

Aus dem Institut für
Zelluläre und Molekulare Immunologie
(Prof. Dr. rer. nat. J. Wienands)
im Zentrum Hygiene und Humangenetik
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Neuartige Wirkmechanismen und Therapiestrategien von Glukokortikoiden in
der Behandlung von Multipler Sklerose im Tiermodell**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Nils Schweingruber

aus

Hannover

Göttingen 2014

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
I. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Holger M. Reichardt
II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Alexander Flügel

Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.2014

1	Einleitung	1
1.1	Pathogenese, Histologie und Therapie der Multiplen Sklerose	1
1.2	EAE als Modell für MS	4
1.3	Makrophagen	6
1.3.1	Allgemeine Aufgabe von Makrophagen im Immunsystem	6
1.3.2	Klassische und alternative Aktivierung von Makrophagen	6
1.3.3	Makrophagen im Kontext einer EAE	7
1.4	T-Zellen	8
1.4.1	Klassifikation von T-Zellen	8
1.4.2	Chemokine und ihre Rolle in T-Zellen	8
1.4.3	Die CXCL12-CXCR4 Chemokin – Chemokinrezeptor-Achse	10
1.4.4	Die T-Zell-Wanderung durch die Blut-Hirn-Schranke (BBB) bei entzündlichen Prozessen des ZNS	11
1.5	Glukokortikoide (GCs)	13
1.5.1	Molekulare Grundlagen der GC-Behandlung	14
1.5.2	Genetisch veränderte Mausmodelle zur Charakterisierung der Wirkung einer GC-Therapie bei der EAE	16
1.5.3	Die proapoptotische Wirkung von GCs	17
1.5.4	Die klinische Anwendung von GCs	19
1.5.5	Prednisolon-beladene Liposomen (PL)	20
1.5.5.1	Das Konzept der Anwendung von Liposomen	20
1.5.5.2	Pegylierte Liposomen sind stealth-Liposomen	21
1.6	Hypothese und Zielsetzung	22
2	Material und Methoden	24
2.1	Geräte, Materialien, Puffer und Lösungen	24
2.2	Tierexperimente	33
2.2.1	Verwendete Tierstämme/Mausmodelle	33
	wurden an der Universitätsmedizin Innsbruck gezüchtet (Ogilvy et al. 1999).	34
2.2.2	Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis (EAE)	34
2.2.2.1	Aktive EAE-Induktion	35
2.2.2.2	Bewertung der Krankheitssymptome	35
2.2.2.3	Therapeutische Behandlung der EAE	36
2.2.3	Injektionen i.v. und i.p.	36
2.2.3.1	Dexamethason und Liposomen	36
2.2.3.2	Behandlung mit Plerixafor®	36
2.2.3.3	Behandlung mit Antikörpern	37

2.3	Zellbiologische Methoden.....	37
2.3.1	Isolation primärer Lymphozyten.....	37
2.3.2	Knochenmarkisolation	38
2.3.3	Bestimmung der Zellzahl	38
2.3.4	<i>In vitro</i> -Aktivierung von T-Zellen	38
2.3.5	T-Zellisolation durch magnetische Zellsortierung (Auto-MACS®).....	39
2.3.6	T-Zellisolation aus Buffy-Coats oder humanem Blut (EasySep)	39
2.3.7	Durchflusszytometrie (FACS)	40
2.3.8	Apoptose-Assay	41
2.3.9	Migration	41
2.3.10	Makrophagen.....	42
2.3.10.1	Peritoneale Makrophagen	42
2.3.10.2	Bone Marrow Derived Macrophages (BMDM)	42
2.3.11	Phagozytose-Assay.....	43
2.4	Biochemie	44
2.4.1	DNA	44
2.4.1.1	PCR.....	44
	PCR mit Pfu-Polymerase	44
2.4.2	RNA	44
2.4.2.1	Isolation.....	44
2.4.2.2	cDNA-Synthese.....	45
2.4.2.3	Quantitative-Reverse-Transkriptase-PCR (RT-qPCR)	45
2.5	Histologie	47
2.5.1	Immunhistochemie-Protokoll	47
2.6	Statistik.....	48
3	Ergebnisse.....	49
3.1	Liposomal verkapselte GCs wirken im Vergleich zu freien GCs bei der Behandlung einer EAE auf andere Zelltypen und über einen unterschiedlichen Mechanismus.....	49
3.1.1	T-Zellen sind kein Hauptangriffspunkt der PL-Therapie bei einer EAE.....	49
3.1.2	Modulation der Makrophagen durch PL	50
3.1.2.1	Beeinflussung von Makrophagen-Funktion durch PL.....	51
3.1.2.1.1	Beeinflussung der MHC-II-Expression durch PL in vivo.....	51
3.1.2.1.2	Beeinflussung der Phagozytose von Makrophagen durch PL in vitro	52
3.1.2.2	Charakterisierung des Phänotyps der Makrophagen nach In vivo-Behandlung mit PL	53
3.1.2.2.1	PL inhibiert die Genexpression von pro-inflammatorischen Molekülen.....	53

3.1.2.2.2	Die In vivo-Applikation von PL hemmt auch die Genexpression von anti-inflammatorischen Molekülen.....	54
3.1.2.2.3	PL fördert die M2-Polarisierung von Makrophagen.....	55
3.1.2.3	Nachweis des M2-Phänotyps der Makrophagen in vivo bei der EAE	58
3.2	Die Beeinflussung der Chemokin-induzierten Migration von T-Zellen als neuer Wirkmechanismus der GC-Therapie.....	61
3.2.1	GC-induzierte Apoptose von T-Zellen ist für die Therapie einer EAE mit Dex nicht erforderlich	61
3.2.1.1	Bcl-2-überexprimierende T-Zellen sind gegenüber dem GICD resistent.....	61
3.2.1.2	Die EAE in chimären Bcl-2-transgenen Mäusen lässt sich mit Dex behandeln.	63
3.2.1.3	Die EAE in GR ^{dim} -Mäusen lässt sich mit Dex therapieren.	63
3.2.1.4	Die Anzahl der T-Zellen im Rückenmark bei einer EAE von C57Bl/6-GR ^{dim} -Mäusen nimmt nach einer Dex-Therapie ab.....	64
3.2.2	Dex beeinflusst die Migration von T-Zellen <i>in vitro</i>	67
3.2.2.1	Dex hat innerhalb der ersten 5 Stunden keinen Einfluss auf die Expression von Chemokinrezeptoren auf T-Zellen.....	67
3.2.2.2	Dex hemmt die CCL19-induzierte Transmigration von T-Zellen in vitro.	68
3.2.2.3	Dex verstärkt die CXCL12-induzierte Transmigration von T-Zellen in vitro.....	69
3.2.2.4	Dex verstärkt die CXCL12-induzierte Transmigration in vitro unabhängig vom genetischen Hintergrund der Mäuse	70
3.2.2.5	Separate Analyse der Transmigration einzelner T-Zellpopulationen.....	72
3.2.2.6	Wanderungsverhalten aktivierter T-Zellen	74
3.2.3	Untersuchung der Relevanz der <i>in vitro</i> beobachteten Effekte auf die T-Zell-Migration in der Therapie der EAE mit Dex.....	76
3.2.3.1	Rolle der CCR7 – CCL19-Migrationsachse für den Verlauf einer EAE	76
3.2.3.1.1	Eine alleinige CCR7-Antikörper-Behandlung hat keinen Einfluss auf die EAE..	76
3.2.3.1.2	Beeinflussung der CCL19-induzierten T-Zellmigration in vitro durch i.v.-Applikation des CCR7-spezifischen Antikörpers in vivo	76
3.2.3.1.3	Eine Therapie mit CCR7-spezifischen Antikörpern verstärkt die therapeutische Wirkung von Dex.	78
3.2.3.2	Die Verstärkung der CXCL12-induzierten Wanderung von T-Zellen im Kontext einer Dex-Therapie der EAE.	78
3.2.3.2.1	Die Blockade von CXCR4 durch AMD3100 verringert den Therapieeffekt von Dex auf die Behandlung von EAE signifikant.....	78
3.2.3.2.2	In vitro-Nachweis der Hemmung der CXCL12-induzierten Migration durch AMD3100	79
3.2.3.2.3	Immunhistochemische Analyse von EAE-Tieren die mit AMD3100 und Dex behandelt wurden.....	81
3.2.3.2.4	Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	83
3.2.4	Die CXCL12-induzierte Migration humaner T-Zellen <i>in vitro</i> wird durch Dex verstärkt...	84

3.2.5	Die CXCL12-induzierte Migration von T-Zellen von MS-Patienten ist nach einer Methylprednisolon-Therapie ebenfalls verstärkt.....	85
4	Diskussion	89
4.1	Liposomale GCs wirken bei der Behandlung der EAE auf andere Zelltypen und über einen unterschiedlichen Mechanismus im Vergleich zu freien GCs.....	89
4.1.1	Der Weg der Liposomen ist das Ziel der Therapie	89
4.1.2	Werden Makrophagen durch PL beschränkt oder gelenkt?	91
4.1.3	Die Zytokinfreisetzung von Makrophagen wird durch Dex und PL gleichermaßen gehemmt	93
4.1.4	Makrophagen werden durch eine Behandlung mit PL in Richtung M2-Typ polarisiert ...	94
4.1.5	Wozu wird CD163 auf M2-ähnlichen durch PL induzierten Makrophagen benötigt? Ist es ein potentielles Ziel für Therapien?.....	96
4.2	Die Beeinflussung der Chemokin-induzierten Migration von T-Zellen als neuer Wirkmechanismus der GC-Therapie.....	98
4.2.1	Dex wirkt unabhängig von GICD	98
4.2.2	GCs steuern die Wanderung von T-Zellen	100
4.2.2.1	T-Zellen werden durch GCs in ihrer Wanderung im Körper umgelenkt.....	100
4.2.2.2	GCs fördern die CXCR4-vermittelte Migration von T-Zellen – ein konservierter Weg	101
4.2.2.3	Die Behandlung einer EAE mit GCs ist von CXCR4- und damit von der CXCL12-induzierten Migration der T-Zellen abhängig.....	102
4.2.2.4	Der konservierte Weg über CXCR4 wird auch durch T-Zellen von MS-Patienten nach Methylprednisolon-Puls-Therapie vermehrt eingeschlagen	105
4.2.2.5	Kampf oder Flucht des Immunsystems – weiterführende Thesen.....	106
5	Literaturverzeichnis	109

Abbildung 1: Chemokinrezeptorexpression auf unterschiedlichen T-Zell-Klassen	9
Abbildung 2: Transmigration von T-Zellen durch die Blut-Hirn-Schranke	12
Abbildung 3: Molekulare Wirkung des GR	16
Abbildung 4: Behandlungsschema	36
Abbildung 5: EasySep T-Zell-Isolation	40
Abbildung 6: Transwell-Wanderung	42
Abbildung 7: Phagozytose-Assay	43
Abbildung 8: Einfluss des Applikationswegs von PL auf die Behandelbarkeit einer EAE	50
Abbildung 9: Reduktion der MHC-II-Oberflächenexpression auf peritonealen Makrophagen nach <i>In vivo</i> -Behandlung mit Dex oder PL	52
Abbildung 10: Einfluss von PL und Dex auf die Phagozytose von CFSE-gefärbten Lymphozyten durch BMDMs	53
Abbildung 11: Die Genexpression von peritonealen Makrophagen 24 Stunden nach einer Behandlung mit PBS, Dex oder PL <i>in vivo</i>	55
Abbildung 12: Expressionsänderungen von Markern für einen M2-Phänotyp bei peritonealen Makrophagen von C57Bl/6-wt-Mäusen nach einer Behandlung mit PBS, Dex und PL <i>in vivo</i>	56
Abbildung 13: Die Hochregulation von Markern von peritonealen Makrophagen, die für einen M2-Phänotyp typisch sind, ist GC-abhängig.	58
Abbildung 14: Histologische Analyse von CD163+-Zellen im Rückenmark von EAE-kranken Tieren die mit PBS oder PL behandelt wurden.	59
Abbildung 15: Die CD163-Genexpression ist bei Lymphozyten aus dem Rückenmark und den Meningen von an EAE-erkrankten Mäusen nach PL-Behandlung höher....	60
Abbildung 16: GC-induzierte Apoptose von T-Zellen ist für die Therapie von EAE bei C57Bl/6-wt-Mäusen mit Dex nicht erforderlich.....	62
Abbildung 17: Die EAE von Balb/c-wt- und GR ^{dim} -Mäusen lässt sich mit Dex behandeln.....	64
Abbildung 18: FACS Analysen von Zellen aus dem Rückenmark und der Milz von C57Bl/6-wt- und GR ^{dim} -Mäusen nach Dex-Behandlung einer EAE.	66
Abbildung 19: Dex hat keinen wesentlichen Einfluss auf die Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren CXCR4, CCR7 und CXCR3 auf T-Zellen aus C57Bl/6-wt-Mäusen.....	68

Abbildung 20: Dex hemmt die CCL19-induzierte Transmigration von T-Zellen aus C57Bl/6-wt- nicht aber GR ^{lck} -Mäusen.	69
Abbildung 21: Dex verstärkt die CXCL12-induzierten Transmigration von T-Zellen aus C57Bl/6-wt- und GR ^{dim} -, nicht aber von GR ^{lck} -Mäusen	70
Abbildung 22: Die CXCL12-induzierte nicht aber die CCL19-induzierte Transmigration wird auch bei Balb/c-wt- und GR ^{dim} -T-Zellen durch Dex moduliert. .	71
Abbildung 23: Die Analyse der migrierten Population zeigt einen vergleichbaren Effekt von Dex auf die Transmigration von CD4+, CD8+ sowie Effektor/Memory-T-Zellen.....	73
Abbildung 24: Die Behandlung mit Dex von <i>in vitro</i> aktivierten T-Zellen hat keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression von Chemokinrezeptoren sowie die Transmigration.....	75
Abbildung 25: Die alleinige Therapie mit CCR7-Antikörper hat keinen Einfluss auf die EAE von C57Bl/6-Mäusen, verstärkt aber den Behandlungseffekt einer niedrigen Dosis von Dex	77
Abbildung 26: Die Blockade von CXCR4 durch AMD3100 verringert den Therapieeffekt von Dex in der Behandlung einer EAE.	80
Abbildung 27: Immunhistochemische Analyse der CD3+-Zellen im Rückenmark von EAE-erkrankten Tieren die mit AMD3100 und Dex behandelt wurden.	82
Abbildung 28: Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Analyse von EAE-Tieren die mit Dex und AMD 3100 behandelt wurden.....	84
Abbildung 29: <i>In vitro</i> mit Dex behandelte humane T-Zellen sowie T-Zellen von MS-Patienten nach MP-Stoßtherapie zeigen eine verstärkte CXCL12-induzierte Transmigration.....	87
Abbildung 30: Der Einfluss von GCs auf die CXCL12-induzierte Wanderung	104

- Tabellenverzeichnis -

Tabelle 1: Geräte	24
Tabelle 2: Puffer / Medien / Lösungen	25
Tabelle 3: Chemikalien / biologische Materialien / Medien	28
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien	30
Tabelle 5: Enzyme und Kits	31
Tabelle 6: Antikörper	32
Tabelle 7: Angaben zu den MS-Patienten, die Blut vor und nach einer MP Therapie gespendet haben	88
Tabelle 8: Phänotyp der analysierten Peritonealmakrophagen.....	95

- Abkürzungsverzeichnis -

11 β -HSDII	11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2
ACTH	adrenokortikotropes Hormon
AP-1	Activated Protein 1
APC	Antigen-präsentierende Zellen
BBB	<i>blood brain barrier</i> / Blut-Hirn-Schranke
Bcl	B-cell lymphoma
BMDMs	<i>bone marrow derived macrophages</i> / aus Knochenmark generierte Makrophagen
CD	cluster of differentiation
CD163	Scavanger Rezeptor Gruppe B (Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexe)
CD206	Mannose-Rezeptor
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester (Farbstoff)
Dex	Dexamethason
EAE	Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis
ECM	extrazelluläre Matrix
EPR	<i>enhanced permeability and retention</i> -Effekt
FACS	Durchflusszytometrie
FasL	Fas-Liganden
GC	Glukokortikoid
GCs	Glukokortikoide
GICD	GC-induzierter Zelltod
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
GR ^{dim}	mutierter GR (keine Dimerisierung)
GRE	GR responsive elements /DNA-Bindestelle für GR
GR ^{lck}	fehlender GR in T-Zellen (konditionaler Knockout)
GR ^{LysM}	fehlender GR in Makrophagen (konditionaler Knockout)
HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Achse
HSP	heat shock protein / Hitzeschock-Protein
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
IL	Interleukin
MBP	Myelinbasisches Protein

MDSCs	Myeloid Derived Suppressor Cells
MHC	Hauptgewebeverträglichkeitskomplex Klasse I oder II
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MP	Methylprednisolon
MR	Mineralokortikoid-Rezeptor
MRT	Magenetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NF- κ B	nukleärer Faktor- κ B
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (dient als Kontrolle)
PEG	Polyethylenglycol
PI3K	Phosphinositid-3-Kinase
PL	Prednisolon-gefüllte PEG-Liposomen
PLP	Proteolipid-Protein
PPMS	Primary Progressive MS / primär progrediente MS
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RRMS	Relapsing Remitting MS / schubförmig remittierende MS
s.c.	subkutan
SPMS	Secondary Progressive MS / sekundär progrediente MS
TCR	T-Zell Rezeptor
TGF	<i>tumor growth factor</i>
TLR	<i>toll-like</i> -Rezeptor
TNF	<i>tumor-necrosis</i> -Rezeptorfamilie
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Pathogenese, Histologie und Therapie der Multiplen Sklerose

Multiple Sklerose (MS) ist eine neurodegenerative Autoimmunerkrankung des Menschen. Der erste Fall einer Multiplen Sklerose wurde im Jahr 1838 von einem Schotten namens Carswell durch das makroskopische Bild von vielen (multiplen) Narben (Sklerose) im Bereich der weißen Substanz des Gehirns und des Rückenmarks beschrieben. Daraufhin folgten Berichte aus Deutschland, England und vielen anderen Teilen der Welt. Charcot war es dann, der 1868 diese Fälle zusammenfasste und eine erste umfassende Beschreibung der Erkrankung lieferte (Sherwin 1957). Heute weiß man, dass die Multiple Sklerose die häufigste chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung des Gehirns in der westlichen Welt ist (Noseworthy 2003).

Histologisch ist zunächst eine akute scharf begrenzte Entmarkung der weißen Substanz zusammen mit einer Infiltration von Entzündungszellen ins ZNS zu erkennen. Es wird angenommen, dass die Entzündung zunächst durch das Einwandern von T-Zellen in das Parenchym des Gehirns gekennzeichnet ist. Die T-Zellen reagieren auf die Myelinscheiden der Nerven und setzen somit einen Ausgangspunkt für eine entzündliche Läsion. Der genaue Pathomechanismus ist jedoch immer noch unbekannt (Junker und Brück 2012).

Nach dem Erkennen von körpereigenen Strukturen durch T-Zellen kommt es sekundär zu einem Nachstrom von myeloiden Zellen und wenigen B-Zellen. In den Läsionen sind Makrophagen zu erkennen, die Myelin in ihren Vakuolen tragen (Lucchinetti et al. 1996). Die Axone bleiben zunächst durch den Entzündungsprozess unbeeinträchtigt, liegen aber aufgrund des fehlenden Myelins unisoliert frei. Dies beeinflusst deutlich die saltatorische Leitungsgeschwindigkeit der Axone und spiegelt die Pathophysiologie der Ausfallerscheinungen eines Schubes wider. Die Entzündungen sind bei regulären Schüben selbstlimitierend und es folgt eine Phase, in der Oligodendrozyten die freiliegenden Nervenfasern remyelinisieren. Anhand dieser Kompensation des Gehirngewebes können erste Schübe auch inapparent verlaufen. Daher wird angenommen, dass die MS erst ab einer bestimmten Schwelle

der Läsionslast klinisch in Erscheinung tritt und bleibende neurologische Defizite diagnostiziert werden können (Ferguson et al. 1997).

Für eine klare Diagnose ist es wichtig, eine zeitliche und örtliche Dissemination der Schübe zu verifizieren. Hierbei erfolgte früher die Diagnose rein durch die klinische Diagnostik der neurologischen Defizite (McDonald et al. 2001). Heutzutage gibt es die McDonald-Kriterien, die es zulassen, über die Darstellung der Herde im Gehirn eine MS durch eine einzelne Kernspinaufnahme zu diagnostizieren. Eine zeitliche Unterteilung der im MRT erkennbaren Läsionen ist möglich, da nur Läsionen, die nicht älter als ein paar Wochen sind, Kontrastmittel aufnehmen. Die örtliche Verteilung der Herde wird durch das Auftreten von Läsionen in verschiedenen Bereichen des Gehirns beschrieben. Zur Komplementierung der Diagnostik wird eine Liquorpunktion durchgeführt, um die MS von anderen neuroinflammatorischen Erkrankungen abzugrenzen. Zusätzlich ist die MS häufig durch das Auftreten von oligoklonalen Banden in der Gelelektrophorese des Liquors gekennzeichnet, was eine intrathekale Antikörperproduktion ohne Barriere-Störung widerspiegelt (Polman et al. 2011) .

MS wird klinisch in verschiedene Untergruppen aufgeteilt. Die größte und häufigste Gruppe sind Patienten mit einer schubförmigen MS (Relapsing Remitting MS = **RRMS**). Das durchschnittliche Erkrankungsalter bei einer RRMS liegt zwischen 20 und 30 Jahren, wobei Frauen häufiger betroffen sind als Männer. Die ersten Symptome sind abhängig vom Ort der Läsionen. Oft beschreiben die Patienten Parästhesien (Kribbeln und Missempfindungen) im Bereich der Arme, optische Beeinträchtigungen oder auch eine allgemeine Schwäche (Fatigue) als erste Symptome. Nach einem längeren Verlauf (ca. 10 Jahre) einer RRMS kann sich diese chronifizieren. Die Umwandlung einer RRMS in eine chronische Form, wird Sekundär-Progrediente MS genannt (Secondary Progressive MS = **SPMS**). Die dritte Form ist die Primär-Progrediente MS (Primary Progressive MS = **PPMS**). Sie tritt häufig in einem höheren Alter auf und manifestiert sich klinisch zunächst durch aufsteigende Lähmungserscheinungen. Dadurch werden Patienten mit einer PPMS häufig durch ein sich progressiv verschlechterndes ataktisches und breitbasiges Gangbild klinisch auffällig. Schübe sind bei der PPMS nicht mehr abgrenzbar und gelten als Ausschlusskriterium für eine PPMS. Bei beiden chronischen Formen wird

angenommen, dass ein Entzündungsprozess nicht mehr im Vordergrund steht, sondern sekundär neurodegenerative Veränderungen in Gang gesetzt worden sind (Junker und Brück 2012).

In der Therapie einer RRMS unterscheidet man zwischen der akuten Schubtherapie, einer Basistherapie und einer Eskalationstherapie. Bei der **Schubtherapie** steht die Gabe von hochdosiertem Methylprednisolon (MP) von einem Gramm an drei aufeinanderfolgenden Tagen im Vordergrund. Dies führt in der Regel im akuten Schub zum schnellen Abklingen der Symptome. Eine Erweiterung der Schubtherapie kann die Erhöhung der Dosis, eine Verlängerung der Methylprednisolongabe oder eine Plasmapherese sein (Burton et al. 2009; Durelli et al. 1986; Oliveri et al. 1998). Die **Basistherapie** hat zum Ziel, die Schubhäufigkeit zu verringern. Zunächst kommen immunmodulatorische Substanzen zum Einsatz. Die am häufigsten eingesetzten Medikamente sind Beta-Interferone und Glatirameracetat (Comi et al. 2001; Jacobs et al. 1996). Beide Substanzen verringern wirksam die Anzahl der Schübe, müssen jedoch s.c. oder i.m. gespritzt werden. Aktuell wurde eine Tablette, die ein Derivat der Fumarsäure enthält, als eine neue orale Basistherapie zugelassen (Stroet et al. 2013). Bei der **Eskalationstherapie** werden immunmodulatorische und immunsuppressive Substanzen eingesetzt. Zu der ersten Substanzklasse zählen Fingolimod und Natalizumab. Fingolimod ist eine Substanz, welche als Sphingosin-1-Phosphat-Analogon wirkt und somit T-Zellen an der Extravasion aus dem Lymphknoten hindert (Kappos et al. 2010). Bei Natalizumab handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, der T-Zellen an der Einwanderung in das ZNS hindert. Dieser Antikörper blockiert VLA-4 ($\alpha 4$ -Integrin), welches benötigt wird, damit Lymphozyten an das Endothel des Rückenmarks adhären (Coyle 2010). Als immunsuppressive Substanzen sind insbesondere Mitoxantron, Azathioprin und Cyclophosphamid zu nennen. Diese Medikamente wirken zytostatisch auf das Immunsystem und verringern so die Anzahl der Lymphozyten und sekundär die Entzündungslast. Aktuell werden weiterhin Substanzen diskutiert, die keine direkte Wirkung auf das Immunsystem an sich haben, sondern eine Remyelinisierung fördern und somit neuroprotektiv wirken könnten (Stroet et al. 2013)

Bei der SPMS und PPMS steht die Entzündung nicht mehr im Vordergrund. Hochdosis-MP-Therapien werden daher über einen längeren Zeitraum in einem

Abstand von jeweils 2-3 Monaten wiederholt, um eine Remission oder ein langsames Voranschreiten der Symptome zu bewirken (Thompson et al. 1997). Bei der Therapie der RRMS und besonders bei der chronischen Form der MS, nehmen Ergo- und Physiotherapie oder begleitende Psychotherapie eine zentrale Rolle für die Lebensqualität der Patienten ein (Mohr et al. 2003).

1.2 EAE als Modell für MS

Die Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) ist ein weitverbreitetes Tiermodell der MS. Die Grundlage einer EAE ist die Immunisierung mit Bestandteilen der Myelinscheide von Axonen zusammen mit einem Adjuvans, wie beispielsweise CFA mit dem Ziel, autoreaktive Effektor-T-Zellen zu generieren (Miller und Karpus 2007; Sallusto et al. 2012).

EAE kann bei Affen, Hamstern oder Nagetieren induziert werden. Die verschiedenen Tiermodelle können jeweils nur bestimmte Aspekte der MS widerspiegeln. Das Modell wurde am Anfang durch den Einsatz von kompletten Homogenisaten des Gehirns bei Affen induziert (Rivers et al. 1933). Heute können verschiedene Aspekte der MS in der EAE durch den Einsatz einzelner Proteine der Myelinscheide oder davon abgeleiteter Peptide moduliert werden.

Ein schubförmiger Verlauf einer EAE kann durch Einsatz von Proteolipid-Protein (PLP) bei SJL-Mäusen induziert werden (Zamvil et al. 1985). Das Myelinbasierte Protein (MBP) kommt hingegen zum Einsatz, um bei Lewis-Ratten einen monophasischen Verlauf, ähnlich einem akuten Schub, zu verursachen (Chou et al. 1979). Histologisch kommt es bei einer solchen EAE lediglich zur Einwanderung von Lymphozyten in das Rückenmark, was durch die Bildung eines Ödems zu klinischen Lähmungserscheinungen führt, aber keine Gewebszerstörung hervorruft (Lyman et al. 1989). Dieses Modell wird gerne zur Analyse der immunologischen Aspekte einer MS genutzt, da die Infiltrate denen der MS bei Menschen sehr ähnlich sind.

Zu einer Zerstörung von Axonen und einem chronischen Krankheitsverlauf kommt es beim EAE-Modell der C57Bl/6-Maus, die mit Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein-Peptid 35-55 (MOG₃₅₋₅₅) immunisiert wurde. Dieses Modell kommt dem histologischen Erscheinungsbild der MS am nächsten. Auch hier kommt es zum

Einwandern von T-Zellen und aktivierten Makrophagen ins Rückenmark, jedoch zerstören diese die Myelinscheiden und die in ihnen verlaufenden Axone. Dadurch kommt es klinisch zu einer aufsteigenden Lähmung bei den Tieren. Zunächst ist die Schwanzspitze betroffen, dann verändert sich das Gangbild bis hin zu einer kompletten Parese der Hinter- und Vorderbeine (Schweingruber et al. 2011; Schweingruber et al. 2012).

Grundsätzlich spielen beim Modell der MOG₃₅₋₅₅-EAE alle Zellen des Immunsystems eine Rolle. Man nimmt an, dass dendritische Zellen als Antigen-präsentierende Zellen (APC) das s.c. gespritzte MOG₃₅₋₅₅ aufnehmen und präsentieren können. Dabei wird die ansonsten gegenüber Eigenantigenen tolerante Immunantwort durch das CFA und Pertussistoxin überwunden und in den nahegelegenen Lymphknoten auto-reaktive CD4+-T-Zellen aktiviert. Diese wandern als erstes in das Rückenmark der Mäuse ein und setzen den Ausgangspunkt für eine Entzündung. Sekundär wandern anschließend Makrophagen ein und sorgen für eine ausgeprägte und irreversible Demyelinisierung und Zerstörung von Axonen.

Auch wenn eine EAE bei unterschiedlichen Spezies induziert werden kann, kommen überwiegend Nagetiere zur Anwendung, da das Repertoire an genetisch veränderten Tieren bei Mäusen und Ratten am größten ist. In vielen Fällen werden Knockout-Mäuse benutzt, denen entweder ein bestimmtes Protein komplett fehlt (embryonaler Knockout) oder bei denen ein Protein spezifisch in einer bestimmten Zelle oder zu einem bestimmten Zeitpunkt ausgeschaltet ist (konditionaler Knockout). Die meisten genetisch veränderten Stämme sind auf dem genetischen Hintergrund der C57Bl/6-Mäuse vorhanden.

Es ist hervorzuheben, dass die EAE ein wichtiges Tiermodell ist, um die Grundlagen der MS beim Menschen zu verstehen und neue Therapieansätze zu entwickeln. Zum Beispiel wurde die Eskalationstherapie der MS mit Natalizumab bei der EAE zuerst beschrieben (Yednock et al. 1992). Dennoch kann eine EAE nie in allen Aspekten einer MS entsprechen.

1.3 Makrophagen

1.3.1 Allgemeine Aufgabe von Makrophagen im Immunsystem

Makrophagen sind ein Teil des angeborenen Immunsystems und sind wichtig für die Pathogenbekämpfung. Sie können Keime unterscheiden und beeinflussen dann grundlegend die Art der adaptiven Immunantwort. Sie begleiten den Prozess und können ihn auch wieder beenden.

Makrophagen können zwei Ursprünge haben. Entweder bilden sie sich aus hämatopoetischen Vorläuferzellen, die über die Blutbahn zu den immunologischen Organen gelangen oder sie stammen aus Zellen des embryonalen Dottersacks. Es ist erst seit kurzem bekannt, dass bestimmte Makrophagen, wie die Mikroglia des ZNS oder die Kupffer-Zellen der Leber, von diesen Vorläuferzellen des Dottersacks abstammen (Schulz et al. 2012).

Makrophagen können durch Expression von *toll-like*-Rezeptoren (TLR) erkennen, um welche Form von Pathogen es sich bei einer Infektion handelt und somit bestimmen, ob eine Th1- oder Th2- gerichtete Immunantwort benötigt wird. Sie reagieren auf Gewebsdefekte und auch auf andere aktivierte Lymphozyten.

Interessanterweise spielen Makrophagen nicht nur bei der Immunabwehr eine Rolle, sondern erledigen auch in bestimmten Organen metabolische Aufgaben. In der Milz und der Leber bilden Makrophagen ein phagozytäres System, das an der Filtrierung und Eliminierung von zellulären Blutbestandteilen beteiligt ist (Biswas und Mantovani 2012).

1.3.2 Klassische und alternative Aktivierung von Makrophagen

Der Phänotyp von Makrophagen ist sehr heterogen. Bei einer klassischen Aktivierung durch Bakterien oder Interferon- γ (Inf- γ) nehmen sie einen M1-Phänotyp an. Dieser M1-Phänotyp wird in der Literatur durch eine hohe Genexpression von Interleukin (IL)-12 und IL-23 sowie einer geringen Genexpression von IL-10 charakterisiert. Sie produzieren Stickstoffmonoxid (NO), reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und schütten pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β , *tumor-necrosis-factor*

(TNF α) und IL-6 aus. Sie sind selbst Teil der Immunantwort und fördern zusätzlich die Th1-Differenzierung von T-Zellen (Gordon 2003).

Wenn es darum geht, eine Immunantwort lokal zu beenden, verändern Makrophagen sich zu M2-Makrophagen. Der Phänotyp der M2-Makrophagen sorgt dafür, dass Zelltrümmer abgeräumt werden und Fibrozyten proliferieren (Reilkoff et al. 2011). Dadurch wird extrazelluläre Matrix (ECM) produziert, die hilft, eine Wunde wieder zu verschließen. Der M2-Phänotyp ist durch die Expression von Scavenger-Rezeptoren (CD163) und Mannose-Rezeptoren (C-Typ-Lektin-Rezeptor = CD206) gekennzeichnet. Der Arginin-Metabolismus in den Makrophagen wird durch eine vermehrte Genexpression von Arginase1 von der Produktion von NO hin zu der von Ornithin und Polyaminen umgelenkt (Mantovani et al. 2013). Typischerweise induzieren IL-4 und IL-13 einen M2-Phänotyp, aber auch IL-10, Glukokortikoide (GCs) oder Immunkomplexe können diesen Phänotyp induzieren. Hierbei wird von einem M2-vergleichbaren Phänotyp gesprochen, der ähnlich wie der IL-4- und IL-13-induzierte M2-Phänotyp aussieht, jedoch durch eine höhere Expression des Mannose-Rezeptors (CD206) oder IL-10 gekennzeichnet ist (Mantovani et al. 2004).

1.3.3 Makrophagen im Kontext einer EAE

Makrophagen werden durch MOG₃₅₋₅₅-spezifische CD4⁺-T-Zellen in das Parenchym über die BBB hinweg gelockt. Auch ZNS-eigene Makrophagen, die Mikroglia, werden aktiviert und produzieren zusammen mit den einwandernden Makrophagen einen Großteil der pro-inflammatorischen Zytokine und Mediatoren wie IL-1 β , TNF- α und NO. Darüber hinaus spielen auch Enzyme wie Matrix-Metalloproteinasen eine wichtige Rolle bei der Zerstörung der ECM. Makrophagen verursachen auch direkte Zellschäden durch die Freisetzung von ROS oder können über TNF- α oder FasL Apoptose induzieren (Benveniste 1997). Nach einer Effektorphase können Makrophagen inflammatorische Prozesse im ZNS auch selbst limitieren. Bei den anti-inflammatorischen oder gewebereparierenden Vorgängen sind die zuvor beschriebenen M2-Makrophagen entscheidend (Liu et al. 2013; Schweingruber et al. 2011). Auch endogenen GCs wird hierbei eine Rolle zugeschrieben (Schweingruber et al. 2012).

1.4 T-Zellen

1.4.1 Klassifikation von T-Zellen

Die wichtigsten Zellen des adaptiven Immunsystems sind T-Zellen. Sie erfüllen Effektorfunktionen und dienen als Boten und Vermittler von adaptiven Immunprozessen. Jede T-Zelle trägt einen bestimmten T-Zell Rezeptor (TCR), der durch eine konservierte Reifung im Thymus spezifisch Eigen- oder Fremdartigene auf Hauptgewebeverträglichkeitskomplex Klasse I oder II (MHC-I / MHC-II) Oberflächenmolekülen anderer Zellen erkennen kann. MHC-I-Moleküle werden auf allen somatischen Zellen exprimiert und von CD8+-T-Zellen erkannt. MHC-I und CD8+-T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von intrazellulären Keimen, wie zum Beispiel Viren, oder auch bei dem Erkennen von entarteten Tumorzellen. MHC-II-Moleküle werden auf APCs zusammen mit Bestandteilen von Fremdpathogenen, insbesondere Bakterien, präsentiert und spezifisch von CD4+-T-Zellen erkannt. Außerdem gibt es regulatorische T-Zellen (T_{reg}), die eine anti-inflammatorische Wirkung haben.

1.4.2 Chemokine und ihre Rolle in T-Zellen.

Die Migration lymphatischer Zellen ist für die Funktion des Immunsystems essentiell. Diese Wanderung dient einerseits der Überwachung von Organen oder Geweben und andererseits der Kommunikation mit anderen Immunzellen in lymphatischen Organen wie den Lymphknoten, der Milz oder dem Knochenmark. Zellbewegungen werden durch das Auf- und Abbauen von Zytoskelettbestandteilen vermittelt. Hier sind allen voran die Aktinfilamente zu nennen. Durch die Bewegung der Zelle entsteht eine Polarität, wobei sich ein Leitsaum und ein Rückpol unterscheiden lässt. Auf dem Führungspol befinden sich wichtige Rezeptoren, die eine zielgerichtete Bewegung steuern. Diese Rezeptoren reagieren auf Gewebshormone wie Chemokine, die gebunden an die ECM Wege für die Migration von Zellen markieren können (Fischer et al. 2013).

Chemokine sind kleine Moleküle, die die Bewegung unter anderem von T-Zellen regulieren. Sie können in zwei Kategorien unterteilt werden. Einerseits werden homöostatische Chemokine ständig im Körper in verschiedenen Organen sezerniert

und steuern zum Beispiel die Migration von CD8+-T-Zellen im Körper oder die Unterteilung von T- und B-Zell-Kompartimenten in Lymphknoten. Andererseits gibt es Chemokine, die nur unter inflammatorischen Bedingungen freigesetzt werden (Charo und Ransohoff 2006). Chemokine werden nach einer bestimmten Nomenklatur, die auf der Basis ihrer Anordnung von Cystein-Resten beruht, benannt: CC, CXC und CX3C. Danach werden die Chemokine mit einem L oder R und einer Nummer versehen. Das L kennzeichnet das lösliche Chemokin (den Liganden) und das R kennzeichnet den dazugehörigen Rezeptor. Chemokine können verschiedene Rezeptoren beeinflussen und erfüllen somit redundante Aufgaben. Des Weiteren können die Rezeptoren und die Liganden Heterodimere und Homodimere bilden, was ihre Komplexität deutlich erhöht. Die Rezeptoren vermitteln ihre Signale über G-Protein-gekoppelte Kinasen (Allen et al. 2007). Einzelne Subpopulationen von T-Zellen weisen jeweils charakteristische Kombinationen von Chemokinrezeptoren auf (siehe Abbildung 1).

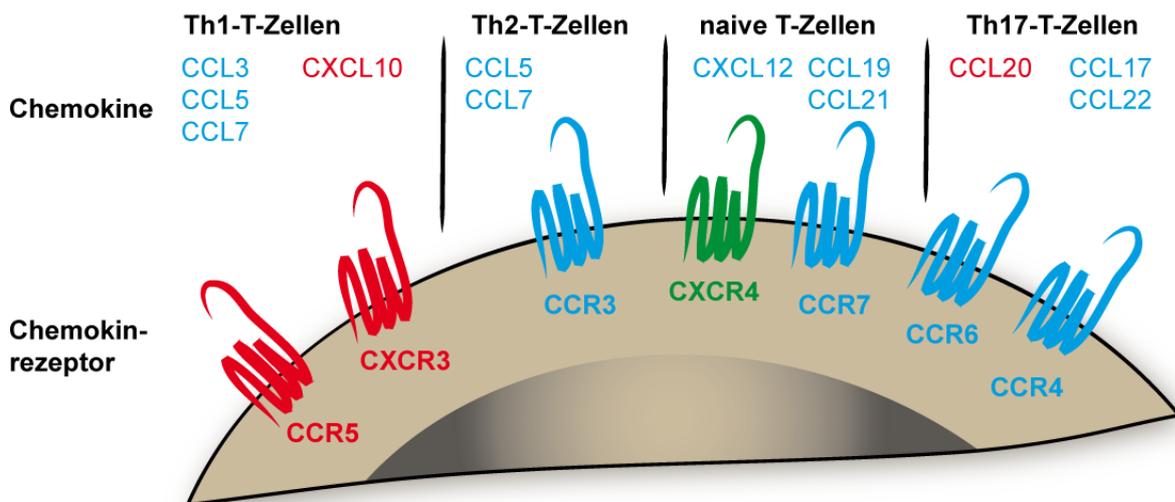


Abbildung 1: Chemokinrezeptorexpression auf unterschiedlichen T-Zell-Klassen

Farblich dargestellt ist der Einfluss von GCs auf Chemokine und ihre Rezeptoren auf verschiedenen T-Zell-Klassen. Th1-, Th2-, Th17- und naive-T-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche verschiedene Chemokinrezeptoren. Rezeptoren oder Liganden werden in ihrer Expression oder Funktion durch GCs gefördert (grün) oder gehemmt (rot) (Eigene Abbildung, publiziert in Fischer et al. 2013).

1.4.3 Die CXCL12-CXCR4 Chemokin – Chemokinrezeptor-Achse

Ein Beispiel für ein homöostatisches Chemokin und dessen vielfältige Wirkungen auf das Immunsystem sowie auf den Organismus ist die CXCL12-CXCR4-Achse. Es werden zirkadiane Einflüsse auf im Blut zirkulierende T-Zellen (Dimitrov et al. 2009; Kirsch et al. 2012) und deren *In vitro*- und *In vivo*-Antwort auf GCs diskutiert (Ghosh et al. 2009; Okutsu et al. 2005).

