

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

**Wirkmechanismen von Glukokortikoiden im Mausmodell der EAE –  
Einfluss auf Effektor- und Bystander-T-Zellen und  
Relevanz der T-Zell-Apoptose**

**INAUGURAL – DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Lisa Maria Müller, geb. Fischer**

aus

Wesel

Göttingen 2015

**Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer**

**I. Berichtstatter: Prof. Dr. rer. nat. H. Reichardt**

**II. Berichtstatter/in: Prof. Dr. med. Jens Schmidt**

**III. Berichtstatter/in:**

**Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.2015**

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	II
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
1. Einleitung .....	1
1.1 Multiple Sklerose .....	1
1.2 Das Tiermodell der MS – experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis .....	4
1.3 Glukokortikoide .....	5
1.3.1 Allgemeines und Nebenwirkungen .....	5
1.3.2 Glukokortikoidrezeptor (GR) .....	6
1.3.3 Glukokortikoide in der MS und EAE .....	7
1.4 GR <sup>dim</sup> -Mäuse .....	9
1.5 T-Zell-spezifische GR <sup>dim</sup> .....	10
1.6 Ziel der Arbeit .....	11
2. Material und Methoden .....	13
2.1 Geräte .....	13
2.2 Antikörper .....	13
2.3 Arzneimittel .....	14
2.4 Chemikalien .....	14
2.5 Medien .....	15
2.6 Reagenzlösungen .....	16
2.7 Pufferlösungen .....	16
2.8 Tierexperimente .....	18
2.8.1 Generierung und Zucht .....	18
2.8.2 Induktion der EAE .....	18
2.8.3 Therapeutische Behandlung .....	20
2.9 Zellbiologische Methoden .....	20
2.9.1 Einzelzellsuspension aus Lymphknoten und Milz .....	20
2.9.2 Bestimmung der Zellzahl .....	20

2.9.3	Perfusion.....	20
2.9.4	Isolierung von Leukozyten aus dem Rückenmark mittels Dichtezentrifugation.....	21
2.9.5	Durchflusszytometrie .....	21
2.9.6	Proliferations-Assay.....	22
2.9.7	Zytokinbestimmung mittels ELISA.....	23
2.9.8	Isolierung von Makrophagen aus dem Peritoneum.....	24
2.9.9	NO-Test via Gries-Reaktion .....	24
2.9.10	Stimulation der Makrophagen für FACS-Analyse.....	25
2.9.11	Dex-Apoptose-Assay.....	25
2.10	Histologie und Immunhistochemie .....	26
2.10.1	Gewebefixierung und Paraffin-Konservierung.....	26
2.10.2	Immunhistochemische Färbungen.....	26
2.10.3	Quantifizierung immunhistochemischer Färbungen.....	27
2.11	Molekularbiologische Methoden .....	27
2.11.1	Isolation von RNA aus den Zellen.....	27
2.11.2	Aufreinigung der RNA.....	28
2.11.3	Umschreiben von mRNA in cDNA.....	28
2.11.4	Real-Time qPCR .....	28
2.12	Statistik.....	29
3.	Ergebnisse.....	30
3.1	Etablierung eines Modells für die Untersuchung des Einflusses von Dexamethason auf Effektor- und Bystander-T-Zellen .....	30
3.1.1	Supplementierung mit 2D2/GFP <sup>+</sup> -T-Zellen.....	30
3.1.2	Supplementierung mit GFP <sup>+</sup> -T-Zellen nach Vorbehandlung mit Dexamethason.....	32
3.1.3	Supplementierung von Knochenmark und 2D2-T-Zellen nach Bestrahlung.....	33
3.1.4	Supplementierung von RAG-1-defizienten Mäusen mit Bystander- und Effektor-T-Zellen .....	35
3.1.5	Supplementierung von RAG-1-defizienten Mäusen mit Effektor- und Bystander-T-Zellen aus GR-knock-out-Tieren.....	37

