1997): Amelioration of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with myelin basic protein peptides involves different cellular mechanisms. *J Neuroimmunol* 74, 149-158
51. Gayo A, Mozo L, Suárez A, Tuñón A, Lahoz C, Gutiérrez C (1998): Glucocorticoids increase IL-10 expression in multiple sclerosis patients with acute relapse. *J Neuroimmunol* 85(2), 122-30
52. Gold R, Hartung HP, Lassmann H (1997): T-cell apoptosis in autoimmune diseases: termination of inflammation in the nervous system and other sites with specialized immune-defence mechanisms. *Trends Neurosci*. 20, 399-404
53. Gold R, Hartung HP, Toyka KV (2000): Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Mol Med Today* 6, 88-91.
54. Gold R, Buttgereit F, Toyka KV (2001): Mechanism of action of glucocorticosteroid hormones: possible implications for therapy of neuroimmunological disorders. *J Neuroimmunol* 117, 1-8
55. Gold R, Linington C, Lassmann H (2006): Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129, 1953-1971
56. Göttlicher M, Heck S, Herrlich P (1998): Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J Mol Med* 76, 480-489
57. Gregory SG, Schmidt S, Seth P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A, Caillier S, Ban M, Goris A, Barcellos LF, Lincoln R, Mc Cauley JL, Sawcer SJ, Copmston DA, Dubois B, Hauser SL, Garcia-Blanco MA, Haines JL, (2007): Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis". *Nat Genet* 39(9), 1083-91
58. Gregoriadis G (1989): Liposomes as carriers of drugs. Observations on vesicle fate after injection and its control. *Subcell Biochem* 14, 363-378

59. Gregoriadis G, Florence AT (1993): Liposomes in drug delivery. Clinical, diagnostic and ophthalmic potential. *Drugs* 45, 15-28
60. Grossmann C, Scholz T, Rochel M, Bumke-Vogt C, Oelkers W, Pfeiffer AF, Diederich S, Bahr V (2004): Transactivation via the human glucocorticoid and mineralocorticoid receptor by therapeutically used steroids in CV-1 cells: a comparison of their glucocorticoid and mineralocorticoid properties. *Eur J Endocrinol* 151(3), 397-406
61. Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K (1994): Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265, 103-106
62. Hachem RY, Boktour MR, Hanna HA, Husni RN, Torres HA, Afif C, Kontoyiannis DP, Raad II (2008): Amphotericin B lipid complex versus liposomal amphotericin B monotherapy for invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancy. *Cancer* 112, 1282-1287
63. Hafezi-Moghadam A, Simoncini T, Yang Z, Limbourg FP, Plumier JC, Rebsamen MC, Hsieh CM, Chui DS, Thomas KL, Prorock AJ, Laubach VE, Moskowitz MA, French BA, Ley K, Liao JK (2002): Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 8, 473-479
64. Hafler DA (2004): Multiple sclerosis. *J Clin Invest* 113, 788-794
65. Hafler DA, Slavik JM, Anderson DE, O'Connor KC, De Jager P, Baecher-Allan C (2005): Multiple sclerosis. *Immunol Rev* 204, 208-231
66. Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, de Bakker PI, Gabriel SB, Mirel DB, Ivinson AJ, Pericak-Vance MA, Gregory SG, Rioux JD, McCauley JL, Haines JL, Barcellos LF, Cree B, Oksenberg JR, Hauser SL (2007): Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* 357, 851-862.
67. Hanson RW, Reshef L (1997): Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Biochem* 66, 581-611
68. Harkioliaki M, Holmes SL, Svendsen P et al. (2009): T cell-mediated autoimmune diseases due to low-affinity crossreactivity to common microbial peptides. *Immunity* 30(3), 348-57
69. Hart FD, Clark CJ, Golding JR (1955): Prednisone and prednisolone in the treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet* 269(6898), 998-1001
70. Hartung HP, Warnke C, Hohlfeld R, Kieseier BC (2009): Progressive multifocal leukoencephalopathy. Undesirable side effects of immunotherapy. *Nervenarzt* 80(10) 1143-4, 1146-8, 1150-3
71. Hayes CE (2000): Vitamin D: a natural inhibitor of multiple sclerosis. *Proc Nutr Soc* 59, 531-535
72. Hendriks JJ, Teunissen CE, de Vries HE, Dijkstra CD (2005) : Macrophages and neurodegeneration. *Brain Res Brain Res Rev* 48(2), 185-95
73. Herold MJ, McPherson KG, Reichardt HM (2006): Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell Mol Life Sci* 63, 60-72
74. Herrero-Herranz E, Pardo LA, Gold R, Linker RA (2008): Pattern of axonal injury in murine myelin oligodendrocyte glycoprotein induced experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 30(2), 162-73
75. Hill N, Sarvetnick N (2002): Cytokines: promoters and dampeners of autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 14, 791-797
76. Hrynyk R, Storm G, Metselaar B, Langner M (2003): Pharmacokinetics of liposomes designed to carry glucocorticoids. *Pol J Pharmacol* 55, 1063-1070
77. Hu W, Metselaar J, Ben LH, Cravens PD, Singh MP, Frohman EM, Eagar TN, Racke MK, Kieseier BC, Stüve O. (2009): PEG minocycline-liposomes ameliorate CNS autoimmune disease. *PLoS One* 4(1), e4151. Epub