CXCL12 ist bis heute der einzig bekannte Ligand des Chemokinrezeptors CXCR4. Die CXCL12-CXCR4-Achse ist nicht nur wichtig für das Immunsystem, sondern spielt auch während der embryonalen Entwicklung des Nervensystems eine wichtige Rolle (Li und Ransohoff 2008). So dient sie während des Verschließens des Neuralrohrs den Neuralleistenzellen zur Orientierung (McGrath et al. 1999).

Die Sequenz von CXCR4 ist zwischen verschiedenen Spezies im Tierreich stark konserviert. Dies spiegelt evolutionär meist sehr zentrale Prozesse von Organismen wider, was dadurch bestätigt wird, dass die *Loss-of-function*-Mutation sowohl von CXCR4 als auch von CXCL12 bei Mäusen nicht mit dem Leben vereinbar ist (Klein und Rubin 2004).

Ursprünglich wurde CXCL12 als wichtiger Faktor bei der Entwicklung von B-Zellen beschrieben (Zou et al. 1998). Weiterhin spielt CXCL12 bei der Reifung von Thymozyten eine Rolle (Ara et al. 2003; Plotkin et al. 2003). Sowohl aktivierte als auch naive T-Zellen tragen den Rezeptor CXCR4 auf ihrer Oberfläche. Er ist wichtig für die homöostatische Migration von T-Zellen in sekundäre lymphatische Organe, lenkt Lymphozyten aber auch zu peripheren lymphatischen Organen wie dem Knochenmark und auch der Lunge. CXCL12 kann im Kontext einer Entzündung außerdem aktivierte T-Zellen anlocken (Charo und Ransohoff 2006). CXCR4 spielt nicht nur bei Wanderungsprozessen eine Rolle, sondern kann auch gemeinsam mit CCR5 ein Teil der immunologischen Synapse sein und den Aktivierungszustand von T-Zellen beeinflussen (Molon et al. 2005).

1.4.4 Die T-Zell-Wanderung durch die Blut-Hirn-Schranke (BBB) bei entzündlichen Prozessen des ZNS

Das ZNS gilt als immunprivilegiertes Organ. Dieser Begriff stammt aus einer Zeit, in der angenommen wurde, dass Lymphozyten unter physiologischen Bedingungen nicht in das ZNS gelangen können. Heute ist diese Annahme überholt und man weiß, dass auch im ZNS unter normalen Bedingungen Lymphozyten zumindest in bestimmten Abschnitten des ZNS zu finden sind. Eine dieser Regionen ist der Virchow-Robin Raum, der sich postkapillär der Versorgung der Hirnhäute anschließt. Er wird auf der einen Seite vom Endothel der Gefäße und deren Basalmembran gebildet, auf der anderen Seite wird er von den Endfüßchen der Astrozyten, der sogenannten *glia limitans*, begrenzt (siehe Abbildung 2). Die *glia limitans* bildet mit *tight junctions* im klassischen Sinne die Blut-Hirn-Schranke, durch die hydrophile Stoffe nur mittels Transporter gelangen können. Zellen können diese Schranke gar nicht überqueren.

Unter gesunden Bedingungen wird auf der basalen Seite des Endothels unter anderem das Chemokin CXCL12 exprimiert, um eine homöostatische Überwachung des ZNS sicher zu stellen (Engelhardt und Ransohoff 2012).

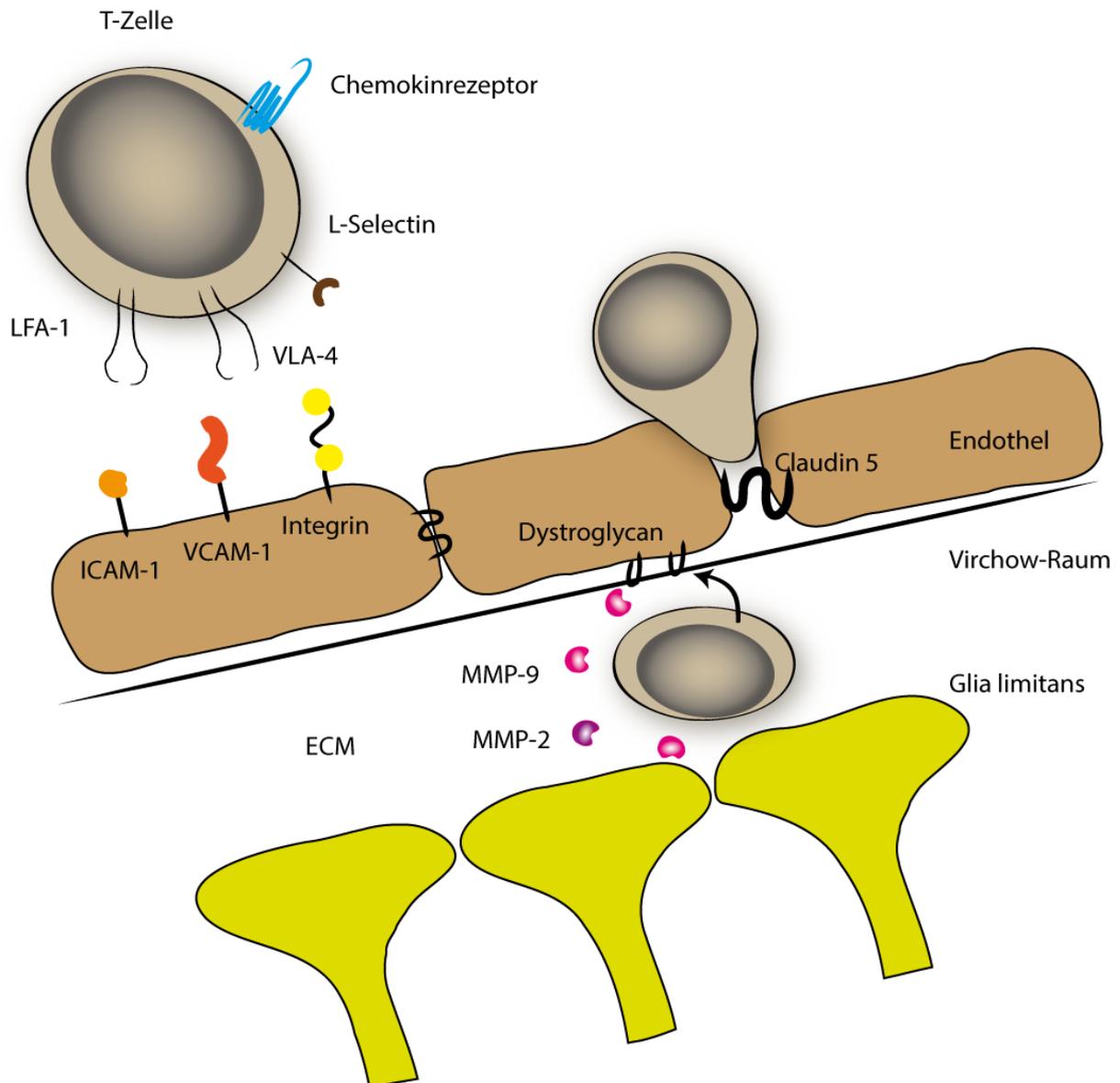


Abbildung 2: Transmigration von T-Zellen durch die Blut-Hirn-Schranke

Kommt es zu einer Entzündung im Bereich des ZNS, wie zum Beispiel bei einer EAE, einer MS oder Meningitis, wird das Endothel durch Signale von Lymphozyten aktiviert und Adhäsionsmoleküle wie E-Selectin und ICAM-1 erscheinen luminal auf der Oberfläche. Damit bilden sie eine Art Landebahn für die im Blut zirkulierenden Lymphozyten. Der erste Schritt der „Landing“ beschreibt ein Rollen von Lymphozyten über das Endothel und wird über Integrine wie LFA-1 und VLA-4 vermittelt. Als nächstes bremsen die Lymphozyten durch luminal gelegene Chemokine ab und wandern dann interessanterweise gegen den Blutfluss um eine geeignete Stelle für die Transmigration zu finden. Eine Transmigration durch das Endothel kann sowohl inter- als auch parazellulär erfolgen. Damit Lymphozyten das Parenchym des ZNS über die *glia limitans* erreichen können, bedarf es außerdem der Sezernierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die die ECM degradieren können (Ransohoff et al. 2003) (Eigene Abbildung, publiziert in Fischer et al. 2013).

1.5 Glukokortikoide (GCs)

Das Hormon Cortison wurde in den dreißiger Jahren des letzten Jahrhunderts von Edward Kendall, Tadeusz Reichstein und Otto Wintersteiner isoliert und beschrieben. In den 1940iger Jahren hat Philip Hench als erster das aus der Nebennierenrinde isolierte Hormon zur Therapie einer Patientin im Endstadium einer rheumatoiden Arthritis eingesetzt. Schon damals wurde eine umgehende Verbesserung der klinischen Symptome beobachtet (Hench 1950). Das Hormon wird endogen als Antwort auf Stress, unter der Kontrolle der Hypothalamus-Hypophysen-Achse (HPA), aus der Nebennierenrinde ausgeschüttet. Es dient dem Organismus zur Adaptation auf chronischen Stress, wie zum Beispiel dem Überleben während langer Kälte- oder Hungerperioden. Hierbei wird von einer anabolen auf eine katabole Stoffwechsellage umgestellt; Energielieferanten wie Glukose, Fette oder Aminosäuren werden dabei in das Blut freigesetzt (Reichardt 2004).

Es gibt viele chemisch veränderte GC-Derivate, die sehr effektiv bei akuten und chronisch entzündlichen Exazerbationen, sowie onkologischen Erkrankungen zum Einsatz kommen (Lühder und Reichardt 2009). Obwohl die Therapie mit GCs in der Klinik bei entzündlich bedingten Erkrankungen eine sehr gute Wirksamkeit zeigt, gibt es auch einige schwere Nebenwirkungen. Besonders die lange Anwendung von Cortison-Derivaten oberhalb der Cushingschwelle von 7 mg pro Tag, führt zu Nebenwirkungen wie Diabetes, Osteoporose und Muskelatrophie (Kleiman und Tuckermann 2007). Dementsprechend wird weltweit ein großer Forschungsaufwand betrieben, um chemische Derivate zu entwickeln, die ähnlich anti-inflammatorische Eigenschaften wie das Cortison haben, jedoch weniger Nebenwirkung zeigen (Schäcke et al. 2007).

Ein großer Durchbruch war die Entdeckung, dass der Glukokortikoid-Rezeptor (GR) nicht nur in Form eines Dimers als klassischer Transkriptionsfaktor, sondern auch alleine als Bindungspartner anderer Proteine dienen kann (Jonat et al. 1990). Seitdem gibt es die Hoffnung, dass Liganden für den GR entwickelt werden können, die einen der beiden Mechanismen bevorzugen (Reichardt et al. 1998). Jedoch ist heute schon bekannt, dass die Nebenwirkungen und therapeutischen Wirkung der

GC-Therapie sich nicht eindeutig einem dieser beiden molekularen Wirkungen des GR zuschreiben lassen.

1.5.1 Molekulare Grundlagen der GC-Behandlung

Sowohl therapeutisch applizierte als auch endogene GCs sind im Blutstrom an Transportproteine gebunden. Sie können aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften aber frei in jede Zelle diffundieren. Die meisten zellulären und physiologischen Effekte werden durch den ubiquitär exprimierten GR vermittelt. Der GR ist Mitglied einer Familie von nukleären Rezeptoren, die im Zytosol in einem Komplex mit *heat-shock*-Proteinen (z.B. Hsp 70) gehalten werden.

Wenn das Hormon an den GR bindet, löst sich dieser von dem Komplex und wird daraufhin in den Zellkern transloziert, wo er als Dimer an GC-responsive Elemente (GRE) bindet. Der Mechanismus, bei dem der GR an GREs bindet und der meist eine verstärkte Genexpression zur Folge hat, wird als Transaktivierung bezeichnet. Gene, die unter der Kontrolle von GREs stehen, sind zum Beispiel GILZ, Annexin-I oder I κ B. Der größte Teil der Langzeiteffekte auf die Genexpression und somit auch der größte Teil der Nebenwirkungen wird der direkten Transaktivierung von Genen durch den GR zugeschrieben.

Der GR alleine kann auch als Bindungspartner anderer Transkriptionsfaktoren agieren. Die Interaktion des monomeren GR mit dem Activated Protein 1 (AP-1), dem Nukleären-Faktor- κ B (NF- κ B) oder vielen weiteren Transkriptionsfaktoren hat meist eine verminderte Genaktivität zur Folge und wird daher als Transrepression bezeichnet. Die überwiegende Mehrheit der immunsuppressiven Wirkungen von GCs werden dem transreprimierenden Mechanismus des GR zugeschrieben (Baschant und Tuckermann 2010) (s. Abbildung 3).

GCs können neben dem GR auch an den Mineralokortikoid-Rezeptor (MR) binden. Die Affinität zum MR ist sogar etwas höher als die zum GR. Der MR wird jedoch nur in wenigen Geweben im Körper exprimiert. Um eine Bindung der GCs zu verhindern und eine rein Aldosteron-vermittelte Wirkung zu erzeugen, inaktiviert das Enzym 11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 (11 β -HSDII) die GCs in diesen Geweben.

Eine Ausnahme bildet die myeloide Zellreihe des lymphatischen Systems sowie der Hippocampus die keine 11 β -HSDII exprimieren.

Weiterhin können genomische von nicht-genomischen Wirkungen des GR unterschieden werden. Zu den genomischen Effekten zählen die direkte Beeinflussung der Genexpression durch Transaktivierung von Genen mit GREs sowie die Transrepression durch Interaktion des monomeren GRs mit anderen Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und AP-1. Nicht-genomische Wirkungen betreffen hingegen direkte Veränderungen von im zeitlichen Kontext parallel aktivierten Signalkaskaden oder indirekte Effekte durch das Stearangerüst des Hormons.

Die Beeinflussung von Signalkaskaden kann bei verschiedenen Zelltypen unterschiedlich sein. In T-Zellen kann der GR direkt an den T-Zell Rezeptor (TCR) binden, was zu einer Veränderung der Signalkaskaden des GR und des TCR führt (Löwenberg et al. 2005). Der GR kann auch andere zytoplasmatische Signalkaskaden beeinflussen wie zum Beispiel die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) (Rhen und Cidlowski 2005). Bei der myeloiden Zellreihe wie zum Beispiel Makrophagen, treffen die Signalkaskaden des GR und des Toll-Like Rezeptors (TLR) auf Höhe der DNA-Bindung aufeinander. Daher verändert der GR, je nachdem welche TLR Signalkaskade angeschaltet wurde, die TLR-Antwort unterschiedlich (Ogawa et al. 2005). Neben diesen direkten rezeptorvermittelten Einflüssen werden auch indirekte Effekte durch das Einlagern des Stearangerüsts der GCs in die Zellmembranen diskutiert. Dadurch kann es zu einer Versteifung und Beeinflussung der *lipid rafts* kommen (Yamagata et al. 2012)(Abbildung 3).

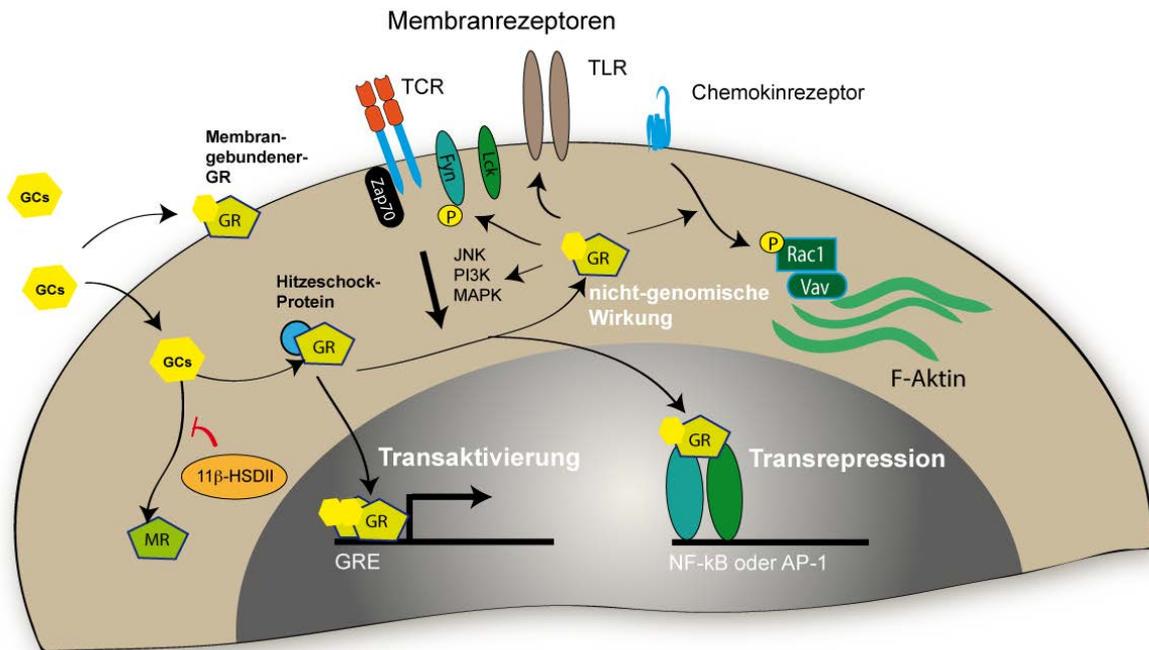


Abbildung 3: Molekulare Wirkung des GR

GCs binden entweder einen Membran-gebundenen GR oder treten passiv in das Zytosol einer Zelle ein. GCs können neben dem GR auch an den Mineralokortikoid-Rezeptor (MR) binden. Um eine Bindung der GCs zu verhindern und eine rein Aldosteron-vermittelte Wirkung zu erzeugen, inaktiviert das Enzym 11-β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 (11β-HSDII) die GCs. Weiterhin können genomische von nicht-genomische Wirkungen des GR unterschieden werden. Zu den genomischen Effekten zählen die direkte Beeinflussung der Genexpression durch Transaktivierung von Genen mit GREs sowie die Transrepression durch Interaktion des monomeren GRs mit anderen Transkriptionsfaktoren wie NF-κB und AP-1. Nicht-genomische Wirkungen betreffen hingegen direkte Veränderungen von im zeitlichen Kontext parallel aktivierten Signalkaskaden, zum Beispiel Chemokinrezeptoren, TLR oder TCR. (eigene Abbildung)

1.5.2 Genetisch veränderte Mausmodelle zur Charakterisierung der Wirkung einer GC-Therapie bei der EAE

Es ist seit je her ein Wunsch, die anti-inflammatorischen GC-Wirkungen von ihren Nebenwirkungen zu trennen. Dabei ist wichtig, dass die anti-inflammatorische Wirkung von GCs vom genaueren Entzündungsgeschehen abhängig ist. Eine Asthma-Therapie mit GCs hat andere molekulare Grundlagen und zelluläre Ziele als die Therapie von MS.

GCs sind notwendig für die embryonale Entwicklung von Säugetieren. Der komplette Knockout des GR ist deshalb nicht lebensfähig (Cole et al. 1995). Um die Wirkung der GC-Therapie näher zu charakterisieren, kommen daher konditionale Knockout-

Mäuse zum Einsatz, bei denen der GR in bestimmten Zelltypen fehlt. Hierbei ist ein Teil des GR-Gens von zwei loxP Stellen flankiert, welche durch eine Cre-Rekombinase erkannt und herausgeschnitten werden. Das Enzym, die Cre-Rekombinase, stammt vom P1-Phagen und kann durch genetische Techniken in Mäusen unter der Kontrolle verschiedener zellspezifischer Promotoren exprimiert werden. Ein Promotor zur zellspezifischen Expression eines Gens ist bei T-Zellen der Ick-Promoter (Gu et al. 1994) und bei myeloiden Zellen der lysM-Promotor (Clausen et al. 1999). Sogenannte GR^{lysM}-Mäuse exprimieren somit keinen GR in Makrophagen und GR^{Ick}-Mäusen fehlt der GR in T-Zellen (Wüst et al. 2008).

Um eine genauere Aussage über die molekulare Wirkung des GR treffen zu können, kommen GR^{dim}-Mäuse zum Einsatz. Die genetisch veränderten GR^{dim}-Mäuse tragen einen mutierten GR, bei dem es nur noch zur rezeptorvermittelten Wirkung des Monomers und somit der transreprimierenden Beeinflussung der Genexpression kommen kann (Reichardt et al. 1998).

1.5.3 Die proapoptische Wirkung von GCs

Zellen können auf zwei verschiedene Arten sterben, die auch histologisch voneinander abzugrenzen sind. Auf der einen Seite können sie keine Energie mehr bekommen, schwellen an und platzen, weil sie den energetisch aufwändigen Gradienten von Na⁺ und K⁺ nicht mehr aufrechterhalten können und somit Wasser in die sterbenden Zellen einströmt. Das plötzliche Absterben von Zellen bezeichnet man als Nekrose und tritt zum Beispiel bei Infarkten oder größeren Wunden, als Folge einer Hypoxie im Gewebe auf.

Die zweite Möglichkeit wie eine Zelle untergehen kann ist Apoptose. Sie ist die Form von programmiertem Zelltod der unter verschiedenen Einflüssen stattfinden kann. Dies dient unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich der Homöostase von Geweben oder ist eine natürliche Folge von Seneszenz. In der Entwicklung eines Organismus werden zum Beispiel viele Zellen angelegt, die nur zur Ausreifung aber nicht zur Funktion des Organismus nötig sind. Diese Zellen müssen nicht weiter erhalten werden und gehen in Apoptose. Der programmierte Zelltod ist histologisch durch eine Zellpyknose und das sogenannte *blebbing* charakterisiert.

Apoptose kann durch zwei verschiedene Signalkaskaden in Gang gesetzt werden. Es können einerseits Stimuli von außen oder andererseits von innen auf eine Zelle einwirken. Beim extrinsischen Weg werden Todesrezeptoren aktiviert, die zu der Familie der *tumor-necrosis-factor*-Rezeptorfamilie (TNFR) gehören (Ashkenazi und Dixit 1998). Auch zelleigene Signale können dazu führen, dass Apoptose in Gang gesetzt wird. Der intrinsische Weg wird hingegen durch das Gleichgewicht von pro- und anti-apoptischen Genen der *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2)-Familie bestimmt (Wang 2001).

Bcl-2-Gene können zum Beispiel durch intrazellulären Stress, wie DNA-Schäden, das Fehlen von Wachstumsfaktoren, zytotoxischen Medikamenten oder Hormonen, die direkt die Bcl-2-Genexpression beeinflussen, induziert werden. Beim Überwiegen der pro-apoptischen Stimuli bilden bestimmte Mitglieder der Bcl-2-Proteine (Bax und Bak) Poren in den Mitochondrien, was schließlich zu einer Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol führt. Dieses lagert sich mit dem Apoptose-aktivierenden-Faktor 1 (apaf-1) und der Procaspase-9 zusammen um das Apoptosom zu bilden, was den „*point of no return*“ der Zellapoptose markiert. Bei beiden Apoptosewegen kommt es schließlich durch die Aktivierung von verschiedenen Cysteinproteasen (Caspasen) zum Zelltod (Reichardt und Lühder 2012).

Für den GC-induzierten-Zelltod (GICD) sind die Transaktivierungsfunktion des GR und eine funktionierende Transkription notwendig (Herold et al. 2006; Reichardt et al. 1998). Weiterhin wurden im Zusammenhang mit dem GICD verschiedene pro- und anti-apoptische Faktoren beschrieben. So wird die Genexpression der pro-apoptischen Faktoren Bim, Bmf und Puma nach GC-Behandlung in T-Zellen hochreguliert. Wenn diese pro-apoptischen Faktoren in den T-Zellen fehlen, sind sie unempfindlich gegenüber dem GICD (Erlacher et al. 2006; Labi et al. 2008). Die genetischen Überexpression anti-apoptischer Gene wie Bcl-2 oder auch Bcl-xL verhindert ebenfalls einen GICD (Rathmell et al. 2002). Werden einzelne Caspasen gehemmt, so kann der GICD immer noch stattfinden, was für eine Redundanz der einzelnen Caspasen in den jeweiligen Signalkaskaden spricht (Herold et al. 2006). Werden hingegen alle Caspasen durch einen Pancaspasen-Inhibitor gehemmt unterdrückt dies zumindest *in vitro* den GICD (Wang et al. 2006). Es wird ange-

nommen, dass der GICD nach einer Therapie mit GCs, wie dem Methylprednisolon in der Klinik, eine wichtige Rolle für die Behandelbarkeit entzündlicher Erkrankungen spielt.

1.5.4 Die klinische Anwendung von GCs

Seit der ersten Behandlung der rheumatoiden Arthritis und anderer entzündlichen Erkrankungen mit Cortison sind viele weitere GC-Derivate entwickelt worden. Diese zeigen eine höhere Affinität zum GR und eine geringere Affinität zum MR. Dadurch können GCs in höheren Dosen eingesetzt werden und verursachen weniger über den MR vermittelte Nebenwirkungen, wie beispielsweise eine Hypertonie.

Die Nebenwirkungen einer Therapie mit GCs ergeben sich aus dem metabolischen Wirkungsprofil. Im Knochen werden die Osteoklasten aktiviert (Weinstein et al. 2002), in der Leber wird die Glukoneogenese gefördert (Exton 1979) und auch die Lipoblasten differenzieren sich (Gimble und Guilak 2003). Dies führt zu den drei Hauptnebenwirkungen einer GC-Therapie: Osteoporose, Diabetes und Stammfettsucht.

Um anti-inflammatorische Effekte zu erzielen, gleichzeitig aber langfristige Nebenwirkungen zu minimieren, sind die Behandlungsschemata einer GC-Therapie meist so angelegt, dass sie mit einer hohen Dosis (um die 250-1000 mg/ Tag) beginnen und diese dann langsam verringert wird (Milligan et al. 1987). Eine solche Hochdosis-Therapie hilft jedoch nur bei akuten entzündlichen Exazerbationen, wie bei einem Schub der MS oder einem Asthma-Anfall, jedoch nicht bei chronischen Verläufen.

Mittels des Adrenokortikotropen Hormon (ACTH) kontrolliert die HPA die Ausschüttung von endogenen GCs in der Nebennierenrinde. Durch eine hochdosierte GC-Therapie wird diese Achse stark gehemmt (Negativ-Feedback). Dies führt zu einer geringeren Ausschüttung des ACTH was wiederum nach 5 Tagen Behandlung zu einer Atrophie der Nebennierenrinde führen kann. Daher ist nach einer Hochdosis-Therapie ein Schema zur ausschleichenden Verringerung der GC-Dosis nötig, um auf diese Weise eine sogenannte Addisonkrise zu vermeiden (Boumpas et al. 1993).

Grundsätzlich sollte nach Möglichkeit auf eine langandauernde Gabe von GCs verzichtet werden. Bei chronischen Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis oder den Endstadien von Asthma und COPD, kann jedoch auf GCs nicht verzichtet werden, weshalb die Applikation so gering und gleichmäßig wie möglich geschehen sollte. Unter Anderem gibt es Therapiepläne, die eine endogene Ausschüttung von GCs am frühen Morgen ausnutzen und nur zu dieser Zeit eine Applikation von GCs erfolgt. Bei dieser Chronotherapie soll die endogene Feedbackschleife der HPA am wenigsten gestört werden und klinisch weniger Nebenwirkungen auftreten (Alten et al. 2010). Eine weitere Möglichkeit ist die chemische Modifizierung von GCs, so dass sie einem hohen *first-pass*-Mechanismus in der Leber unterliegen und sie somit kaum noch systemisch im übrigen Körper wirken können. Hier wäre das GC-Derivat Budenosid erwähnenswert, welches bei Asthma zum Beispiel inhalativ gegeben werden kann und überwiegend lokal in der Lunge wirkt. Dasselbe gilt für die dermale Applikation von verschiedenen kortisonhaltigen Cremes.

1.5.5 Prednisolon-beladene Liposomen (PL)

Klinisch verabreichte GCs müssen über einen längeren Zeitraum und in höherer Dosis gegeben werden, um eine ausreichende Wirkung am Ort der Entzündung zu erzeugen. Hierbei nimmt man viele unerwünschte systemische Nebenwirkungen in Kauf. Aus pharmakologischer Sicht wäre es jedoch wünschenswert, GCs in geringerer Dosis einzusetzen, ebenso dass diese nur am Zielort wirken und dass die Wirkung möglichst nachhaltig ist. Polyethylenglycol (PEG)-Liposomen, gefüllt mit Prednisolon (PL), könnten diese Erwartungen möglicherweise erfüllen. Es wurde gezeigt, dass sie bei erheblich geringerer Dosis und Anwendungshäufigkeit im Vergleich zu freien GCs einen vergleichbaren therapeutischen Effekt in Modellen der rheumatoiden Arthritis (Ulmansky et al. 2012) und der EAE haben (Schmidt et al. 2003).

1.5.5.1 Das Konzept der Anwendung von Liposomen

Liposomen wurden ursprünglich als Vektoren zur Transfektion von Zellen entwickelt. Sie bestehen aus einer zweischichtigen Lipidmembran und beinhalten im Inneren eine wässrige Phase in die chemisch Substanzen eingelagert werden können. In Liposomen lassen sich zum Beispiel Enzyme oder sogar ganze DNA- oder RNA-klar

Fragmente verpacken. Wenn sie i.v. appliziert werden, entfernen Makrophagen des phagozytären Systems die Liposomen innerhalb von wenigen Minuten aus dem Blutstrom. Sie werden von Opsoninen oder dem Komplementsystem markiert und gelangen durch das fenestrierte Epithel in Leber und Milz, wo sie von Makrophagen umgehend erkannt und eliminiert werden (Immordino et al. 2006). Dies lässt sich einerseits pharmakologisch nutzen, um diese Organe speziell zu therapieren (z.B. bei Hepatitis), andererseits stellt es aufgrund der hieraus resultierenden geringeren pharmakologische Halbwertszeit auch die größte Limitierung der Anwendung von klassischen Liposomen dar (Ambrosch et al. 1997).

1.5.5.2 Pegylierte Liposomen sind stealth-Liposomen

Sollen Liposomen in einem therapeutischen Kontext zur Anwendung kommen, wie zum Beispiel um GCs zu transportieren, bedarf es einer chemischen Modifikation, damit diese nicht sofort vom monozytären phagozytären System aus dem Blutstrom herausgefiltert werden. Pegylierte Liposomen, auch *stealth* oder *long-circulating* Liposomen genannt, haben durch ihre chemische Modifikation eine inerte, positiv geladene hydrophile Polyethylenglycol (PEG)-Außenschicht. Es gibt verschiedene Theorien, weshalb diese PEG-Schicht eine verminderte Phagozytose verursacht. Einerseits verhindert es sterisch die Bindung an Zelloberflächenproteine und Plasma-proteine wie beispielsweise dem Komplement Protein C3b. Andererseits wird durch eine Bindung von Dysopsoninen die direkte Phagozytose von PEG-Liposomen verhindert (Johnstone et al. 2001; Mittelstadt et al. 2012).

Die Pharmakokinetik kann durch die Veränderung der Dicke der äußeren PEG-Schicht, durch Modifikation des Anker-moleküls des PEG in der Lipiddoppelschicht, der Zusammensetzung der Lipidschicht und Veränderungen der Substanzen die in der wässrigen Phase gelöst sind, beeinflusst werden (Allen et al. 2002). Somit kommt es zu einer verlängerten Zirkulation und einer verringerten *Clearance* aus dem Blut, da die pegylierten Liposomen in den Organen mit phagozytärem System weniger resorbiert werden können. Die Leber und die Milz weisen somit nach einer gewissen Zeit eine geringere Konzentration der pegylierter Liposomen auf, als beim Einsatz von herkömmlichen Liposomen.

Eine klinische Anwendung findet sich gegenwärtig bei Chemotherapeutika wie Doxorubicin, die in PEG-Liposomen verpackt, therapeutisch zum Beispiel bei Brustkrebs appliziert werden können (O'Brien 2008).

1.6 Hypothese und Zielsetzung

Ungeachtet des enormen Fortschritts bei der Entwicklung neuer Therapieverfahren wie beispielsweise monoklonaler Antikörper sind GCs noch immer eine der besten Optionen, die uns bei der Behandlung entzündlicher Erkrankungen gegenwärtig zur Verfügung stehen. Einer der Hauptnachteile dieser Substanzklasse liegt jedoch in den teils erheblichen Nebenwirkungen, die vor allem bei einer längeren und hochdosierten Anwendung auftreten. Zur Lösung dieses Problem ist es erforderlich, die Wirkungsweise einer GC-Therapie im Kontext verschiedener Entzündungsmodelle genauer zu charakterisieren. Dies kann als Grundlage für die Entwicklung zukünftig verbesserter medikamentöser Therapien dienen, aber auch zum Verständnis der Pathogenese entzündlicher Erkrankung beitragen.

Der erste Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Möglichkeit der therapeutischen Anwendung einer innovativen Applikation von GCs, nämlich Prednisolon-beladenen pegylierten Liposomen (PL). Diese erlauben es prinzipiell, die gleiche Wirkung der GCs auf inflammatorische Prozesse bei geringeren systemischen Nebenwirkungen zu erzielen. Während die klinische Wirksamkeit in Modellen der rheumatoiden Arthritis (Metselaar et al. 2004) und der EAE (Schmidt et al. 2003) bereits etabliert ist, sollten in dieser Arbeit neue Erkenntnisse zum zellulären und molekularen Mechanismus von PL im Kontext der EAE gewonnen werden. Durch Verwendung konditionaler Knockout-Mäuse war es insbesondere möglich, zwischen einer GR-abhängigen Wirkung des PL auf Makrophagen und T-Zellen zu unterscheiden. Die detaillierte Charakterisierung der Makrophagen *in vitro* und *ex vivo* sollte es dann erlauben, den Wirkmechanismus von PL im Vergleich zu freiem Dexamethason zu ermitteln.

Im zweiten Teil der Arbeit ging es um die Rolle von Apoptose bei der GC-Therapie von EAE sowie den Einfluss von GCs auf die Migration von T-Zellen in diesem Zusammenhang. Die Rolle des GC-induzierten Zelltods wurde in Mausmodellen

untersucht, deren T-Zellen refraktär gegenüber dem GICD sind (Reichardt et al. 1998). Darüber hinaus sollte die Beeinflussung der Chemokin-induzierten Migration von T-Zellen als weiterer Wirkmechanismus von GCs getestet werden. Hierbei erwies sich das Chemokin-Chemokinrezeptor-Paar CXCL12/CXCR4 als besonders vielversprechend. Mittels *In vitro*-Analyse von T-Zellen, pharmakologischer Blockade von CXCR4 in der EAE *in vivo* sowie durch Untersuchung von primären T-Zellen von gesunden Probanden und MS-Patienten verschiedener klinischer Krankheitsverläufe sollte die Bedeutung dieses neuartigen Wirkmechanismus von GCs in der EAE und MS bestimmt werden.

Kurz gesagt war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, neue und unmittelbar klinisch relevante Erkenntnisse zum Mechanismus der GC-Therapie von MS, ausgehend von der Zellkultur bis hin zum humanen Patienten, zu gewinnen.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte, Materialien, Puffer und Lösungen

Tabelle 1: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
7500 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Arium 611 Reinstwassersystem	Sartorius, Göttingen, Deutschland
autoMACS Cell Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Axiovert 35 Mikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
BD FACSCanto II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD LSR II Cell Analyzer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Biophoto Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Capsulefuge PMC-060	TOMY Digital Biology, Tokyo, Japan
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ChemiLux Imager	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland
Electrophoresis Power Supply EPS 301	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St. Giles, England
Gel Imager	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland
Heizblock Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
HeraCell 150 Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
HeraSafe Sterilbank	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
IKA T18 basic Ultra Turrax Gewebehomogenisierer	IKA, Staufen, Deutschland
Mastercycler Gradient PCR-Cycler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mini-PROTEAN Tetra Cell SDS-Gelkammer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Multifuge 4KR	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Pipettierhilfe PipetBoy Multipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

PowerPac Basic Netzanschluss	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
RS 225 A X-ray Box	Gulmay Medical, Camberley, Großbritannien
SE 600 Ruby Standard Vertical Unit	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St. Giles, England
Sigma 2-S Zentrifuge	SIGMA Laborzentrifugen, Osterode, Deutschland
Sorvall RC 26 Plus Zentrifuge	Thermo Scientific, Rockford, USA
TE-70 semi-dry transfer unit Blotting Kammer	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St. Giles, England
Analysewaage TE612	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Telaval 31 Mikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Vortex- Genie 2	Bender und Hopstein, Zürich, Schweiz
Mikroskope	Hersteller
Axiovert 35	Zeiss, Jena, Deutschland
M 651	Leica, Wetzlar, Deutschland
Ms 5	Leica, Wetzlar, Deutschland
Observer Z.1	Zeiss, Jena, Deutschland
Axiovert 40	Zeiss, Jena, Deutschland
Software	Hersteller
FlowJo	Tree Star, Inc., Ashland, USA
ImageJ	Wayne Rasband (frei verfügbar)
AB 7500	Applied Biosystems, Foster City, USA
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
FACSDiva	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 2: Puffer / Medien / Lösungen

Bezeichnungen	Zusammensetzung
1% Agarosegel	1% Agarose in TAE-Puffer; 0,1 µg/mL Ethidiumbromid
Annexin-Puffer	2,38 g Hepes in 40 mL H ₂ O (pH 7,4) + 10 mL CaCl ₂ (250 mMol) + 28 mL NaCl (5 M) ad 100 mL H ₂ O

- Material & Methoden -

Blotting Buffer	39 mM Glycin; 48 mM Tris; 0,0375% SDS; 0,01% NaN ₃
BSA-Lösung	PBS/Tween; 5% BSA; 0,01% NaN ₃
BSS	11% BSS 1, 11% BSS 2
BSS 1	13,4 mM Na ₂ HPO ₄ ; 4,4 mM KH ₂ PO ₄ ; 50 mM Glukose; 0,1% Phenolrot
BSS 2	53,6 mM KCl; 12,65 mM CaCl ₂ × 2 H ₂ O; 9,8 mM MgCl ₂ × 6 H ₂ O; 8,1 mM MgSO ₄ × 7 H ₂ O; 1,37 M NaCl
Citratpuffer	10X Stock 0,1M C ₆ H ₈ O ₇ *H ₂ O 1X Stock ist Gebrauchslösung
Coating-Buffer	7,13 g/mL NaHCO ₃ ; 1,95 g/mL Na ₂ CO ₃ , pH=9,5
ConA-Stimulationsmedium	1% Penicillin/Streptavidin; 1% Sodium Pyruvat; 0,1% inaktiviertes Rattenserum; 2,5 µg/mL ConA; 0,00075% β- Mercaptoethanol
DAB-Entwicklerlösung	Sigma (D5637) Stock: 2g in 80 ml PBS Gebrauchslösung: 1 ml Stock in 50 ml PBS + 20 µl 30%ige H ₂ O ₂
DEPC-Wasser	0,1% DEPC
Einfriermedium	RPMI, 50% FCS; 10% DMSO
FACS-Puffer	PBS pH 7,2 + 0,1% BSA + 0,01% NaN ₃
Krebs-Ringer-Lösung	140 mM NaCl; 4 mM KCl; 1 mM MgCl ₂ ; 10 mM D-Glukose; 10 mM HEPES
Kulturmedium	RPMI; 10% FCS; 1% Penicillin/Streptavidin
Laemmli-Puffer	62,5 mM Tris/HCl (pH=6,8); 20% Glycerol; 2% SDS; 5% β-Mercaptoethanol; 0,0125% Bromphenolblau
Laufpuffer (MACS)	PBS; 2 mM EDTA; 0,5% BSA
L cell conditioned medium (LCCM)	DMEM + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptavidin + M-CSF

- Material & Methoden -

Lösung A (Western Blot)	250 mg/L Luminol; 0,1 M Tris/HCl; pH=8,6
Lösung B (Western Blot)	1,1 mg/mL Parahydroxycomarinsäure in DEPC-Wasser
OrangeG	100 mg OrangeG in 30% Glycerin
PBS	0,8% NaCl; 0,02% KCl; 0,29% Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O; 0,02% KH ₂ PO ₄
PBS/BSA	PBS; 0,1% BSA
PBS/Tween	PBS; 1% Tween
Protein-Lysepuffer	1x RIPA; 1% NP40; 1 mM Na ₃ VO ₄ ; 10 µM Na ₂ MoO ₄ ; 2,5% Proteaseinhibitor
ratReMed	RPMI; 1% Penicillin/Streptavidin; 1% Rattenserum; 0,2% β-Mercaptoethanol
RIPA	5mM EDTA; 10 mM Tris; 150 mM NaCl; 10 mM NaF; 1 mM Na ₄ P ₂ O ₇ x 10 H ₂ O, 1% NP40; 2,5% Proteaseinhibitor
RPMI Kulturmedium ++	RPMI 1640 (+L-Glutamin) + 10% FCS + 1% Pyruvat (100 mM) + 1% NE-Aminosäuren + 1% Pen/Strep + 0,01% β-Mercaptoethanol
SDS-Gel Lower Buffer	1,5 M Tris/HCl (pH=8,8); 14 mM SDS
SDS-Gel Upper Buffer	0,5 M Tris/HCl (pH=6,8); 14 mM SDS
SDS-Puffer	3,03 g/ Tris; 14,4 g/L Glycin; 10 g/L SDS
TAE	40 mM Tris-Acetat + 1 mM EDTA
TAC	20 mM Tris/HCl pH 7,2 + 155 mM Ammonium-Chlorid
Tail-Puffer	Tris (5 mM) pH 8,0 + NaCl (100 mM) + EDTA (100 mM) + 1% SDS
TE-Puffer	Tris (5 mM) pH 8,0 + NaCl (100 mM) + EDTA (100 mM)
TCGF	RPMI; 10% ConAÜ; 1% Penicillin/Streptavidin; 5% FCS
TE-Puffer	1 mM EDTA; 10mM Tris
MACS Laufpuffer	PBS + 1 mM EDTA + 0,5% BSA