3.2	Analyse von möglichen Wirkmechanismen der GCs in der Therapie der EAE anhand von Experimenten mit T-Zell-spezifischen GR <sup>dim</sup> - und GR <sup>dim</sup> -Mäusen .....	38
3.2.1	T-Zell-spezifische GR <sup>dim</sup> -Mäuse sind mit Dexamethason therapierbar .....	38
3.2.2	Makrophagenfunktion.....	39
3.2.3	Auch GR <sup>dim</sup> -Tiere sind mit Dex behandelbar .....	41
3.2.4	Weitere Tests zur Apoptoseinduktion.....	41
3.2.4.1	Zellzahl.....	42
3.2.4.2	Bestimmung von apoptotischen Zellen in der Durchflusszytometrie .....	44
3.2.4.3	Dex-Apoptose-Assay <i>in vitro</i> .....	45
3.2.5	Migration der Zellen ins ZNS .....	47
3.2.5.1	Zellzahl (FACS-Analyse).....	47
3.2.5.2	Histologie (CD3- und MAC3-Färbung RM).....	49
3.2.6	Proliferation.....	50
3.2.7	Adhäsionsmoleküle .....	51
3.2.8	Zytokine .....	53
3.2.8.1	Bestimmung der Zytokinsekretion von Splenozyten mittels ELISA.....	53
3.2.8.2	Bestimmung von Zyto- und Chemokinen aus RM-infiltrierenden Lymphozyten mittels PCR .....	55
4.	Diskussion.....	57
4.1	Bystander- und Effektor-T-Zellen .....	57
4.1.1	GCs in der Therapie der MS und EAE .....	57
4.1.2	Der Einfluss von Dexamethason auf Effektor- und Bystander-T-Zellen: Suche nach einem geeigneten Tiermodell .....	57
4.1.3	Mögliche Ursachen für das Scheitern bei der Suche nach einem Modell.....	58
4.1.4	EAE in RAG-1-defizienten Mäusen .....	60
4.1.5	Mögliche Hinweise auf die Wichtigkeit von Effektor- und Bystander-T-Zellen in der Entwicklung und Behandlung der EAE .....	61
4.2	GR <sup>dim</sup> .....	61
4.2.1	Bereits beschriebene Ergebnisse aus Versuchen mit GR <sup>dim</sup> -Mäusen .....	61

4.2.2	Die Therapierbarkeit mit GCs beruht nicht auf der Einleitung von Apoptose .....	62
4.2.3	Zytokine .....	63
4.2.4	Adhäsionsmoleküle .....	65
4.2.5	Chemokine.....	66
4.2.6	Möglicher Mechanismus Migration – ein komplexes Zusammenspiel von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen.....	67
5.	Zusammenfassung.....	68
6.	Literaturverzeichnis.....	70

## Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Animoactinomycin
AxV	Annexin
AP-1	<i>activator protein 1</i>
AsMAse	<i>acid Sphingomyelinase</i>
AT-EAE	<i>adoptive transfer EAE</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	bovines Serum-Albumin
CCL	<i>chemokine ligand</i>
CCR	<i>chemokine receptor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFA	Komplettes Freundesches Adjuvans
cGR	zytosolischer Glukokortikoidrezeptor
ConA	Concavalin A
Dex	Dexamethason
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EAE	experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
ELISA	<i>enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
FACS	fluoreszenzaktivierter Zellsorter
GC	Glukokortikoid
GFP	<i>green fluorescent proteine</i>
GILZ	<i>glucocorticoid-induced leucin zipper</i>
GM-CSF	<i>granulozyte macrophage colony stimulating factor</i>
GR	Glukokortikoidrezeptor
GRE	<i>glucocorticoid responsive element</i>
Gy	<i>Gray</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HSP	Hitzeschock-Protein
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICAM	<i>intracellular cell adhesion molecule</i>
IFN $\gamma$	Interferon Gamma
IL	Interleukin
iNOS	<i>inducible NO synthase</i>
KG	Körpergewicht

KM	Knochenmark
LFA-1	<i>lymphocyte function associated antigen-1</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MOG	Myelinoligodendrozytenglykoprotein
MS	Multiple Sklerose
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PLP <sub>139-151</sub>	Proteolipid-Protein
PP-MS	<i>primary-progressive multiple sclerosis</i>
PTX	Pertussistoxin
RAG-1	<i>recombination activation gene 1</i>
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RM	Rückenmark
RNA	Ribonucleinsäure
RR-MS	<i>relapsing-remitting multiple sclerosis</i>
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
TCR	<i>T cell receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VLA-4	<i>very late antigen-4</i>
Wt	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

## 1. Einleitung

### 1.1 Multiple Sklerose

Die multiple Sklerose (MS) ist eine primär entzündliche, demyelinisierende und degenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). In Mitteleuropa ist die MS die häufigste chronisch-entzündliche Erkrankung des ZNS. In zwei Drittel der Fälle manifestiert sich die Erkrankung zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr. Frauen sind deutlich häufiger betroffen.