78. Huscher D, Thiele K, Gromnica-Ihle E, Hein G, Demary W, Dreher R, Zink A, Buttgereit F (2009): Dose-related patterns of glucocorticoid-induced side effects. *Ann Rheum Dis* 68(7), 1119-24
79. Iglesias A, Bauer J, Litzenburger T, Schubart A, Linington C (2001): T- and B- cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Glia* 36, 220-34
80. Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP, Myers LW, Panitch HS, Rose JW, Schiffer RB, Vollmer T, Weiner LP, Wolinsky JS (1998): Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 50, 701-708
81. Jonas JB, Spandau UH, Harder B, Vossmerbaeumer U, Kampeter BA (2005): Intereye difference in exudative age-related macular degeneration with minimally classic or occult subfoveal neovascularization after unilateral intravitreal injection of triamcinolone acetonide. *Am J Ophthalmol* 139(6), 1073-9
82. Jondal M, Pazirandeh A, Okret S (2004): Different roles for glucocorticoids in thymocyte homeostasis? *Trends Immunol* 25, 595-600
83. Kahn CR, Goldfine ID, Neville DM Jr, De Meyts P (1978): Alterations in insulin binding by changes in vivo in the levels of glucocorticoid and growth hormone. *Endocrinology* 103(4), 1054-66
84. Kim HJ, Thao H, Kitaura H, Bhattacharyya S, Brewer JA, Muglia LJ, Patrick Ross F, Teitelbaum SI (2007): Glucocorticoids and the osteoclast. *Ann N Y Acad Sci* 1116, 335-9
85. Komarek A, Dietrich FM (1971): Chemical prevention of experimental allergic encephalomyelitis in rats: a quantitative evaluation of steroids and various non-steroid drugs. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 193, 249-257
86. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y (2006): IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 177, 566-573
87. Koricanac G, Isenovic E, Stojanovic-Susulic V, Miskovic D, Zakula Z, Ribarac-Stepic N (2006): Time dependent effects of dexamethasone on serum insulin level and insulin receptor in rat liver and erythrocytes. *Gen Physiol Biophys* 25(1), 11-24
88. Koritschoner R und Schweinburg F (1925): Klinisch und experimentelle Beobachtungen über Lähmungen nach Wutschutzimpfung. *Z Immunitats Allergieforsch* 42, 217-281
89. Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Brück W (2002): Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain*: 125, 2202-12
90. Kurtzke JF (2005): Epidemiology and etiology of multiple sclerosis. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 16, 327-349.
91. La Mantia L, Eoli M, Milanese C, Salmaggi A, Dufor A, Torri V (1994): Double-blind trial of dexamethasone versus methylprednisolone in multiple sclerosis acute relapses. *Eur Neurol* 34(4), 199-203
92. Lasic DD, Papahadjopoulos D (1995): Liposomes revisited. *Science* 267, 1275-1276
93. Laverman P, Boerman OC, Oyen WJ, Dams ET, Storm G, Corstens FH (1999): Liposomes for scintigraphic detection of infection and inflammation. *Adv Drug Deliv Rev* 37, 225-235
94. Lebar R, Lubetzki C, Vincent C, Lombrail P, Boutry JM (1986): The M2 autoantigen of central nervous system myelin, a glycoprotein present in oligodendrocyte membrane. *Clin Exp Immunol* 66, 423-434
95. Lidofsky S, Smith J (2009): Glucocorticoid-induced osteoporosis in inflammatory bowel disease. *Med Health R I* 92, 128-130
96. Limbourg FP, Huang Z, Plumier JC, Simoncini T, Fujioka M, Tuckermann J, Schutz G, Moskowitz MA, Liao JK (2002): Rapid nontranscriptional activation of endothelial nitric oxide synthase mediates increased cerebral blood flow and stroke protection by corticosteroids. *J Clin Invest* 110, 1729-1738