MACS Waschpuffer

PBS + 1 mM EDTA

Tabelle 3: Chemikalien / biologische Materialien / Medien

Bezeichnungen	Hersteller
7-AAD	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Acrylamid	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
AnnexinV-Cy5	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
APS	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bradford	Sigma Aldrich, St. Luis, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
BSA (Rinderserumalbumin)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA Fettfrei	Sigma Aldrich, München, Deutschland
CaCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
CFA	Sigma Aldrich, München, Deutschland
CFSE (C1157)	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
ConcavalinA	Sigma Aldrich, St. Luis, USA
CCL19 Maus (rekombinant)	Biomol, Hamburg, Deutschland
CXCL12 Maus (rekombinant)	PeptoTech, Hamburg, Deutschland
CXCL10 Maus (rekombinant)	Biomol, Hamburg, Deutschland
CCL19 Human (rekombinant)	ImmunoTools, Friesothye, Germany
CXCL12 Human (rekombinant)	ImmunoTools, Friesothye, Germany
D-Glukose	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
DEPC	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dexamethason	Sigma Aldrich, St. Luis, USA
Dexa-ratiopharm [®] 100 mg Injektionslösung	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
DMSO	Finzymes, Espoo, Finnland
DNA-Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
DNase I Puffer	Roche, Grenzach, Deutschland
Doxycyclin	Sigma Aldrich, St. Luis, USA

DTT	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
EGTA	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
EH-Medium	Invitrogen, Carlsbad, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ficoll	Biochrom, Berlin, Germany
FCS	Invitrogen, Carlsbad, USA
Glycerin	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaun	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
H ₂ O ₂	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
HCl	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hepes	Sigma Aldrich, St. Luis, USA
IFA	Sigma Aldrich, St. Luis, USA
Interferon Gamma	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Indo-1	Invitrogen, Carlsbad, USA
Isopropanol	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ketamin	Medistar, Ascheberg, Deutschland
KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Liposomen (PEG)	Bufa, Uitgeest, The Netherlands
Luminol	Sigma Aldrich, St. Luis, USA
Lymphoprep	Fresenius Kabi Norge AS, Halden, Norwegen
MOG ₃₅₋₅₅	Charité, Berlin, Deutschland
Methanol	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mg-Puffer	Genaxxon, Ulm, Deutschland
MgCl ₂	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ MoO ₄	Sigma Aldrich, St. Luis, USA
Na ₃ VO ₄	Sigma Aldrich, St. Luis, USA
Na ₄ P ₂ O ₇ x10H ₂ O	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland

NaF	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaN ₃	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaOH	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
NP40	Sigma Aldrich, St. Luis, USA
OrangeG	Sigma Aldrich, St. Luis, USA
Parahydroxycomarinsäure	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptavidin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Percoll	GE Healthcare, Munich, Deutschland
Pertussis Toxin	List, Campbell, Kalifornien (#180)
PFA 4%	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Plerixafor	IBL International, Hamburg, Deutschland
PLP 180-199	Peptides International, Louisville Kentucky, USA
Proteaseinhibitor	Sigma Aldrich, St. Luis, USA
Puronsäure	Invitrogen, Carlsbad, USA
Pyruvat	Invitrogen, Carlsbad, USA
RPMI-Medium	Invitrogen, Carlsbad, USA
SDS	Serva, Heidelberg, Deutschland
TEMED	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizol	Invitrogen, Carlsbad, USA
Tween	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylazin	Ecuphar, Greifswald, Deutschland

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Alzet Osmotic Pumps	Model 1002; Durect corporation, Cupertino, CA, USA
Falcons (15 mL oder 50 mL)	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Kryo-Röhrchen	Nunc GmbH & Co KG, Langenselbold, Deutschland

Nitrocellulose-Membran	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Platten (6-, 12-, 24- oder 96-Well)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Transwell® 24- Well Platte	Corning Life Sciences, Acton MA, USA
Reaktionsgefäße (1,5 oder 2 mL)	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Rundbodenröhrchen (12 mL)	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Rundbodenröhrchen (5 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritzen (1 mL, 10 mL, 60 mL)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Zellkultur-Schalen (10x2 cm oder 60x15 mm)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Transwell® Inserts (5 µm)	Corning Life Sciences, Acton MA, USA Nummer: 3421
Transwell® 24- Well Platte	Corning Life Sciences, Acton MA, USA Nummer: 3527
Zellsiebe (40 µm oder 100 µm)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 5: Enzyme und Kits

Bezeichnung	Hersteller
DNase I	Roche, Grenzach, Deutschland
GeneScan 400 HD®	Applied Biosystems, Foster City, USA
Taq-Polymerase	Genaxxon, Ulm, Deutschland
Quick-RNA™ Mini Prep	Zymo-Research, Orange, USA
RNeasy® MiniKit	Quiagen, Hilden, Deutschland
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, Hercules, Californien, USA
Proteinase K	Applichem, Gatersleben, Deutschland
SYBR-Green Powermix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Zell Isolations Kits	Hersteller
EasySep human T cell Enrichment Kit	Stemcell Technologies, Grenoble, Frankreich
Pan T cell isolation kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

Tabelle 6: Antikörper

FACS			
Epitope	Klon	Spezifität	Farbstoff
CD3	HIT3a	Mensch	APC
	17A2	Maus	Alexa647
CD4	OKT4	Mensch	FITC
	RM4-5	Maus	FITC
CD8α	HIT8a	Mensch	PE
	53-6.7	Maus	FITC
CD44		Maus	
LFA-1(CD11a)		Maus	
GR-1	RB68C5	Maus	APC-Cy7
B220	RA3-6B2	Maus	PE
F4/80		Maus	
MHC-2	AF6-120.1	Maus	PE
Mac3	M3/84	Maus	FITC
CD206	CO68C2	Maus	APC
CXCR3	CxCR3-173	Maus	APC
CXCR4		Maus	
CCR7	4B12	Maus	Alexa-647
Calibrite Beads	BD Bioscience		10 ⁵ / ml APC/FITC
Histologie		Verdünnung	
CD163	SantaCruz #sc-33560	1:1000	
CD3	Serotec #1477	1:200	
Anti-rat-IgG	Vector #4001	1:200	Biotin
Streptavidin	Sigma E2886	1:1000	
Peroxidase			
Therapie			
CCR7	eBioscience		

Alle Antikörper wurden entweder von BD Bioscience, eBioscience oder BioLegend bezogen.

2.2 Tierexperimente

Die Tierexperimente wurden gemäß des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und waren zuvor durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) genehmigt worden (Akt.: 33.14.42502-04-10/0316)

Die Tierhaltung erfolgt in speziellen einzeln belüfteten Käfigen (IVC) Käfigen unter spezifiziert keimfreien Bedingungen und einem 12/12-Stunden-Tag/Nacht-Rhythmus, mit freiem Zugang zu Trinkwasser sowie pelletiertem Nagerfutter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest). Die Experimentelle Tierhaltung wurde im Institut für Multiple Sklerose Forschung (IMSF, Waldweg 33, 37073 Göttingen), in der Zentralen Tierexperimentellen Einheit der Universitätsmedizin Göttingen (ZTE der UMG, Robert-Koch-Straße 40, 37099 Göttingen), sowie im European Neuroscience Institute Göttingen (ENI, Grisebachstr. 5, 37077 Göttingen) von staatlich geprüften Versuchstierpflegern betreut.

2.2.1 Verwendete Tierstämme/Mausmodelle

Tierstamm	Herkunft und Beschreibung
C57Bl/6 wt	Inzuchtstamm: Dieser stammt aus der Eigenzucht des IMSF oder wurde von Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Sie dienen in manchen Experimenten auch als Wildtypkontrollen, da die konditionellen Knockout-Tiere den selben genetischen Hintergrund haben.
C57Bl/6 GR ^{dim}	Gezielte Punktmutation an der Stelle 458 des GR Proteins, bei der ein Alanin durch ein Threonin ausgetauscht wurde. Durch diese Mutation kann der GR nicht mehr dimerisieren und somit ist die Transaktivierung unterbunden (Reichardt et al. 1998).
C57Bl/6 GR ^{fllox}	Diese Tiere besitzen loxP-Stellen vor bzw. nach Exon 3 des GR Gens (Tronche et al. 1999).
C57Bl/6	Bei dieser Maus wird die Cre-Rekombinase exprimiert unter der

LckCre	Kontrolle des T-Zell-spezifischen proximalen Ick-Promoter exprimiert (Gu et al. 1994).
C57Bl/6 LysMCre	Die Cre Rekombinase wird unter der Kontrolle des Lysozym-M-Promoters exprimiert (Clausen et al. 1999).
C57Bl/6 GR ^{Lck}	Diese Mäuse sind das Ergebnis aus der Kreuzung von LckCre-transgenen Mäusen und GR ^{flox} -Mäusen. Sie wurden im Leibniz Institut für Altersforschung – Fritz-Lipmann Institut (Jena) von der AG Tuckermann gezüchtet. Die Erhaltungszucht fand in der Tierhaltung der ZTE statt.
C57Bl/6 GR ^{LysM}	Die GR ^{flox} Mäuse wurden im IMSF mit der LysMCre Maus gekreuzt (Wüst et al. 2008).
C57Bl/6 GR ^{LysM+Lck(DKO)}	Diese Mäuse stammen aus eigener Zucht und sind ein Ergebnis der Verpaarung aus GR ^{Lck} und GR ^{Lys} -Mäusen. Sie sind jeweils positiv für die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des LysM und des Ick Promoter, somit fehlt ihnen der GR in der myeloiden und in der T-Zell-Linie.
Balb/c wt	Inzuchtstamm: Dieser stammt aus der Eigenzucht des ENI oder wurde von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Sie dienen in manchen Experimenten auch als Wildtypkontrollen, wenn die konditionellen Knockout-Tiere den selben genetischen Hintergrund haben.
Balb/c GR ^{dim}	Rückkreuzung der GR ^{dim} C57Bl/6-Mäuse auf Balb/c-Background für mehr als 10 Generationen (Reichardt et al. 2012).
vavBcl-2 tg	wurden an der Universitätsmedizin Innsbruck gezüchtet (Ogilvy et al. 1999).

2.2.2 Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis (EAE)

Für die Induktion von EAE wurden gleichermaßen männliche und weibliche Mäuse im Alter von 10 bis 12 Wochen (20-30 g) verwendet.

2.2.2.1 Aktive EAE-Induktion

Die Mäuse wurden mit einer Ketamin-Xylazin-Lösung narkotisiert (Ketamin 80 mg/kg, Xylazin 8 mg/kg Körpergewicht). Danach wurde ihnen 100 µl einer Emulsion aus MOG₃₅₋₅₅ Peptid in NaCl 0,9% [1 mg/ml] und CFA [1 mg/ml] rechts und links neben der Schwanzbasis subkutan appliziert (Tag 0). Im Anschluss wurden an Tag 0 und Tag 2 je 200 ng Pertussistoxin in 200 µl NaCl-Lösung (PTX) i.p. injiziert.

2.2.2.2 Bewertung der Krankheitssymptome

9-13 Tage nach der Immunisierung traten üblicherweise die ersten EAE-Symptome auf. Die Tiere wurden im Verlauf der EAE täglich anhand einer 10-Punkte-Tabelle bewertet (s. u.) und gewogen. Eine Zunahme und anschließend rapide Abnahme des Gewichts war ein Hinweis für ein baldiges Eintreten der ersten Lähmungserscheinungen. Der Verlauf des in dieser Arbeit verwendeten C57Bl/6-Modells war chronisch. Somit wurden die Tiere sukzessiv krank, bis sie bei einem Score von 7 aus tierschutzrechtlichen Gründen getötet wurden und für die Statistik mit einem Score von 10 weitergeführt wurden. Als akute Phase der EAE wurden die ersten 4-6 Tage angenommen, in welcher auch die Therapien getestet werden sollte.

Score	Klinischer Verlauf
0	Gesund
1	Schwanzspitze hängend, Tonusminderung im Schwanz
2	Schlaffe Schwanzlähmung
3	Fehlende Gangausgleichbewegung
4	Gangataxie
5	Leichte, schlaffe Parese der Hinterläufe
6	Deutliche Parese beider Hinterläufe oder eines Beins
7	Plegie beider Hinterläufe
8	Tetraparese mit leichter Parese der Vorderläufe
9	Moribund mit erhöhter Atemfrequenz
10	Verstorben

2.2.2.3 Therapeutische Behandlung der EAE

Die im Folgenden dargestellte Abbildung gibt einen Überblick über die angewandten Therapie Schemata:

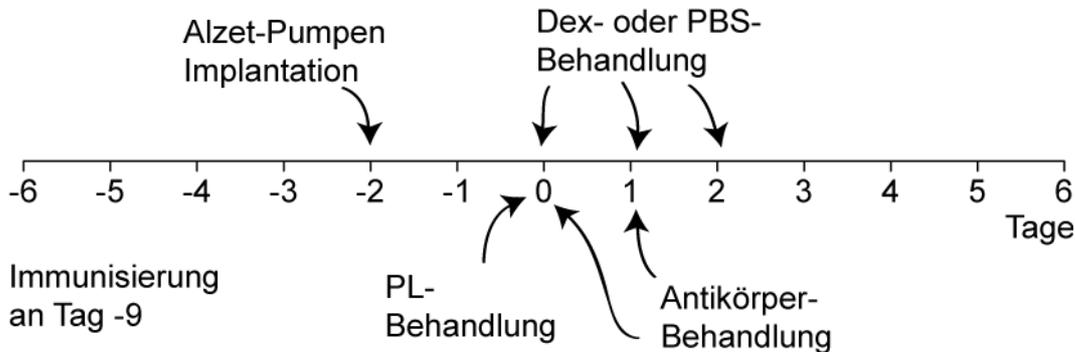


Abbildung 4: Behandlungsschema

Auf der Achse sind die Tage aufgeführt. Der Tag 0 war in einem therapeutischen Behandlungsschema der Tag, an dem die Tiere im Mittel einen Score von 2 hatten. An Tag -2 wurden die Alzet-Pumpen mit Plerixafor s.c. implantiert. An Tag 0 wurde mit der jeweiligen Behandlung begonnen. Dexamethason wurde an drei aufeinander folgenden Tagen gegeben, PL nur am ersten und die CCR7-Antikörper an den ersten beiden Tagen.

2.2.3 Injektionen i.v. und i.p.

Für Injektionen wurden 1-ml-Spritzen mit einer feinen Kanüle verwendet. Die i.p. Injektionen erfolgten in den linken unteren Quadranten des Abdomens. Für i.v. Injektionen wurden die Mäuse in einer Plexiglasröhre fixiert. Es wurde eine Rotlicht-Lampe benutzt, um die Venen am Schwanz zu erweitern, damit diese besser zu sehen und zu treffen waren.

2.2.3.1 Dexamethason und Liposomen

Dexamethason (**DEX**) wurde in einer Konzentration von 100 mg/kg Körpergewicht oder 4 mg/kg Körpergewicht an drei konsekutiven Tagen verabreicht. Die mit Prednisolon gefüllten PEG-Liposomen (**PL**) wurden in einer einmaligen Injektion in einer Konzentration von 10 mg/ kg Körpergewicht verabreicht.

2.2.3.2 Behandlung mit Plerixafor®

Das abgegebene Volumen einer Alzet-Pumpe variiert je nach Model. Um eine konstante Verabreichung von Plerixafor® während der akuten Phase der EAE zu

gewährleisten, wurden den Mäusen Alzet-Pumpen implantiert. Eine Kontrollgruppe wurde scheinoperiert. Die verwendeten Alzet-Pumpen geben ein Volumen von 0,25 $\mu\text{l/h}$ [Q] ab. Die abgegebene Menge wird nach folgender Formel berechnet: $K_0 [\mu\text{g/h}] = Q [\mu\text{l/h}] \times C_d [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$. Die Tiere sollten ab Tag 8 eine Dosis von 4 mg/kgxd Plerixafor® verabreicht bekommen. Dies wurde auf ein Gewicht von 20 g pro Maus standardisiert, also $K_0 = 4 \text{ mg}/20 \text{ mg} \times 24 \text{ h} = 3,33 \mu\text{g/h}$. Die Konzentration **Cd** des Füllvolumens der Pumpen betrug $C_d = K_0 / Q = 3,33 [\mu\text{g/h}] / 0,25 [\mu\text{l/h}] = 13 [\mu\text{g}/\text{ml}]$. Plerixafor® wurde in der berechneten Konzentration in PBS gelöst und mit einer abgerundeten Kanüle in die Pumpen injiziert.

Alle Mäuse wurden mittels Injektionsnarkose (siehe 1.5.2.1) betäubt und kranial der Immunisierungsposition mit einem Rasierer enthaart. Die Haut wurde nach Desinfektion 0,5 cm aufgeschnitten und mit einer stumpfen Pinzette von der unteren Faszie nach kranial bis kurz vor den Schädel gelöst. Die vorbereiteten Alzet-Pumpen wurden so weit kranial wie möglich eingesetzt. Die Öffnung der Pumpen sollte hierbei nach kaudal zeigen. Mit resorbierbarem Nahtmaterial (Größe 7) wurde die Inzision verschlossen.

2.2.3.3 Behandlung mit Antikörpern

Die Behandlung der EAE erfolgte nach Erreichen eines Scores von etwa 2. Hierfür wurden insgesamt 100 μg des CCR7-Antikörpers (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) an zwei aufeinander folgenden Tagen i.v. appliziert. Der Kontrollgruppe wurden anstelle des Antikörpers 100 μl NaCl injiziert.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Isolation primärer Lymphozyten

Die tierschutzgerechte Tötung der Mäuse erfolgte durch CO_2 . Danach wurde die ventrale Haut aufgetrennt und von der Fascie gelöst. Die Organentnahme richtete sich nach dem jeweiligen Experiment. Zur Aufreinigung von T-Zellen wurden die Lymphknoten (zervikal und mesenterial) und die Milz entnommen. Bei Analysen des Entzündungsortes der EAE wurde das Rückenmark *in toto* präpariert. Hierbei wurde auf die Mitnahme der meningealen Häute geachtet. Die jeweiligen Organe wurden direkt nach der Entnahme in PBS/BSA auf Eis gelagert. Zur Herstellung der

Einzelzellsuspension wurden alle Organe mit einem Spritzen-Stempel durch ein Nylon-Sieb gedrückt (Maschengröße: 70 µm, BD Pharmingen, Heidelberg) und mit PBS/BSA gespült. Die Suspensionen wurden bei 300 g und 4°C für 10 min zentrifugiert und das Pellet anschließend in 1 ml PBS/BSA aufgenommen.

2.3.2 Knochenmarkisolation

Zur Gewinnung des Knochenmarks dienten der Femur und die Tibia der Hinterläufe. Sie wurden nach der Entnahme auf Eis gelagert und unter sterilen Bedingungen eröffnet. Die Kondylen wurden abgeschnitten und der nun zu beiden Seiten offene Schaft des Knochens konnte mit einer Spritze gespült werden. Nach dem Resuspendieren mit einer Kanüle wurden die Zellen für 10 min bei 300 g und 4°C abzentrifugieren.

2.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Ein 1:100 verdünntes Aliquot der Zellsuspension wurde mittels Neubauer-Kammer gezählt. Es wurden minimal 100 Zellen über die 4 Quadranten einer Neubauer Zählkammer bei einer 10x Vergrößerung gezählt. Hierbei gilt: [gezählte Zellen] × 10⁴ Zellen/ml (Kammerfaktor) × 100 = Zellzahl/ml

2.3.4 *In vitro*-Aktivierung von T-Zellen

Um T-Zellen zu aktivieren wurde entweder ConA eingesetzt oder spezifisch mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper gearbeitet. Vorversuche hatten gezeigt, dass die Expression der Chemokinrezeptoren (Daten nicht gezeigt) nach einer Aktivierung mit Antikörpern höher ist. Daher wurden T-Zellen für Migrationsversuche ausschließlich mittels Antikörpern stimuliert. Hierfür wurde die Lymphozytensuspension in RPMI++ Medium aufgenommen und mit 1 µl/ml anti-CD3 und 5 µl/ml anti-CD28 Antikörper für 48h in einem Inkubator (37°C, 5% CO₂) kultiviert. Die stimulierten Zellen wurden entweder direkt mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von Oberflächenmarkern analysiert oder weiter zur MACS-Aufreinigung und für Migrationsversuche verwendet.

2.3.5 T-Zellisolation durch magnetische Zellsortierung (Auto-MACS®)

Das Prinzip der Zellsortierung anhand von magnetischen Beads basiert auf der Vormarkierung bestimmter Zellen mit einem Biotin-gekoppelten Antikörper. Im zweiten Schritt binden Streptavidin-Beads an das Biotin. Wenn die Zellen über eine magnetische Säule laufen, bleiben die markierten Zellen im Feld hängen. Nach einem Waschschrift wird das magnetischen Feld entfernt, die gewünschten Zellen können eluiert werden. Nach der Inkubation trennt ein Gerät (Auto-MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) vollautomatisch die Zellen. In dieser Arbeit wurde mit naiven T-Zellen gearbeitet, die negativ selektioniert werden sollten, um eine Beeinflussung durch gebundene Beads zu vermeiden. Deshalb kam ein Kit (Pan-T Zell Kit 2, Miltenyi) zum Einsatz, mit dem alle Zellen außer T-Zellen von der eingesetzten Zellsuspension abgetrennt wurden (Negative Depletion, Programm: Deplete). Zur MACS-Isolation wurden 10 µl Antikörper Mix pro 1×10^7 Zellen verwendet und die Proben nach 20 min Inkubation (4°C) gewaschen (10 min, 300 g, 4°C). Anschließend erfolgte eine zweite Inkubation mit 20 µl Beads auf 1×10^7 Zellen und Zentifugation. Die Reinheit wurde mittels der Durchflusszytometrie durch Anfärbung von CD3, CD4, CD8 und B220 bestimmt und betrug immer ca 95%.

2.3.6 T-Zellisolation aus Buffy-Coats oder humanem Blut (EasySep)

Alle im Folgenden beschriebenen Experimente wurden durch die Ethik Kommission der UMG genehmigt (**Az: ZI11/10**).

Die Buffy-Coats enthalten alles, was bei einer Blutspende nach dem Abtrennen der Erythrozyten, der Thrombozyten und des Plasmas übrig bleibt. Die Abteilung Hämatologie und Onkologie der Universitätsmedizin Göttingen hatte die Buffy-Coats aufgearbeitet um humane Monozyten zu isolieren. Beim letzten Gradienten mit 46% Percoll, werden die größeren Monozyten von den restlichen Leukozyten abgetrennt. T-Zellen wurden aus dieser Restpopulation mittels eines EasySep Humanem T-Zell-Anreicherungs-Kit aufgereinigt. Die Zellen durften maximal auf eine Konzentration von 5×10^7 Zellen/ml eingestellt werden. Daraufhin wurden 5 µl pro 100 µl Antikörper Cocktail dazugegeben und 10 min gewartet. Danach kamen 5 µl pro 100 µl von den Beads des Kits zu dem Ansatz. Nach 5 Minuten wurde das Volumen auf 2,5 ml aufgefüllt und in einen EasySep Magneten gegeben. Unter vorsichtigem Schütteln

wurde nach weiteren 5 Minuten der Inhalt ausgeschüttet und die gewonnenen T-Zellen konnten für die Wanderung verwendet werden. Die Reinheit wurde jedes mal bestimmt und betrug im Schnitt 98%. Es befanden sich CD4 und CD8 T-Zellen in einem Verhältnis von 2:1 im Präparat.

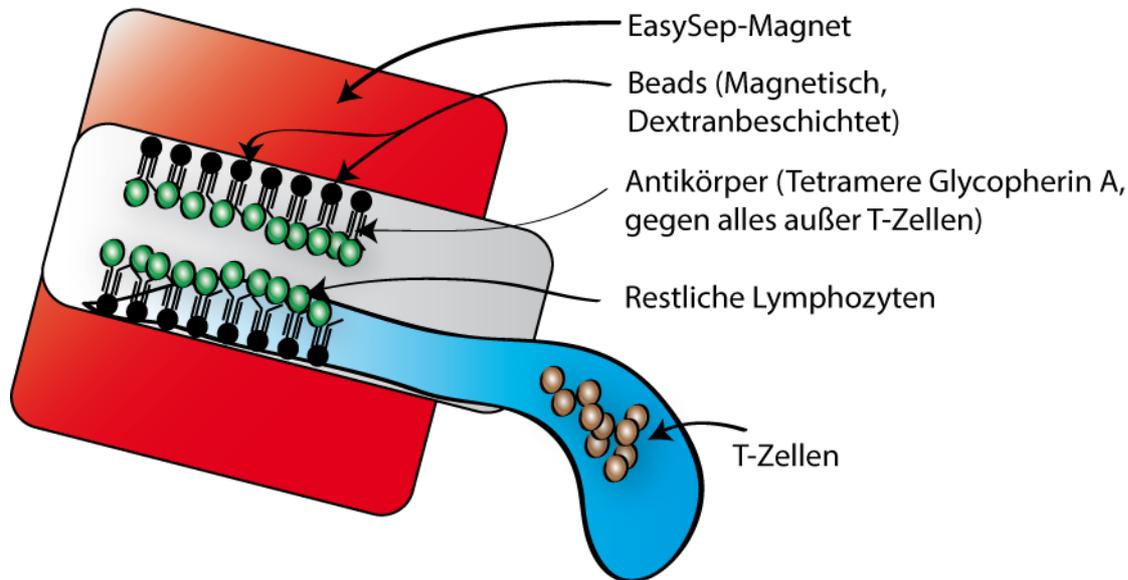


Abbildung 5: EasySep T-Zell-Isolation

Schematische Darstellung des Prinzips der Isolation von T-Zellen mittels des EasySep Human Enrichment Kits. Ein Antikörper Cocktail gegen alle Lymphozyten außer den T-Zellen wird zu einer Zellsuspension gegeben (Blau). Diese binden über Glycopherin A an dextranbeschichtete Beads. Die Beads werden von einem speziellen EasySep Magneten beim Herauskippen (siehe Zeichnung) im Röhrchen festgehalten. (Abbildung in Eigenproduktion)

2.3.7 Durchflusszytometrie (FACS)

Bei der Durchflusszytometrie werden Einzelzellsuspensionen durch eine Kapillare an verschiedenen Lasern vorbeigesogen. Die Streuung des Laserlichts korreliert mit der Granularität (sideward scatter, SSC) und der Größe der Zellen (forward scatter, FSC). Des Weiteren können durch die Laserstrahlen Fluoreszenzfarbstoffe angeregt werden, die, an spezifische Antikörper gekoppelt, so die Analyse von extrazellulären und intrazellulären Antigenen ermöglichen. Die Emission der Farbstoffe wird über selektiv durchlässige Spiegel in sechs Kanäle aufgeteilt, so dass bis zu sechs Antigene gleichzeitig analysiert werden können. Auch Fluoreszenzfarbstoffe in Zellen transgener Tiere können detektiert werden.

Vor Verwendung der FACS-Antikörper wurden diese stets titriert. Für eine Färbung wurden 1×10^5 – 1×10^6 Zellen in 4 ml FACS-Puffer aufgenommen und gewaschen

(450 g, 5 min, RT). Es wurden je 20 µl der FACS-Antikörper in einer titrierten Vorverdünnung hinzugegeben. Nach 20 minütiger Inkubation wurde vor dem Messen erneut gewaschen (450 g, 5 min RT). Zur Messung wurde ein BD FACS Canto II und für die Auswertung FlowJo Software (Treestar, Inc.) verwendet.

2.3.8 Apoptose-Assay

1×10^6 Lymphozyten aus Lymphknoten wurden in einer 24 Loch-Platte (Greiner, Bio Rad) über 24 h mit verschiedenen Konzentrationen (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M) von Dexamethason inkubiert.

Zur Quantifizierung apoptotischer Zellen wurde eine AnnexinV-Cy5 Färbung an den letzten Waschschrift angeschlossen. Es wurde 1 µl AnnexinV-Cy5 und 3 µl 7-AAD in 100 µl AnnexinV Bindepuffer auf die Proben gegeben und nach 15 min Inkubation sofort gemessen.

2.3.9 Migration

Nach einer negativen Auto-MACS Zellsortierung wurden die T-Zellen gezählt, in PBS gewaschen, in RPMItrans (+0,5% fettfreies BSA) aufgenommen, und in eine 6 Loch-Platte gegeben (Cell Suspension Plate, Greiner). Die Hälfte der Zellen wurde mit 10^{-7} M Dexamethason behandelt. Nach 3 h im Inkubator wurden die Zellen mit PBS gewaschen (10 min, 300 g, 4°C). Parallel wurden 600 µl Medium mit Chemokin (100/50/0 ng/ml) in die untere Hälfte eines Transwell-Systems vorgelegt. Die Siebchen wurden mit 1×10^6 Zellen in einem Volumen von 100 µl RPMItrans beladen. Separat wurde auf der Platte die Ausgangspopulation mitgeführt. Nach dreistündiger Wanderung wurden die Siebchen entfernt und aus jedem Loch 200 µl entnommen. Die Zellzahl wurde durch Hinzufügen von 50 µl fluoreszierenden Beads in einer Konzentration von ca. 1×10^6 Beads/ml (Calibrite Beads BD Bioscience) mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

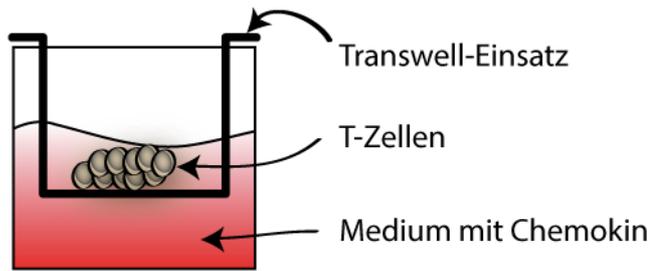


Abbildung 6: Transwell-Wanderung

Schema eines Transwell-Inserts mit T-Zellen in einem Loch, gefüllt mit Medium und einem Chemokin. Die Wanderung erfolgt durch eine Membran mit 5 µm Porengröße in den unteren Bereich des Lochs. Hier werden die durchgewanderten Zellen später abgenommen und mittels Durchflusszytometrie und Calibrite-Beads quantifiziert.

2.3.10 Makrophagen

Um *in vitro* mit Makrophagen arbeiten zu können, wurden zum einen peritoneale Makrophagen in der Maus angelockt und isoliert, und zum anderen Stammzellen aus dem Knochenmark mit Zytokinen zu Makrophagen differenziert.

2.3.10.1 *Peritoneale Makrophagen*

Der Vorteil von Makrophagen aus dem Peritoneum ist, dass sie *in vivo* behandelt werden können und somit deren Phänotyp und Expressionsmuster nicht durch die Kultivierung verändert wird. Hierzu wurde einer Maus 1 ml Thioglycolat (aus eigener Herstellung, im Fass gereift) i.p. gespritzt. Nach 72 h wurden die Mäuse getötet und das Peritoneum freigelegt. Hierbei wurde der Bauchraum zweimal mit eiskaltem PBS/BSA gespült und die Suspension anschließend abzentrifugiert (10 min, 300 g, 4°C). Adhärenente Makrophagen konnten von den anderen Zellen separiert werden, indem sie 2-3 h in Petrischalen inkubiert wurden. Zur Ablösung der adhärenenten Makrophagen wurde *Enzyme-free Buffer* eingesetzt. Die peritonealen Makrophagen konnten für RNA Analysen, die Bestimmung von NO oder einen Phagozytose-Assay genutzt werden.

2.3.10.2 *Bone Marrow Derived Macrophages (BMDM)*

Zunächst wurden die Hinterbeine einer Maus präpariert und das Knochenmark gewonnen. Dieses wurde auf 6 Petrischalen mit 10 ml LCCM Medium ausplattiert und dabei mit einer Pipette suspendiert. Am nächsten Tag wurden die nicht-adhärenenten

Zellen im Überstand abgenommen (Bone-Marrow-Derived Stem-Cells) und wieder mit 10 ml LCCM in Zellkulturflaschen ausplatiert. An Tag 6 werden 5 ml LCCM als frische Quelle für M-CSF hinzugegeben. Zur Untersuchung des Einflusses von Dex wurde an Tag 6 bei der Hälfte der Platten 10^{-7} M Dex hinzugegeben. An Tag 7 wurden die Zellen geerntet und auf eine Konzentration von 10^6 Zellen/ml eingestellt.

2.3.11 Phagozytose-Assay

Pro Loch wurden $2,5 \times 10^5$ BMDMs eingesetzt. Das Phagozytose-Substrat der Zellen bestand aus CFSE gefärbten bestrahlten Lymphozyten. Hierzu wurden Lymphozyten aus Lymphknoten von C57Bl/6-Mäusen gewonnen und gewaschen. Die Zellen wurden in Medium aufgenommen und zur Hälfte 3 h mit 10^{-7} M Dex inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach folgendem Protokoll mit CFSE gefärbt. Die Zellen wurden mit sterilem PBS gewaschen (Zentrifugieren: 8 min, 300g) und die Zellzahl auf 10^6 Zellen/ml mit PBS eingestellt. Dann wurde CFSE dazugeben ($0,05 \mu\text{l}/10^6$ Zellen; die Konzentration des eingesetzten CFSE-Stocks betrug 5 mmol/ml). Die Zellen mussten dann 10 min in einem 37°C Wasserbad stehen und jede Minute gemischt werden (sehr wichtig). Um die Reaktion abzublocken wurde 2% des eingesetzten Volumens an FCS zugeben. Nach gutem Mischen und Abzentrifugieren wurden die Zellen erneut mit 10 ml PBS / 2% FCS gewaschen. Danach wurden die Zellen zur vollständigen Inaktivierung mit 30 Gray bestrahlt (6 min mit 5 Gray, Tisch auf 200). 5×10^5 Lymphozyten wurden auf die vorher ausplatierten Makrophagen gegeben. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Ansätze mittels Durchflusszytometrie untersucht.

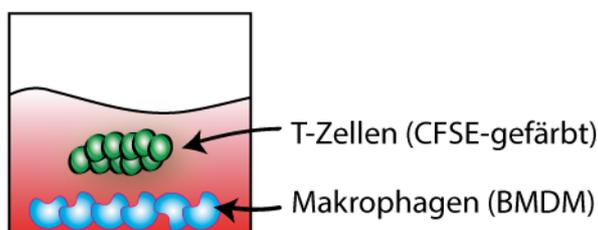


Abbildung 7: Phagozytose-Assay

Darstellung des Phagozytose-Assays. Bestrahlte und CFSE-gefärbte Lymphozyten wurden auf zuvor aus Knochenmark generierten BMDMs gegeben. Die Makrophagen wurden dann zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert und deren CFSE Gehalt gemessen.

2.4 Biochemie

2.4.1 DNA

2.4.1.1 PCR

<i>PCR mit Taq-Polymerase</i>		Abschnitt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1 µl	cDNA	Annealing	25	5
19,8 µl	H ₂ O	Elongation (35 x)	42	30
2,5 µl	10x Puffer S	Denaturation	85	5
2,5 µl	dNTP			
0,5 µl	Primermix (10 µM)			
0,2 µl	Taq-Polymerase			

<i>PCR mit Pfu-Polymerase</i>		Abschnitt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1 µl	cDNA	Annealing	25	5
12,7 µl	H ₂ O	Elongation (35 x)	42	30
4 µl	HF Puffer	Denaturation	85	5
2,5 µl	dNTP			
0,5 µl	Primermix (10 µM)			
0,2 µl	Pfu-Polymerase			

2.4.2 RNA

2.4.2.1 Isolation

Aus MACS-sortierten CD4⁺-T-Zellen aus Lymphknoten adulter Tiere oder aus deren Thymocyten wurde die RNA direkt nach der Zellpräparation isoliert. Hierzu wurden 5×10^6 Zellen in Röhrchen überführt. Die RNA wurde mit dem *mini RNA Isolation II Kit™* (Zymo Research) nach dem Protokoll für *cells in suspension* extrahiert. Die Zellen wurden bei 6000 rpm für 6 min pelettiert und in ZR-Puffer (Kit-Bestandteil) resuspendiert. Die RNA wurde nach Herstellerangaben isoliert.

2.4.2.2 cDNA-Synthese

Zur Erstellung von cDNA aus der gewonnenen RNA wurde das *iScriptTM Reverse Transcriptase* Kit von BIO-RAD verwendet. Pro Ansatz wurden 500 ng RNA, 4 µL 5× *iScriptMix* und 0,25 µL reverse Transkriptase in einem Gesamtvolumen von 20 µL eingesetzt. Es wurde ausschließlich mit RNase/DNase freiem Wasser gearbeitet. Für die Anlagerung der im *iScriptMix* enthaltenen Random- und OligodT-Primer wurde die Probe zunächst 5 min bei 25°C inkubiert. Die reverse Transkription erfolgte in 30 min bei 42 °C. Anschließend wurde die Reaktion für 5 min bei 85 °C abgestopt. Die cDNA-Proben wurden bei 4°C aufbewahrt und in einer PCR getestet.

2.4.2.3 Quantitative-Reverse-Transkriptase-PCR (RT-qPCR)

Bei der quantitativen Reversen Transkriptase PCR (RT-qPCR) konnte die relative Expression einer mRNA bestimmt werden. Die Grundlage ist eine PCR, bei der in den entstehenden Doppelstrang der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green eingelagert wird. Nach jedem Zyklus wird die Fluoreszenzintensität gemessen. Da die gemessene Fluoreszenz direkt mit der Menge der Doppelstrang-DNA korreliert, kann eine quantitative Aussage über die Expression einer bestimmten mRNA getroffen werden. Diese wird in das Verhältnis zu einem „Housekeeping“ Gen gestellt, also einer mRNA die in allen zu analysierenden Zellen gleichmäßig exprimiert sein sollte, wie zum Beispiel Bestandteile des Zytoskeletts.

<i>RT-qPCR</i>		Abschnitt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1 µl	cDNA	Annealing	25	5
11 µl	H ₂ O	Elongation (50 x)	60	2
12,5 µl	Sybergreen	Denaturation	85	5
0,25 µl	Primermix (10 µM)			

Primer für die RT-qPCR

HPRT	Sequenz
For: 5´	GTC CTG TGG CCA TCT GCC TA
Rev: 5´	GGG ACG CAG CAA CTG ACA TT

CD 163

For: 5' TGG TCC AGG AAC TGG GCC CA
Rev: 5' GGG TGG GGT GAC CTG TGC CA

Arginase 1

For: 5' AGC CCG AGC ACA TGC AGC AG
Rev: 5' ACC CCT CCT CGA GGC TGT CCT

Ym1

For: 5' ACT TTG ATG GCC TCA ACC TG
Rev: 5' AAT GAT TCC TGC TCC TGT GG

Fizz1

For: 5' TGC TGG GAT GAC TGC TAC TG
Rev: 5' CTG GGT TCT CCA CCT CTT CA

CD206

For: 5' TCG AAT GGG TGC CTC CCT GGT T
Rev: 5' GAC AAA CCA ATG CAA CCC AGT GC

F13a1

For: 5' CCT GCG TAC TCG AAG AGA CC
Rev: 5' CTT CGA ACT GGC CAT AGC TC

II-10

For: 5' AGG CAG AGA AGC ATG GCC CAG A
Rev: 5' CGG GAG AAA TCG ATG ACA GCG CC

TGF- β

For: 5' TGA CGT CAC TGG AGT TGT ACG G
Rev: 5' GGT TCA TGT CAT GGA TGG TGC

Annexin-1

For: 5' ACG AAG CCA TGA AGG GTG CCG
Rev: 5' TCC ACC ACA CAG AGC CAC CAG

Dusp1

For: 5' CCC GGT CAG CCA CCA TCT GC
Rev: 5' TGG CAG GGC TCC CAG CTT CA

2.5 Histologie

2.5.1 Immunhistochemie-Protokoll

Zunächst wurden die Tiere vor der Organpräparation mit NaCl und 4% PFA perfundiert. Die isolierten Organe wurden in 4% PFA gelagert und zur Einbettung in Paraffin verwendet. Die Schnitte wurden nach folgendem Protokoll entwässert und gefärbt. Das Entparaffinieren der Schnitte wurde mit dem Abschmelzen des Paraffins bei 58°C begonnen und dann anhand einer absteigenden Alkoholreihe automatisch gewässert (2 x 15 min Xylol, 2 x 2 min 99% EtOH, 2 x 2 min 96% EtOH, 2 x 2 min 70% EtOH und 2 x 2 min aqua dest.). Anschließend wurden die Schnitte 15 min in 1x Citratpuffer in der Mikrowelle gekocht und zum Abkühlen stehen gelassen. Danach wurde mit aqua dest. und PBS gespült. Das Blocken mittels Peroxidase 3% in PBS in 50 ml geschah für 10 - 20 min bei +4°C. Daraufhin wurde mit 10% FCS in PBS 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Dekantieren wurde der erste Antikörper für T-Zellen hinzugegeben: CD3 1:200 in 10% FCS/PBS. Nach erneutem Spülen mit PBS konnte der zweite Antikörper anti-Rat-IgG Biotin 1:200 in 10% FCS/PBS hinzugegeben werden. Danach wurde erneut gespült. Die Streptavidin-Peroxidase wurde in einer Konzentration von 1:1000 in 10% FCS für 1 h bei Raumtemperatur hinzugegeben. Es wurde mit PBS gespült. Die DAB-Entwicklung geschah in einer Küvette für 1-2 min bei Raumtemperatur in Aqua dest..