MS wurde erstmals 1868 von Jean-Martin Charcot beschrieben. Als typische Symptome der MS wurde damals die sogenannte Charcot-Trias aus Nystagmus, skandierender Sprache und Intentionstremor festgehalten. Doch diese Trias wird selten isoliert beobachtet. Vielmehr findet sich bei MS-Erkrankten eine Vielzahl von neurologischen Symptomen wie zentrale Paresen und Sensibilitätsstörungen, begleitet von Ataxie und Miktionsstörungen. In einem Drittel der Fälle manifestiert sich die Erkrankung zunächst mit Sehstörungen im Rahmen einer Optikusneuritis (Retrobulbärneuritis). Die MS ist folglich eine sehr heterogene Erkrankung. Zudem nimmt sie verschiedene Verläufe. In circa 85-90% der Fälle findet man einen schubförmig-remittierenden Verlauf (*relapsing-remitting MS*; RR-MS) (Sospedra und Martin 2005). Wie Figur 1 zu entnehmen ist, treten hierbei die Symptome in zeitlich voneinander unabhängigen Schüben auf und bilden sich innerhalb eines Schubes, der einige Wochen andauern kann, vollständig zurück. Die RR-MS geht in den meisten Fällen in einen schubförmig-progredienten Verlauf über. Nach einer gewissen Zeit und Anzahl an Schüben, die von Patient zu Patient sehr variieren können, wird nach dem jeweiligen Schub keine vollständige Remission mehr erreicht. Ein Teil der Symptome bleibt als Residuum des Schubes zurück und führt so zu einer progredienten Behinderung des MS-Erkrankten. Die verbleibenden 10-15% der Erkrankten zeigen einen primär chronischen Verlauf (*primary-progressive MS*; PP-MS) (Sospedra und Martin 2005). Hier finden sich keine Schübe mit akutem Auftreten der Symptome und anschließender Remission, vielmehr nehmen die Symptome im Verlauf schleichend zu und bleiben in ihrer vollständigen Ausprägung als Residuum der Entzündungsreaktion im ZNS erhalten. (Abb. 1, rechts)

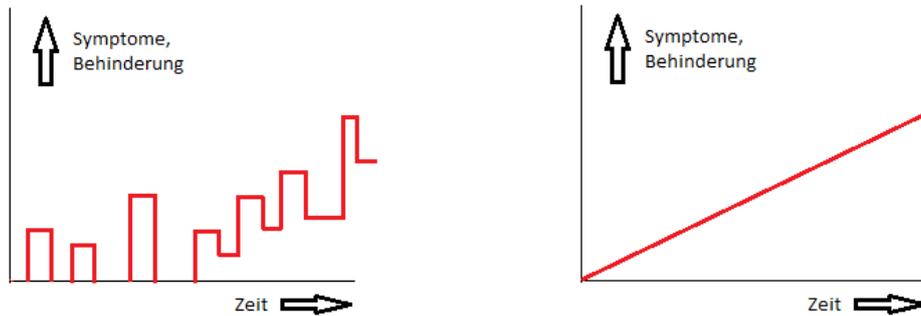


Abb. 1 **Verlaufsformen der Multiplen Sklerose.** Links: schubförmig-remittierender Verlauf der MS (RR-MS) mit Übergang in einen schubförmig-progredienten Verlauf. Rechts: primär chronischer Verlauf der MS (PP-MS).