97. Lim HY, Müller N, Herold MJ, van den Brandt J, Reichardt HM (2007): Glucocorticoids exert opposing effects on macrophage function dependent on their concentration. *Immunology* 122(1), 47-53
98. Linker RA, Weller C, Lühder F, Mohr A, Schmidt J, Knauth M, Metselaar JM, Gold R (2008): Liposomal glucocorticosteroids in treatment of chronic autoimmune demyelination: long-term protective effects and enhanced efficiency of methylprednisolone formulations. *Exp Neurol* 211, 397-406
99. Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408
100. Löwenberg M, Stahn C, Hommes DW, Buttgereit F (2008): Novel insights into mechanisms of glucocorticoid action and the development of new glucocorticoid receptor ligands. 1025-9
101. Lühder F, Göttingen: mündliche Mitteilung, 2007
- ....102. Lühder F, Göttingen: mündliche Mitteilung, 2009
103. Lühder F, Reichardt HM (2009): Traditional concept and future avenues of glucocorticoid action experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis therapy. *Crit Rev Immunol* 29(3), 255-73
104. Lundmark F, Duvefeldt K, Jacobaeus E et al. (2007): Variation in Interleukin 7 receptor alpha chain influences risk of multiple sclerosis. *Nat Genet* 39(9), 1108-13
105. Lutsky BN, Berkenkopf J., Fernandez X., Monahan M., Shue HJ., Tiberi RL., Green MJ (1979): A novel class of potent topical anti-inflammatory agents: 17-benzoylated, 7 alpha-halogeno substituted corticosteroids. *Arzneimittelforschung* 29, 1662-7
106. 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, 677-86
107. Martinez FO, Sica A, Locati M (2008): Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 13, 453-61
108. Martinez FO, Helming L, Gordon S (2009): Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. *Annu Rev Immunol* 27, 451-83
109. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den NS, Weinschenker BY, Wolinsky JS (2001): Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50, 121-127
110. McGeachy MJ, Stephens LA, Anderton SM (2005): Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol* 175(5), 3025-3032
111. Mendel I, Kerlero dR, Ben Nun A (1995): A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol* 25, 1951-1959
112. Metselaar JM, Mastrobattista E, Storm G (2002): Liposomes for intravenous drug targeting: design and applications. *Mini Rev Med Chem* 2, 319-329
113. Metselaar JM, Wauben MH, Wagenaar-Hilbers JP, Boerman OC, Storm G (2003): Complete remission of experimental arthritis by joint targeting of glucocorticoids with long-circulating liposomes. *Arthritis Rheum* 48, 2059-2066
114. Metselaar JM, van den Berg WB, Holthuysen AE, Wauben MH, Storm G, van Lent PL (2004): Liposomal targeting of glucocorticoids to synovial lining cells strongly increases therapeutic benefit in collagen type II arthritis. *Ann Rheum Dis* 63, 348-353
115. 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