Danach wurden die Schnitte mit Hämalaun für 20 s in Leitungswasser gebläut. Nach der Färbung wurden die Schnitte wieder entwässert (2 x 2 min 70% EtOH, 2 x 2 min 96% EtOH, 2 x 2 min 99% EtOH 2 x 15 min Xylol).

2.6 Statistik

Statistische Auswertungen wurden mit GraphPad Prism durchgeführt. Es wurden die einzelnen Gruppen gegeneinander mit einem ungepaarten t-Test verglichen. Nur bei den Proben von einem Patienten wurden gepaarte Analysen durchgeführt. Die Gruppen der EAE Experimente wurden erst ab dem ersten Tag der Behandlung gegeneinander verglichen. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. P-Werte über 0.05 wurden als nicht signifikant bewertet. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) oder *** ($p < 0.001$) gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Liposomal verkapselte GCs wirken im Vergleich zu freien GCs bei der Behandlung einer EAE auf andere Zelltypen und über einen unterschiedlichen Mechanismus

Bei Behandlungen mit freiem Dexamethason (Dex), einem synthetischen GC, kommt es zu einer effizienten Verbesserung des klinischen Verlaufes einer EAE bei Mäusen und Ratten (Schmied et al. 1993; Wüst et al. 2008). Die Wirkung von Dex (100 mg/kg) hängt von der Expression des GR in T-Zellen, sowie der eingesetzten Dosis ab (Wüst et al. 2009). Neben einer vermehrten Apoptose der peripheren T-Zellen kommt es zu einer Herunterregulation von pro-inflammatorischen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen. Als Folge nimmt die Anzahl der Rückenmark-infiltrierenden Zellen ab. Appliziert man hingegen in Liposomen verpacktes Prednisolon (PL) zeigt dieses bei einer viel geringeren Dosis (10 mg/kg) und Applikationshäufigkeit einen vergleichbaren klinischen Effekt wie Dex in der EAE (Schmidt et al. 2003; Schweingruber et al. 2011) sowie in Modellen der rheumatoiden Arthritis (RA) (Ulmansky et al. 2012; van den Hoven et al. 2011). Der genaue Mechanismus und die Zielzellen der PL-Therapie im Vergleich zur Therapie mit Dex waren bislang unbekannt. Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es, hierzu neue Erkenntnisse zu gewinnen.

3.1.1 T-Zellen sind kein Hauptangriffspunkt der PL-Therapie bei einer EAE

In Abwesenheit des GR in T-Zellen ist eine EAE bei Mäusen mit Dex nicht mehr behandelbar. Dies bedeutet, dass die T-Zellen das Hauptziel der Therapie mit freien GCs sind. Die Vermutung lag somit nahe, dass der GR in T-Zellen, und somit die T-Zellen selbst auch für die Therapie einer EAE mit PL entscheidend sind. Um dies zu überprüfen wurde eine EAE bei C57BL/6-GR^{lck}-Mäusen, denen der GR in T-Zellen fehlt, induziert und diese i.v. mit 10 mg/kg PL behandelt (**Abbildung 7**).

Nach Gabe von PL kam es zu einer signifikanten Verbesserung des Krankheitsverlaufes der EAE. Dies deutet darauf hin, dass die Expression des GR in T-Zellen für die Behandelbarkeit der Erkrankung entbehrlich ist. Um zu überprüfen, ob der

Applikationsweg für die Wirkung von PL eine Rolle spielt, wurde eine EAE in C57BL/6-GR^{lck}-Mäusen induziert und entweder i.p. oder i.v. mit PL therapiert (**Abbildung 7**). Die Verbesserung der Krankheitssymptome war in beiden Fällen vergleichbar. In allen folgenden Experimenten wurde PL daher i.p. verabreicht.

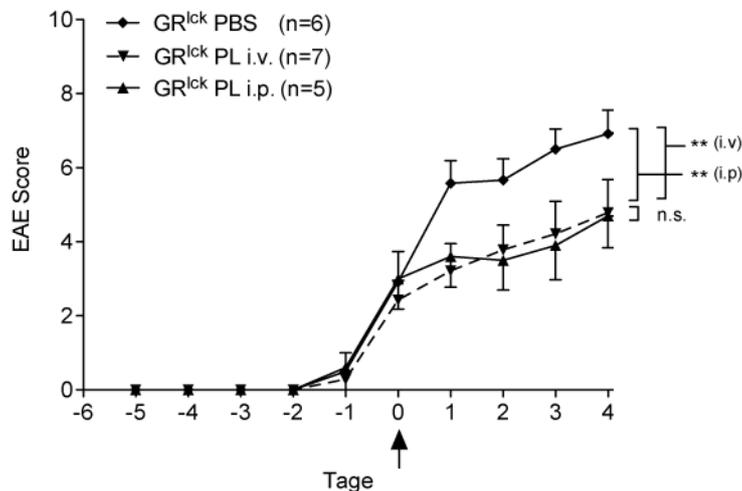


Abbildung 8: Einfluss des Applikationswegs von PL auf die Behandelbarkeit einer EAE

C57Bl/6-GR^{lck}-Mäuse wurden mit MOG₃₅₋₅₅ immunisiert und bei einem EAE-Score von 1 - 2 (= Tag 0) mit PL i.v. oder i.p. oder PBS i.v. als Kontrolle behandelt. An Tag 0 beginnen die ersten klinischen EAE-Symptome. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test von Tag 1 - 4. N = 5 - 7. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. P-Werte über 0.05 wurden als nicht signifikant bewertet. Signifikante Unterschiede sind mit * (p<0.05), ** (p<0.01) oder *** (p<0.001) gekennzeichnet.

3.1.2 Modulation der Makrophagen durch PL

Liposomen haben die Eigenschaft durch Makrophagen phagozytiert zu werden. Man nimmt deshalb an, dass sie präferentiell auf diese Zellpopulation wirken (Immordino et al. 2006). Aus diesem Grund postulierten wir, dass der GR in Makrophagen für die PL-Therapie einer EAE entscheidend sein könnte. Frühere Arbeiten belegten, dass die Therapieeffizienz von PL in GR^{LysM}-Mäusen, denen der GR in allen myeloiden Zellen fehlt, vermindert ist (Schweingruber et al. 2011). Wurde der GR in myeloiden Zellen und T-Zellen gleichzeitig ausgeschaltet, konnte durch die Behandlung mit PL annähernd kein Therapieeffekt mehr erzielt werden. Dies belegt, dass beide Zelltypen gemeinsam als Zielzellen dieses Therapieschemas fungieren (Schweingruber et al. 2011).

Um zu untersuchen, welche Wirkung von PL auf Makrophagen für die Verbesserung der EAE verantwortlich ist, wurde eine Anzahl funktioneller Tests durchgeführt.

3.1.2.1 Beeinflussung von Makrophagen-Funktion durch PL

Makrophagen dienen der Antigen-Präsentation für T- und B-Zellen, der Phagozytose von Zelltrümmern und Pathogenen, und sind für das Mikromilieu von Entzündungen wichtig, zu welchem NO, Zytokine, Chemokine und weitere Substanzen beitragen. Daher wurde der Einfluss von Dex und PL auf die Antigenpräsentation und die Phagozytose von Makrophagen verglichen.

3.1.2.1.1 Beeinflussung der MHC-II-Expression durch PL in vivo

Makrophagen sind professionelle Antigenpräsentierende Zellen (APCs). Diese Funktion wird maßgeblich durch die Oberflächenexpression von MHC-II-Molekülen mitbestimmt. Zur Untersuchung dieser Eigenschaft wurde C57BL/6-wt-Mäusen Thioglycolat i.p. gespritzt; ein Tag vor der Isolation der peritonealen Makrophagen wurden diese mit PL oder Dex i.p. behandelt. Die Oberflächenexpression von MHC-II wurde durch beide Behandlungen signifikant in gleichem Maße reduziert (**Abbildung 8A**). Dieser Effekt war abhängig von der Expression des GR in den Makrophagen, da er in GR^{LysM}-Mäusen nicht mehr auftrat (**Abbildung 8B**). Durch die geringere Dichte von MHC-II-Molekülen auf der Oberfläche von Makrophagen nach Therapie mit PL verringert sich die Wahrscheinlichkeit der Aktivierung von T-Zellen durch die Makrophagen. Da die Herunterregulation der MHC-II-Moleküle auf der Oberfläche von Makrophagen in GR^{LysM}-Mäusen nicht beobachtet wurde, ist von einem rezeptorabhängigen Effekt auszugehen. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Oberflächenexpression indirekt moduliert wird.

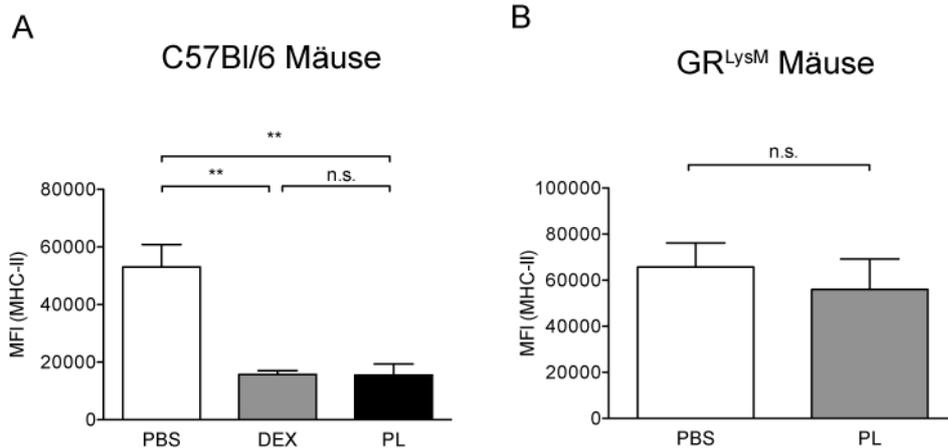


Abbildung 9: Reduktion der MHC-II-Oberflächenexpression auf peritonealen Makrophagen nach *In vivo*-Behandlung mit Dex oder PL

C57Bl/6-wt-Mäusen wurden 1 ml Thyoglycolat i.p. gespritzt; an Tag 3 wurde jeweils *in vivo* mit PBS als Kontrolle, Dex (100 mg/kg) oder PL (10 mg/kg) i.p. behandelt. 24 h später wurden die peritonealen Makrophagen zur durchflusszytometrischen Analyse isoliert. **A** Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen F4/80, GR-1, B220 und MHC-II gefärbt. Dargestellt ist die MFI der MHC-II-Expression nach Gating auf F4/80⁺ GR1⁻ B220⁻ -Zellen. **B** Wirkung von PL im Vergleich zu PBS als Kontrolle auf die Oberflächenexpression von MHC-II-Molekülen von peritonealen Makrophagen bei GR^{LysM}-Mäusen. Dargestellt ist die MFI der MHC-II-Expression nach Gating auf F4/80⁺ GR1⁻ B220⁻ -Zellen. Die statistischen Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. N = 4 – 6 (in Triplets gemessen). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. P-Werte über 0.05 wurden als nicht signifikant bewertet. Signifikante Unterschiede sind mit ** (p<0.01) gekennzeichnet.

3.1.2.1.2 Beeinflussung der Phagozytose von Makrophagen durch PL *in vitro*

Phagozytose ist eine Hauptaufgabe von Makrophagen. Um die Phagozytose *in vitro* zu testen, wurden *Bone Marrow Derived Macrophages* (BMDMs) aus dem Knochenmark von Mäusen generiert. Dadurch konnte eine größere Anzahl und höhere Reinheit von Makrophagen im Vergleich zur Isolation von peritonealen Makrophagen erzielt werden. Die Phagozytosefähigkeit von unbehandelten BMDMs wurde gegenüber *in vitro* mit Dex oder PL behandelten BMDMs verglichen.

Die Bestimmung der Phagozytoseaktivität erfolgte durch eine *In vitro*-Ko-Kultur mit CFSE-gefärbten Lymphozyten, die als Substrat dienten. Der Anteil an Makrophagen, die CFSE-gefärbte Lymphozyten phagozytiert hatten, konnte mittels FACS anhand des aufgenommenen Farbstoffes bestimmt werden. Die BMDMs konnten aufgrund ihrer Größe im FSC/SSC Diagramm ohne vorherige Färbung von den eingesetzten Lymphozyten unterschieden werden. Bereits nach 30 min konnten CFSE-positive Makrophagen nachgewiesen werden (**Abbildung 9**). BMDMs, die mit PL *in vitro* behandelt worden waren, nahmen nach 2 Stunden weniger Lymphozyten auf als BMDMs die mit PBS oder Dex behandelt wurden.

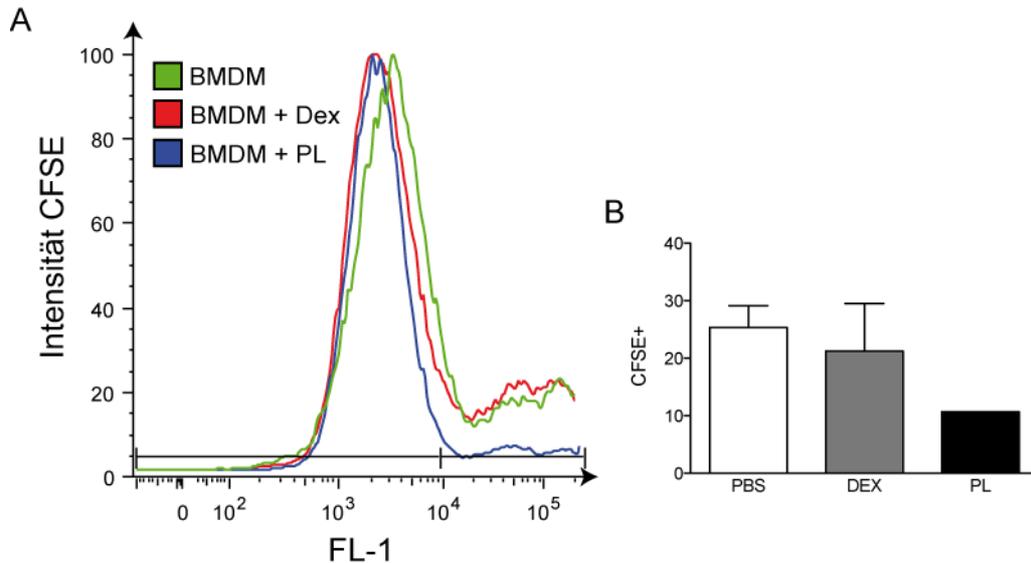


Abbildung 10: Einfluss von PL und Dex auf die Phagozytose von CFSE-gefärbten Lymphozyten durch BMDMs.

Makrophagen wurden *in vitro* mit PL (20µg/ml) oder 10⁻⁷ M Dex behandelt und für die Phagozytose von CFSE-gefärbten und bestrahlten Lymphozyten eingesetzt. **A** Makrophagen wurden auf Basis ihrer Granularität im FSC/SSC-Blot identifiziert und bezüglich ihres CFSE-Gehalts im FL-1 Kanal analysiert. Dargestellt sind repräsentative Histogramme der Behandlungsschemata (PBS: grün, Dex: rot, PL: blau) nach 2 Stunden mit Lymphozyten als Substrat. **B** Quantifizierung der Phagozytoseleistung der Makrophagen nach PL oder Dex-Behandlung auf Basis des Anteils der CFSE+ Zellen. N = 2 (Dex, PBS) und N = 1 (PL) (in Triplets gemessen). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt.

3.1.2.2 Charakterisierung des Phänotyps der Makrophagen nach *In vivo*-Behandlung mit PL

Nach der Überprüfung der Wirkung von PL auf die Antigenpräsentation und die Phagozytose von Makrophagen sollte anschließend der Phänotyp der Makrophagen charakterisiert werden. Dieser wird unter anderem durch die Genexpression von pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren und der Oberflächenexpression bestimmter Moleküle definiert. Dies ist wichtig, um den speziellen Einfluss und die Rolle der Makrophagen bei einer PL-Therapie einer EAE zu verstehen.

3.1.2.2.1 PL inhibiert die Genexpression von pro-inflammatorischen Molekülen

Der reprimierende Effekt von Dex auf entzündliche Prozesse wird hauptsächlich der negativen Beeinflussung der Genexpression von pro-inflammatorischen Molekülen zugeschrieben. Es wurde daher postuliert, dass PL ebenfalls die Genexpression von pro-inflammatorischen Molekülen bei Makrophagen inhibiert.

Die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 wurden nach einer *In vivo*-PL-Behandlung bei peritonealen Makrophagen in gleichem Umfang inhibiert, wie bei der Gabe von Dex. Das Interferon-gamma induzierte Protein 10 (IP-10 bzw. CXCL10) wird durch die Gabe von PL stärker gehemmt als bei der Gabe von Dex (**Abbildung 10A**). Der hemmende Effekt von Dex auf die Genexpression pro-inflammatorischer Moleküle ließ sich durch PL bei peritonealen Makrophagen somit reproduzieren.

3.1.2.2.2 Die In vivo-Applikation von PL hemmt auch die Genexpression von anti-inflammatorischen Molekülen

Die anti-inflammatorische Wirkung von PL auf Makrophagen ließe sich auch durch die vermehrte Genexpression anti-inflammatorischer Moleküle begründen. Jedoch wurde die Genexpression von anti-inflammatorischen Zytokinen wie TGF- β und IL-10 bei peritonealen Makrophagen von beiden Therapien ebenfalls negativ beeinflusst. Die Genexpression von IL-10 war nach der Gabe von PL zwar höher als nach der Behandlung mit Dex, aber sie übertraf dennoch nicht die der Kontrollen (**Abbildung 10B**). Das von den peritonealen Makrophagen produzierte Zytokin-Milieu, sowohl anti- als auch pro-inflammatorisch, wird durch die Applikation von Dex und PL gleichermaßen inhibiert. Somit muss der Therapie einer EAE mit PL ein anderer Mechanismus zugrunde liegen, als lediglich die inhibierte Genexpression von Zytokinen.

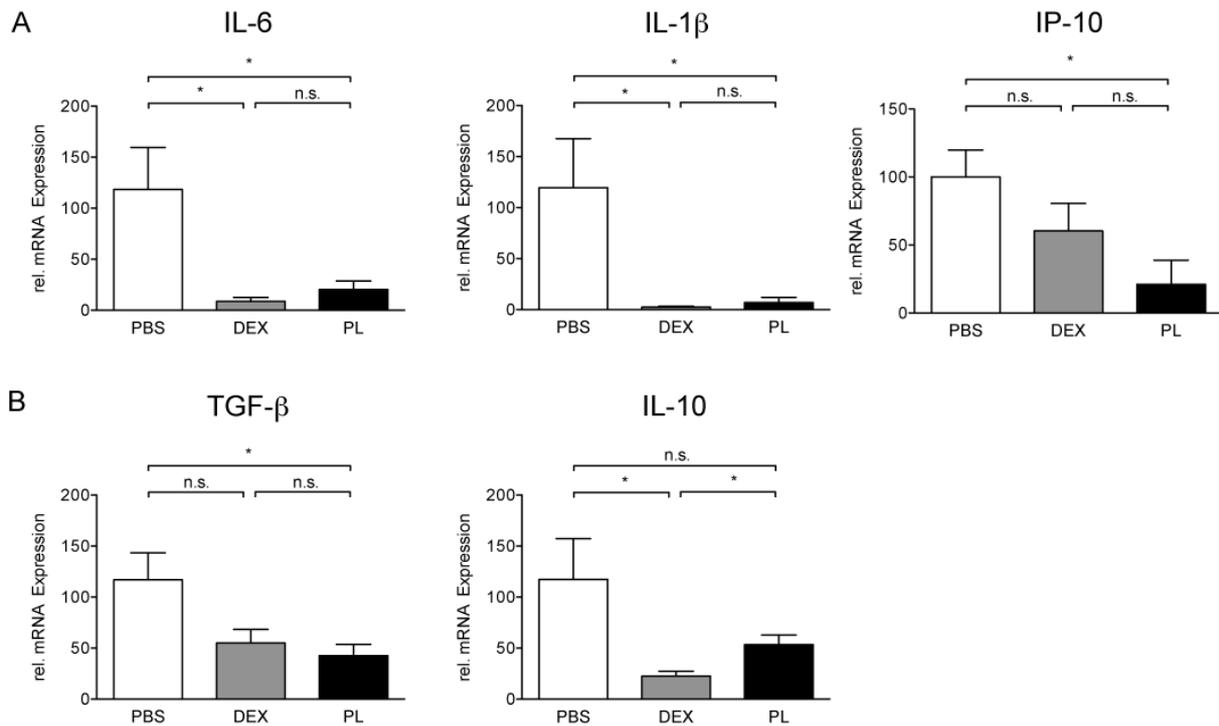


Abbildung 11: Die Genexpression von peritonealen Makrophagen 24 Stunden nach einer Behandlung mit PBS, Dex oder PL *in vivo*.

C57Bl/6-wt-Mäusen erhielten 1 ml Thyoglycolat i.p. und wurden an Tag 3 jeweils *in vivo* mit PBS als Kontrolle, Dex (100 mg/kg) oder PL (10 mg/kg) i.p. behandelt. 24 h später wurden die peritonealen Makrophagen zur RNA-Gewinnung für RT-qPCR Analysen isoliert. **A** Dargestellt ist die Expression typischer pro-inflammatorischer Interleukine: IL-6, IL-1 β und IP-10. **B** Dargestellt sind anti-inflammatorische Zytokine: TGF- β und IL-10. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. N = 5 - 6 (in Triplets gemessen). Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. P-Werte über 0.05 wurden als nicht signifikant bewertet. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0.05$)

3.1.2.2.3 PL fördert die M2-Polarisierung von Makrophagen

Durch Gabe von GCs oder IL-4 lassen sich Makrophagen zu einem M2-Phänotyp polarisieren (Mantovani et al. 2013). Um dies im Kontext einer *In vivo*-Dex- und PL-Behandlung bei peritonealen Makrophagen zu testen, wurde die Genexpression von Molekülen, die einen M2-Phänotyp definieren, gemessen. Es war zu beobachten, dass die Genexpression von CD163, der Arginase1 und der Chitinase Ym1 durch die Gabe von PL induziert wurde. Dex induzierte Arginase1 im Vergleich zu PL in einem geringeren Umfang und YM1 im gleichen Umfang. Es ist hervorzuheben, dass die Verstärkung der Genexpression von CD163 und CD206 nur bei der Behandlung mit PL auftrat. Dex förderte die Genexpression von Fizz1 nur geringfügig, die Applikation von PL verminderte die Genexpression sogar (**Abbildung 11A**).

Der Oberflächenmarker GR1 (Ly6G/Ly6C) findet bei der Charakterisierung von Granulozyten häufig Anwendung. Er beschreibt aber auch eine Population von *Myeloid Derived Suppressor Cells* (MDSCs), die bei der Anti-Tumor Immunität eine

Rolle spielen. Er kommt daher ebenfalls zur Klassifikation von M2-Makrophagen in Betracht. Bei der durchflusszytometrischen Analyse vor Isolation der RNA wurde nach einer PL-Behandlung eine Hochregulation dieses Oberflächenantigens auf den Makrophagen gemessen (**Abbildung 11B**).

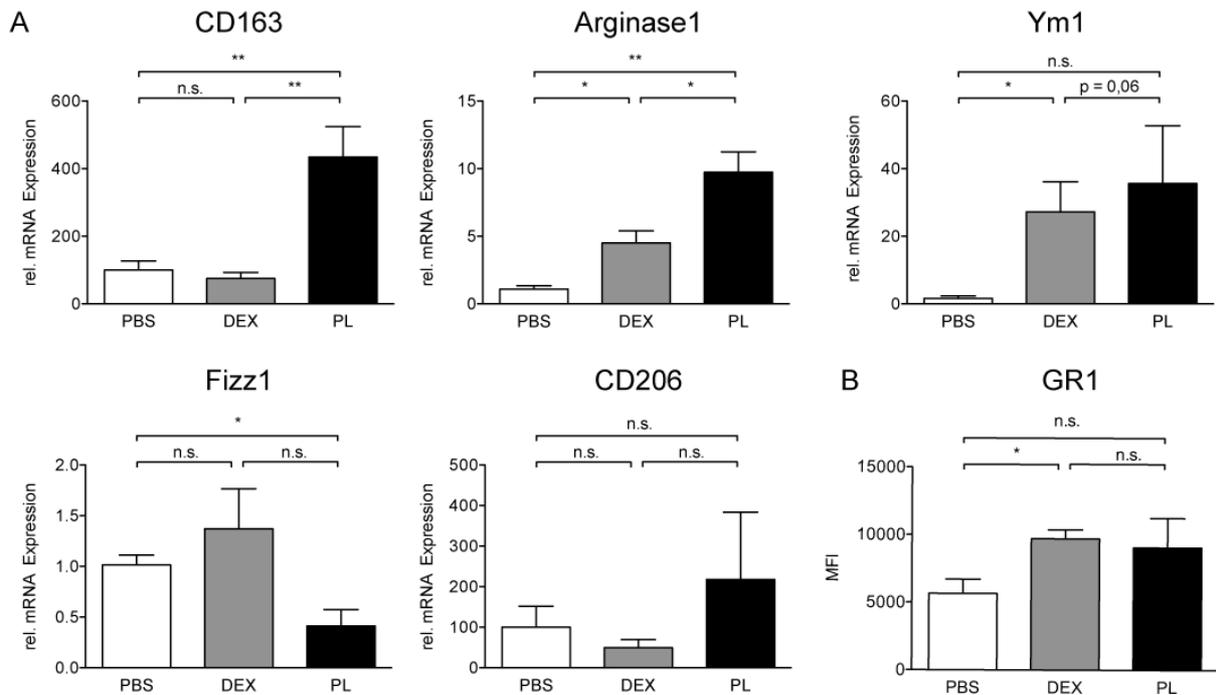


Abbildung 12: Expressionsänderungen von Markern für einen M2-Phänotyp bei peritonealen Makrophagen von C57Bl/6-wt-Mäusen nach einer Behandlung mit PBS, Dex und PL *in vivo*.

C57Bl/6-wt-Mäusen wurden 1 ml Thyoglycolat i.p. gespritzt; an Tag 3 wurden sie jeweils *in vivo* mit PBS als Kontrolle, Dex (100 mg/kg) oder PL (10 mg/kg) i.p. behandelt. 24 h später wurden die peritonealen Makrophagen zur RT-qPCR und durchflusszytometrischen Analysen isoliert. **A** Es wurden typische M2-Gene mittels RT-qPCR 24h nach PBS-, DEX- oder PL-Behandlung gemessen: CD163, Arginase1, Ym1, Fizz1 und CD206

B Makrophagen wurden mit Antikörpern gegen MHC-II, GR1, F4/80 und B220 gefärbt. Dargestellt ist die MFI von GR1 innerhalb der F480⁺B220⁻ Zellpopulation. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. N = 2 - 6 (in Triplets gemessen). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. P-Werte über 0.05 wurden als nicht signifikant bewertet. Signifikante Unterschiede sind mit * (p<0.05), ** (p<0.01) oder *** (p<0.001) gekennzeichnet.

Diese Beobachtungen unterstützen die These einer M2-Polarisierung der Makrophagen mittels *In vivo*-GC-Behandlung. Durch Applikation von PL konnte, im Vergleich zu der alleinigen Gabe von Dex, hingegen eine deutlich stärkere und auch spezifischere Polarisation der Makrophagen zu einem M2-Phänotyp beobachtet werden.

Die M2-Polarisierung kann entweder durch die reine Phagozytose der Liposomen oder spezifisch durch das Prednisolon induziert werden. Zur Unterscheidung zwischen GC-abhängiger und -unabhängiger Induktion der Genexpression wurden Peritoneal-Makrophagen von GR^{LysM}-Mäusen *in vivo* mit PL behandelt. Hierbei sollte bei GR^{LysM}-Mäusen keine Polarisierung der Genexpression von Makrophagen hin zu einem M2-Phänotyp beobachtet werden. Die Genexpression von CD163 und Fizz1 wurden nach Behandlung mit PL signifikant herunterreguliert, die Arginase1 sowie die Chitinase Ym1 zeigen hingegen keinen Unterschied in ihrer Genexpression (**Abbildung 12A**). Die Oberflächenexpression von GR1 blieb in Abwesenheit des GR auf den Makrophagen ebenfalls unverändert (**Abbildung 12B**). Die Herunterregulation von Fizz1 war bei den C57Bl/6-wt- und den GR^{LysM}-Tieren kohärent zu beobachten und ließ sich dadurch als phagozytoseabhängiger Prozess erklären. Somit ist ein M2-Phänotyp der Makrophagen mit vermehrter Expression von CD163, Arginase1 und CD206 beschreibbar, der von der Behandlung mit Prednisolon-gefüllten Liposomen abhängig und unabhängig von der reinen Phagozytose der Liposomen ist.

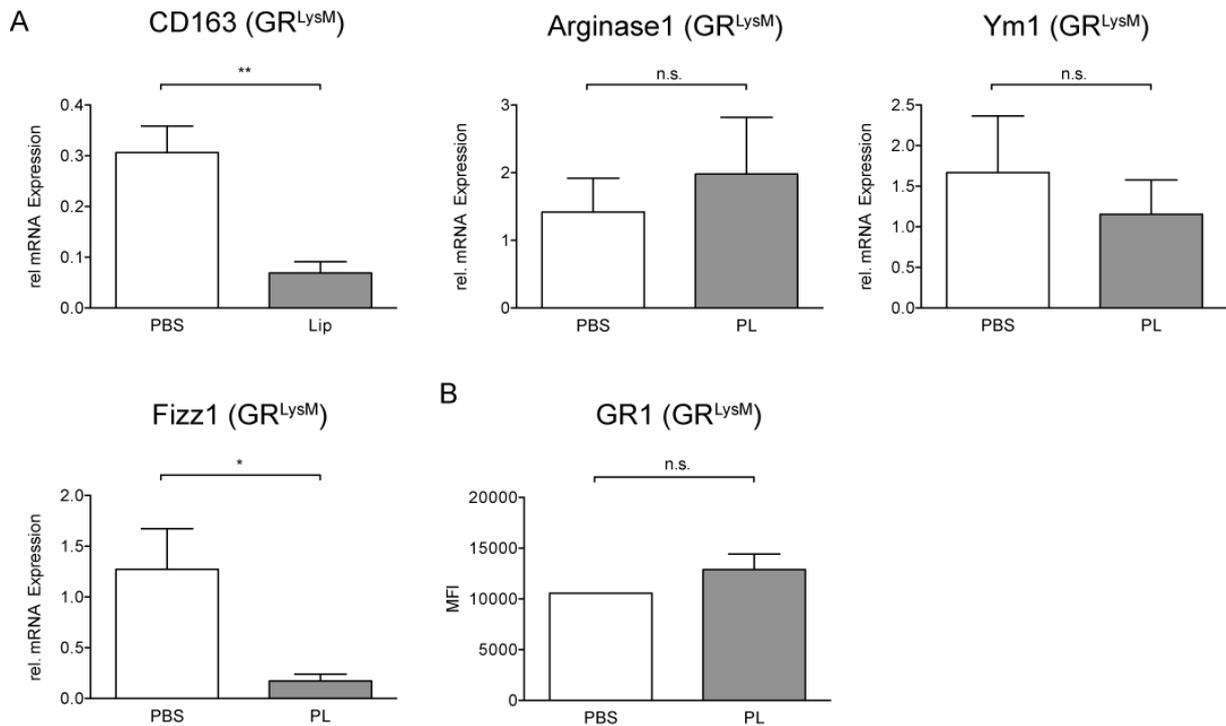


Abbildung 13: Die Hochregulation von Markern von peritonealen Makrophagen, die für einen M2-Phänotyp typisch sind, ist GC-abhängig.

GR^{LysM}-Mäusen wurden 1 ml Thyoglycolat i.p. gespritzt; an Tag 3 wurden sie jeweils *in vivo* mit PBS als Kontrolle, Dex (100 mg/kg) oder PL (10 mg/kg) i.p. behandelt. 24 h später wurden die peritonealen Makrophagen zur RT-qPCR und durchflusszytometrischen Analysen isoliert. **A** Dargestellt ist die Genexpression von Markern eines M2-Phänotyps bei GR^{LysM}-Mäusen. **B** Makrophagen wurden mit Antikörpern gegen MHC-II, GR1, F4/80, B220 gefärbt. Dargestellt ist die MFI von GR1 innerhalb der F480+ B220- Zellpopulation. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. N = 2 - 6 (in Triplets gemessen wurden). Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. P-Werte über 0.05 wurden als nicht signifikant bewertet. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) oder *** ($p < 0.001$) gekennzeichnet.

3.1.2.3 Nachweis des M2-Phänotyps der Makrophagen *in vivo* bei der EAE

Um die für eine PL-Behandlung spezifische erhöhte alternative Aktivierung bzw. den M2-Phänotyp der Makrophagen auch am Ort des Geschehens bei der EAE nachzuweisen, wurden histologische Schnitte vom Rückenmark von Tieren mit einer EAE nach PL-Behandlung angefertigt. Hierbei war eine vermehrte Anzahl von CD163-positiven Zellen in der PL-behandelten Gruppe gegenüber PBS-behandelten Tieren zu beobachten. Diese Zellen waren hauptsächlich an dem Rand des Rückenmarks lokalisiert (**Abbildung 13**). Die Färbung mit CD206, welches ebenfalls bei den Voranalysen spezifisch für eine Therapie mit PL war, zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Daten nicht gezeigt).

Dieses Ergebnis erlaubt es, eine Korrelation zwischen den CD163⁺-Zellen in der Histologie und deren Lokalisation in den festen Bestandteilen des Rückenmarkes, nämlich den Meningen, herzustellen.

Insgesamt bestätigen diese Daten, dass es bei der Therapie einer EAE mit PL *in vivo* zu der bereits zuvor beobachteten Polarisierung der Makrophagen hin zu einem M2-Phänotyp kommt, und dass diese bei der Applikation von PL ausgeprägter als bei Dex allein ausfällt. Somit ließe sich der zusätzliche therapeutische Effekt der PL-Behandlung auf Makrophagen mit dieser Beobachtung erklären.

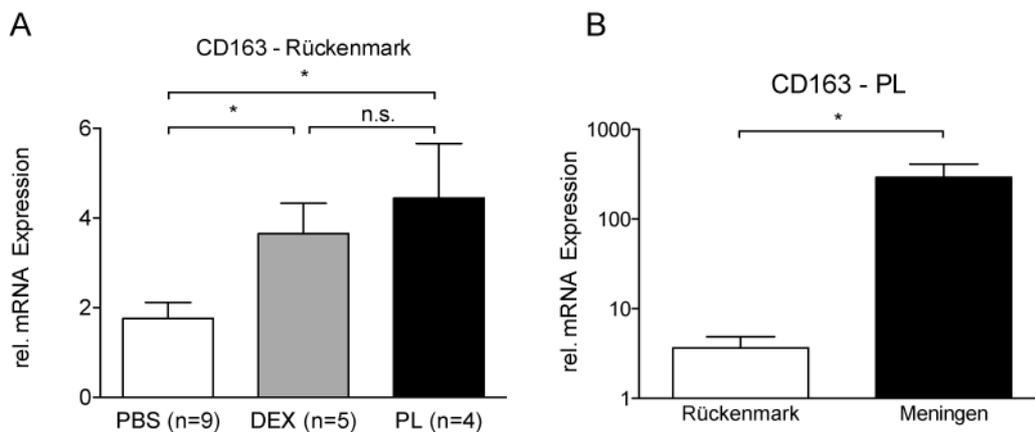


Abbildung 15: Die CD163-Genexpression ist bei Lymphozyten aus dem Rückenmark und den Meningen von an EAE-erkrankten Mäusen nach PL-Behandlung höher.

Eine EAE bei C57Bl/6-wt-Mäusen wurde bei einem durchschnittlichen Score von 2 mit Dex (100 mg/kg), PL (4 mg/kg) oder PBS als Kontrolle therapeutisch i.p. behandelt. 4 Tage nach Therapiebeginn wurden aus dem Rückenmark und den Meningen der Mäuse Lymphozyten zur RT-qPCR Analyse isoliert. **A** Dargestellt ist die quantitative mRNA-Expression von CD163 in Rückenmark-infiltrierenden Zellen. **B** Die Meningen wurden separat zur RNA-Gewinnung und Analyse der Genexpression von CD163 genutzt. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von CD163 von Lymphozyten aus dem Rückenmark im Vergleich zu den Meningen unter PL-Behandlung. Die statistischen Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. N = 4 – 9. Die Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Experimenten (in Triplets gemessen). Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. P-Werte über 0.05 wurden als nicht signifikant bewertet. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0.05$).

3.2 Die Beeinflussung der Chemokin-induzierten Migration von T-Zellen als neuer Wirkmechanismus der GC-Therapie

3.2.1 GC-induzierte Apoptose von T-Zellen ist für die Therapie einer EAE mit Dex nicht erforderlich

Die Beobachtung, dass die Zahl der T-Zellen unter dem Einfluss von GCs sowohl *in vivo* als auch *in vitro* abnimmt, ist seit langem bekannt. Dieser Effekt wurde sowohl in der Klinik als auch in der Therapie der EAE als wesentlicher Behandlungseffekt beschrieben. Mechanistisch konnte gezeigt werden, dass GCs pro-apoptotische Moleküle wie Bim und Puma induzieren (Erlacher et al. 2006) und so zur Induktion von Apoptose führen. Diesem Prozess kann wiederum durch eine Überexpression von anti-apoptotischen Molekülen wie Bcl-2 entgegengewirkt werden (Memon et al. 1995).

3.2.1.1 Bcl-2-überexprimierende T-Zellen sind gegenüber dem GICD resistent

Zur Untersuchung der Rolle von GICD für die Therapie einer EAE mit Dex wurden zuerst chimäre Mäuse verwendet, in denen Bcl-2 spezifisch in T-Zellen überexprimiert ist. Um die Resistenz von T-Zellen gegenüber dem GICD *in vitro* nachzuweisen, wurden aus den chimären Tieren die Lymphknoten isoliert und Lymphozyten für einen Apoptose-Assay eingesetzt. Frühe apoptotische Zellen wurden mittels Annexin-Cy5 angefärbt, tote Zellen wurden durch den Farbstoff 7-AAD sichtbar gemacht. Lymphozyten aus wildtypischen Kontrollmäusen zeigten eine konzentrationsabhängige Reduktion der Annexin-Cy5-negativen Population, also der lebenden Zellen. Bei den Bcl-2-überexprimierenden Lymphozyten überlebten fast alle Zellen unabhängig von der eingesetzten Konzentration von Dex (**Abbildung 15A,B**). Dies belegt, dass Bcl-2-überexprimierende Lymphozyten *in vitro* wie erwartet gegenüber GICD resistent sind.

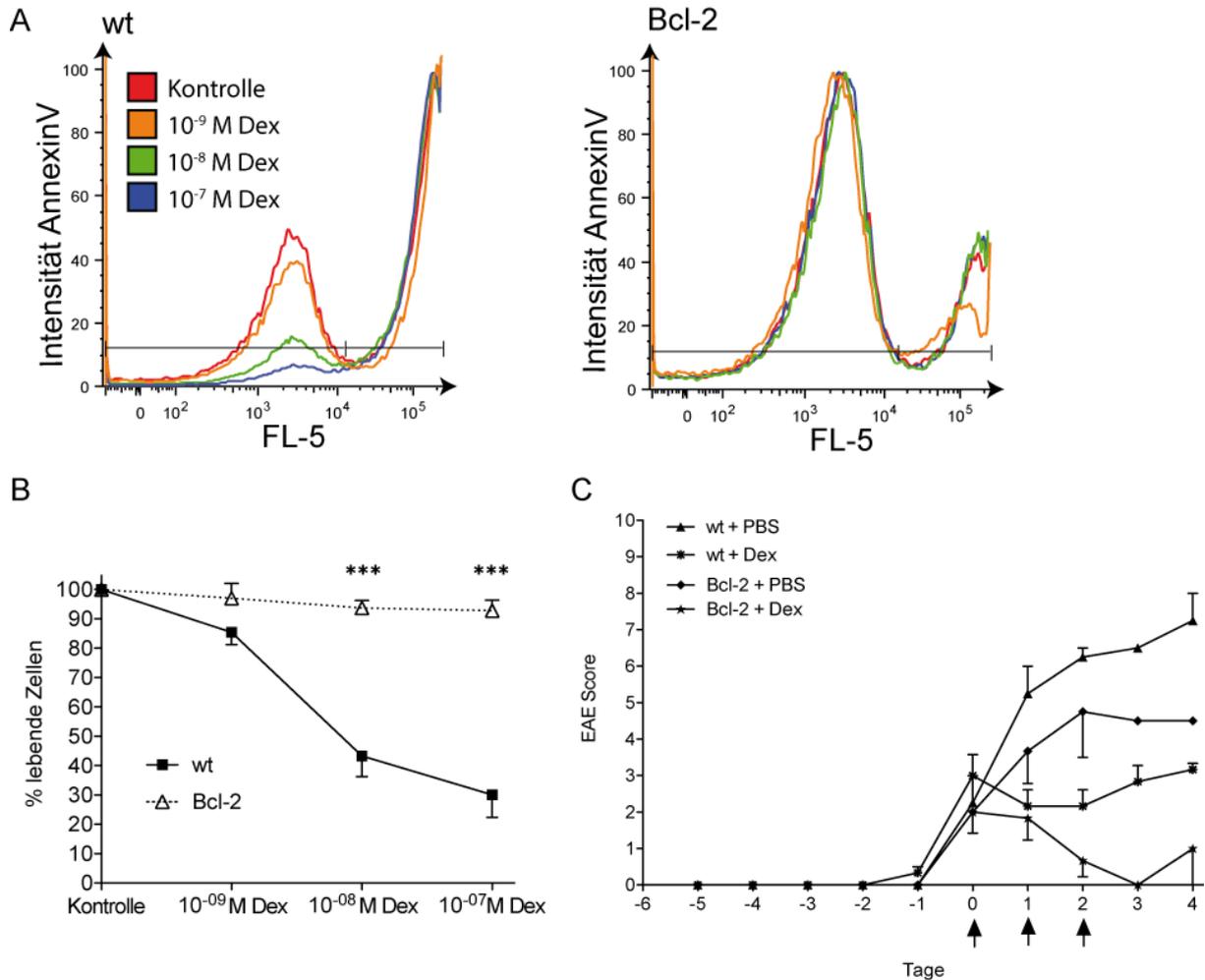


Abbildung 16: GC-induzierte Apoptose von T-Zellen ist für die Therapie von EAE bei C57Bl/6-wt-Mäusen mit Dex nicht erforderlich.