Auch histopathologisch wurde die MS erstmals von J.M. Charcot 1868 beschrieben. Die Erkrankung erhielt den Namen *sclérose en plaques disseminées* oder Multiple Sklerose aufgrund der Läsionen, die Charcot im ZNS von Patienten mit neurologischen Ausfällen gefunden hatte: perivaskuläre Akkumulation von Entzündungszellen in der weißen Substanz des ZNS (Hafler 2004). Bevorzugt finden sich die Entzündungsherde beziehungsweise Plaques im Nervus opticus, im Corpus callosum und in der periventriculären Substanz. Im Vordergrund der Gewebeschädigung stehen zunächst demyelinisierende Prozesse. Begleitet werden diese von axonaler Schädigung. In aktiven Läsionen finden sich vor allem oligoklonale CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen sowie Makrophagen und vereinzelt B-Zellen, während die Zahl der Oligodendrozyten deutlich vermindert ist. In chronisch aktiven Läsionen verlagern sich die Lymphozyten und Makrophagen eher an den Rand der Läsion, während im Zentrum narbiges Gewebe imponiert (Hafler 2004, Hafler et al. 2005). In chronisch inaktiven Läsionen schließlich dominieren Astrozyten, die mit ihren Fortsätzen ein fibrilläres Netz ausbilden, entsprechend einer Narbe (Stangel und Lassmann 2003).

Die Ätiopathogenese der MS ist bis heute nicht vollständig geklärt. Seit vielen Jahren werden sowohl genetische Komponenten als auch Umwelteinflüsse und infektiöse Ursachen als Trigger der MS vermutet. In den letzten Jahren konzentrierte man sich vor allem auf die Annahme, dass es sich bei der MS um eine Autoimmunerkrankung handelt. Die Symptome, so wird angenommen, werden hervorgerufen durch die Einwanderung von aktivierten T-Zellen in das ZNS. Diese T-Zellen, spezifisch für bestimmte Bestandteile des Myelins, rufen dort eine akute Entzündungsreaktion mit Begleitödem hervor (Hafler 2004). Diese Annahme wird unterstützt durch die Tatsache, dass das Tiermodell der MS, die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), sowohl durch eine MS-ähnlich Symptomatik gekennzeichnet als auch eine CD4-vermittelte Autoimmunerkrankung ist, die nicht nur durch die Immunisierung mit Myelinbestandteilen hervorgerufen werden kann, sondern auch durch den Transfer von enzephalitogenen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in naive Tiere (Sospedra und Martin 2005). Zudem wird die Zuordnung

der MS zu den Autoimmunerkrankungen dadurch bestärkt, dass erhöhte Werte von oligoklonalen Immunglobulinen im Liquor bei einer Vielzahl von MS-Patienten gefunden werden (Hafler 2004, Kabat et al. 1948). Einer der wichtigsten genetischen Faktor bei der MS sind bestimmte HLA-Klasse-II-Moleküle, die für die Antigenpräsentation für pathogene CD4<sup>+</sup>-T-Zellen verantwortlich sind (Sospedra und Martin 2005). Die aktiven Läsionen der MS sind vor allem durch eine hohe Zellzahl an MHC-I-assoziierten CD8<sup>+</sup>-Zellen und einer nur geringen Anzahl von MHC-II-assoziierten CD4<sup>+</sup>-Zellen gekennzeichnet, wohingegen in den EAE-Läsionen die Zahl an CD4<sup>+</sup>-T-Zellen den größten Anteil ausmacht (Hayashi et al. 1988, Lassmann et al. 2007). Diese Beobachtungen und die Tatsache, dass MS-Erkrankte in den meisten Fällen auf die Behandlung mit immunmodulatorischen und immunsuppressiven Medikamenten ansprechen unterstützen sehr stark die Annahme einer autoimmunen Genese der Erkrankung.