116. Mirowska-Guzel D (2009): The role of neurotrophic factors in the pathology and treatment of multiple sclerosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 31(1), 32-8
117. Moser M, De Smedt T, Sornasse T, Tielemans F, Chentoufi AA, Muraille E, Van Mechelen M, Urbain J, Leo O (1995): Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo. *Eur J Immunol* 25, 2818-2824
118. Navarro J, Aristimuno C, Sanchez-Ramon S, Vigil D, Martinez-Ginez ML, Fernandez-Cruz E, de Andres C (2006): Circulating dendritic cell subsets and regulatory T-cells at multiple sclerosis relapse: differential short-term changes on corticosteroids therapy. *J Neuroimmunol* 176, 153-161
119. Nguyen KB, McCombe PA, Pender MP (1997): Increased apoptosis of T lymphocytes and macrophages in the central and peripheral nervous systems of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis treated with dexamethasone. *J Neuropathol Exp Neurol* 56 (1), 58-69
120. Oliveri RL, Valentino P, Russo C, Sibilio G, Aguglia U, Bono F, Fera F, Gambardella A, Zappia M, Pardatscher K, Quattrone A (1998): Randomized trial comparing two different high doses of methylprednisolone in MS: a clinical and MRI study. *Neurology* 50, 1833-1836
121. Orchinik M, Murray TF, Moore FL (1991): A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science* 252, 1848-1851
122. Paliard X, de Waal Malefijt R, Yessel H, Blanchard D et al. (1988): Simultaneous production of IL-2, IL-4 and IFN- $\gamma$  by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones. *J Immunol* 141, 849-55
123. Papahadjopoulos D, Gabizon A (1990): Liposomes designed to avoid the reticuloendothelial system. *Prog Clin Biol Res* 343, 85-93.
124. Papadopoulos D, Pham-Dinh D, Reynolds R (2006): Axon loss is responsible for chronic neurological deficit following inflammatory demyelination in the rat. *Exp Neurol* 197(2), 373-85
125. Paterson PY (1960): Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. *J Exp Med* 111, 119-36
126. Paul C, Bolton C (1995): Inhibition of blood-brain barrier disruption in experimental allergic encephalomyelitis by short-term therapy with dexamethasone or cyclosporin A. *Int J Immunopharmacol* 17, 497-503
127. Pazirandeh A, Xue Y, Rafter I, Sjoval J, Jondal M, Okret S (1999): Paracrine glucocorticoid activity produced by mouse thymic epithelial cells. *FASEB J* 13, 893-901
128. Pender MP, Wolfe NP (2002): Prevention of autoimmune attack and disease progression in multiple sclerosis: current therapies and future prospects. *Intern Med J* 32, 554-63
129. Peltonen L (2007): Old Suspects Found Guilty – The First Genome Profile of Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 357, 327-329
130. Perretti M, Paul-Clark MJ, Mancini L, Flower RJ (2003): Generation of innovative anti-inflammatory and anti-arthritic glucocorticoid derivatives that release NO: the nitro-steroids. *Dig Liver Dis* 35, 41-8
131. Pielen A, Goffette S, Van Pesch V, Gille M, Sindic CS (2008): Mitoxantrone-related acute leukemia in two MS patients. *Acta Neurol Belg* 108(3), 99-102
132. Pierce JE, Trojanowski JQ, Graham DI, Smith DH, McIntosh TK (1996): Immunohistochemical characterization of alterations in the distribution of amyloid precursor proteins and beta-amyloid peptide after experimental brain injury in the rat. *J Neurosci* 16, 1083-1090
133. Pitzalis C, Pipitone N, Perretti M (2002): Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids. *Ann N Y Acad Sci* 966, 108-118.
134. Pozzilli C, Marinelli F, Romano S, Bagnato F (2004): Corticosteroids treatment. *J Neurol Sci* 223, 47-51
135. Pratt WB, Gehring U, Toft DO (1996): Molecular chaperoning of steroid hormone receptors. *EXS* 77, 79-95