C57Bl/6-wt-Mäuse wurden bestrahlt und mit Knochenmark von Bcl-2-transgenen Mäusen substituiert. **A** Lymphknoten aus C57Bl/6-wt- und chimären Bcl-2-transgenen Mäusen wurden zur Gewinnung der Lymphozyten präpariert und für einen Apoptose-Assay verwendet. Danach wurden die Lymphozyten mit Antikörpern gegen CD3, CD4 und CD8 sowie mit AnnexinV und 7-AAD gefärbt und bezüglich ihrer AnnexinV Färbung im FL-5 Kanal analysiert. Dargestellt sind repräsentative Histogramme von CD3+ AnnexinV+ Lymphozyten 24h nach Behandlung mit verschiedenen Dex-Konzentrationen (Kontrolle: rot, 10⁻⁹ M Dex: orange, 10⁻⁸ M Dex: grün, 10⁻⁷ M Dex: blau). **B** Darstellung der CD3+AnnexinV-Zellpopulation als lebende Zellen nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Dex-Konzentrationen. **C** C57Bl/6-wt- und chimäre Bcl-2-transgene Mäuse wurden mit MOG₃₅₋₅₅ immunisiert und bei einem durchschnittlichen EAE-Score von 2 (Tag = 0) i.p. mit PBS oder Dex (100 mg/kg) behandelt. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. N = 3. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. P-Werte über 0.05 wurden als nicht signifikant bewertet. Signifikante Unterschiede sind mit * (p<0.05), ** (p<0.01) oder *** (p<0.001) gekennzeichnet.

3.2.1.2 Die EAE in chimären Bcl-2-transgenen Mäusen lässt sich mit Dex behandeln.

Die Relevanz des GICD für die Behandlung einer EAE mit Dex *in vivo* wurde mittels chimärer Bcl-2-transgener Mäuse getestet. Zum Vergleich wurde die Kontrollgruppe mit C57Bl/6-wt-Knochenmark rekonstituiert. Generell ist anzumerken, dass die EAE in chimären Mäusen aufgrund der Bestrahlung stets früher beginnt und fulminanter verläuft. Der Verlauf der Erkrankung war in beiden Gruppen vergleichbar, wobei anzumerken ist, dass die Zahl der untersuchten Tiere im vorliegenden Experiment sehr gering war. Entscheidend war, dass sich die EAE-Symptome beider Gruppen mit Dex verbessern ließen. Somit ist entgegen der Annahme eine Therapie mit Dex trotz fehlenden GICDs möglich (**Abbildung 15C**).

3.2.1.3 Die EAE in GR^{dim}-Mäusen lässt sich mit Dex therapieren.

Vorarbeiten hatten gezeigt, dass sich eine EAE in C57Bl/6-GR^{dim}-Mäusen mit Dex effizient reprimieren lässt. C57Bl/6-GR^{dim}-Mäuse sind jedoch schwer zu züchten, da nur etwa 1-2 % der mutanten Nachkommen überleben. Deshalb sollte das genannte Ergebnis in Balb/c-GR^{dim}-Mäusen reproduziert werden, die sich wesentlich besser züchten lassen.

Balb/c-wt- und GR^{dim}-Mäuse wurde mittels PLP₁₈₀₋₁₉₉-Peptid immunisiert und beim Auftreten erster Krankheitssymptome mit Dex behandelt. Der Krankheitsverlauf war bei beiden Gruppen vergleichbar (**Abbildung 16**). Weiterhin konnte durch eine Therapie mit Dex ein signifikanter Behandlungserfolg auf den Verlauf der EAE erzielt werden, welcher bei GR^{dim}- und wt-Mäusen ebenfalls vergleichbar war (**Abbildung 16**). Dieses Ergebnis belegt, dass Dex unabhängig vom genetischen Hintergrund bei GR^{dim}-Mäusen die EAE-Symptome mildert. Die zuvor gemachte Beobachtung, dass T-Zellen von GR^{dim}-Mäusen gegenüber dem GICD resistent sind, stellt eine weitere Bestätigung für die Unabhängigkeit einer Therapie mit GCs von der Apoptose von Lymphozyten dar.

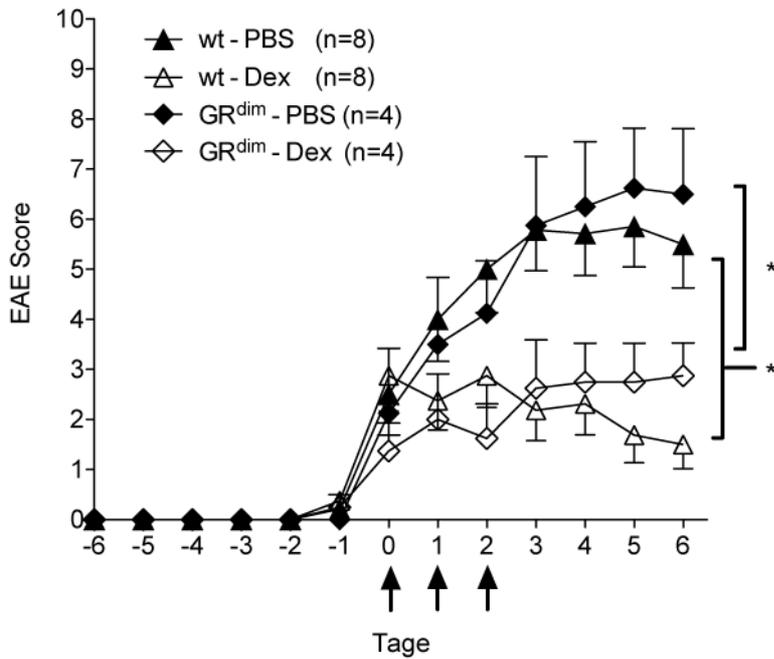


Abbildung 17: Die EAE von Balb/c-wt- und GR^{dim}-Mäusen lässt sich mit Dex behandeln.

Balb/c-wt- und GR^{dim}-Mäuse wurden mit PLP₁₈₀₋₁₉₉ immunisiert und bei einem durchschnittlichen EAE-Score von 2 (Tag = 0) i.p. mit PBS oder Dex (100 mg/kg) behandelt. Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test gefolgt von Dunn's Multiple Comparison von Tag 1 - 6. N = 4 - 8. Die Ergebnisse sind aus zwei unabhängigen Experimenten gepoolt. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. P-Werte über 0.05 wurden als nicht signifikant bewertet. Signifikante Unterschiede sind mit * (p<0.05) gekennzeichnet.

3.2.1.4 Die Anzahl der T-Zellen im Rückenmark bei einer EAE von C57Bl/6-GR^{dim}-Mäusen nimmt nach einer Dex-Therapie ab

Für alle zellulären Analysen der EAE wurden C57Bl/6-GR^{dim}-Mäuse verwendet, um eine Vergleichbarkeit zu den Vorexperimenten herzustellen, die ebenfalls mit diesem genetischen Hintergrund durchgeführt worden waren. Zuerst wurden die absoluten Zellzahlen in der Milz und im Rückenmark bei einer EAE von C57Bl/6-wt- und GR^{dim}-Mäusen nach Dex-Behandlung verglichen.

Die Zahl der CD4⁺-T-Zellen in der Milz bei C57Bl/6-wt-Tieren nahm nach der Gabe von Dex stark ab, während sie bei den GR^{dim}-Mäusen nahezu unverändert blieb (**Abbildung 17A**). Dies ist in guter Übereinstimmung mit der Resistenz von GR^{dim}-T-Zellen gegenüber dem GICD. Die absolute Zahl der CD4⁺-Zellen im Rückenmark hingegen ging sowohl bei den C57Bl/6-wt- als auch den GR^{dim}-Mäusen deutlich zurück (**Abbildung 17B**). Die Abnahme der Zellzahlen im Rückenmark spiegelt in diesem Fall das geringere Ausmaß der klinischen Symptome bei einer EAE nach einer Dex-Behandlung wider.

Die Adhäsionsmoleküle LFA-1 und CD44 werden von T-Zellen benötigt, um vor einer Extravasation an das aktivierte Endothel zu binden. Auf den CD4⁺-T-Zellen in der Milz wurde die Oberflächenexpression von LFA-1 und nach Dex-Behandlung herunterreguliert. Dies geschah sowohl bei der EAE von C57Bl/6-wt- als auch von GR^{dim}-Mäusen (**Abbildung 17A**). Im Rückenmark war interessanterweise zu beobachten, dass die CD4⁺ Population nach Dex-Behandlung eine höhere Expression von CD44 vorwies, als unbehandelte Kontrolltiere. Die Expression von LFA-1 im Rückenmark wurde von der Therapie mit Dex nicht beeinflusst. Allgemein war zu beobachten, dass der Anteil von LFA-1⁺ und CD44⁺ Zellen unter den CD4⁺-T-Zellen im Rückenmark bei einer EAE zwischen 70 und 100% lag (**Abbildung 17B**).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Anzahl der T-Zellen im Rückenmark und die Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen auf T-Zellen in der Peripherie bei der EAE nach Dex, unabhängig von der Transaktivierung des GR, vermindert ist. Bei der EAE von GR^{dim}-Mäusen war hingegen keine Verminderung von T-Zellen in der Peripherie zu beobachten. Dies unterstützt die Annahme, dass unabhängig von GICD andere Effekte für die Behandlung einer EAE mit GCs entscheidend sein könnten.

- Ergebnisse -

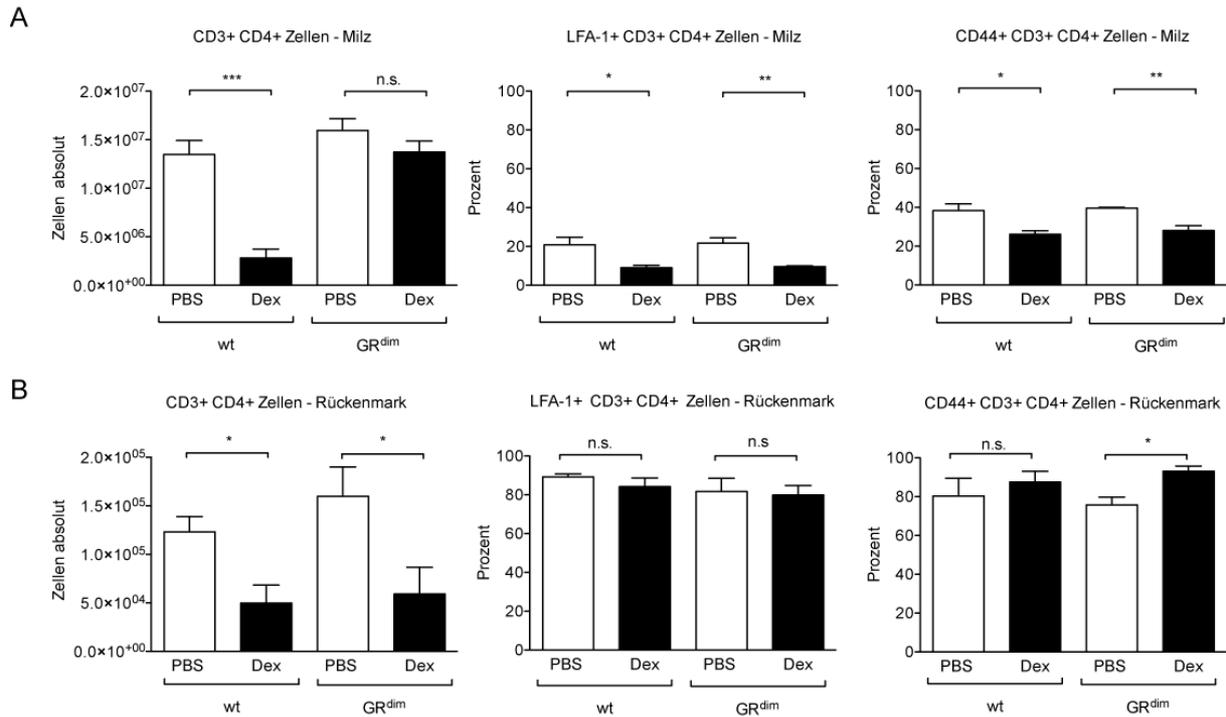


Abbildung 18: FACS Analysen von Zellen aus dem Rückenmark und der Milz von C57Bl/6-wt- und GR^{dim}-Mäusen nach Dex-Behandlung einer EAE.

C57Bl/6-wt- und GR^{dim}-Mäuse wurden mit MOG₃₅₋₅₅ immunisiert und bei einem durchschnittlichen Score von 2 i.p. mit Dex (100 mg/kg) oder PBS behandelt. An Tag 3 nach Therapiebeginn wurden die Milz (A) und das Rückenmark (B) zur durchflusszytometrischen Analysen präpariert. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD3, CD4, CD8, CD44, LFA-1 gefärbt. Dargestellt sind die absoluten Zahlen der CD3⁺CD4⁺-T-Zellen und der jeweilige prozentuale Anteil an CD44 und LFA-1 positiven Zellen innerhalb dieser Population. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. N = 3. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. P-Werte über 0.05 wurden als nicht signifikant bewertet. Signifikante Unterschiede sind mit * (p<0.05), ** (p<0.01) gekennzeichnet.

3.2.2 Dex beeinflusst die Migration von T-Zellen *in vitro*

Die bislang erzielten Ergebnisse belegen, dass eine EAE mit Dex behandelt werden kann, selbst wenn T-Zellen gegenüber GICD refraktär sind. Als möglicher alternativer Mechanismus der therapeutischen Wirkung von GCs auf die EAE wurde daher im Folgenden die Beeinflussung der Chemokin-induzierte Wanderung von T-Zellen durch GCs untersucht.

3.2.2.1 Dex hat innerhalb der ersten 5 Stunden keinen Einfluss auf die Expression von Chemokinrezeptoren auf T-Zellen

Zunächst wurde die Oberflächenexpression der zu CXCL12, CCL19 und CXCL10 korrespondierenden Chemokinrezeptoren CXCR4, CCR7 und CXCR3 auf T-Zellen aus sekundären lymphatischen Organen (Milz und Lymphknoten) bestimmt. Hierzu wurden die Zellen *in vitro* mit Dex behandelt und anschließend mittels FACS analysiert. Innerhalb der ersten 5 Stunden ergab sich zwischen der unbehandelten und der Dex-Gruppe keinen Unterschied. Jedoch stieg die Expression der Chemokinrezeptoren auf den Zellen behandlungsunabhängig insgesamt etwas an. Dieser „Hunger“-Effekt war bekannt und einer der Gründe, weshalb Transmigrations-Experimente standardmäßig eine Präinkubation in serumfreiem Medium beinhalten. Die Oberflächenexpression von CXCR4, dem Rezeptor für CXCL12, war nach 24 Stunden, die CXCR3-Expression nach 10 Stunden auf Dex-behandelten Zellen höher als in der unbehandelten Gruppe (**Abbildung 18A**). Für die Beurteilung des Einflusses von GCs auf die *In vitro*-Migration sind hingegen die 3 und 5 Stunden Zeitpunkte entscheidend, da die Zellen hier zunächst 3 Stunden vorinkubiert werden und danach eine 3 stündige Transwellmigration folgte (**Abbildung 18B**). Die Oberflächenexpression des Chemokinrezeptors CXCR3 schwankt auf einem sehr niedrigen Niveau, wobei dessen Beurteilung außen vor bleiben muss.

Zusammenfassend weisen Dex-behandelte T-Zellen innerhalb der ersten 5 Stunden der *In vitro*-Kultivierung keine signifikanten Unterschiede in der Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR7 auf, die ein verändertes Wanderungsverhalten erklären könnten.

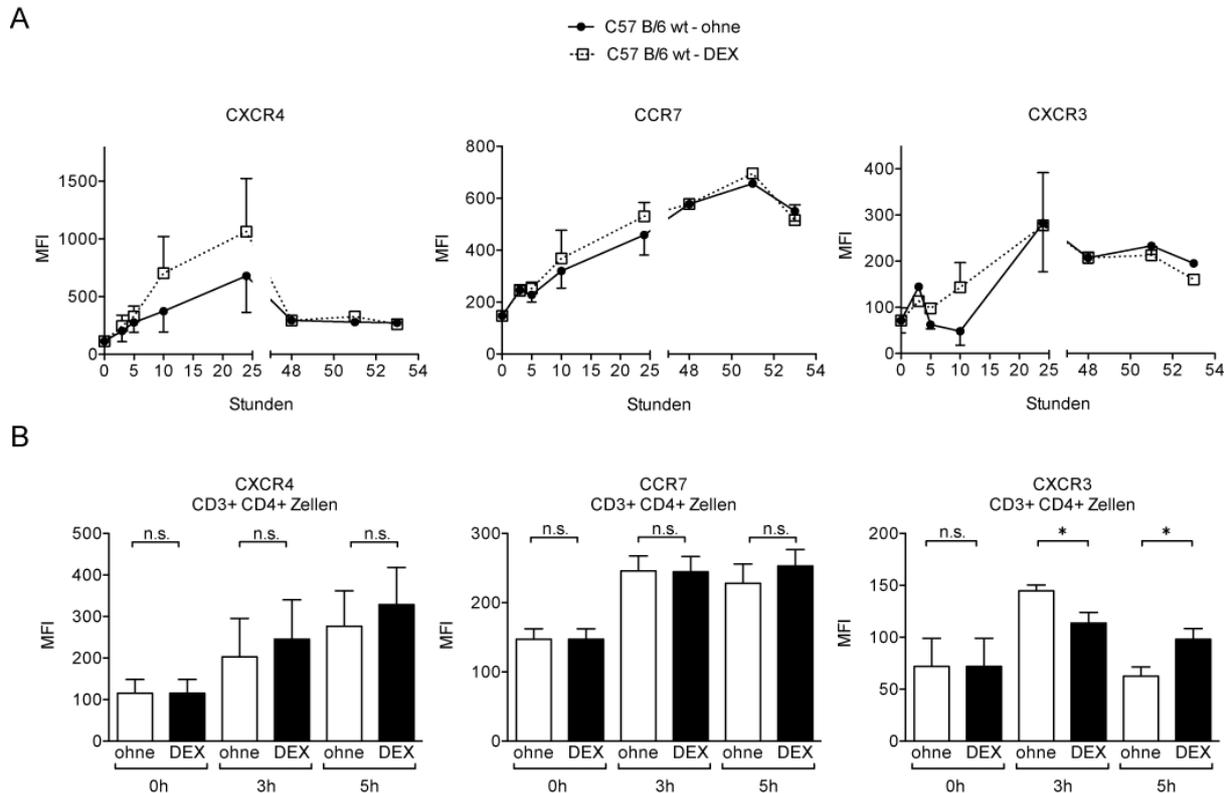


Abbildung 19: Dex hat keinen wesentlichen Einfluss auf die Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren CXCR4, CCR7 und CXCR3 auf T-Zellen aus C57Bl/6-wt-Mäusen

Leukozyten wurden aus den Lymphknoten und der Milz von C57Bl/6-wt-Mäusen isoliert und unter serumfreien Konditionen kultiviert. Die Hälfte der Zellen wurde zusätzlich mit Dex (10^{-7} M) inkubiert. Die Kinetik der Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren CXCR4, CCR7 und CXCR3 wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD3, CD4, CD8 und CD44 sowie separat gegen den jeweiligen Chemokinrezeptor gefärbt. Dargestellt ist die MFI der Chemokinrezeptoren auf $CD3^+CD4^+$ -T-Zellen. **A** Kinetik der Oberflächenexpression über 54 Stunden gemessen ($n=2$). **B** Darstellung der für Transmigrations-Experimente relevanten Zeitpunkte 3 und 5 Stunden nach Inkulturnahme ($n=3$). Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. $N = 2-3$ (in Dupletts gemessen). Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. P-Werte über 0.05 wurden als nicht signifikant bewertet. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0.05$) gekennzeichnet.

3.2.2.2 Dex hemmt die CCL19-induzierte Transmigration von T-Zellen *in vitro*.

In einem ersten Schritt wurde die CCL19-induzierte Transmigration von T-Zellen analysiert. Nach Präinkubation mit Dex für 3 Stunden war die CCL19-induzierte Transmigration der T-Zellen signifikant vermindert. Dieser inhibitorische Effekt war bei beiden eingesetzten Konzentrationen vergleichbar; bei 100 ng/ml CCL19 war die Hemmung jedoch etwas ausgeprägter. Wurden T-Zellen aus GR^{lck} -Tieren untersucht, die keinen GR exprimierten, konnte der inhibitorische Effekt von Dex auf die Transmigration nicht beobachtet werden (**Abbildung 19**). Wurden hingegen T-Zellen aus GR^{dim} -Mäusen untersucht, war die Repression der T-Zell-Wanderung erhalten (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass GCs die Wanderung von T-Zellen gegen einen Gradienten von CCL19 reprimieren, obwohl die Oberflächenexpression des korrespondierenden Rezeptors CCR7 unverändert bleibt. Der beobachtete Effekt war vom Vorhandensein des GR, nicht aber dessen Transaktivierungsfunktion abhängig.

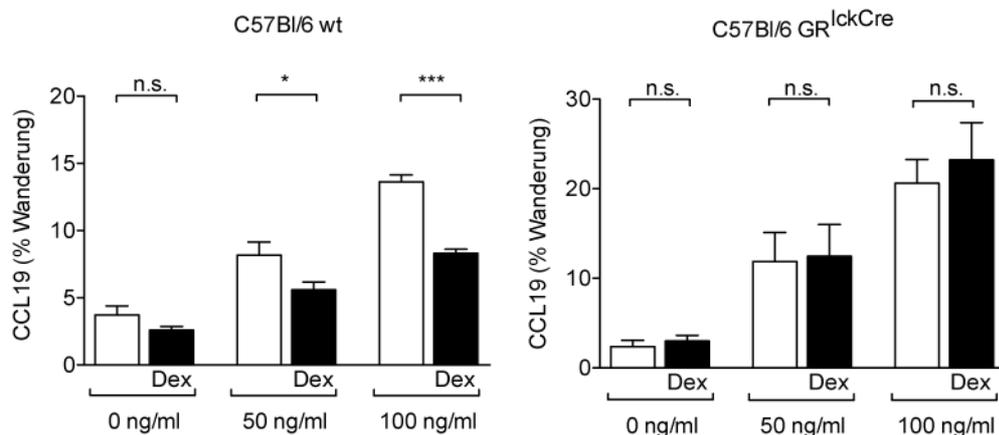


Abbildung 20: Dex hemmt die CCL19-induzierte Transmigration von T-Zellen aus C57Bl/6-wt- nicht aber GR^{lck}-Mäusen.

T-Zellen wurden aus den Lymphknoten und der Milz von C57Bl/6-wt- und GR^{lck}-Mäusen isoliert und 3 h unter serumfreien Bedingungen kultiviert. Die Hälfte der Zellen wurde zusätzlich mit Dex (10^{-7} M) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 3 hrs in einem Transmigrations-Assay eingesetzt. Dargestellt ist die relative Zahl der gewanderten Zellen ausgehend von 10^6 eingesetzten T-Zellen pro Loch gegen reines Medium (Willkürwanderung) oder einen Gradienten von 50 ng/ml oder 100 ng/ml CCL19. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. N = 3 - 4 gepoolt aus 3 unabhängigen Experimenten (in Quadruplikaten gemessen). Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. P-Werte über 0.05 wurden als nicht signifikant bewertet. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0.05$) oder *** ($p < 0.001$) gekennzeichnet.

3.2.2.3 Dex verstärkt die CXCL12-induzierte Transmigration von T-Zellen in vitro.

Im nächsten Schritt wurde die CXCL12-induzierte Transmigration von T-Zellen untersucht, welche sowohl für naive als auch Gedächtnis T-Zellen eine Rolle spielt. Interessanterweise wanderten T-Zellen nach einer Behandlung mit Dex effizienter in Richtung CXCL12 als unbehandelte Kontrollzellen. Dieser Effekt war bei beiden eingesetzten Konzentrationen gleichermaßen zu beobachten. Weiterhin war die verstärkte Transmigration gegen CXCL12 auch bei T-Zellen aus GR^{dim}-Mäusen erhalten. Erstaunlicherweise wanderten hingegen GR-defiziente T-Zellen überhaupt nicht gegen einen Gradienten von CXCL12. (**Abbildung 20**).

Zuletzt wurde die CXCL10-induzierte Transmigration *in vitro* anhand eines Transwell-Assays getestet. Es war jedoch keine verstärkte Wanderung der T-Zellen gegenüber CXCL10, selbst bei sehr hohen Chemokin-Konzentrationen, zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Dies war lediglich nach Aktivierung der T-Zellen durch Co-Stimulation mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 der Fall (s. 3.2.6.).

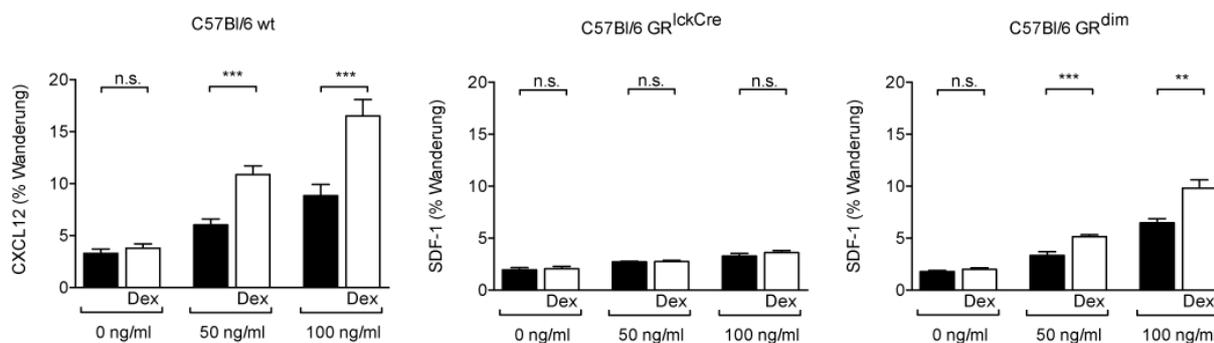


Abbildung 21: Dex verstärkt die CXCL12-induzierten Transmigration von T-Zellen aus C57Bl/6-wt- und GR^{dim}-, nicht aber von GR^{lck}-Mäusen

T-Zellen wurden aus den Lymphknoten und der Milz von C57Bl/6-wt-, GR^{lck}- und GR^{dim}-Mäusen isoliert und 3 h unter serumfreien Konditionen kultiviert. Die Hälfte der Zellen wurde zusätzlich mit Dex (10^{-7} M) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für einen Transmigrations-Assay verwendet. Dargestellt ist die relative Zahl der gewanderten Zellen ausgehend von 10^6 eingesetzten T-Zellen pro Loch gegen reines Medium (Willkürwanderung) oder einen Gradient von 50 ng/ml oder 100 ng/ml CXCL12. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. N = 2 - 4 gepoolt aus 2 unabhängigen Experimenten (in Quadruplikaten gemessen). Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. P-Werte über 0.05 wurden als nicht signifikant bewertet. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) oder *** ($p < 0.001$) gekennzeichnet.

3.2.2.4 Dex verstärkt die CXCL12-induzierte Transmigration *in vitro* unabhängig vom genetischen Hintergrund der Mäuse

Bei der Induktion einer EAE in Mäusen bestehen deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Mausstämmen wie beispielsweise C57Bl/6 und Balb/c. Ausgehend von der Annahme, dass die Modulation der Migration von T-Zellen durch Dex eine Rolle für die Therapierbarkeit einer EAE hat, sollten die bisherigen Beobachtungen mit T-Zellen aus C57Bl/6-Mäusen auch in Balb/c-wt- und GR^{dim}-Tieren rekapituliert werden.

Insgesamt reagieren T-Zellen aus Balb/c Mäusen im Vergleich zu T-Zellen aus C57Bl/6-Mäusen stärker auf die Chemokine CCL19 und CXCL12. Dies könnte ein erster Hinweis auf stammspezifische Unterschiede auch in der EAE sein. Die verstärkte CXCL12-induzierte Transmigration war bei C57Bl/6- und Balb/c-T-Zellen gleichermaßen zu beobachten (**Abbildung 21A**). Weiterhin war die vermehrte

Migration nach Dex-Behandlung bei GR^{dim}-Tieren ebenfalls stammunabhängig. Die CCL19-induzierte Transmigration ließ sich hingegen erstaunlicherweise bei Balb/c T-Zellen durch Dex nicht reprimieren (**Abbildung 21B**).

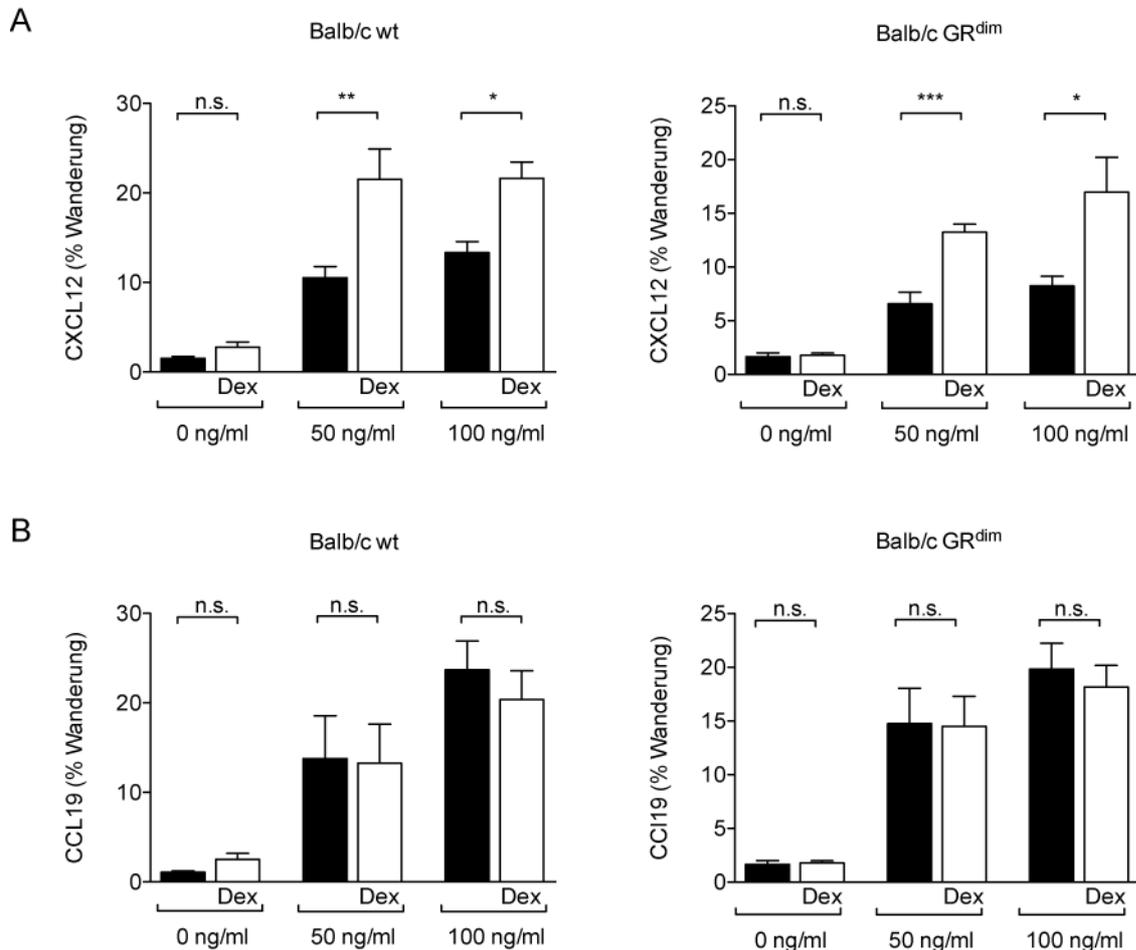


Abbildung 22: Die CXCL12-induzierte nicht aber die CCL19-induzierte Transmigration wird auch bei Balb/c-wt- und GR^{dim}-T-Zellen durch Dex moduliert.

T-Zellen wurden aus den Lymphknoten und der Milz von Balb/c-wt- und GR^{dim}-Mäusen isoliert und 3 h unter serumfreien Konditionen kultiviert. Die Hälfte der Zellen wurde zusätzlich mit Dex (10⁻⁷ M) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für einen Transmigrations-Assay verwendet. Dargestellt ist die relative Zahl der gewanderten Zellen ausgehend von 10⁶ eingesetzten T-Zellen pro Loch gegen reines Medium (Willkürwanderung) oder einen Gradient von 50 ng/ml oder 100 ng/ml **A** CXCL12 oder **B** CCL19. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. N = 2 - 4 gepoolt aus 3 unabhängigen Experimenten (in Quadruplikaten gemessen). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. P-Werte über 0.05 wurden als nicht signifikant bewertet. Signifikante Unterschiede sind mit * (p < 0.05), ** (p < 0.01) oder *** (p < 0.001) gekennzeichnet.

3.2.2.5 Separate Analyse der Transmigration einzelner T-Zellpopulationen.

In allen bisherigen Experimenten waren bei der Migration durch die Transwell-Membranen alle T-Zellen aus den sekundären lymphatischen Organen eingesetzt worden. Hierbei wurde nicht unterschieden, ob es sich um CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen bzw. um Effektor- oder Gedächtnis-T-Zellen handelte. Aus diesem Grund wurde im folgenden Experiment eine solche Unterscheidung vorgenommen (**Abbildung 22**).

Die CCL19-induzierte Transmigration war bei den CD4⁺-T-Zellen am stärksten ausgeprägt. Auch die Hemmung der CCL19-induzierten Transmigration durch Dex war bei den CD4⁺-T-Zellen am deutlichsten. Die Anreicherung der CD4⁺CD44⁺ Effektor T-Zellen innerhalb der gewanderten Fraktion wurde durch Dex ebenfalls deutlich gehemmt.

Die CXCL12-induzierte Transmigration wurde sowohl bei den CD4⁺ als auch bei den CD8⁺-T-Zellen beobachtet. Die Verstärkung der CXCL12-induzierten Migration nach Dex-Applikation war bei allen analysierten Populationen deutlich zu beobachten. Die Anreicherung der Effektor T-Zellen bei CXCL12 ohne Inkubation mit Dex war auf dem Niveau der Willkürwanderung. Dies legt nahe, dass die Effektor Memory T-Zellen erst nach Inkubation mit Dex eine spezifische CXCL12-induzierte Transmigration zeigen.

Bei der CXCL10-induzierten Transmigration zeigten CD4⁺CD44⁺ Effektor Memory T-Zellen die größte Anreicherung. Diese wurde durch Dex negativ beeinflusst. Die CXCL10-induzierte Transmigration der übrigen T-Zell-Populationen konnte eine Willkürwanderung nicht übertreffen, daher waren Aussagen über eine Beeinflussung durch GCs schwer zu treffen.

Insgesamt war die Verstärkung der CXCL12-induzierten Transmigration sowie die Hemmung der CCL19-induzierten Transmigration durch Dex bei CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen gleichermaßen vorhanden. Erstaunlicherweise waren die Effekte von Dex auf die Transmigration der CD4⁺CD44⁺ Effektor/Memory T-Zellen mit den anderen Populationen vergleichbar.

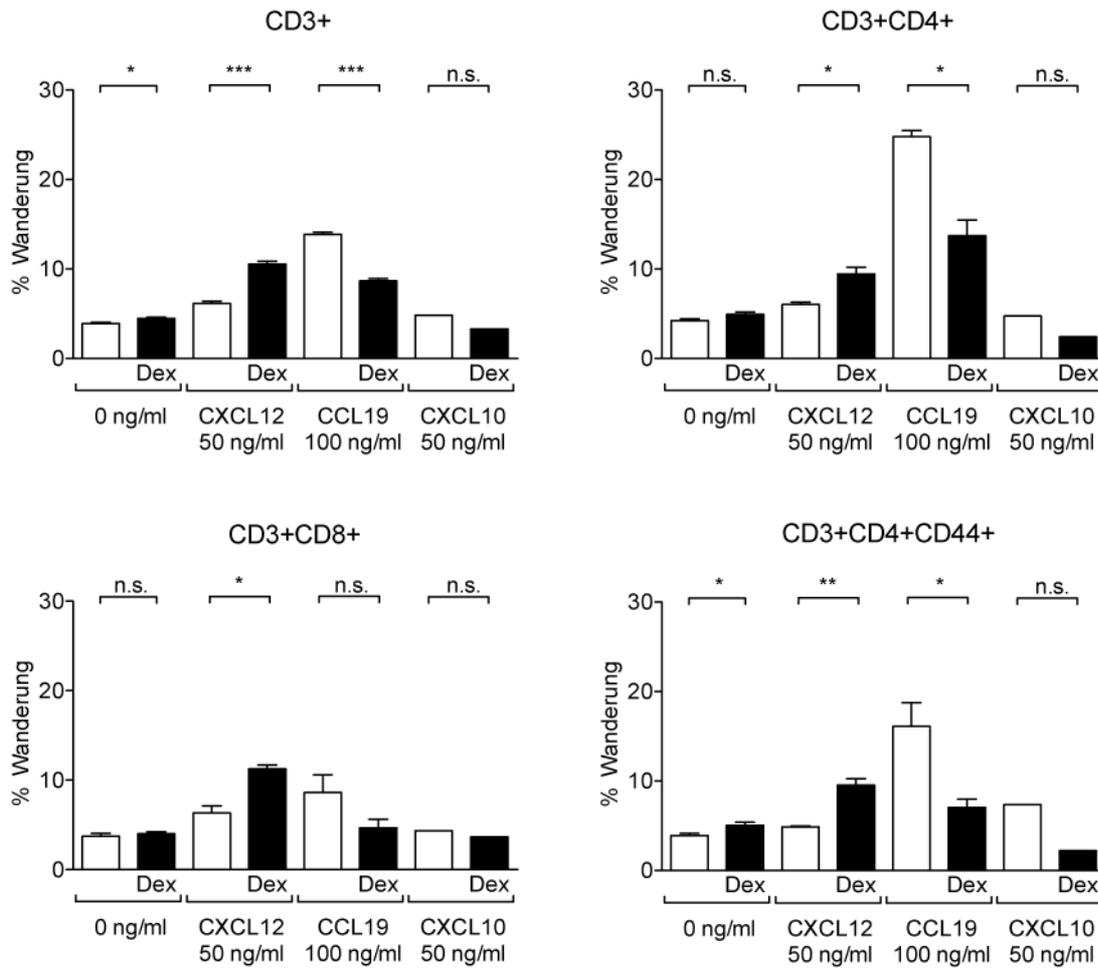


Abbildung 23: Die Analyse der migrierten Population zeigt einen vergleichbaren Effekt von Dex auf die Transmigration von CD4+, CD8+ sowie Effektor/Memory-T-Zellen.

T-Zellen wurden aus den Lymphknoten und der Milz von C57Bl/6-wt-Mäusen isoliert und 3 h unter serumfreien Konditionen kultiviert. Die Hälfte der Zellen wurde zusätzlich mit Dex (10^{-7} M) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für einen Transmigrations-Assay verwendet und die relative Zahl der gewanderten Zellen ohne Chemokin (Willkürwanderung) oder gegen einen Gradienten von 50 ng/ml und 100 ng/ml CXCL12, CCL19 und CXCL10 bestimmt. Die Ausgangspopulation und die gewanderten Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD3, CD4, CD8 und CD44 gefärbt. Dargestellt ist das Anreicherungsverhältnis der Fraktionen von CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ und CD3⁺CD44⁺ Zellen innerhalb der gewanderten Zellen im Vergleich zur Ausgangspopulation. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. N = 3 gepoolt aus 3 unabhängigen Experimenten (in Duplikaten gemessen). Außer bei CXCL10 N=1 daher kein t-Test. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. P-Werte über 0.05 wurden als nicht signifikant bewertet. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) oder *** ($p < 0.001$) gekennzeichnet.