Die Therapie der MS machte in den letzten Jahren einige Fortschritte durch die Entwicklung von neuen Medikamenten. Zwar gibt es keine kausale Behandlung der MS, doch existieren gute symptomatische Therapieschemata. Wichtigste Therapieziele sind hierbei die Verminderung der Frequenz der Schübe, die Verkürzung der Dauer des einzelnen Schubes und nicht zuletzt die Verhinderung der bleibenden neurologischen Ausfälle (Gold und Hartung 2003). Der akute Schub der MS wird mit einer Hochdosierung von Glukokortikoiden behandelt. Standardmäßig werden im akuten Schub 1000 mg Methylprednisolon i.v. über drei bis fünf Tage verabreicht (Milligan et al. 1987). Als Dauertherapie zur Immunmodulation werden Glatirameracetat oder Interferon Beta eingesetzt, die die Schubrate deutlich reduzieren und somit das Fortschreiten der MS verlangsamen beziehungsweise vollständig verhindern (Nicholas et al. 2011, Munari et al. 2004). Bei schweren progredienten Verläufen werden zudem Medikamente wie Cyclophosphamid oder Mitoxantron zur Therapie der MS eingesetzt. In therapieresistenten oder rasch progredienten Fällen steht Natalizumab zur Verfügung, ein selektiver Inhibitor von Adhäsionsmolekülen. Natalizumab bindet an die  $\alpha 4$ -Untereinheit von  $\alpha 4\beta 1$ -Integrinen auf der Zelloberfläche von Lymphozyten und verhindert hierdurch deren Bindung an VCAM-1 auf Gefäßendothelien, wodurch die Extravasation der Lymphozyten verhindert wird (Polman et al. 2006). All die genannten Medikamente sind nur als intravenöse Applikationsformen verfügbar, so dass die neuesten Entwicklungen ihren Schwerpunkt auf orale Therapieformen legen. Einige orale Therapeutika befinden sich zurzeit in Phase-II- beziehungsweise Phase-III-klinischen Studien zur Behandlung der Multiplen Sklerose. Hierzu zählen Cladribin, Laquinimod, BG-12 und Teriflunomid. Cladribin ist ein synthetisches Purinnukleosidanalogon, das durch Inhibition von DNA-Synthese und -Reparatur zum selektiven Abbau von Lymphozyten führt (Brousil et al. 2006). Der therapeutische Wirkmechanismus von BG-12, einem oralen Dimethylfumarat, ist noch unklar. Hier wird beispielsweise die verminderte Akkumulation von Leukozyten in den Entzündungsherden als ein möglicher Wirkmechanismus vermutet (Nicholas et al. 2011). Auch die Wirkweise von Laquinimod ist nicht vollständig geklärt. Angenommen wird, dass Laqui-

nimod, ein Chinolon-Carboxamid, immunmodulatorische Effekte durch einen Th1/Th2-Shift zeigt, jedoch nicht immunsuppressiv wirkt (Fernandez 2011). Fingolimod ist als orales Therapeutikum für die MS bereits zugelassen. Es interferiert mit Sphingosin-1-Phosphat und verhindert hierüber den Austritt der Lymphozyten aus den Lymphknoten und die Migration in andere Gewebe (Nicholas et al. 2011, Kappos et al. 2010).

Neben der medikamentösen Therapie stellen auch die Physiotherapie und die Logopädie wichtige Komponenten in der Behandlung der MS dar.

## **1.2 Das Tiermodell der MS – experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis**

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis ist ein häufig genutztes Tiermodell für die MS, das in verschiedenen Tierspezies angewandt werden kann (Gold et al. 2000). Erste Wurzeln der Entstehung beziehungsweise Entdeckung der EAE reichen zurück bis in die 1920er Jahre, als Koritschoner und Schweinburg bei ihrer Arbeit beobachteten, dass die mehrfache Impfung von Kaninchen mit Bestandteilen des menschlichen ZNS oder aus Schafshirn zur Entwicklung einer Paralyse bei einigen Versuchstieren führte (Koritschoner und Schweinburg 1925). Erste gezielte Versuche führte Thomas Rivers in den 1930er Jahren an Affen durch, welche nach verschiedenen Impfungen Gangunsicherheiten entwickelt hatten (Rivers et al. 1933, Rivers und Schwentker 1935). In den hierauf folgenden Jahrzehnten wurden eine Reihe von verschiedenen Modellen zur Induktion der EAE entwickelt und in einer Vielzahl von verschiedenen Tieren wie Meerschweinchen, Kaninchen, Mäusen, Ratten, Schafen und Affen etabliert (Baxter 2007). Besonders bevorzugt wurde hierbei das Tiermodell der Ratte. Vor allem bei Verwendung der Lewis-Ratte zeigte sich der enorme Vorteil einer sehr gleichmäßigen Suszeptibilität für die Erkrankung sowie ein sehr uniformer Beginn und Ausprägung der Symptome nach Immunisierung mit nur sehr kleinen Dosen von Myelin-basischem Protein (Swanborg 2001). Ähnlich der MS ist der Beginn der Erkrankung charakterisiert durch die Einwanderung autoreaktiver T-Zellen über die Blut-hirnschranke (BHS) ins ZNS und einer hierauf folgenden Entzündungsreaktion (Furtado et al. 2008, Reichardt et al. 2006). Viele verschiedene Modelle der EAE sind bis heute etabliert und spiegeln in ihrer Gesamtheit viele verschiedene Aspekte der MS wider (Gold et al. 2006).