136. Raes G, Van den Bergh R, De Baetselier P, Ghassabeh GH, Scotton C, Locati M, Mantovani A, Sozzani S (2005): Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells. *J Immunol* 174(11), 6561
137. Reder AT, Thapar M, Jensen MA. (1994): A reduction in serum glucocorticoids provokes experimental allergic encephalomyelitis: implications for treatment of inflammatory brain disease. *Neurology* 44(12), 2289-94
138. Reichardt HM, Gold R, Luhder F (2006): Glucocorticoids in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Expert Rev Neurother* 6, 1657-1670.
139. Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP (1933): Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J Exp Med* 58(1), 39-53
140. Rosen J, Miner JN (2005): The search for safer glucocorticoid receptor ligands. *Endocr Rev* 26, 452-464
141. Rouser G, Fkeischer S, Yamamoto A (1970): Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 5(5), 494-496
142. Rousseau V, Denizot B, Le Jeune JJ, Jallet P (1999): Early detection of liposome brain localization in rat experimental allergic encephalomyelitis. *Exp Brain Res* 125, 255-64
143. Runmarker B, Andersen O (1995): Pregnancy is associated with a lower risk of onset and a better prognosis in multiple sclerosis. *Brain* 118, 253-261
144. Sauer B, Henderson N (1988): Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5166-5170
145. Schacke H, Docke WD, Asadullah K (2002): Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharm Ther* 96, 23-43
146. Schacke H, Berger M, Rehwinkel H, Asadullah K (2007): Selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAs): Novel ligands with an improved therapeutic index. *Mol Cell Endocrinol* 275, 109-17
147. Schakman O, Gilson H, Thissen JP (2008): Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *J Endocrinol* 197, 1-10
148. Schluesener HJ, Sobel RA, Lington C, Weiner HL (1987): A monoclonal antibody against a myelin oligodendrocyte glycoprotein induces relapses and demyelination in central nervous system autoimmune disease. *J Immunol* 139, 4016-4021
149. Schmid E, Schmid W, Jantzen M, Mayer D, Jastorff B, Schutz G (1987): Transcription activation of the tyrosine aminotransferase gene by glucocorticoids and cAMP in primary hepatocytes. *Eur J Biochem* 165, 499-506
150. Schmidt J, Gold R, Schönrock L, Zettl UK, Hartung HP, Toyka KV (2000): T-cell apoptosis in situ experimental autoimmune encephalomyelitis following methylprednisolone pulse therapy. *Brain* 123 (7), 1431-41
151. Schmidt J, Metselaar JM, Gold R (2003a): Intravenous liposomal prednisolone downregulates in situ TNF-alpha production by T-cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Histochem Cytochem* 51, 1241-1244
152. Schmidt J, Metselaar JM, Wauben MH, Toyka KV, Storm G, Gold R (2003b): Drug targeting by long-circulating liposomal glucocorticosteroids increases therapeutic efficacy in a model of multiple sclerosis. *Brain* 126, 1895-1904
153. Schrempf W, Ziemssen T (2007): Glatiramer acetate: mechanisms of action in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 6, 469-75
154. Screpanti I, Morrone S, Meco D, Santoni A, Gulino A, Paolini R, Crisanti A, Mathieson BJ, Frati L (1989): Steroid sensitivity of thymocyte subpopulations during intrathymic differentiation. Effects of 17 beta-estradiol and dexamethasone on subsets expressing T cell antigen receptor or IL-2 receptor. *J Immunol* 142, 3378-3383