3.2.2.6 Wanderungsverhalten aktivierter T-Zellen

Sowohl Effektor als auch Bystander T-Zellen spielen eine wichtige Rolle für die Pathogenese der EAE. Die bislang erzielten Ergebnisse hatten gezeigt, dass die CXCL12- und CCL19-induzierte Transmigration und der verstärkende beziehungsweise hemmende Effekt von Dex bei naiven wie auch CD4⁺ CD44⁺ Effektor Memory T-Zellen beobachtet werden kann. Unklar war jedoch, ob diese Effekte auch für akut aktivierte T-Zellen gelten.

Nach Co-Stimulation mit spezifischen Antikörpern gegen CD3 und CD28 zeigten T-Zellen generell eine höhere Oberflächenexpression von Chemokinrezeptoren als nach Aktivierung mit ConA (Daten nicht gezeigt). Die Präinkubation mit Dex für 3 oder 5 Stunden bewirkte keinem Unterschied hinsichtlich der Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR7. Die Expression von CXCR3 war nach 5 Stunden Inkubation mit Dex hingegen signifikant vermindert (**Abbildung 23A**).

Die Transmigration der mit Dex präinkubierten T-Zellen gegen einen Gradienten von CXCL12, CCL19 und CXCL10 war mit der von unbehandelten T-Zellen identisch. Die Transmigration war interessanterweise insgesamt jedoch etwas stärker als bei naiven T-Zellen. Bei CXCL10 wurde durch Dex-Behandlung keine nennenswert verstärkte Migration erzielt, wobei die die Migration gegenüber CXCL10 etwas höher war als die der naiven unstimulierten T-Zellen (**Abbildung 23B**).

Die zuvor beobachtete ausgeprägte Modulation der Transmigration von CD4⁺CD44⁺ Effektor Memory T-Zellen durch Dex konnte somit durch die Aktivierung von T-Zellen mittels Co-Stimulation nicht rekapituliert werden.

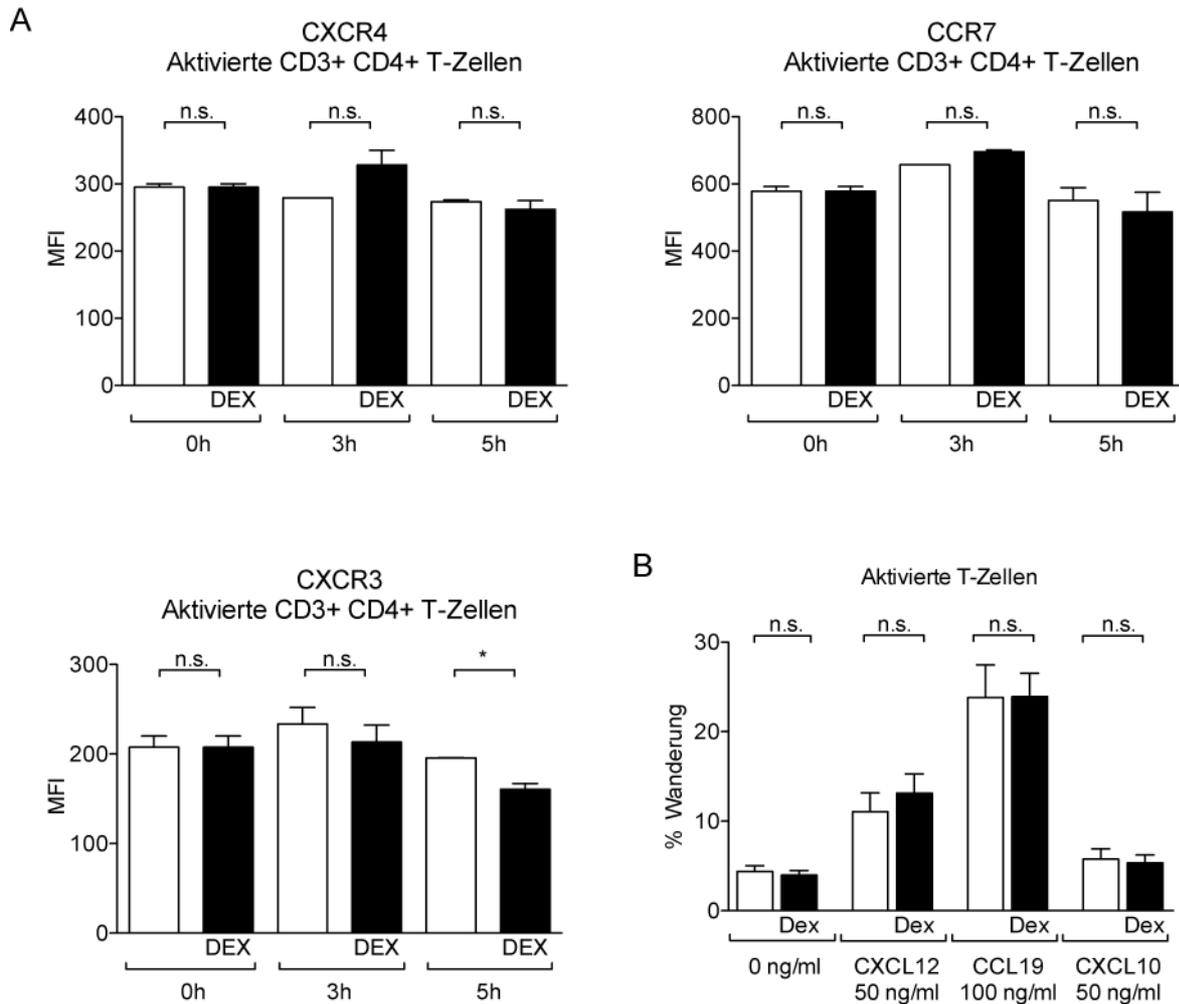


Abbildung 24: Die Behandlung mit Dex von *in vitro* aktivierten T-Zellen hat keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression von Chemokinrezeptoren sowie die Transmigration.

Lymphozyten wurden aus den Lymphknoten und der Milz von C57Bl/6-wt-Mäusen isoliert und 3 Tage mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper stimuliert. Danach wurden die T-Zellen isoliert und 3 h unter serumfreien Konditionen kultiviert. Die Hälfte der Zellen wurde zusätzlich mit Dex (10^{-7} M) inkubiert. **A** Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD3, CD4, CD44, CXCR4, CCR7 und CXCR3 gefärbt. Dargestellt ist die MFI der Chemokinrezeptoren bezogen auf die CD3⁺CD4⁺-T-Zellen 3 h und 5 h nach Inkulturnahme (n=3). **B** Die co-stimulierten T-Zellen wurden wie in A beschrieben für 3 h unter serumfreien Konditionen mit bzw. ohne Dex (Dex 10^{-7} M) inkubiert und anschließend ein Transmigrations-Assay durchgeführt. Das Wanderungsverhalten wurde mittels FACS-Analyse quantifiziert. Die Wanderung von 10^6 eingesetzten T-Zellen/Loch erfolgte gegen reines Medium (Willkürwanderung), 50 ng/ml CXCL12, 100 ng/ml CCL19 und 50 ng/ml CXCL10. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. N = 2-3 (in Dupletts: Chemokinrezeptoren, Quadruplikaten: Transmigration). Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. P-Werte über 0.05 wurden als nicht signifikant bewertet. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0.05$) gekennzeichnet.

3.2.3 Untersuchung der Relevanz der *in vitro* beobachteten Effekte auf die T-Zell-Migration in der Therapie der EAE mit Dex

Die *In vitro*-Analysen hatten gezeigt, dass GCs vielfältige Wirkungen auf die Transmigration von T-Zellen ausüben. Im Folgenden sollte nun der Frage nachgegangen werden, welche Relevanz dieser Effekte möglicherweise für die Therapie einer EAE mit Dex *in vivo* besitzen. Lymphozyten benötigen Chemokine zwar hauptsächlich bei der homöostatischen Wanderung hin zu sekundären lymphatischen Organen, jedoch wurde gezeigt, dass sowohl Ccl19 als auch CXCL12 für die Entwicklung der EAE entscheidend sind (Kuwabara et al. 2009; Meiron et al. 2008). Hieraus wurde geschlossen, dass die Beeinflussung der homöostatischen Migration eine Rolle für die Therapierbarkeit der EAE mit Dex spielen könnte.

3.2.3.1 Rolle der CCR7 – CCL19-Migrationsachse für den Verlauf einer EAE

3.2.3.1.1 Eine alleinige CCR7-Antikörper-Behandlung hat keinen Einfluss auf die EAE.

Es hatte sich gezeigt, dass Dex die CCL19-induzierte Transmigration *in vitro* hemmt. Daher sollte eine Blockade des CCR7-Rezeptors durch einen spezifischen Antikörper einen ähnlichen Effekt auf eine Therapie einer EAE wie die alleinige Gabe von Dex haben, insofern die Modulation der CCR7-CCL19-Achse durch Gcs überhaupt einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf hat.

Die therapeutische i.v.-Applikation eines CCR7-Antikörpers hatte keine Wirkung auf den Verlauf einer EAE. Die mit CCR7-Antikörpern behandelten Mäuse unterschieden sich von den mit PBS i.v. behandelten Kontrolltieren nicht (**Abbildung 24A**). Die Repression der CCL19-vermittelten Migration von T-Zellen scheint somit für die Behandelbarkeit einer EAE mit Dex keine Rolle zu spielen.

3.2.3.1.2 Beeinflussung der CCL19-induzierten T-Zellmigration *in vitro* durch i.v.-Applikation des CCR7-spezifischen Antikörpers *in vivo*

Nachdem die i.v.-Applikation des CCR7-spezifischen Antikörpers entgegen der Erwartung keinen therapeutischen Effekt auf die EAE hatte, sollte überprüft werden, ob die applizierte Menge an Antikörper ausreichend war, die Transmigration von T-Zellen zu hemmen. Hierzu wurden aus mit CCR7-Antikörper behandelten Tieren T-

Zellen isoliert und in einem Transmigrations-Assay *in vitro* untersucht. Die Migration gegen einen Gradienten von CCL19 *in vitro* wurde durch die *In vivo*-Applikation des Antikörpers erfolgreich vermindert (**Abbildung 24B**). Somit war die eingesetzte Menge an Antikörper ausreichend, um einen physiologischen Effekt zu erzielen.

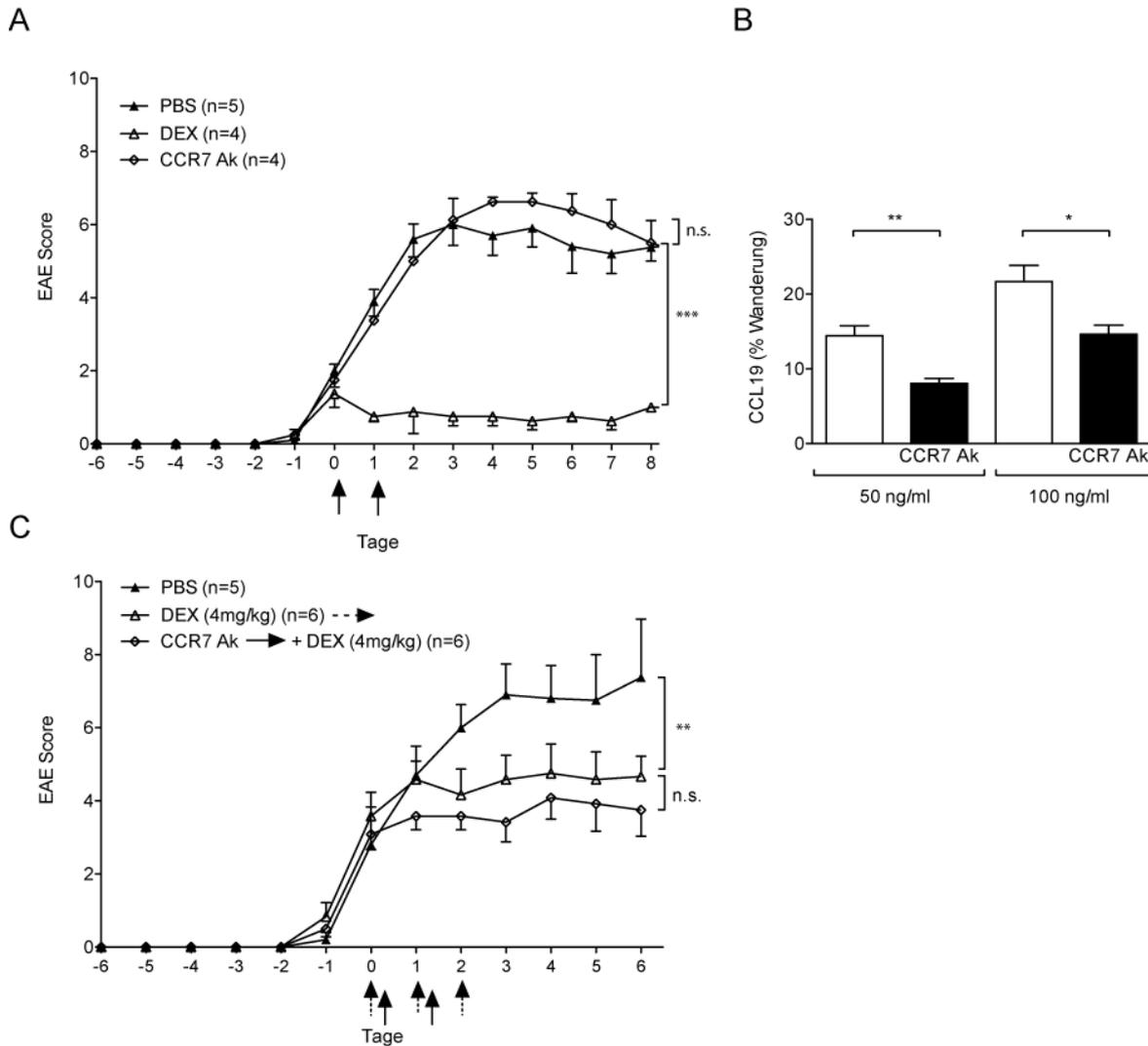


Abbildung 25: Die alleinige Therapie mit CCR7-Antikörper hat keinen Einfluss auf die EAE von C57Bl/6-Mäusen, verstärkt aber den Behandlungseffekt einer niedrigen Dosis von Dex

A C57Bl/6-wt-Mäuse wurden mit MOG₃₅₋₅₅ immunisiert und bei einem durchschnittlichen EAE-Score von 2 (Tag = 0) i.v. mit PBS, Dex (100 mg/kg) oder anti-CCR7 AK (100 µg) behandelt. Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test gefolgt von Dunn's Multiple Comparison von Tag 1 - Tag 6. N = 4 - 5. **B** T-Zellen wurden aus den Lymphknoten und der Milz von 24 h zuvor mit anti-CCR7 AK i.v. (100 µg) und PBS i.v. behandelten C57Bl/6-wt-Mäusen isoliert und 3 h unter serumfreien Konditionen kultiviert. Dargestellt ist die Quantifizierung der durchflusszytometrischen Analyse der Transwell-Wanderung von 10⁶ eingesetzten T-Zellen/Loch gegen reines Medium (Willkürwanderung) und CCL19 (100 ng/ml). Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. N = 2 (in Duplikaten gemessen). **C** C57Bl/6-wt-Mäuse wurden mit MOG₃₅₋₅₅ immunisiert und bei einem durchschnittlichen EAE-Score von 2 (Tag = 0) i.p. mit PBS, Dex (4 mg/kg) oder mit anti-CCR7 AK in Kombination mit Dex (4 mg/kg) behandelt. Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test gefolgt von Dunn's Multiple Comparison von Tag 1 - Tag 6. N = 5 - 6. Die Ergebnisse sind aus zwei unabhängigen Experimenten gepoolt und als Mittelwert ± SEM dargestellt. P-Werte über 0.05 wurden als nicht signifikant bewertet. Signifikante Unterschiede sind mit * (p<0.05) oder ** (p<0.01) gekennzeichnet.

3.2.3.1.3 Eine Therapie mit CCR7-spezifischen Antikörpern verstärkt die therapeutische Wirkung von Dex.

Da die CCL19-induzierte Wanderung *in vitro* durch Dex reprimiert wurde, wäre auch ein zusätzlicher Effekt einer anti-CCR7-Therapie auf die Behandlung mit Dex denkbar. Um einen eventuell verstärkenden Effekt durch die zusätzliche Gabe von CCR7-Antikörpern besser zeigen zu können, wurde eine niedrige Dosis von 4 mg/kg Dex gewählt. Bei dieser Dosis ist, wie in **Abbildung 24C** zu sehen, noch immer ein Behandlungseffekt durch Dex vorhanden. Durch zusätzliche Gabe von CCR7-Antikörpern wurde der Behandlungserfolg von Dex nicht signifikant verstärkt, jedoch konnte eine Tendenz beobachtet werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Beeinflussung der CCR7-induzierten Wanderung zur Effizienz einer Therapie mit Dex beitragen könnte, diese aber nicht alleine erklärt.

3.2.3.2 Die Verstärkung der CXCL12-induzierten Wanderung von T-Zellen im Kontext einer Dex-Therapie der EAE.

T-Zellen zeigen *in vitro* nach Behandlung mit Dex eine verstärkte CXCL12-induzierte Transmigration. Zur Untersuchung der Relevanz dieses Phänomens sollte AMD3100 (Plerixafor), ein Inhibitor gegen CXCR4, eingesetzt werden. Plerixafor wird gegenwärtig in der Klinik zur Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark eingesetzt (DiPersio et al. 2009) und galt lange Zeit als potenzielle Wunderwaffe gegen HIV (Flexner 2007).

3.2.3.2.1 Die Blockade von CXCR4 durch AMD3100 verringert den Therapieeffekt von Dex auf die Behandlung von EAE signifikant

Sollte die durch Dex verstärkte CXCL12-induzierte Transmigration im Kontext einer Therapie von EAE *in vivo* von Relevanz sein, so sollte die Blockade des Rezeptors CXCR4 einen negativen Einfluss auf die Therapierbarkeit der Erkrankung durch GCs haben.

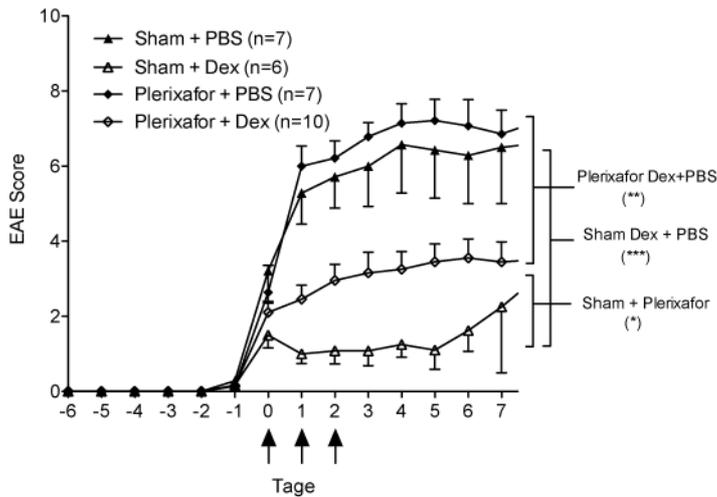
Zunächst beobachteten wir, dass die Inzidenz der EAE bei der mit AMD3100 behandelten Gruppe insgesamt etwas höher war (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus wiesen die mit PBS behandelten Tiere unter AMD3100 einen etwas stärkeren Krankheitsverlauf auf als die mit PBS behandelten Kontrolltiere. Entscheidend war jedoch die Beobachtung, dass AMD3100 die Therapierbarkeit mit Dex beeinflusste.

Der mittlere Behandlungserfolg durch Dex alleine lag bei einem Score von 1 und wurde durch AMD3100 auf 3,5 angehoben. Die Kontrolltiere schwankten um den Score von 6, wobei der Mittelwert der Kontrolltiere mit AMD3100 marginal über dem der Kontrollgruppe lag, welche nur PBS erhalten hat (**Abbildung 25A**). Dies konnte in zwei unabhängigen Experimenten reproduziert werden.

3.2.3.2.2 *In vitro*-Nachweis der Hemmung der CXCL12-induzierten Migration durch AMD3100

Um den Effekt von AMD3100 auf eine CXCL12-induzierte Migration *in vitro* zu testen, wurde ein Transmigrations-Assay in Gegenwart von 50 nM AMD3100 durchgeführt. Der CXCR4-Inhibitor funktionierte sehr effizient, sowohl bei T-Zellen die unbehandelt waren als auch bei denen, die mit Dex behandelt waren. So konnte weder eine CXCL12-induzierte Wanderung, noch eine zu erwartende Verstärkung durch Dex gemessen werden (**Abbildung 25B**).

A



B

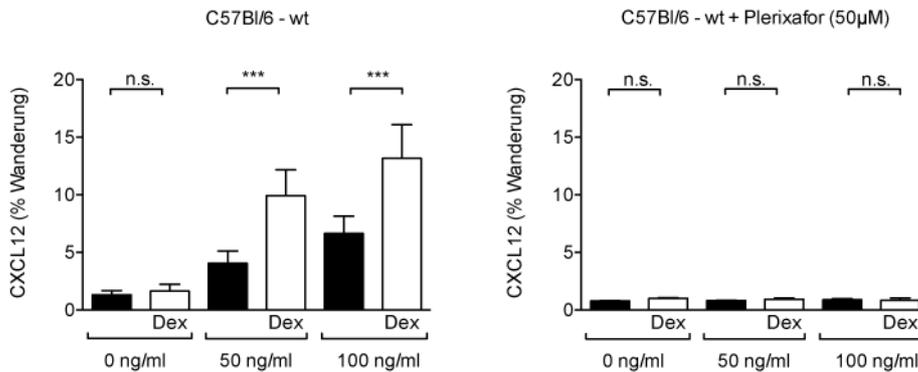


Abbildung 26: Die Blockade von CXCR4 durch AMD3100 verringert den Therapieeffekt von Dex in der Behandlung einer EAE.

A C57Bl/6-wt-Mäuse wurden mit MOG₃₅₋₅₅ immunisiert und an Tag 8 in zwei Gruppen aufgeteilt. Die eine Gruppe erhielt eine Scheinoperation (Sham), der anderen wurden Alzet-Pumpen s.c. implantiert, die gleichmäßig AMD3100 (4 mg/kg/d) abgeben. Danach wurden beide Gruppen bei einem durchschnittlichen EAE-Score von 2 (Tag = 0) i.p. mit PBS oder Dex (100 mg/kg) behandelt. Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test gefolgt von Dunn's Multiple Comparison von Tag 1 - Tag 7. N = 6 - 10 Daten gepoolt aus zwei unabhängigen Experimenten. **B** T-Zellen wurden aus den Lymphknoten und der Milz von C57Bl/6-wt-Mäusen isoliert und 3 h unter Serum-freien Konditionen kultiviert. Die Hälfte der Zellen wurde zusätzlich mit Dex (10^{-7} M) und AMD3100 (50 μ M) inkubiert. Dargestellt ist die Quantifizierung der Transwell-Wanderung von 10^6 eingesetzten T-Zellen/Loch gegen reines Medium (Willkür-wanderung) und CXCL12 (50 ng/ml). Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. N = 2 (in Duplikaten gemessen). Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. P-Werte über 0.05 wurden als nicht signifikant bewertet. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) oder *** ($p < 0.001$) gekennzeichnet.

3.2.3.2.3 Immunhistochemische Analyse von EAE-Tieren die mit AMD3100 und Dex behandelt wurden

Bei einem der beiden vorherigen Experimente wurden die Tiere an Tag 8 nach den ersten Symptomen der EAE getötet, und deren Rückenmark zur histologischen Analyse genutzt. Dabei sollten die T-Zellinfiltrate näher analysiert werden, welche mit einer immunhistochemischen CD3-Färbung dargestellt wurden. Es war zu sehen, dass sich bei PBS-behandelten Tieren abgegrenzte Läsionen in der weißen Substanz über verschiedene Segmente hinweg zeigten. Die Läsionen waren dicht an den Hirnhäuten angesiedelt, wo auch die Gefäßversorgung des Rückenmarkes zu finden ist (**Abbildung 26A**).

Die alleinige Behandlung der EAE mit AMD3100 bewirkte eine Auflösung der klaren Abgrenzbarkeit der Läsionen. Es waren nur noch vereinzelt kleine aufgelockerte Infiltrate auszumachen. Außerdem befanden sich CD3+-Zellen nicht nur im Bereich der weißen Substanz, sondern waren auch in der grauen Substanz wiederzufinden. Dieses Phänomen ist für die chronische EAE der C57Bl/6-Mäuse untypisch und könnte den etwas stärkeren Verlauf der Klinik der EAE der AMD3100 behandelten Mäuse widerspiegeln (**Abbildung 26B**).

Eine Behandlung mit Dex alleine bewirkte eine klare Reduktion der Läsionslast im Bereich des Rückenmarkes. Histologisch war dies durch das weitgehende Fehlen von CD3+ Infiltraten gekennzeichnet (**Abbildung 26C**).

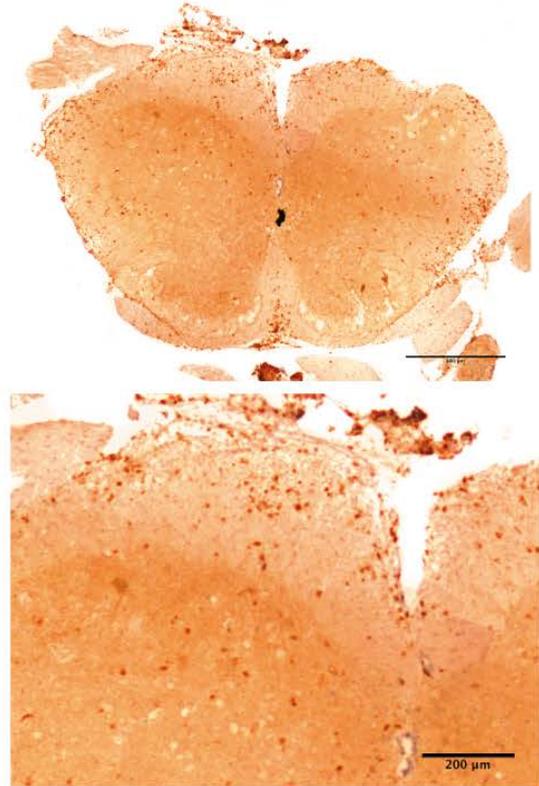
Bei gleichzeitiger Applikation von AMD3100 und Dex zusammen konnten Infiltrate identifiziert werden, die jedoch wieder über die graue Substanz hinweg verteilt waren. In der weißen Substanz wirkten die CD3+-Zellen sehr an den Rand gedrängt. Die Meningen färbten sich ebenfalls stark an, jedoch wirkten die Läsionen immer noch aufgelockerter als bei der EAE der Kontrolltiere (**Abbildung 26D**).

Zusammenfassend ergibt sich in der Immunhistochemie ein zu den klinischen Symptomen der EAE konsistentes Bild.

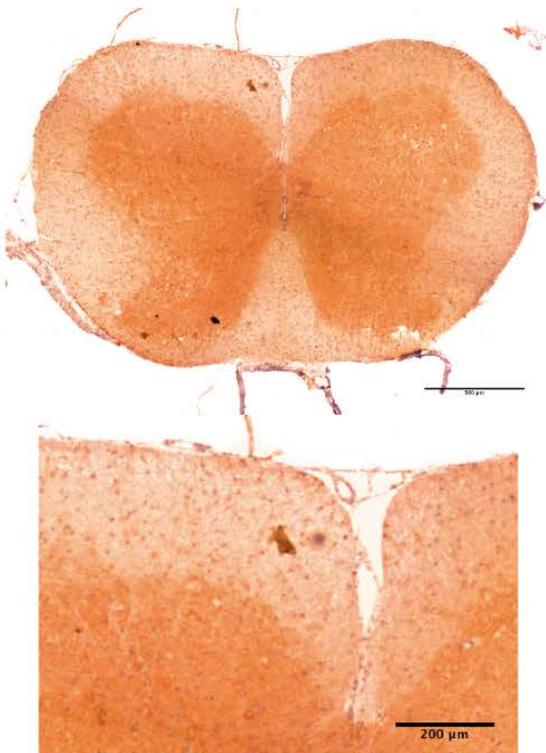
PBS



PBS und AMD3100 (Plerixafor)



Dexamethason



Dexamethason und AMD3100 (Plerixafor)



Abbildung 27: Immunhistochemische Analyse der CD3+-Zellen im Rückenmark von EAE-erkrankten Tieren die mit AMD3100 und Dex behandelt wurden.

C57Bl/6-wt-Mäuse wurden mit MOG₃₅₋₅₅ immunisiert und wie in Abbildung 25A mit Alzet-Pumpen implantiert sowie mit PBS oder Dex behandelt. An Tag 8 nach Auftreten der ersten EAE-Symptome wurden die Tiere getötet und das Rückenmark zur immunhistochemischen Färbung von CD3+-Zellen eingesetzt. Die Übersichtsaufnahmen sind mit einem 4x und die Vergrößerung mit einem 20x Objektiv eines Durchlichtmikroskops aufgenommen worden. Der Balken zeigt eine Länge von 500 µm in der Übersichtsaufnahme und 200 µm in der Vergrößerungsaufnahme. Es wurde ein repräsentatives Bild für jede Gruppe (n = 4-6) gezeigt.

3.2.3.2.4 Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Um zu einer objektiveren Beurteilung der immunhistochemischen Analysen der EAE-Tiere unter AMD3100 und Dex-Therapie zu gelangen, wurden die T-Zellinfiltrate digital ausgewertet und quantifiziert.

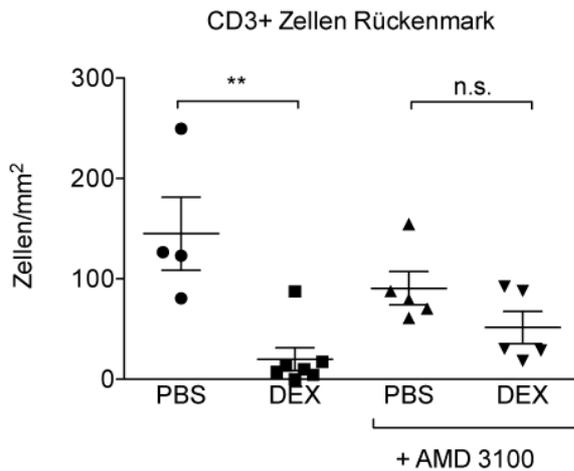
Die Anzahl der T-Zellen war nach alleiniger Dex-Behandlung im Vergleich zu der PBS-Kontrollbehandlung drastisch niedriger. Bei der zusätzlich mit AMD3100 behandelten Gruppe ließ sich ebenfalls eine Verringerung der T-Zellinfiltrate nach Dex-Applikation darstellen. Dieser Effekt fiel jedoch deutlich geringer aus als in der Kontrollgruppe (**Abbildung 27A**).

Bei gezielter Betrachtung der weißen Substanz war zu sehen, dass die Zellzahl bei der Kontrollgruppe durch die alleinige Gabe von Dex ebenfalls vermindert war. Der Effekt der solitären AMD3100-Applikation war im Vergleich zur Kombination mit Dex in der weißen Substanz geringer als bei Betrachtung des gesamten Querschnittes des Rückenmarks (**Abbildung 27B**).

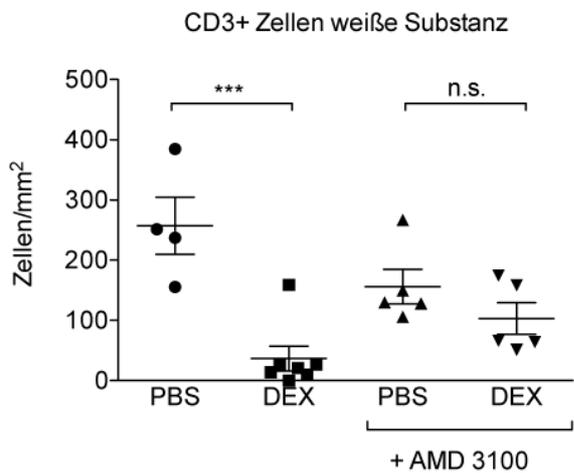
In der grauen Substanz waren bei der Kontrollgruppe und der mit Dex behandelten Gruppe zunächst kaum Infiltrate zu sehen. Die Applikation von AMD3100 zeigt eine Dissoziation der Läsion und somit auch in der digitalen Auswertung einen klaren Anstieg der T-Zellinfiltrate in der grauen Substanz. Die Infiltration der grauen Substanz wurde durch die Kombination von Dex und AMD3100 erstaunlicherweise deutlich verringert (**Abbildung 27C**).

Die histologische Betrachtung der EAE, die mit AMD3100 und Dex behandelt wurde, liefert eine zusätzliche Erklärung für den Verlauf der klinischen EAE-Symptome. AMD3100 alleine verursachte eine Dissoziation der normalerweise klar abzugrenzenden Läsionen, bei der die T-Zellen sich sogar über die graue Substanz hinweg verteilten. Die Infiltration wird durch AMD3100 nicht erhöht und die zusätzliche Gabe von Dex konnte die Infiltrate nicht deutlich verringern.

A



B



C

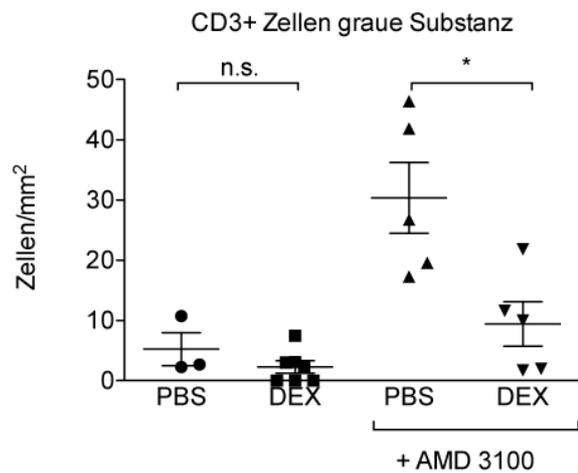


Abbildung 28: Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Analyse von EAE-Tieren die mit Dex und AMD 3100 behandelt wurden.

Quantifizierung der immunhistochemischen Analyse CD3+ Zellen in Abbildung 26. Die Bilder wurden mit ImageJ ausgewertet wobei die gezählten Zellen in Relation zur gemessenen Fläche gebracht wurden. Dargestellt ist das Verhältnis der T-Zellinfiltrate pro mm² zum Gesamtquerschnitt (A), der weißen Substanz (B) bzw. der grauen Substanz (C) des Rückenmarkes. N = 4 - 6. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. P-Werte über 0.05 wurden als nicht signifikant bewertet. Signifikante Unterschiede sind mit * (p<0.05), ** (p<0.01) oder *** (p<0.001) gekennzeichnet.

3.2.4 Die CXCL12-induzierte Migration humaner T-Zellen *in vitro* wird durch Dex verstärkt

Die Beobachtungen, dass die Verstärkung der CXCL12-induzierten Migration durch Dex sowohl *in vitro* eine Rolle spielt als auch *in vivo* relevant zu sein scheint, führte zur Hypothese, dass ähnliche Mechanismen auch bei der Behandlung von MS in der Klinik von Bedeutung sein sollten. Im ersten Schritt wurden daher die *In vitro*-Transmigrationsexperimente mit humanen Zellen wiederholt.

Humane T-Zellen wiesen im Vergleich zur Maus eine stärker ausgeprägte CXCL12-induzierte Transmigration auf. Eine CCL19-induzierte Transmigration wurde nicht beobachtet. Die Ursache hierfür ist gegenwärtig unklar. Insgesamt lag die CXCL12-induzierte mittlere Transmigrationsrate bei etwa 50 % bezogen auf die eingesetzte Gesamtpopulation. Eine Verstärkung der Wanderung durch Dex war dennoch zu beobachten. Ebenfalls war die Willkürmigration der humanen T-Zellen allgemein etwas ausgeprägter (**Abbildung 28A**).

Die erzielten Ergebnisse belegen, dass humane T-Zellen in ähnlicher Weise wie murine T-Zellen eine starke CXCL12-induzierte Transmigration, sowie einen deutlich verstärkenden Effekt durch die Applikation von Dex *in vitro* aufweisen.

3.2.5 Die CXCL12-induzierte Migration von T-Zellen von MS-Patienten ist nach einer Methylprednisolon-Therapie ebenfalls verstärkt

Zuletzt sollte das Konzept, dass die CXCL12-CXCR4-Achse für die Therapie neuroinflammatorischer Erkrankungen von Bedeutung ist, anhand von MS-Patienten unter Methylprednisolon (MP)-Therapie überprüft werden. Patienten mit schubförmigem oder primär progredientem Krankheitsverlauf werden üblicherweise mit einer hohen Dosis von MP therapiert. Wir postulierten nun, dass es am Tag nach der Gabe von MP zu einer verstärkten CXCL12-vermittelten T-Zellwanderung kommen sollte, was den positiven Effekt der Therapie auf die Krankheitssymptome zumindest teilweise erklären könnte.

MS-Patienten verschiedener Altersgruppen und Krankheitsverläufe wurden vor und 24 Stunden nach Gabe von MP (Details siehe Tabelle 7) 20 ml Blut abgenommen, um daraus T-Zellen für einen *In vitro*-Transmigrations-Assay zu isolieren. Die CXCL12-induzierte Transmigration der frisch isolierten T-Zellen vor der Gabe von MP konnte gemessen werden, war aber etwas geringer ausgeprägt als bei Verwendung von humanen T-Zellen die aus den Spender-Buffy-Coats gewonnen wurden (siehe Abbildung 28A). Eine mögliche Erklärung ist, dass die T-Zellen der MS-Patienten direkt nach Isolation aus dem Blut für die Analyse der Transmigration verwandt wurden, ohne dass eine vorherige 3 Stunden-*In vitro*-Inkubation unter serumfreien Bedingungen stattgefunden hat. Dadurch fehlt der schon beschriebene „Hunger“-Effekt, der normalerweise mit einer Inkretion von Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche einhergeht.

Die Migrationsanalysen 24 h nach der MP-Stoßtherapie der MS-Patienten belegt, dass es in jedem getesteten Patient zu einer verstärkten CXCL12-induzierte Transmigration kam (**Abbildung 28B**). Die Darstellung der Verläufe der einzelnen Patienten spiegelt die Heterogenität der Patienten wider, aber verdeutlicht auch die Kontinuität des verstärkenden Effektes von MP auf die CXCL-12-induzierte Transmigration der T-Zellen (**Abbildung 28C**).

Um die Allgemeingültigkeit des neuen Wirkmechanismus zu bestimmen, wurden Patienten mit unterschiedlichen MS-Diagnosen in die Studie zur Analyse der CXCL12-induzierten Transmigration eingeschlossen. Ordnet man die Patienten nach ihrer MS-Diagnose, so sieht man, dass die Patienten mit einer RRMS den deutlichsten Anstieg in der CXCL12-induzierten Transmigration der T-Zellen hatten. Bei Patienten aus der Gruppe der PPMS sowie Kindern mit einer RRMS war ein geringer ausgeprägter Anstieg zu verzeichnen. Etwaige Rückschlüsse auf deren Erkrankung lässt die kleine Studienpopulation bislang jedoch nicht zu. Auch der Nutzen der MP-Stoßtherapie für jeden einzelnen Patienten ließ sich in der vorliegenden Studie nicht verifizieren. Im Allgemeinen ist jedoch bekannt, dass RRMS-Patienten eher von einer MP-Therapie profitieren als Patienten mit PPMS oder die pädiatrischen RRMS-Patienten (**Abbildung 28D**). Ein Patient aus der Gruppe der RRMS fällt aus der Reihe, da er nicht wegen eines Schubes in der Klinik war. Er stand an der Schwelle zur Diagnose einer SPMS. **Tabelle 7** gibt einen Überblick über die Charakteristika der einzelnen in die Studie eingeschlossenen Patienten.

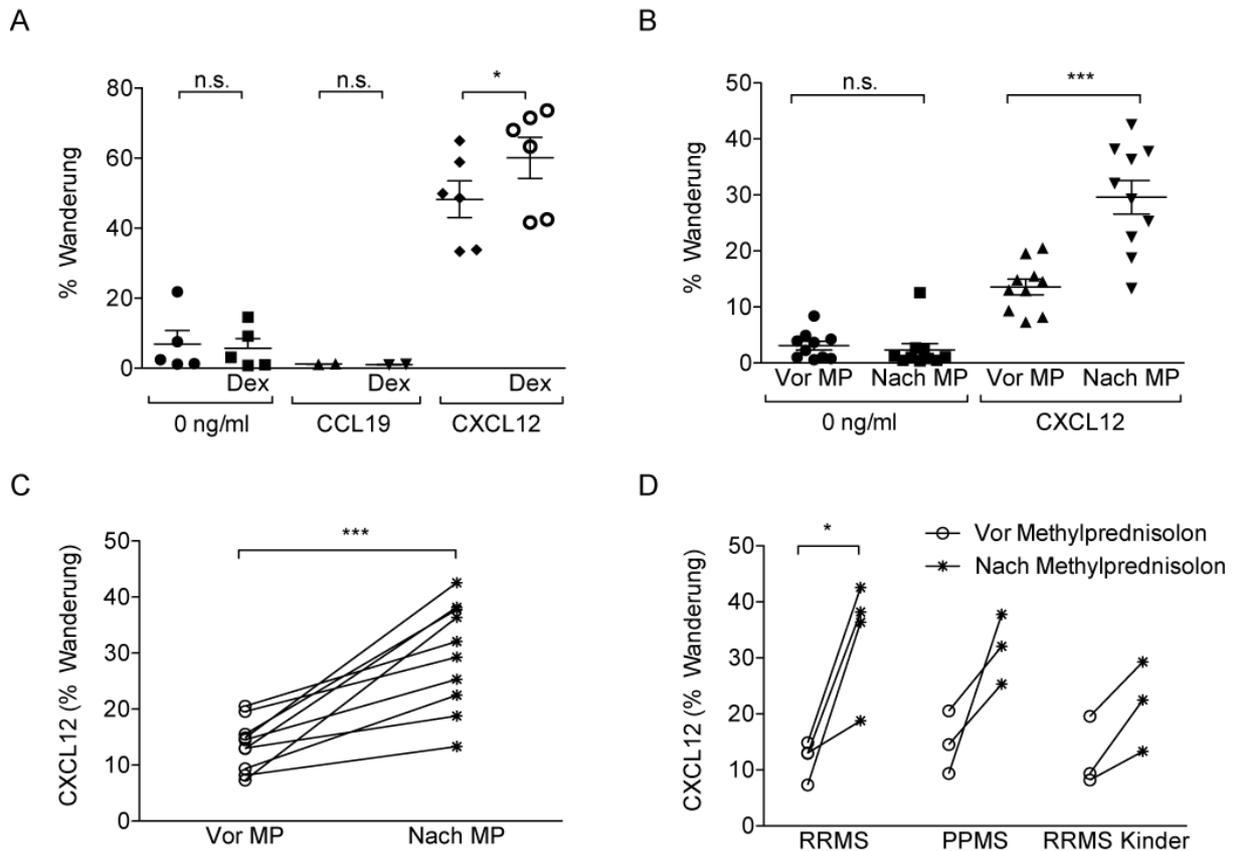


Abbildung 29: *In vitro* mit Dex behandelte humane T-Zellen sowie T-Zellen von MS-Patienten nach MP-Stoßtherapie zeigen eine verstärkte CXCL12-induzierte Transmigration.

A Humane T-Zellen wurden aus Spender-Buffy-Coats isoliert und 3 h unter serumfreien Konditionen kultiviert. Die Hälfte der Zellen wurde zusätzlich mit Dex (10^{-7} M) inkubiert. Dargestellt ist die Quantifizierung der Transwell-Wanderung von 10^6 eingesetzten T-Zellen/Loch gegen reines Medium (Willkürwanderung), humanes CXCL12 (50 ng/ml) und humanes CCL19 (100 ng/ml). Jeder Punkt repräsentiert einen einzelnen Spender. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. N = 2 - 5. Die Ergebnisse wurden aus unabhängigen Experimenten gepoolt und sind in Quadruplikaten gemessen. **B** MS-Patienten wurden vor und 24 h nach einer MP-Stoßtherapie Blut abgenommen. Aus dem Blut wurden T-Zellen isoliert und $2 \cdot 10^5$ bis 10^6 Zellen für die Wanderung gegen humanes CXCL12 (50 ng/ml) eingesetzt. Als Kontrolle diente die Wanderung gegen Medium. Jeder Punkt repräsentiert einen Patienten. **C** Um den individuellen Verlauf darzustellen wurden die Transmigration vor und nach MP Therapie miteinander jedes einzelnen Patienten longitudinal verglichen. RRMS: n = 4, PPMS: n = 3, RRMS: Kinder n = 3. **D** Klassifizierung der Patienten nach der Art ihrer MS bzw. ihrem Alter. N = 10 Patienten. Alle Daten stammen aus unabhängigen Experimenten, Die statistischen Analyse erfolgte mittels gepaartem t-Test. P-Werte über 0.05 wurden als nicht signifikant bewertet. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) oder *** ($p < 0.001$) gekennzeichnet.

Die Beobachtungen, dass die CXCL12-induzierte Wanderung von T-Zellen im Kontext einer EAE ein entscheidender Wirkmechanismus der Dex-Therapie ist, korreliert sehr gut mit der verstärkten CXCL12-induzierten Transmigration von T-Zellen von MS-Patienten nach MP-Therapie. Dies deutet darauf hin, dass die CXCL12-induzierte Transmigration von T-Zellen ein möglicherweise wesentlicher Bestandteil der GC-Therapie bei MS-Patienten ist.

Tabelle 7: Angaben zu den MS-Patienten, die Blut vor und nach einer MP Therapie gespendet haben

Pat.	Alter	Geschlecht	Art der MS	Erkrankungsdauer (Jahre)	Medikamente (immunmodulatorisch)	Zeitpunkt der letzten Methylprednisolon-Therapie
1	43	w	PPMS	10	keine	3 Jahre
2	31	w	RRMS	neu diagnostiziert	keine	n.a.
3	67	m	PPMS	2	keine	10 Wochen
4	15	w	RRMS Kind	2	Interferon beta Rebif 44	6 Monate
5	29	m	RRMS	1	Copaxone	10 Monate
6	11	w	RRMS Kind	5	keine	10 Wochen
7	36	m	RRMS/ SP MS	6	Betaferon til 2012	6 Monate
8	59	m	PPMS	10	keine	3 Monate
9	17	w	RRMS Kind	1/2	Rebif + Ibuprofen	5 Monate
10	33	w	RRMS	1	Rebif	10 Monate

4 Diskussion

4.1 Liposomale GCs wirken bei der Behandlung der EAE auf andere Zelltypen und über einen unterschiedlichen Mechanismus im Vergleich zu freien GCs

4.1.1 Der Weg der Liposomen ist das Ziel der Therapie

PL zeigt bei Ratten und Mäusen einen therapeutischen Effekt auf den Verlauf einer EAE, sein Mechanismus war jedoch noch unklar definiert (Linker et al. 2008; Schmidt et al. 2003). Später wurde dann gezeigt, dass T-Zellen als alleiniges Ziel einer Therapie mit PL nicht in Frage kommen (Schweingruber et al. 2011). Bei Fehlen des GR in T-Zellen konnte eine EAE zwar durch Dex nicht mehr verbessert werden, es war aber weiterhin möglich diese mit PL zu behandeln. Das Fehlen des GR in Makrophagen hingegen verminderte den Behandlungseffekt von PL auf eine EAE zumindest teilweise. Durch die kombinierte Deletion des GR sowohl in Makrophagen als auch T-Zellen wurde der Behandlungserfolg von PL schließlich annähernd aufgehoben. Diese Ergebnisse grenzten das zelluläre Ziel liposomaler GCs ein und begründeten die Suche nach dem genauen Mechanismus von PL in Makrophagen im Kontext der Therapie einer EAE bei Mäusen.

Eine grundlegende Frage hinsichtlich des Wirkmechanismus liposomal verpackter GCs ist, wie diese zu den T-Zellen und den Makrophagen im Rückenmark gelangen, wenn sie intraperitoneal verabreicht werden. Zur Zeit ist die intravenöse Gabe von liposomalen Wirkstoffen zum Beispiel in der Onkologie die Applikationsart der Wahl, um einen Therapieeffekt zu erzielen (O'Brien 2008). Im Vergleich beider Applikationswege konnten wir hingegen keinen Unterschied hinsichtlich der Effizienz in der EAE finden. Beide Verabreichungswege müssen somit zu einer Zirkulation von PL im Blutkreislauf führen. Es wurde beschrieben, dass die chemischen Eigenschaften der *stealth*-Liposomen (pegylierte Liposomen) deren Biokinetik bestimmen. Liposomen bis zu einem Durchmesser von 100 nm zeigen auch bei i.p.-Gabe eine Anreicherung im Blut, die im Vergleich zur i.v.-Applikation allerdings 30 Minuten später eintritt (Allen et al. 1993). Die Halbwertszeit (HWZ) der PEG-Liposomen beträgt etwa 21 Stunden. Dies bedeutet, dass auch nach Tagen PL im

Blut zu finden sein sollte. Bei Modellen der rheumatoiden Arthritis wird sogar der Vorteil einer s.c.-Applikation gegenüber der i.v.-Gabe diskutiert (Ulmansky et al. 2012).

Hinsichtlich der Frage, wie PL bei einer EAE zu den Läsionen im Rückenmark gelangt, sind zwei Mechanismen denkbar:

Zum einen könnte dies passiv durch den sogenannten *enhanced permeability and retention*-(EPR)-Effekt geschehen (Maeda 2001). Dadurch wird ein Effekt beschrieben, in dem entzündetes oder auch tumoröses Gewebe eine erhöhte Permeabilität für Makromoleküle zeigt und es dadurch physikalisch zu deren Akkumulation kommt. Somit könnte allein durch Diffusionskräfte getrieben, der EPR zu einer Anreicherung von PL in entzündlichen Läsionen im Rückenmark führen. Entzündungsprozesse im ZNS sind jedoch strikt kontrolliert. Bei einem zu großen Einstrom immunologisch aktiver Substanzen und Zellen kommt es zu einem massiven Ödem, wofür auf Grund der anatomischen Gegebenheiten im Schädel oder auch im Rückenmarkskanal kein Platz ist. Denkbar wäre daher eher eine Anreicherung von PL im postkapillären perivaskulären Virchow-Robin-Raum.

Ein zum anderen ebenfalls diskutierter Anreicherungsmechanismus ist die Aufnahme von PL durch Makrophagen, welche Bestandteil der infiltrierenden Zellen im Rückenmark sind und somit das PL mitbringen. Ein Rekrutierungseffekt könnte beispielsweise stattfinden, wenn Liposomen durch Komplement markiert und anschließend durch Scavenger-Rezeptoren phagozytiert werden. Mit Prednisolon-gefüllte Liposomen scheinen dabei hauptsächlich über C5b markiert zu werden (van den Hoven et al. 2013). Im Bereich der Läsion käme es dann passiv zu einer Freisetzung von Prednisolon aus den PL, wodurch am Ort der Inflammation die höchste Konzentration von Prednisolon generiert werden würde. Dies würde auch für den Effekt sprechen, dass die Phagozytose von Komplement-markierten Bestandteilen, nur durch weitere pro-inflammatorische Stimuli stattfinden kann (Aderem und Underhill 1999). Am wahrscheinlichsten ist eine Kombination aus dem EPR und dem Rekrutierungseffekt. Durch den EPR entsteht die höchste Konzentration von PL im Bereich des Virchow-Robin-Raumes und während der Passage nehmen die Makrophagen das Komplement-markierte PL auf und tragen es in das Parenchym des Rückenmarkes.

4.1.2 Werden Makrophagen durch PL beschränkt oder gelenkt?

T-Zellen sind das wichtigste Ziel einer Therapie mit freien GCs (Wüst et al. 2008). Bei der Therapie mit PL kann es auch zur Freisetzung von MP aus den Liposomen kommen, was wiederum zu der bekannten anti-inflammatorischen Wirkung auf T-Zellen führt. Der neue Therapieeffekt durch PL bezieht nun allerdings Makrophagen verstärkt mit ein, weshalb besonderes Augenmerk auf diese Zellen gerichtet werden muss. Dabei ist wichtig, zwischen Effekten von PL auf die Funktionalität versus die Genexpression bei Makrophagen im Vergleich zur Behandlung mit freien GCs zu unterscheiden. Denn genau diese Unterschiede dürften bei der Behandlung mit PL zusätzlich hinzukommen und für spätere Therapieoptimierungen entscheidend sein.

Die Makrophagen haben zwei wesentliche Aufgaben. Sie phagozytieren Zelltrümmer und unterscheiden durch bestimmte Rezeptoren, ob es sich hierbei um körpereigene, wie zum Beispiel apoptotische Zellen, oder fremde gefährliche Bestandteile handelt. Die Phagozytose selbst entscheidet über eine lange und differenziert aufeinander folgende Kette immunologischer Prozesse. Daher wurde die Phagozytose-Fähigkeit von Makrophagen *in vitro* getestet. Als Substrat dienten tote, mit CFSE gefärbte Lymphozyten. CFSE reichert sich im Zytoplasma an und wird normalerweise als Teilungsmarker für Proliferations-Assays genutzt. Die toten Lymphozyten werden über den CD14-Scavenger-Rezeptor aufgenommen und induzieren daher keine erhöhte Expression von Zytokinen. Apoptose sollte ein nicht-entzündlicher Prozess sein. (Aderem und Underhill 1999). Nichtsdestotrotz ist dieser Assay störanfällig und schwer reproduzierbar, da das Substrat bei jedem neuen Ansatz neu hergestellt werden muss und somit sehr heterogen sein kann. Trotzdem ließen sich konstante Ergebnisse generieren. Erstaunlicherweise konnte bei Gabe von freiem Dex keine veränderte Phagozytosekapazität beobachtet werden. Lediglich die Gabe von PL verursachte deren Hemmung. Entweder führt die liposomale Verpackung der GCs zu einer höheren effektiven Konzentration in den Makrophagen oder die Aufnahme des PL erzeugt einen Sättigungseffekt, weshalb weniger Phagozytose stattfinden kann. Um diese beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, müssten weitere Versuche mit leeren Liposomen durchgeführt werden. Im zweiten Fall könnte man den klinisch-therapeutischen Effekt von PL auf eine EAE dadurch erklären, dass weniger Phagozytose von Lipidbestandteilen zu weniger sekundären Axonschädigungen führen würde. In diesem Fall wäre die Wirkung von PL jedoch unabhängig von den

darin enthaltenen GCs, was wiederum den Ergebnissen mit den GR-Knockout-Mäusen widersprechen würde. Trotzdem müssen die Ergebnisse in weiteren Phagozytose-Assays rekapituliert werden. Sollte eine verringerte Phagozytose mit einem klinisch besseren Ergebnis einer EAE korrelieren, würde dies neue Wege zur Therapie einer MS eröffnen. Nach dem Prinzip eines Trojanischen Pferdes wäre es so denkbar, eine Art „Phagozytosefalle“ zu stellen und damit den Krankheitsverlauf positiv zu beeinflussen (van Rooijen et al. 1990).

Vor dem Hintergrund, dass PL eine stärkere M2-Polarisierung der Makrophagen zur Folge hat, ist die beobachtete geringere Phagozytose-Aktivität allerdings untypisch (Mantovani et al. 2013). M2-Makrophagen weisen normalerweise eine verstärkte Phagozytose auf, da Ihre Funktion primär darin liegt, Zelltrümmer zu entfernen und Entzündungen zu beenden. Hierbei sollte aber nicht außer Acht gelassen werden, dass es bei den verschiedenen Arten von Phagozytose durchaus Unterschiede geben kann (Aderem und Underhill 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich gezeigt, dass die Aufnahme von apoptotischen Zellen verringert wird, was aber nicht bedeutet, dass die Aufnahme von Zelltrümmern oder anderen organischen Bestandteilen ebenfalls verringert sein muss. Denkbar wäre auch ein verstärkter Abbau von CFSE in den Lysosomen der mit PL behandelten Makrophagen. Hierbei könnte es verstärkt zur Abspaltung des CFSE von den Lysinresten der Proteinbestandteile kommen, wodurch dieses schneller freigesetzt würde. Mittels FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass die gesamte Population aller Makrophagen insgesamt positiver für CFSE wird. Dies deutet darauf hin, dass das CFSE sich im Zytoplasma der Makrophagen anreichert.

Wenn Makrophagen Bakterienbestandteile bei der Phagozytose aufnehmen, werden diese in Lysosomen prozessiert, auf MHC-II-Moleküle geladen und dann auf der Oberfläche T-Zellen präsentiert. Die Antigenpräsentation ist eine der wichtigsten Funktionen von Makrophagen und wird durch die Gabe sowohl von Dex als auch PL gehemmt (Schweingruber et al. 2011). Diese Reduktion der Oberflächenexpression von MHC-II-Molekülen ist in Abwesenheit des GR in Makrophagen durch PL nicht mehr beeinflussbar. Dadurch kann ein passiver Effekt auf die Antigenpräsentation durch die alleinige Phagozytose der Liposomen ausgeschlossen werden. Es ist

daher anzunehmen, dass die Hemmung der MHC-II-Oberflächenexpression ein GC-spezifischer Effekt ist.

Zur Beantwortung der Frage, ob die Makrophagen in ihrer Funktion beschränkt oder gelenkt werden, geben die Ergebnisse über deren Phagozytose-Aktivität und Antigen-präsentation Hinweise. Es scheint, dass die Antigenpräsentation, ähnlich wie bei der Gabe von freien GCs, gehemmt wird. Damit stellt dieser Effekt keine Besonderheit der PL-Therapie dar. Die Phagozytose wird hingegen spezifisch durch PL reguliert. Dies lässt vermuten, dass der Phänotyp der Makrophagen verändert wird. Es gilt allerdings weiterhin zu differenzieren, um welchen Phänotyp es sich genau handelt. Hierzu müssen die Ergebnisse der *In vitro*-Analysen zur Funktionalitäts-veränderungen von Makrophagen durch PL *in vivo* bestätigt werden. Hierbei könnte die MHC-II-Expression im Rückenmark zusammen mit dem Aktivierungszustand der T-Zellen histologisch analysiert werden (Lodygin et al. 2013). Die Phagozytose könnte weiterhin anhand elektronenmikroskopischer Analysen der Vakuolendichte und deren Inhalte beschrieben werden. Der adoptive Transfer von CFSE-gefärbten T-Zellen könnte als Spur für die Bestimmung des Schicksals von T-Zellen genutzt werden.

4.1.3 Die Zytokinfreisetzung von Makrophagen wird durch Dex und PL gleichermaßen gehemmt

PL und Dex haben eine vergleichbare Wirkung auf die Genexpression von pro-inflammatorischen Zytokinen. Auffällig ist lediglich die stärker ausgeprägte Hemmung von CXCL10. Bei diesem Molekül handelt es sich um eine Antwort auf $\text{INF-}\gamma$. Eine verringerte Antwort auf dieses pro-inflammatorische Zytokin gibt erste Hinweise auf den später noch genauer beschriebenen M2-Phänotyp der Makrophagen nach PL-Behandlung (Sica und Mantovani 2012). Des Weiteren führt eine geringere extrazelluläre Konzentration von CXCL10 zu einer verminderten Rekrutierung von zusätzlichen Lymphozyten. Außerdem hemmt die verringerte Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine T_H1 -Antworten, wie sie für die EAE und MS typisch sind.

Durch PL und Dex kommt es erstaunlicherweise auch zu einer verminderten Genexpression anti-inflammatorischer Zytokine. Lediglich die Menge an IL-10 ist bei

der Gabe von PL signifikant höher als bei der Behandlung mit Dex. Allerdings ist IL-10 bei den Kontrollen immer noch am höchsten. Interessanterweise wird IL-10 nach Aktivierung von CD163 durch Hämoglobin-Haptoglobin Komplexe vermehrt ausgeschüttet (Philippidis et al. 2004). Dies könnte mit der vermehrten CD163-Expression durch Makrophagen nach PL-Behandlung entstehen (siehe unten).

4.1.4 Makrophagen werden durch eine Behandlung mit PL in Richtung M2-Typ polarisiert

Makrophagen erfüllen bei entzündlichen Prozessen verschiedene Aufgaben. Dabei spiegelt die Polarisierung in einen M1- beziehungsweise M2-Phänotyp die Extreme wider. Der M1-Typ ist die pro-inflammatorische Form eines Makrophagen, bei dem eine Immunantwort gefördert wird und Substanzen zum Zerstören von Zellen oder Pathogenen produziert werden. Der M2-Phänotyp ist insbesondere am Ende einer Immunreaktion wichtig, wenn immunologische Prozesse herunterreguliert werden müssen und das Gewebe wieder aufgebaut wird. Die Plastizität von Makrophagen ist sehr groß und wird durch verschiedenste Substanzen beeinflusst. Es ist bekannt, dass neben IL-4 und IL-13 vor allem GCs, TGF- β und IL-10 einen M2- ähnlichen Phänotyp generieren. Dieser M2- ähnliche Phänotyp teilt gewisse Eigenschaften mit den klassischen M2-Makrophagen. Typische Oberflächenmarker dieses Phänotyps sind der Mannose-Rezeptor (CD206), die Chitinase (YM1), Fizz1 und die verstärkte Expression von Arginase1 (Mantovani et al. 2013).

Der Phänotyp der analysierten Peritonealmakrophagen lässt sich anhand der hier erhobenen Daten wie folgt charakterisieren:

Tabelle 8: Phänotyp der analysierten Peritonealmakrophagen

	Kontrolle	Dex	PL
Antigenpräsentation	+	-	-
Phagozytosekapazität	+	+	-
Pro-inflammatorische Zytokine	+	-	-
Anti-inflammatorische Zytokine	(=)	-	(-)
M2-Marker (peritoneal):			
CD206 (rel. mRNA)	-	-	+
Arginase1 (rel. mRNA)	-	+	++
Fizz1 (rel. mRNA)	-	+	-
YM-1 (rel. mRNA)	-	+	+(+)
GR-1 (FACS)	-	+	+
CD163 (rel. mRNA)	-	-	++

In den hier beschriebenen Untersuchungen zeigten die Peritonealmakrophagen nach Gabe von PL eine höhere Genexpression von CD206, YM1, CD163 und Arginase1. Alle vier Gene werden durch PL stärker induziert als durch Dex, wobei CD206 und CD163 nur nach der Gabe von PL erhöht waren.

Fizz1 wird durch Dex hochreguliert und durch PL herabreguliert. Bei Analyse von Makrophagen aus GR-defizienten GR^{LysM}-Mäusen ließ sich der Effekt auf die verminderte Expression von Fizz1 gleichermaßen beobachten, was die Vermutung nahelegt, dass dies ein passiver Effekt durch die Aufnahme von Liposomen sein könnte.

Das myeloide Differenzierungsantigen 1 (GR-1) wird normalerweise auf reifen Granulozyten exprimiert, erscheint aber auch transient während der Entwicklung von Monozyten (Youn et al. 2008). Der GR-1 besteht aus zwei Einheiten, dem Ly6-C und Ly6-G. Der Antikörper gegen GR-1 erkennt Ly6-C, welches wiederum auch auf einer Population von „myeloid derived suppressor cells“ (MDSC) exprimiert wird (Varga et al. 2008). Hierbei handelt es sich um undifferenzierte myeloide Vorläuferzellen die

durch Wachstumsfaktoren aus dem Knochenmark rekrutiert werden und auf Entzündungsprozesse hemmend wirken können (Cairo et al. 2011; Gabrilovich und Nagaraj 2009). Sowohl nach Therapie mit Dex als auch PL ist eine höhere Oberflächenexpression von GR-1 auf peritonealen Makrophagen zu messen, was entweder auf einen höheren Anteil von MDSCs schließen ließe oder ebenfalls von den hier beschriebenen M2 ähnlichen Makrophagen exprimiert werden würde. Falls sich dies bestätigen ließe wäre es möglich, den Phänotyp oder auch den Ursprung der M2 ähnlichen Makrophagen nach einer GC-Therapie und hier im Speziellen nach PL-Applikation zu deuten.

Der Mannose-Rezeptor CD206 und der Gruppe-B-Scavenger-Rezeptor CD163 scheinen spezifisch nach PL-Gabe durch peritoneale Makrophagen exprimiert zu werden. Die Genexpression von CD163 wird durch das Fehlen des GR bei GR^{LysM}-Tieren nach PL sogar vermindert, möglicherweise durch die fehlende basale Stimulation der Transkription durch GCs. Beide Rezeptoren sollten histologisch im Rückenmark von Tieren bei einer EAE nachgewiesen werden. CD206 konnte nicht vermehrt histologisch im Rückenmark detektiert werden, jedoch war ein deutlicher Unterschied bei der Oberflächenexpression von CD163 zu erkennen. Daher wird postuliert, dass CD163 einer der entscheidenden phänotypischen Merkmale der durch PL generierten M2 ähnlichen Makrophagen darstellt.

4.1.5 Wozu wird CD163 auf M2-ähnlichen durch PL induzierten Makrophagen benötigt? Ist es ein potentielles Ziel für Therapien?

CD163 ist ein Scavenger (Straßenkehrer) Rezeptor, für den lange Zeit keine körpereigenen Agonisten bekannt waren. Seit neuestem weiß man, dass Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexe an CD163 binden können. Entscheidend ist dabei, dass nur der Komplex an den Rezeptor bindet, nicht aber das Hämoglobin alleine (Kristiansen et al. 2001). Von CD163 existiert auch eine lösliche Form, der sCD163-Rezeptor (solubleCD163), der durch ein Protein der TNF- α Familie oder MMP 9 abgeschnitten wird (Etzerodt et al. 2010; Hintz et al. 2002). Aktuell wird die lösliche Form des CD163 als Marker für chronische Erkrankungen diskutiert, bei denen M2 ähnliche Makrophagen an der Regulation von Entzündungen beteiligt sind (Daly et al. 2006; Fabriek et al. 2007; Kowal et al. 2006; Matsushita et al. 2002).

TNF- α wird durch GCs sehr effektiv gehemmt (Reichardt et al. 2001). Daher könnte neben einer Hochregulation der Genexpression von CD163 auch indirekt eine verminderte TNF- α Sekretion zu einer höheren Konzentration an CD163 auf der Oberfläche von Makrophagen führen.

Auf Basis des Liganden lassen sich Rückschlüsse auf die Funktion des durch PL induzierten CD163 ziehen. Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexe bilden sich einerseits bei der Lyse von Erythrozyten und werden deshalb als klinischer Parameter zur Diagnose einer vermehrten intravasalen Lyse herangezogen. Andererseits werden Hämoglobin und Haptoglobin auch bei inflammatorischen Vorgängen benötigt, um extrazelluläre Redoxprozesse zu unterstützen. ROS werden von M1-Makrophagen freigesetzt, und viele Häm- enthaltende Proteine neutrophiler Granulozyten dienen dazu Gewebe zu zerstören (Buehler et al. 2010; Cairo et al. 2011). Die Aufnahme von Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexen bedeutet daher eine Verminderung dieser schädlichen extrazellulären Redoxprozesse. Ihre Aufnahme wiederum führt zur Freisetzung anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 und IL-6, welche unter anderem autokrin auf die Makrophagen wirken und deren weitere Polarisierung in Richtung M2 fördern. Aus Hämoglobin wird intrazellulär CO und Eisen freigesetzt, was andererseits wieder ein starker Vasodilatator ist (Cairo et al. 2011; Kozma et al. 1997). Vasodilatation und Revaskularisierung sind Prozesse, die benötigt werden, um das hypoxische Inflammationsgeschehen mit Sauerstoff zu versorgen.

Es ist seit längerem bekannt, dass CD163 speziell durch Dex hochreguliert werden kann (Schaer et al. 2008). Unsere Analysen der behandelten Peritonealmakrophagen haben jedoch gezeigt, dass die Genexpression von CD163 speziell durch PL gesteigert wurde. Weiterhin wurde CD163 deutlich vermehrt in den Meningen des Rückenmarks gefunden, was den Ort der höchsten Dichte der durch PL induzierten M2-Makrophagen widerspiegeln könnte.

Es wäre denkbar, die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen in klinischen Anwendungen weiter zu verfeinern. Hierbei sollen zwei Ansätze vorgestellt werden. Zum einen wäre es möglich, Makrophagen durch Antikörper-gekoppelte Liposomen direkt zu treffen. Hierbei könnten zum Beispiel Antikörper oder andere

Liganden an die Liposomen gebunden werden, um eine höhere Spezifität zu generieren (Metselaar et al. 2002). Ein alternativer Ansatz wäre das direkte Abzielen auf den CD163-Rezeptor von Makrophagen mittels eines Antikörpers der mit Dex chemisch gekoppelt ist. Hierbei würden die Signalkaskaden von CD163 in Gang gesetzt und durch die Wirkung von Dex unterstützt (Graversen et al. 2012).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass PL eine innovative Alternative zur Gabe freier GCs sein kann. Makrophagen sind neben den T-Zellen die entscheidenden Ziele dieser Therapie, wobei ein distinkter M2-Phänotyp bei den Makrophagen als der zu Grunde liegende Mechanismus beschrieben werden konnte.

Es wurde beschrieben, dass die negative Ladung der pegylierten Liposomen das Komplementsystem aktivieren kann. Hierbei können sehr ausgeprägte Allergien bei Patienten induziert werden. Eine hohe Aktivierung des Komplementsystems im Serum von mit PEG Liposomen behandelten Patienten, korrelierte mit der Schwere der Hypersensibilitätsreaktion (Szebeni et al. 2002). Auch wurde gezeigt, dass neben dieser unspezifischen Aktivierung des Komplementsystems eine spezifische Produktion von Antikörpern gegen PL möglich sei (van den Hoven et al. 2013). Für den Einsatz in der Klinik, müssen jedoch noch ausgiebige Analysen hinsichtlich des allergenen Effektes der Liposomen angestrebt werden.

4.2 Die Beeinflussung der Chemokin-induzierten Migration von T-Zellen als neuer Wirkmechanismus der GC-Therapie

4.2.1 Dex wirkt unabhängig von GICD

Lange Zeit wurde angenommen, dass der durch therapeutisch verabreichte GCs induzierte Zelltod maßgeblich für die Verbesserung der klinischen Symptome bei der Behandlung akuter Schübe von MS-Patienten verantwortlich sei (Gold et al. 2006; Pender und Rist 2001). In Vorarbeiten war zum einen gezeigt worden, dass periphere naive T-Zellen der Apoptose unterliegen, zum anderen aber auch, dass der Einstrom naiver T-Zellen ins ZNS nach Dex-Therapie vermindert ist (Wüst et al. 2008). Allerdings existieren auch Hinweise, dass GCs klinisch wirken, selbst wenn keine signifikante Apoptose bei T-Zellen zu beobachten ist. So verbessern bereits

geringe Dosen von Dex den Krankheitsverlauf in der Abwesenheit von Apoptose-Induktion (Nguyen et al. 1997). Aktivierte T-Zellen sind außerdem nur wenig anfällig gegenüber dem GICD (Baumann et al. 2005). Zuletzt hat die Gabe eines selektiven GR Agonist (CpdA), der kaum Apoptose in T-Zellen induziert, einen positiven Effekt auf den Verlauf einer EAE (Wüst et al. 2009). Auf Basis dieser Befunde sollte überprüft werden, ob die Induktion von Apoptose durch GCs oder eher andere Wirkungen wie eine Modulation der T-Zell-Migration für die GC-Therapie einer EAE relevant sind.

Unsere Experimente zeigten, dass eine EAE bei Mäusen mit T-Zellen, die refraktär gegenüber dem GICD waren, noch immer mit Dex behandelbar war. Bei dem Modell der chimären Bcl-2-transgenen Mäuse zeigte sich jedoch auch, dass die Tiere einen stärkeren Verlauf der EAE aufwiesen. Diese Beobachtung passt in das Bild, dass die Beeinflussung der Apoptose von T-Zellen selbst auch eine Auswirkung auf den Verlauf einer EAE hat (Moore et al. 2008).

Um in einem weiteren Modell zu bestätigen, dass die Therapie mit Dex unabhängig von GICD ist, wurde eine EAE bei Mäusen induziert, bei denen die Dimerisierung des GR auf Grund einer Mutation nicht mehr möglich ist (Balb/c-GR^{dim}). Dadurch bedingt ist in diesen Mäusen die Induktion von Apoptose durch GCs weitestgehend unterdrückt (Reichardt et al. 1998). Auch in Balb/c GR^{dim}-Tieren konnte die EAE erfolgreich mit Dex behandelt werden. Jedoch kann in diesem Modell eine Beteiligung von Apoptose nicht komplett ausgeschlossen werden. Die Expression des Fas-Liganden (FasL) wird zwar in T-Zellen inhibiert, jedoch kann Dex zu einer verstärkten Expression des FasL in anderem Geweben induzieren (Lieberman et al. 2012). Weiterhin könnte die Expression von FasL bei T-Zellen die lediglich einen monomeren GR besitzen sowie deren Antwort bei T-Zell-Aktivierung anders aussehen. Es wäre daher wichtig, weitere Analysen in Form unterschiedlicher Apoptose-Assays durchzuführen und verschiedene apoptotische Prozesse in den Läsionen histologisch nachzuweisen und mit denen bei Wildtyp-Mäusen zu vergleichen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Dex bei Wildtyp-Mäusen eine massive Leukopenie im Blut und in den sekundären lymphatischen Organen hervorruft.

Dennoch scheint es, dass die durch GICD im peripheren Blut verminderte Anzahl an zirkulierenden T-Zellen nicht entscheidend für die Therapie der EAE mit Dex ist.

4.2.2 GCs steuern die Wanderung von T-Zellen

Auf Grund von Hinweisen, dass bei der EAE von GR^{dim}-Mäusen nach einer Dex-Therapie weniger Zellen im Rückenmark gefunden werden und dass weiterhin Dex Adhäsionsmoleküle herabreguliert, wurde postuliert, dass die Chemokin-induzierte Migration von T-Zellen durch GCs beeinflusst werden könnte (Wüst et al. 2008). Es zeigte sich daraufhin, dass sowohl die CCL19- als auch die CXCL12-induzierte Migration von T-Zellen durch Dex *in vitro* und *in vivo* massiv beeinflusst wird.

4.2.2.1 T-Zellen werden durch GCs in ihrer Wanderung im Körper umgelenkt

CCL19 ist ein homöostatisches Chemokin, welches normalerweise die Wanderung von T-Zellen durch hochendotheliale Venolen aus dem Blut in Lymphknoten steuert. Dieser homöostatische Prozess wird *Homing* genannt und beschreibt das Zurückkehren einer T-Zelle, nachdem sie über die Lymphe in der Blutbahn zirkulierte. Auch für die Architektur des Lymphknotens ist das Chemokin CCL19 und der CCR7-Rezeptor entscheidend (Förster et al. 2008).

Unsere Daten zeigen, dass die Migrationsantwort von T-Zellen auf CCL19 durch Dex *in vitro* gehemmt wird. Die Behandlung einer EAE mit einem Antikörper gegen CCR7 hatte jedoch keinen therapeutischen Effekt. Der i.v. applizierte CCR7-Antikörper war jedoch sehr wohl in der Lage *in vitro* die CCL19 induzierte Migration zu hemmen. Die Liganden und CCR7 selber werden in Läsionen einer EAE exprimiert (Columba-Cabezas et al. 2003), und der Rezeptor ist für die Entstehung einer EAE notwendig (Kuwabara et al. 2009).

Es wird angenommen, dass sich bei chronischen Entzündungen im ZNS ektopisch lymphoides Gewebe in Abhängigkeit der Liganden von CCR7 bilden kann. Einerseits kommt es dabei zu einem begrenzten Einstrom von Leukozyten, die sich ähnlich wie in sekundär lymphatischen Organen organisieren, andererseits wird mitunter auch eine Chronifizierung des Geschehens gefördert (Aloisi und Pujol-Borrell 2006). Die Hemmung der CCR7-Liganden CCL19 oder CCL21 bewirken weiterhin ein vermindertes Einwandern von CCR7+ T-Zellen in die Meningen des Rückenmarks bei einer EAE (Alt et al. 2002). Im Liquor wird CCL19 konstitutiv exprimiert, trotzdem sind T-Zellen in Läsionen von MS-Patienten CCR7 negativ (Krumbholz et al. 2007). Es

wäre denkbar, dass CCR7⁺ Gedächtnis T-Zellen im Bereich der Meningen aktiviert werden und daraufhin CCR7 internalisieren und somit auf der Oberfläche verlieren. Insgesamt scheint es, dass die Liganden und der Rezeptor CCR7 bei der Entstehung einer EAE bei Mäusen eine Rolle spielen und eventuell auch beim Menschen zur Pathogenese einer MS beitragen. Nichtsdestotrotz spielt die therapeutische Behandlung mit CCR7-Antikörpern bei der EAE keine Rolle. Möglicherweise erfüllen die Liganden redundante Aufgaben. So bindet CCL21 neben CCR7 auch den Rezeptor CXCR3, welcher ebenfalls an der Pathogenese der EAE beteiligt sein soll (van Weering et al. 2010).

Eine Aktivierung von CCR7 durch CCL21 fördert die IFN- γ Ausschüttung (Flanagan et al. 2004) und der Verlust von CCR7 in Knockout-Mäusen hat eine Polarisierung zu T_H2 Zellen zur Folge (Moschovakis et al. 2012). Die beiden beschriebenen Phänomene könnten ein Hinweis auf eine synergistische Wirkung mit GCs sein. Interessanterweise sprechen die Ergebnisse der kombinierten Behandlung einer EAE mit CCR7-Antikörpern und Dex auch für einen solchen synergistischen Effekt. Eine EAE bei Mäusen, die eine niedrige Dosis Dex von 4 mg/kg und 50 μ g des CCR7-Antikörpers erhalten haben, wiesen eine Tendenz zu einem milderen Krankheitsverlauf im Vergleich zu der alleinigen Dex-Therapie auf.

Ein synergistischer Effekt könnte darauf hindeuten, dass durch Dex wahrscheinlich die Signalkaskade des CCR7 verändert wird. Hierbei wäre auf der einen Seite an eine geringere Aktivierung der T-Zellen über dendritischen Zellen zu denken, die den CCR7-Rezeptor hierzu nutzen. Auf der anderen Seite könnte die durch CCL21-induzierte IFN- γ -Ausschüttung oder T_H1-Polarisierung unterdrückt werden, ähnlich wie bei CCR7^{-/-} Mäusen (Moschovakis et al. 2012). Eventuell könnten in Zukunft Medikamente mit synergistischen Effekten in der Klinik angewendet werden, auch wenn sich hierdurch möglicherweise das Nebenwirkungsprofil verschlechtern könnte.

4.2.2.2 GCs fördern die CXCR4-vermittelte Migration von T-Zellen – ein konservierter Weg

Nach 3 Stunden Inkubation mit Dex kommt es zu einer stärkeren CXCR4-induzierten Migration bei T-Zellen, ein Zeitraum in dem nicht davon ausgegangen werden kann, dass apoptotische Prozesse stattgefunden haben. Auch T-Zellen, die nur einen

funktionellen monomeren GR haben, zeigen nach dieser kurzen Zeitspanne *in vitro* eine verstärkte Wanderung.

Durch die Analysen humaner T-Zelllinien war bereits zuvor beobachtet worden, dass der GR mit den intrazellulären Signalen des TCR interagieren kann. Hier verstärkt er die Phosphorylierung von ZAP-70, Lck und Fyn, was wiederum zu einer verstärkten Wanderung über CXCL12/CXCR4 führte. Die Wanderung wird durch eine erhöhte Aktivität von Rac und Vav vermittelt, welche für den Aufbau von Aktinfilamenten zuständig sind (Boldizar et al. 2013; Ghosh et al. 2009) (Abbildung 30). Interessanterweise zeigen auch eosinophile Granulozyten nach der Inkubation mit Dex eine verstärkte CXCL12-Antwort (Nagase et al. 2000).

Durch Analyse von T-Zellen aus GR^{Lck}-Mäusen konnte gezeigt werden, dass der GR nicht nur in die Signalkaskade des CXCR4 verstärkend eingreift, sondern auch unabdingbarer Teil dieser Kaskade ist. Die Oberflächenexpression von CXCR4 T-Zellen blieb hingegen nach 3 Stunden unverändert; erst nach einem Tag wurde eine höhere Oberflächenexpression des Rezeptors gemessen. Gegenwärtig geht man davon aus, dass die PI3K für die verstärkte Oberflächenexpression von CXCR4 verantwortlich ist. Normalerweise kommt es durch Aktivierung von Chemokinrezeptoren schnell zu deren Inaktivierung durch Internalisierung. Dieser Prozess wird durch die PI3K gehemmt (Slagsvold et al. 2006). Daher könnte eine spätere erhöhte Expression von CXCR4 durch GCs auch zu einer verstärkten Wanderung führen (Rhen und Cidlowski 2005).

4.2.2.3 Die Behandlung einer EAE mit GCs ist von CXCR4- und damit von der CXCL12-induzierten Migration der T-Zellen abhängig

Durch die Hemmung von CXCR4 mittels AMD3100 konnte die Dex-Therapie einer EAE signifikant gehemmt werden. Es ist hervorzuheben, dass im Gegensatz zur synergistischen Therapie mit CCR7-Antikörper und Dex weiterhin mit der regulären hohen Dosis von 100 mg/kg Dex gearbeitet wurde. Nichtsdestotrotz war der Behandlungseffekt von Dex in zwei unabhängigen Experimenten signifikant reduziert. Dies kann auf die Beeinflussung der Wanderung zurückgeführt werden. Durch die histologischen Analysen der mit AMD3100 und Dex behandelten Tiere konnte herausgefunden werden, dass wegen des AMD3100 die T-Zellen über das gesamte Parenchym des Rückenmarks verstreut waren. Dabei ist anzunehmen, dass diese Zellen auch einen vermehrten Schaden ausüben, obwohl der gesamte

Einstrom von Zellen ins ZNS eher geringer ist als bei den Kontrolltieren. Eine Verschlechterung der EAE durch AMD3100 war bereits zuvor bei 2-Photonen-Analysen des Rückenmarks in einem anderen Kontext beschrieben worden (Siffrin et al. 2009). Erwähnenswert ist, dass auch bei der EAE in GR^{Lck}-Mäusen ein drastischerer Verlauf und früherer Beginn der EAE beschrieben wurde, was mit dem Fehlen einer über CXCR4-verstärkten Migration (Wüst et al. 2008) oder einem anderen Repertoire von Rezeptoren erklärt werden könnte (Mittelstadt et al. 2012).