155. Seder RA, Boulay JL, Finkelman F et al. (1992): CD8+ T cell can be primed in vitro to produce IL-4. *J Immunol* 148, 1652-56
156. Senior JH (1987): Fate and behavior of liposomes in vivo: a review of controlling factors. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 3, 123-193
157. Snell ES (1976): The pharmacological properties of corticosteroids in relation to clinical efficacy. *Br J Dermatol* 94 suppl 12, 15-23
158. Song IH, Buttgerit F (2006): Non-genomic glucocorticoid effects to provide the basis for new drug developments. *Mol Cell Endocrinol* 246, 142-146
159. Sospedra M, Martin R (2005): Immunology of Multiple Sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23, 683-747
160. Steinman L (1999): Assessment of animal models for MS and demyelinating disease in the design of rational therapy. *Neuron* 24, 511-514
161. Steinman L, Zamvil SS (2006): How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Ann Neurol* 60, 12-21
162. Storm G, Steerenberg PA, Emmen F, van Borssum WM, Crommelin DJ (1988): Release of doxorubicin from peritoneal macrophages exposed in vivo to doxorubicin-containing liposomes. *Biochim Biophys Acta* 965, 136-145
163. Swanborg RH (2001): Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat: lessons in T-cell immunology and autoreactivity. *Immunol Rev* 184, 129-135
164. Targoni OS, Baus J, Hofstetter HH, Hesse MD, Karulin AY, Boehm BO, Forsthuber TG, Lehmann PV (2001): Frequencies of neuroantigen-specific T cells in the central nervous system versus the immune periphery during the course of experimental allergic encephalomyelitis. *Immunol* 166(7), 4757-64
165. Thiele K, Buttgerit F, Huscher D, Zink A; German Collaborative Arthritis Centres (2005): Current use of glucocorticoids in patients with rheumatoid arthritis in Germany. *Arthritis Rheum* 53(5), 740-7
166. Tischner D, Reichardt HM (2007): Glucocorticoids in the Control of neuroinflammation. *Mol Cell Endocrinol* 275(1-2), 62-70
167. Tischner D, Weishaupt A, van den Brandt J, Müller N, Beyersdorf N, Ip CW, Toyka HV, Gold R, Kerkau T, Reichardt HM (2006): Polyclonal expansion of regulatory T cells interferes with effector cell migration in a model of multiple sclerosis. *Brain* 129(10), 2635-47
168. Traugott U (1989): Detailed analysis of early immunopathologic events during lesion formation in acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol* 119(1), 114-29
169. Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schütz G (1999): Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* 23(1), 99-103
170. Tuckermann JP, Kleiman A, McPherson KG, Reichardt HM (2005): Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 42, 71-104
171. Tuckermann JP, Kleiman A, Moriggi R, Spanbroek R, Neumann A, Illing A, Clausen BE, Stride B, Förster I, Habenicht AJ, Reichardt HM, Tronche F, Schmid W, Schütz G (2007): Macrophages and neutrophils are the targets for immune suppression by glucocorticoids in contact allergy. *J Clin Invest*; 117(5), 1381-90
172. Vermehren C, Jorgensen K, Frokjaer S (1999): Influence of lipopolymer concentration on liposome degradation and blood clearance. *Int J Pharm* 183, 13-16
173. Vermehren C, Jorgensen K, Schifflers R, Frokjaer S (2001): Activity of mammalian secreted phospholipase A(2) from inflammatory peritoneal fluid towards PEG-liposomes. Early indications. *Int J Pharm* 214, 93-98
174. Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM (2002): Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* 20, 125-163