Die Form der gefundenen Läsionen lässt darauf schließen, dass die Zellen durch AMD3100 nicht mehr im perivaskulären Bereich gehalten werden können. CXCL12 wird unter physiologischen Bedingungen auf der basolateralen Seite des Endothels der BBB exprimiert. Während einer EAE und auch bei einer MS geht die Expression von CXCL12 in diesem Bereich verloren. Es kann so zum Übertritt von Leukozyten aus dem Blut ins ZNS kommen (Cruz-Orengo et al. 2011; McCandless et al. 2006). CXCL12 bindet neben CXCR4 an CXCR7. Dieser Rezeptor ist aber im Gegensatz zu CXCR4 nicht in der Lage intrazelluläre Signale weiterzuleiten. Die Zytokine IL-17 und IL-1 β werden bei einer EAE in großen Mengen ausgeschüttet und induzieren die Expression von CXCR7 auf der basolateralen Seite des Endothels der BBB. Die Konsequenz dieses Prozesses ist eine Aufnahme von CXCL12 in die Endothelzellen durch CXCR7 und hat zur Folge, dass die Leukozyten passieren können (Abbildung 30). Durch die Blockade des CXCR7-Rezeptors mit einem Antikörper kann die Konzentration an CXCL12 im Virchow-Robin-Raum wieder hergestellt werden und es kommt zu der Verbesserung von EAE-Symptomen (Cruz-Orengo et al. 2011). Es ist schon seit längerer Zeit bekannt, dass GCs IL-1 β inhibieren (Lee et al. 1988), was möglicherweise eine Veränderung der CXCR7-Expression durch Hemmung von IL-1 β durch Dex bedeuten könnte.

Zuletzt soll die Frage beantwortet werden, ob T-Zellen durch GCs wirklich gelenkt werden. Bei alleiniger Betrachtung des Einflusses auf die CCL19-induzierte Migration, werden T-Zellen durch Dex in ihrer Migration gehemmt. Jedoch reagieren T-Zellen sensibler auf CXCL12. Dies legt nahe, dass naive T-Zellen und Effektor T-Zellen durch Dex in ihrem Wanderungsprofil ganzheitlich anders reagieren und ein Umlenken stattfindet. Hierbei bleibt jedoch die Frage offen, ob T-Zellen vermehrt in andere Organe abwandern oder sogar ein Herauswandern aus dem Rückenmark bei

einer EAE induziert werden könnte. Auch ein Festhalten von T-Zellen in bestimmten Organen wäre denkbar.

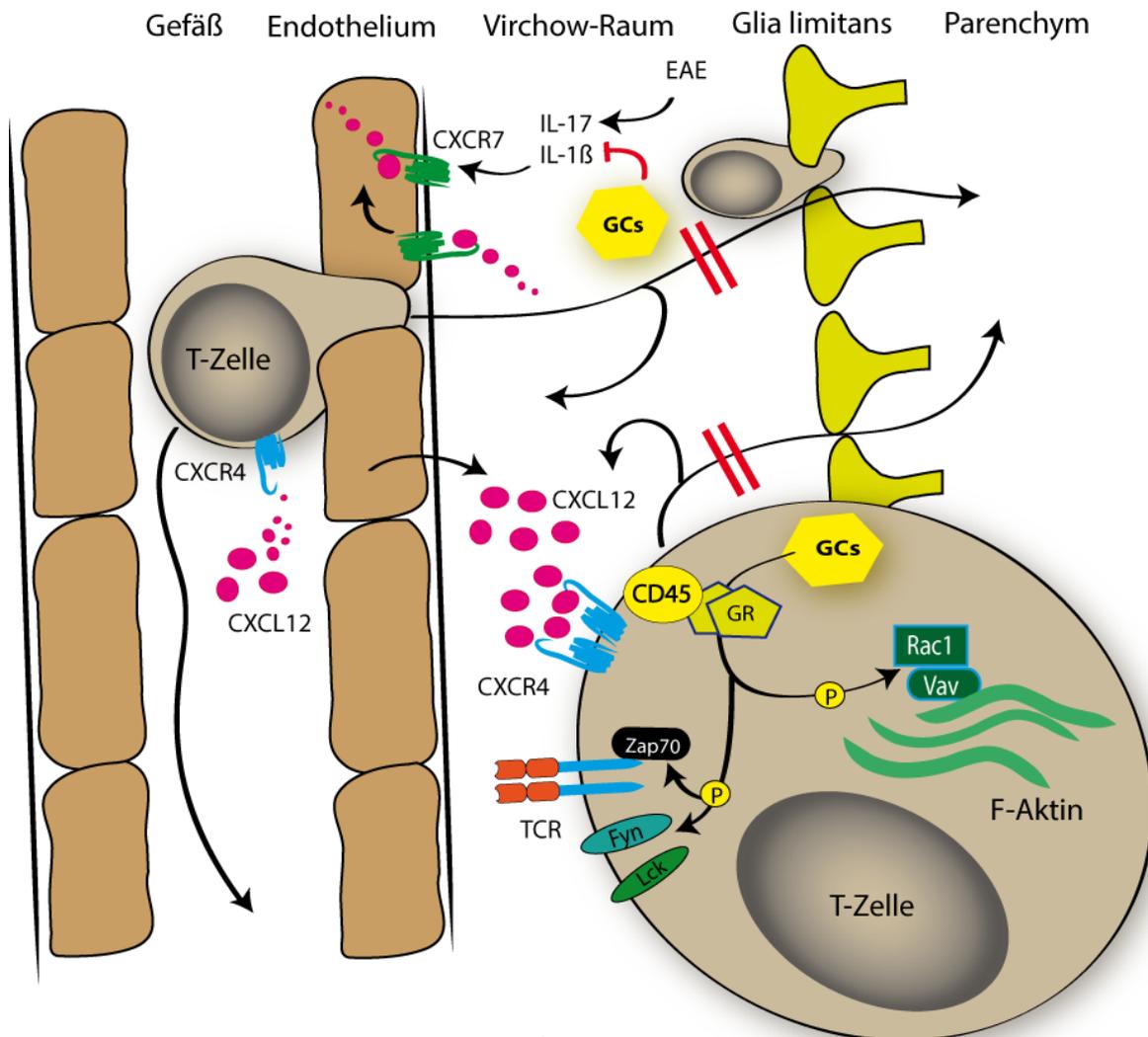


Abbildung 30: Der Einfluss von GCs auf die CXCL12-induzierte Wanderung

CXCL12 wird von peripheren Organen wie der Milz, Leber oder Lunge gebildet und könnte von GC verstärkt werden. CXCL12 bindet neben CXCR4 an CXCR7. Die Zytokine IL-17 und IL-1 β werden bei einer EAE in großen Mengen ausgeschüttet und induzieren die Expression von CXCR7 auf der basolateralen Seite des Endothels der BBB. Die Konsequenz dieses Prozesses ist eine Aufnahme von CXCL12 in die Endothelzellen durch CXCR7 und hat zur Folge, dass die Leukozyten passieren können. Der GR verstärkt die Phosphorylierung von Zap-70, Lck und Fyn, was wiederum zu einer verstärkten Wanderung über CXCL12/CXCR4 führte. Die Wanderung wird durch eine erhöhte Aktivität von Rac und Vav vermittelt, welche für den Aufbau von Aktinfilamenten zuständig sind. Diese potentiellen GC-Beeinflussungen könnten die T-Zelle im Virchow-Robin-Raum halten, sie zum Herauswandern bewegen, oder sie am Nachwandern hindern (eigene Abbildung, publiziert in (Fischer et al. 2013)).

4.2.2.4 Der konservierte Weg über CXCR4 wird auch durch T-Zellen von MS-Patienten nach Methylprednisolon-Puls-Therapie vermehrt eingeschlagen

Die endogene Cortisol-Ausschüttung schwankt im Tagesverlauf. Am frühen Morgen herrscht die höchste Konzentration, was mit einer geringeren Anzahl von im Blut zirkulierenden T-Zellen einhergeht. Diese zirkadiane Rhythmik wird auf die Induktion der CXCR4-induzierten Migration zurückgeführt (Kirsch et al. 2012). Ausdauersport führt ebenfalls zu einer vermehrten endogenen Cortisol-Ausschüttung und zu einer sekundären Lymphopenie. T-Zellen, die von Spendern nach der Ausübung von Sport isoliert wurden, zeigten eine verstärkte CXCL12-induzierte Migration *in vitro* (Okutsu et al. 2005). Zuletzt führt die topische Behandlung einer Uveitis mit GCs zu einer Anreicherung von CXCR4-positiven T-Zellen (Curnow et al. 2004). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die CXCL12-CXCR4-induzierte Migration als Antwort auf eine endogene Cortisol-Ausschüttung bei Menschen eine Rolle unter homöostatischen Bedingungen, zum Beispiel bei der zirkadianen Rhythmik und bei Sport spielt. Es gibt aber auch Hinweise, dass CXCR4 und CXCL12 auch unter pathologischen Bedingungen bei einer MS und beim therapeutischen Einsatz von GCs von Bedeutung sind.

In unserer klinischen Studie wiesen T-Zellen von MS-Patienten nach Hochdosistherapie mit MP eine sehr ausgeprägte CXCL12-induzierte Migration *in vitro* auf. Patienten mit einer RRMS zeigten dabei einen stärkeren Anstieg der Wanderung als Patienten mit einer PPMS oder Kinder mit einer RRMS. Es ist bekannt, dass Patienten mit einer RRMS, die unter einem Schub in die Praxis kommen, unabhängig von ihrem Alter besonders stark von der GC-Therapie profitieren. Die PPMS-Patienten des untersuchten Kollektiv kamen hingegen nicht auf Grund eines Schubes in die Klinik, sondern auf der Grundlage eines alle drei Monate sich wiederholenden, hochdosierten MP-Schemas, mit dem Ziel, eine Remission zu erreichen. Die PPMS-Patienten zeigten einen geringeren Anstieg der CXCL12-induzierten Migration von T-Zellen.

Es kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob es sich bei dem beobachteten Phänomen um den gleichen Mechanismus wie bei den Mäusen handelt. Es besteht aber eine deutliche Korrelation zwischen dem Modell der EAE und dem

Wanderungsverhalten von T-Zellen von MS-Patienten. Allerdings ist auch nicht sicher, ob bei Menschen die CXCL12-induzierte Wanderung von T-Zellen tatsächlich der Therapie-entscheidende Effekt ist.

Zwei Beobachtungen geben Anlass, diesem Zusammenhang in Zukunft weiter nachzugehen. Einerseits reagieren T-Zellen von Menschen wesentlich sensibler auf das Chemokin CXCL12 als die von C57Bl/6- oder Balb/c-Mäusen isolierten T-Zellen. Dies deutet darauf hin, dass humane T-Zellen auch auf Veränderung im Zusammenhang mit dieser Migrationsachse, zum Beispiel durch GCs, sehr sensibel und schnell reagieren könnten. Andererseits liegt eine gute Korrelation von Migrationssteigerung und anzunehmender klinischer Besserung der Symptome von MS-Patienten vor. Es ist klar, dass die Anzahl der Patienten und auch die Erfassung der prospektiven Daten nicht ausreicht, um eindeutige Aussagen über das Profitieren von der GC-Therapie treffen zu können. Bei einer Ausweitung auf eine weitere prospektive Studie und eine Bestätigung der Korrelation könnte möglicherweise ein sensitiver Biomarker für die klinische Anwendung entwickelt werden, der das klinische Ergebnis einer GC- Therapie für Patienten vorhersagt. Infolgedessen könnten etwaige Umstellungen der Therapie erfolgen, wie zum Beispiel eine frühzeitige Eskalation der Therapie oder auch die Gewissheit, dass die Therapie mit GCs ausreichend ist.

4.2.2.5 Kampf oder Flucht des Immunsystems – weiterführende Thesen

Wozu könnte das System der verstärkten CXCL12-CXCR4-induzierten Wanderung als Antwort auf das Stresshormon Cortisol dienen?

1. Eine immunologische Reaktion *per se* ist für den Körper energetisch sehr kostspielig. Der Sauerstoffbedarf steigt, Proteine werden synthetisiert, Glukose wird benötigt und kognitive Leistungen werden heruntergefahren. Ist der Körper nicht in der Lage, sich auszuruhen oder genügend Energie aufzubringen, kann er energetisch aufwendige Prozesse wie eine gezielte Immunabwehr auf lange Zeit nicht aufrechterhalten.
2. Kommt es zu chronischem Stress, also zu einer vermehrten endogenen Cortisol-Ausschüttung, werden T-Zellen und B-Zellen, die schon an einer vorherigen Immunantwort beteiligt waren, über CXCR4 im Knochenmark und in anderen

sekundären Organen zurückgehalten, um nicht dem Zellturnover zu unterliegen. Überflüssige Klone einer lymphatischen Reihe werden eliminiert.

3. CXCR4 könnte T-Zellen als Überlebenssignal dienen. Daher würden CXCR4-hochpositive T-Zellen keiner Apoptose unterliegen. CXCL12 wird hauptsächlich in peripheren endogenen Organen exprimiert. Entweder über CXCR4 selbst oder auch über andere Wege würden T-Zellen unter Bedingungen von chronischem Stress nur da hingelenkt, wo eine akute Gefahr drohen könnte: an allen Stellen, an denen der Körper in Kontakt mit der Außenwelt steht.
4. Neben der Herunterregulation des spezifischen Immunsystems durch GCs, werden Bestandteile des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen oder Granulozyten durch GCs in Bereitschaft gesetzt.
5. Vereinfacht könnten diese Prozesse mit einer Art Kampf oder Fluchtreaktion, bezogen auf das Immunsystem, verglichen werden. Entweder man hat Zeit und kann sich um anspruchsvolle Keime, wie hochdifferenzierte Viren kümmern oder muss auf der Flucht entstehende Wunden schnell wieder schließen.

Die physiologischen Auswirkungen von GCs auf den Körper und das Immunsystem sind genauso mannigfaltig und wichtig wie der klinische Einsatz von GC-Derivaten. Hierbei ist aktuell eine Differenzierung der Effekte oft nicht möglich. In dieser Arbeit werden GC-Wirkungen auf das Immunsystem beschrieben, die ohne ihre Anwesenheit einen klinischen Effekt von GCs in der Therapie einer EAE verringern. Es ist ein Versuch, durch gezielte Beeinflussung einen positiven klinischen GC-Effekt zu ersetzen oder zu optimieren. Die Grundlagenforschung an den vielfältigen Wirkungen von GCs auf das Immunsystem ist daher notwendig.

Teile der Dissertation sind bereits in folgenden Fachzeitschriften publiziert:

Schweingruber N, Fischer HJ, Fischer L, van den Brandt J, Kretzschmar B, Huppke P, Simons M, Flügel A, Lühder F, Reichardt HM (Eingereicht 2013): Redirection of T cells is essential for glucocorticoid therapy in a model of multiple sclerosis.

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

Schweingruber N, Reichardt SD, Lühder F, Reichardt HM (2012): Mechanisms of glucocorticoids in the control of neuroinflammation. *J Neuroendocrinol* 24, 174-182.

Fischer HJ, Schweingruber N, Lühder F, Reichardt HM (2013): The potential role of T cell migration and chemotaxis as targets of glucocorticoids in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Cell Endocrinol.* 380, 99-107

5 Literaturverzeichnis

Aderem A, Underhill DM (1999): Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17, 593-623.

Allen C, Dos Santos N, Gallagher R, Chiu GN, Shu Y, Li WM, Johnstone SA, Janoff AS, Mayer LD, Webb MS *et al.* (2002): Controlling the physical behavior and biological performance of liposome formulations through use of surface grafted poly(ethylene glycol). *Biosci Rep* 22, 225-250.

Allen SJ, Crown SE, Handel TM (2007): Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 25, 787-820.

Allen TM, Hansen CB, Guo LS (1993): Subcutaneous administration of liposomes: a comparison with the intravenous and intraperitoneal routes of injection. *Biochim Biophys Acta* 1150, 9-16.

Aloisi F, Pujol-Borrell R (2006): Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 6, 205-217.

Alt C, Laschinger M, Engelhardt B (2002): Functional expression of the lymphoid chemokines CCL19 (ELC) and CCL 21 (SLC) at the blood-brain barrier suggests their involvement in G-protein-dependent lymphocyte recruitment into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 32, 2133-2144.

Alten R, Doring G, Cutolo M, Gromnica-Ihle E, Witte S, Straub R, Buttgerit F (2010): Hypothalamus-pituitary-adrenal axis function in patients with rheumatoid arthritis treated with nighttime-release prednisone. *J Rheumatol* 37, 2025-2031.

Ambrosch F, Wiedermann G, Jonas S, Althaus B, Finkel B, Gluck R, Herzog C (1997): Immunogenicity and protectivity of a new liposomal hepatitis A vaccine. *Vaccine* 15, 1209-1213.

Ara T, Itoi M, Kawabata K, Egawa T, Tokoyoda K, Sugiyama T, Fujii N, Amagai T, Nagasawa T (2003): A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo. *J Immunol* 170, 4649-4655.

Ashkenazi A, Dixit VM (1998): Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.

Baschant U, Tuckermann J (2010): The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 120, 69-75.

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

Benveniste EN (1997): Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med (Berl)* 75, 165-173.

Biswas SK, Mantovani A (2012): Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell Metab* 15, 432-437.

Boldizsar F, Szabo M, Kvell K, Czompoly T, Talaber G, Bjorkan J, Bartis D, Nemeth P, Berki T (2013): ZAP-70 tyrosines 315 and 492 transmit non-genomic glucocorticoid (GC) effects in T cells. *Mol Immunol* 53, 111-117.

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

Buehler PW, D'Agnillo F, Schaer DJ (2010): Hemoglobin-based oxygen carriers: From mechanisms of toxicity and clearance to rational drug design. *Trends Mol Med* 16, 447-457.

Burton JM, O'Connor PW, Hohol M, Beyene J (2009): Oral versus intravenous steroids for treatment of relapses in multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev*, CD006921.

Cairo G, Recalcati S, Mantovani A, Locati M (2011): Iron trafficking and metabolism in macrophages: contribution to the polarized phenotype. *Trends Immunol* 32, 241-247.

Charo IF, Ransohoff RM (2006): The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 354, 610-621.

Chou CH, Fritz RB, Chou FC, Kibler RF (1979): The immune response of Lewis rats to peptide 68-88 of guinea pig myelin basic protein. I. T cell determinants. *J Immunol* 123, 1540-1543.

Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Forster I (1999): Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* 8, 265-277.

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

Columba-Cabezas S, Serafini B, Ambrosini E, Aloisi F (2003): Lymphoid chemokines CCL19 and CCL21 are expressed in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the maintenance of chronic neuroinflammation. *Brain Pathol* 13, 38-51.

Comi G, Filippi M, Wolinsky JS (2001): European/Canadian multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study of the effects of glatiramer acetate on magnetic resonance imaging--measured disease activity and burden in patients with relapsing multiple sclerosis. European/Canadian Glatiramer Acetate Study Group. *Ann Neurol* 49, 290-297.

Coyle PK (2010): The role of natalizumab in the treatment of multiple sclerosis. *Am J Manag Care* 16, S164-170.

Cruz-Orengo L, Holman DW, Dorsey D, Zhou L, Zhang P, Wright M, McCandless EE, Patel JR, Luker GD, Littman DR *et al.* (2011): CXCR7 influences leukocyte entry into the CNS parenchyma by controlling abluminal CXCL12 abundance during autoimmunity. *J Exp Med* 208, 327-339.

Curnow SJ, Wloka K, Faint JM, Amft N, Cheung CM, Savant V, Lord J, Akbar AN, Buckley CD, Murray PI *et al.* (2004): Topical glucocorticoid therapy directly induces up-regulation of functional CXCR4 on primed T lymphocytes in the aqueous humor of patients with uveitis. *J Immunol* 172, 7154-7161.

Daly A, Walsh C, Feighery C, O'Shea U, Jackson J, Whelan A (2006): Serum levels of soluble CD163 correlate with the inflammatory process in coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 24, 553-559.

Dimitrov S, Benedict C, Heutling D, Westermann J, Born J, Lange T (2009): Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T cell subsets. *Blood* 113, 5134-5143.

DiPersio JF, Stadtmauer EA, Nademanee A, Micallef IN, Stiff PJ, Kaufman JL, Maziarz RT, Hosing C, Fruehauf S, Horwitz M *et al.* (2009): Plerixafor and G-CSF versus placebo and G-CSF to mobilize hematopoietic stem cells for autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Blood* 113, 5720-5726.

Durelli L, Cocito D, Riccio A, Barile C, Bergamasco B, Baggio GF, Perla F, Delsedime M, Gusmaroli G, Bergamini L (1986): High-dose intravenous methylprednisolone in the treatment of multiple sclerosis: clinical-immunologic correlations. *Neurology* 36, 238-243.

Engelhardt B, Ransohoff RM (2012): Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol* 33, 579-589.

Erlacher M, Labi V, Manzl C, Bock G, Tzankov A, Hacker G, Michalak E, Strasser A, Villunger A (2006): Puma cooperates with Bim, the rate-limiting BH3-only protein in cell death during lymphocyte development, in apoptosis induction. *J Exp Med* 203, 2939-2951.

Etzerodt A, Maniecki MB, Moller K, Moller HJ, Moestrup SK (2010): Tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) mediates ectodomain shedding of the scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol* 88, 1201-1205.

Exton JH (1979): Regulation of gluconeogenesis by glucocorticoids. *Monogr Endocrinol* 12, 535-546.

Fabriek BO, Moller HJ, Vloet RP, van Winsen LM, Hanemaaijer R, Teunissen CE, Uitdehaag BM, van den Berg TK, Dijkstra CD (2007): Proteolytic shedding of the macrophage scavenger receptor CD163 in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 187, 179-186.

Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH (1997): Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 120 (Pt 3), 393-399.

Fischer HJ, Schweingruber N, Lühder F, Reichardt HM (2013): The potential role of T cell migration and chemotaxis as targets of glucocorticoids in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Cell Endocrinol* 380, 99-107.

Flanagan K, Moroziwicz D, Kwak H, Horig H, Kaufman HL (2004): The lymphoid chemokine CCL21 costimulates naive T cell expansion and Th1 polarization of non-regulatory CD4+ T cells. *Cell Immunol* 231, 75-84.

Flexner C (2007): HIV drug development: the next 25 years. *Nat Rev Drug Discov* 6, 959-966.

Förster R, Davalos-Miszlitz AC, Rot A (2008): CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol* 8, 362-371.

Gabrilovich DI, Nagaraj S (2009): Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9, 162-174.

Ghosh MC, Baatar D, Collins G, Carter A, Indig F, Biragyn A, Taub DD (2009): Dexamethasone augments CXCR4-mediated signaling in resting human T cells via the activation of the Src kinase Lck. *Blood* 113, 575-584.

Gimble JM, Guilak F (2003): Differentiation potential of adipose derived adult stem (ADAS) cells. *Curr Top Dev Biol* 58, 137-160.

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.

Gordon S (2003): Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3, 23-35.

Graversen JH, Svendsen P, Dagnaes-Hansen F, Dal J, Anton G, Etzerodt A, Petersen MD, Christensen PA, Moller HJ, Moestrup SK (2012): Targeting the hemoglobin scavenger receptor CD163 in macrophages highly increases the anti-inflammatory potency of dexamethasone. *Mol Ther* 20, 1550-1558.

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.

Hench P (1950): Effects of cortisone in the rheumatic diseases. *Lancet* 2, 483-484.

Herold MJ, McPherson KG, Reichardt HM (2006): Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell Mol Life Sci* 63, 60-72.

Hintz KA, Rassias AJ, Wardwell K, Moss ML, Morganelli PM, Pioli PA, Givan AL, Wallace PK, Yeager MP, Guyre PM (2002): Endotoxin induces rapid metalloproteinase-mediated shedding followed by up-regulation of the monocyte hemoglobin scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol* 72, 711-717.

Immordino ML, Dosio F, Cattel L (2006): Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine* 1, 297-315.

Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, Richert JR, Salazar AM, Fischer JS, Goodkin DE, Granger CV, Simon JH *et al.* (1996): Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol* 39, 285-294.

Johnstone SA, Masin D, Mayer L, Bally MB (2001): Surface-associated serum proteins inhibit the uptake of phosphatidylserine and poly(ethylene glycol) liposomes by mouse macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1513, 25-37.

Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, Cato AC, Gebel S, Ponta H, Herrlich P (1990): Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62, 1189-1204.

Junker A, Brück W (2012): Autoinflammatory grey matter lesions in humans: cortical encephalitis, clinical disorders, experimental models. *Curr Opin Neurol* 25, 349-357.

Kappos L, Radue EW, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, Selmaj K, Agoropoulou C, Leyk M, Zhang-Auberson L *et al.* (2010): A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 362, 387-401.

Kirsch S, Thijssen S, Alarcon Salvador S, Heine GH, van Bentum K, Fliser D, Sester M, Sester U (2012): T-cell numbers and antigen-specific T-cell function follow different circadian rhythms. *J Clin Immunol* 32, 1381-1389.

Kleiman A, Tuckermann JP (2007): Glucocorticoid receptor action in beneficial and side effects of steroid therapy: lessons from conditional knockout mice. *Mol Cell Endocrinol* 275, 98-108.

Klein RS, Rubin JB (2004): Immune and nervous system CXCL12 and CXCR4: parallel roles in patterning and plasticity. *Trends Immunol* 25, 306-314.

Kowal K, Moller HJ, Dubuske LM, Moestrup SK, Bodzenta-Lukaszyk A (2006): Differential expression of monocyte CD163 in single- and dual-asthmatic responders during allergen-induced bronchoconstriction. *Clin Exp Allergy* 36, 1584-1591.

Kozma F, Johnson RA, Nasjletti A (1997): Role of carbon monoxide in heme-induced vasodilation. *Eur J Pharmacol* 323, R1-2.

Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, Moestrup SK (2001): Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409, 198-201.

Krumbholz M, Theil D, Steinmeyer F, Cepok S, Hemmer B, Hofbauer M, Farina C, Derfuss T, Junker A, Arzberger T *et al.* (2007): CCL19 is constitutively expressed in the CNS, up-regulated in neuroinflammation, active and also inactive multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol* 190, 72-79.

Kuwabara T, Ishikawa F, Yasuda T, Aritomi K, Nakano H, Tanaka Y, Okada Y, Lipp M, Kakiuchi T (2009): CCR7 ligands are required for development of experimental autoimmune encephalomyelitis through generating IL-23-dependent Th17 cells. *J Immunol* 183, 2513-2521.

Labi V, Erlacher M, Kiessling S, Manzl C, Frenzel A, O'Reilly L, Strasser A, Villunger A (2008): Loss of the BH3-only protein Bmf impairs B cell homeostasis and accelerates gamma irradiation-induced thymic lymphoma development. *J Exp Med* 205, 641-655.

Lee SW, Tsou AP, Chan H, Thomas J, Petrie K, Eugui EM, Allison AC (1988): Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin 1 beta gene and decrease the stability of interleukin 1 beta mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 1204-1208.

Li M, Ransohoff RM (2008): Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: a migration from immunology to neurobiology. *Prog Neurobiol* 84, 116-131.

Lieberman AC, Refojo D, Antunica-Noguerol M, Holsboer F, Arzt E (2012): Underlying mechanisms of cAMP- and glucocorticoid-mediated inhibition of FasL expression in activation-induced cell death. *Mol Immunol* 50, 220-235.

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 efficacy of methylprednisolone formulations. *Exp Neurol* 211, 397-406.

Liu C, Li Y, Yu J, Feng L, Hou S, Liu Y, Guo M, Xie Y, Meng J, Zhang H *et al.* (2013): Targeting the shift from M1 to M2 macrophages in experimental autoimmune encephalomyelitis mice treated with fasudil. *PLoS One* 8, e54841.

Lodygin D, Odoardi F, Schlager C, Korner H, Kitz A, Nosov M, van den Brandt J, Reichardt HM, Haberl M, Flugel A (2013): A combination of fluorescent NFAT and H2B sensors uncovers dynamics of T cell activation in real time during CNS autoimmunity. *Nature medicine* 19, 784-790.

Löwenberg M, Tuynman J, Bilderbeek J, Gaber T, Buttgereit F, van Deventer S, Peppelenbosch M, Hommes D (2005): Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn. *Blood* 106, 1703-1710.

Lucchinetti CF, Bruck W, Rodriguez M, Lassmann H (1996): Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol* 6, 259-274.

Lühder F, Reichardt HM (2009): Traditional concepts and future avenues of glucocorticoid action in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis therapy. *Crit Rev Immunol* 29, 255-273.

Lyman WD, Abrams GA, Raine CS (1989): Experimental autoimmune encephalomyelitis: isolation and characterization of inflammatory cells from the central nervous system. *J Neuroimmunol* 25, 195-201.

Maeda H (2001): The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv Enzyme Regul* 41, 189-207.

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

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

Matsushita N, Kashiwagi M, Wait R, Nagayoshi R, Nakamura M, Matsuda T, Hogger P, Guyre PM, Nagase H, Matsuyama T (2002): Elevated levels of soluble CD163 in sera and fluids from rheumatoid arthritis patients and inhibition of the shedding of CD163 by TIMP-3. *Clin Exp Immunol* 130, 156-161.

McCandless EE, Wang Q, Woerner BM, Harper JM, Klein RS (2006): CXCL12 limits inflammation by localizing mononuclear infiltrates to the perivascular space during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 177, 8053-8064.

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

McGrath KE, Koniski AD, Maltby KM, McGann JK, Palis J (1999): Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4. *Dev Biol* 213, 442-456.

Meiron M, Zohar Y, Anunu R, Wildbaum G, Karin N (2008): CXCL12 (SDF-1alpha) suppresses ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis by selecting antigen-specific regulatory T cells. *J Exp Med* 205, 2643-2655.

Memon SA, Moreno MB, Petrak D, Zacharchuk CM (1995): Bcl-2 blocks glucocorticoid- but not Fas- or activation-induced apoptosis in a T cell hybridoma. *J Immunol* 155, 4644-4652.

Metselaar JM, Mastrobattista E, Storm G (2002): Liposomes for intravenous drug targeting: design and applications. *Mini Rev Med Chem* 2, 319-329.

Metselaar JM, van den Berg WB, Holthuysen AEM, Wauben MHM, Storm G, van Lent P (2004): Liposomal targeting of glucocorticoids to synovial lining cells strongly increases therapeutic benefit in collagen type II arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 63, 348-353.

Miller SD, Karpus WJ (2007): Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Curr Protoc Immunol* Chapter 15, Unit 15 11.

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.

Mittelstadt PR, Monteiro JP, Ashwell JD (2012): Thymocyte responsiveness to endogenous glucocorticoids is required for immunological fitness. *J Clin Invest* 122, 2384-2394.

Mohr DC, Hart SL, Goldberg A (2003): Effects of treatment for depression on fatigue in multiple sclerosis. *Psychosom Med* 65, 542-547.

Molon B, Gri G, Bettella M, Gomez-Mouton C, Lanzavecchia A, Martinez AC, Manes S, Viola A (2005): T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat Immunol* 6, 465-471.

Moore CS, Hebb AL, Blanchard MM, Crocker CE, Liston P, Korneluk RG, Robertson GS (2008): Increased X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) expression exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Neuroimmunol* 203, 79-93.

Moschovakis GL, Bubke A, Dittrich-Breiholz O, Braun A, Prinz I, Kremmer E, Forster R (2012): Deficient CCR7 signaling promotes TH2 polarization and B-cell activation in vivo. *Eur J Immunol* 42, 48-57.

Nagase H, Miyamasu M, Yamaguchi M, Kawasaki H, Ohta K, Yamamoto K, Morita Y, Hirai K (2000): Glucocorticoids preferentially upregulate functional CXCR4 expression in eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 106, 1132-1139.

Nguyen KB, McCombe PA, Pender MP (1997): Increased apoptosis of T lymphocytes and macrophages in the central and peripheral nervous systems of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis treated with dexamethasone. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 58-69.

Noseworthy JH (2003): Management of multiple sclerosis: current trials and future options. *Curr Opin Neurol* 16, 289-297.

O'Brien ME (2008): Single-agent treatment with pegylated liposomal doxorubicin for metastatic breast cancer. *Anticancer Drugs* 19, 1-7.

Ogawa S, Lozach J, Benner C, Pascual G, Tangirala RK, Westin S, Hoffmann A, Subramaniam S, David M, Rosenfeld MG *et al.* (2005): Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell* 122, 707-721.

Ogilvy S, Metcalf D, Print CG, Bath ML, Harris AW, Adams JM (1999): Constitutive Bcl-2 expression throughout the hematopoietic compartment affects multiple lineages and enhances progenitor cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14943-14948.

Okutsu M, Ishii K, Niu KJ, Nagatomi R (2005): Cortisol-induced CXCR4 augmentation mobilizes T lymphocytes after acute physical stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288, R591-599.

Oliveri RL, Valentino P, Russo C, Sibilia G, Aguglia U, Bono F, Fera F, Gambardella A, Zappia M, Pardatscher K *et al.* (1998): Randomized trial comparing two different high doses of methylprednisolone in MS: a clinical and MRI study. *Neurology* 50, 1833-1836.

Pender MP, Rist MJ (2001): Apoptosis of inflammatory cells in immune control of the nervous system: role of glia. *Glia* 36, 137-144.

Philippidis P, Mason JC, Evans BJ, Nadra I, Taylor KM, Haskard DO, Landis RC (2004): Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and

heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ Res* 94, 119-126.

Plotkin J, Prockop SE, Lepique A, Petrie HT (2003): Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus. *J Immunol* 171, 4521-4527.

Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L *et al.* (2011): Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69, 292-302.

Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G (2003): Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 3, 569-581.

Rathmell JC, Lindsten T, Zong WX, Cinalli RM, Thompson CB (2002): Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. *Nat Immunol* 3, 932-939.

Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, Bock R, Gass P, Schmid W, Herrlich P, Angel P *et al.* (1998): DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 93, 531-541.

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

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

Reichardt HM, Lühder F (2012): The ambivalent role of apoptosis in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Curr Pharm Des* 18, 4453-4464.

Reichardt SD, Foller M, Rexhepaj R, Pathare G, Minnich K, Tuckermann JP, Lang F, Reichardt HM (2012): Glucocorticoids enhance intestinal glucose uptake via the dimerized glucocorticoid receptor in enterocytes. *Endocrinology* 153, 1783-1794.

Reilkoff RA, Bucala R, Herzog EL (2011): Fibrocytes: emerging effector cells in chronic inflammation. *Nat Rev Immunol* 11, 427-435.

Rhen T, Cidlowski JA (2005): Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 353, 1711-1723.

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

Sallusto F, Impellizzieri D, Basso C, Laroni A, Uccelli A, Lanzavecchia A, Engelhardt B (2012): T-cell trafficking in the central nervous system. *Immunol Rev* 248, 216-227.

Schäcke H, Berger M, Rehwinkel H, Asadullah K (2007): Selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAs): novel ligands with an improved therapeutic index. *Mol Cell Endocrinol* 275, 109-117.

Schaer CA, Vallelian F, Imhof A, Schoedon G, Schaer DJ (2008): Heme carrier protein (HCP-1) spatially interacts with the CD163 hemoglobin uptake pathway and is a target of inflammatory macrophage activation. *J Leukoc Biol* 83, 325-333.

Schmidt J, Metselaar JM, Wauben MHM, Toyka KV, Storm G, Gold R (2003): Drug targeting by long-circulating liposomal glucocorticosteroids increases therapeutic efficacy in a model of multiple sclerosis. *Brain* 126, 1895-1904.

Schmied M, Breitschopf H, Gold R, Zischler H, Rothe G, Wekerle H, Lassmann H (1993): Apoptosis of T lymphocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. Evidence for programmed cell death as a mechanism to control inflammation in the brain. *American Journal of Pathology* 143, 446-452.

Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SE, Pollard JW *et al.* (2012): A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336, 86-90.

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

Schweingruber N, Reichardt SD, Lühder F, Reichardt HM (2012): Mechanisms of glucocorticoids in the control of neuroinflammation. *J Neuroendocrinol* 24, 174-182.

Sherwin AL (1957): Multiple sclerosis in historical perspective. *McGill Med J* 26, 39-48.

Sica A, Mantovani A (2012): Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122, 787-795.

Siffrin V, Brandt AU, Radbruch H, Herz J, Boldakowa N, Leuenberger T, Werr J, Hahner A, Schulze-Topphoff U, Nitsch R *et al.* (2009): Differential immune cell dynamics in the CNS cause CD4+ T cell compartmentalization. *Brain* 132, 1247-1258.

Slagsvold T, Marchese A, Brech A, Stenmark H (2006): CISK attenuates degradation of the chemokine receptor CXCR4 via the ubiquitin ligase AIP4. *EMBO J* 25, 3738-3749.

Stroet A, Linker RA, Gold R (2013): Advancing therapeutic options in multiple sclerosis with neuroprotective properties. *J Neural Transm* 120 Suppl 1, S49-53.

Szebeni J, Baranyi L, Savay S, Milosevits J, Bungler R, Laverman P, Metselaar JM, Storm G, Chanan-Khan A, Liebes L *et al.* (2002): Role of complement activation in hypersensitivity reactions to doxil and hynic PEG liposomes: experimental and clinical studies. *Journal of liposome research* 12, 165-172.

Thompson AJ, Polman CH, Miller DH, McDonald WI, Brochet B, Filippi MMX, De Sa J (1997): Primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 120 (Pt 6), 1085-1096.

- Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schutz G (1999): Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* 23, 99-103.
- Ulmansky R, Turjeman K, Baru M, Katzavian G, Harel M, Sigal A, Naparstek Y, Barenholz Y (2012): Glucocorticoids in nano-liposomes administered intravenously and subcutaneously to adjuvant arthritis rats are superior to the free drugs in suppressing arthritis and inflammatory cytokines. *J Control Release* 160, 299-305.
- van den Hoven JM, Hofkens W, Wauben MH, Wagenaar-Hilbers JP, Beijnen JH, Nuijen B, Metselaar JM, Storm G (2011): Optimizing the therapeutic index of liposomal glucocorticoids in experimental arthritis. *Int J Pharm* 416, 471-477.
- van den Hoven JM, Nemes R, Metselaar JM, Nuijen B, Beijnen JH, Storm G, Szebeni J (2013): Complement activation by PEGylated liposomes containing prednisolone. *Eur J Pharm Sci* 49, 265-271.
- van Rooijen N, Kors N, vd Ende M, Dijkstra CD (1990): Depletion and repopulation of macrophages in spleen and liver of rat after intravenous treatment with liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Cell and tissue research* 260, 215-222.
- van Weering HR, de Jong AP, de Haas AH, Biber KP, Boddeke HW (2010): CCL21-induced calcium transients and proliferation in primary mouse astrocytes: CXCR3-dependent and independent responses. *Brain Behav Immun* 24, 768-775.
- Varga G, Ehrchen J, Tsianakas A, Tenbrock K, Rattenholl A, Seeliger S, Mack M, Roth J, Sunderkoetter C (2008): Glucocorticoids induce an activated, anti-inflammatory monocyte subset in mice that resembles myeloid-derived suppressor cells. *J Leukoc Biol* 84, 644-650.
- Wang D, Muller N, McPherson KG, Reichardt HM (2006): Glucocorticoids engage different signal transduction pathways to induce apoptosis in thymocytes and mature T cells. *J Immunol* 176, 1695-1702.
- Wang X (2001): The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15, 2922-2933.
- Weinstein RS, Chen JR, Powers CC, Stewart SA, Landes RD, Bellido T, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC (2002): Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. *J Clin Invest* 109, 1041-1048.
- 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, 8434-8443.
- 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, e8202.

Yamagata S, Tomita K, Sano H, Itoh Y, Fukai Y, Okimoto N, Watatani N, Inbe S, Miyajima H, Tsukamoto K *et al.* (2012): Non-genomic inhibitory effect of glucocorticoids on activated peripheral blood basophils through suppression of lipid raft formation. *Clin Exp Immunol* 170, 86-93.

Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N (1992): Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 356, 63-66.

Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI (2008): Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* 181, 5791-5802.

Zamvil S, Nelson P, Trotter J, Mitchell D, Knobler R, Fritz R, Steinman L (1985): T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature* 317, 355-358.

Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR (1998): Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393, 595-599.

Danksagung

Zunächst möchte ich meinen Betreuern Holger Reichardt und Fred Lühder danken. Alle Projekte sind als Tandem-Projekt zwischen der Abteilung für Molekulare und Zelluläre Immunologie und dem Institut für MS-Forschung gefördert wurden. In der Arbeitsgruppe von Herrn Reichardt habe ich alle Grundlagen für die Arbeit an meinen Projekte gelernt, hierfür danke ich der gesamten Arbeitsgruppe und allen voran Henrike Fischer und Jens van den Brandt. Im Institut für MS-Forschung habe ich mit Fred Lühder einen ausgezeichneten Lehrer für alle tierexperimentellen Versuche gehabt. Ohne die ideelle und finanzielle Förderung sowie das Vertrauen von Herrn Reichardt und Herrn Lühder hätte ich keinen so spannenden, kreativen und ansteckenden Einstieg in die Wissenschaft gehabt. Ihr habt in mir das Feuer für die Forschung entfacht und mir mit Rat und Tat bei Problemen im Labor und darüber hinaus zur Seite gestanden.

Ich danke den Technischen Assistenten Julian Koch und Amina Basibas in der Immunologie sowie Nancy Meyer und Martina Weig aus dem IMSF



Jacob-Henle-

Programm

MD PHD Programm