- 
175. Wehling M (1995): Nongenomic aldosterone effects: the cell membrane as a specific target of mineralocorticoid action. *Steroids* 60, 153-156
  176. Wilder RL (1995): Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 13, 307-338
  177. Woodle MC, Newman MS, Cohen JA (1994): Sterically stabilized liposomes: physical and biological properties. *J Drug Target* 2, 397-403
  178. Wüst S, Göttingen: mündliche Mitteilung, 2007
  179. Wüst S, van den Brandt J, Tischner D, Kleiman A, Tuckermann JP, Gold R, Lühder F, Reichardt HM (2008): Peripheral T cells are the therapeutic targets of glucocorticoids in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 180(12), 8434-43
  180. Wüst S, Tischner D, John M, Tuckermann JP, Menzfeld C, Hanisch UK, van den Brandt J, Lühder F, Reichardt HM. (2009): Therapeutic and adverse effects of a non-steroidal glucocorticoid receptor ligand in a mouse model of multiple sclerosis. *PLoS One* 4(12), e8202
  181. Yednock T, Cannon C, Fritz L et al. (1992): Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against  $\alpha 4\beta 1$  integrin. *Nature* 356, 63-66
  182. Yam PS, Takasago T, Dewar D, Graham DI, McCulloch J (1997): Amyloid precursor protein accumulates in white matter at the margin of a focal ischaemic lesion. *Brain Res* 760(1-2), 150-157
  183. Zamvil SS, Steinman L (1990): The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* 8, 579-621

## Danksagung

Mein grösster Dank gilt Herrn PD Dr. Fred Lühder, Abteilung für Neuroimmunologie des Instituts für Multiple Sklerose Forschung (IMSF) Gemeinnützige Hertie-Stiftung, der Universität Göttingen unter Leitung von Prof. Dr. Alexander Flügel.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Brück, Direktor der Abteilung für Neuropathologie der Universität Göttingen, danke ich sehr für seine Unterstützung bei der Realisierung meiner Promotionsarbeit.

Neben der hervorragenden Betreuung meiner Arbeit durch Herrn PD Dr. Fred Lühder danke ich weiterhin seinen Mitarbeitern herzlich für die Unterstützung meiner Tätigkeit im IMSF. Insbesondere gilt mein Dank den ehemaligen Kollegen des IMSF

- Frau Dr. Simone Wüst, Mitarbeiterin des National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, United States of America
- Alexandra Bohl, Mitarbeiterin des Lehrstuhls für Pharmakologie der Universität Würzburg.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei den Kooperationspartnern

- Herrn Prof. Dr. Holger Reichardt und Herrn Dr. Jens van den Brandt aus der Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie der Universität Göttingen
- Herrn Dr. Josbert Metselaar, Pharmakologisches Institut, Universität Utrecht, Niederlande.

---

**Lebenslauf**

Am 16. August 1983 wurde ich als zweiter Sohn meiner Eltern, Eckhard und Cornelia Haine, in Bremen geboren. Meine Schulausbildung habe ich 1989 in Lützensachsen bei Weinheim begonnen und in Ottmaring bei Friedberg/By. sowie in Hofheim im Taunus fortgesetzt. Nach einem Auslandsaufenthalt in Wanganui, Neuseeland, von Juli 1999 bis Februar 2000 habe ich das Oberstufengymnasium in Frankfurt-Höchst besucht. Dort habe ich 2002 meine Schulausbildung mit dem Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife abgeschlossen. Im Wintersemester 2002 habe ich in Köln ein Vorsemester der Medizin an der "Rheinischen Akademie Köln" besucht. Daran anschließend habe ich im Sommersemester 2003 in Köln Mineralogie studiert. Seit dem Wintersemester 2003 bin ich in Göttingen für das Fach Humanmedizin immatrikuliert und habe dort mit Ausnahme des Praktischen Jahres, welches ich in der Schweiz absolviert habe, bis zuletzt studiert. Im September 2009 wurde meine Tochter, Linn Marmet, geboren. Das Studium der Humanmedizin habe ich im Dezember 2009 mit der mündlichen Prüfung in Göttingen abgeschlossen. Seit Januar 2010 bin ich als Assistenzarzt in Bern tätig.