Neben der aktiven Immunisierung mit verschiedenen in den Myelinscheiden des ZNS vorkommenden Peptiden existiert zusätzlich die Möglichkeit einer passiven Induktion der EAE. Bei der adoptiven-Transfer-EAE (AT-EAE) werden den jeweiligen Versuchstieren *in vitro* stimulierte T-Zell-Linien intravenös injiziert und führen so zur Ausbildung der gewünschten Entzündungsreaktion im ZNS (Gold et al. 2000). Die Vor- und Nachteile der EAE als Tiermodell der MS werden seit vielen Jahren diskutiert. Die MS ist eine sehr heterogene Erkrankung und somit nur sehr schwer in Form eines Modells im Tier nachzustellen. Es existieren sicherlich Defizite im Bereich der Tiermodelle, insbesondere wenn nicht die gesamte Bandbreite der Modelle genutzt wird. Allerdings hat die EAE in den vergangenen Jahrzehnten wichtige

Einblicke in die Pathogenese der MS geben können (Swanborg 2001). Ebenso war die EAE maßgeblich an der Einführung von Medikamenten wie Glatirameracetat, Mitoxantron und Natalizumab in die Therapie der MS beteiligt (Steinman und Zamvil 2006), so dass dieses Tiermodell bis heute als wichtiger Bestandteil in der Grundlagen- und klinischen Forschung bezüglich der MS etabliert ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eines der Maus-Modelle der EAE genutzt. Je nach Tierstamm wird bei den Mausmodellen mit verschiedenen Peptiden gearbeitet, die ebenso zu unterschiedlichen Verläufen der EAE führen. Immunisierung von SJL-Mäusen mit Proteolipid-Protein (PLP<sub>139-151</sub>) beispielsweise führt zu einer schubförmigen EAE. In C57/Bl6-Mäusen folgt der Induktion mittels Myelinoligodendrozytenglykoprotein (MOG<sub>33-35</sub>) ein chronisch progressiver Verlauf (Gold et al. 2006). Um eine höhere Inzidenz der Erkrankung zu fördern, werden die jeweils verwendeten Peptide emulgiert in komplettem Freundschem Adjuvans (CFA) injiziert und die Tiere so aktiv immunisiert. Des Weiteren wird den Tieren Pertussistoxin (PTX) intraperitoneal injiziert. Es wird angenommen, dass PTX die BHS öffnet und außerdem eine Th1-vermittelte Immunantwort stimuliert. Die ersten Symptome der Erkrankung wie eine progrediente Schwanzlähmung gefolgt von Gangataxie treten etwa 9-12 Tage nach Immunisierung auf. Bei den hier durchgeführten Versuchen wurde mit C57/Bl6-Mäusen gearbeitet. Diese wurden mit MOG<sub>33-35</sub> in CFA und zusätzlich hierzu mit PTX aktiv immunisiert. Die aktive Immunisierung mit MOG hat den Vorteil, dass hier nicht nur eine Aktivierung von enzephalitogenen T-Zellen stattfindet, sondern über Autoantikörper auch eine Demyelinisierung im ZNS hervorgerufen wird. So werden in diesem Modell wichtige Mechanismen der Pathologie der MS nachgebildet (Gold et al. 2006).

## **1.3 Glukokortikoide**

### **1.3.1 Allgemeines und Nebenwirkungen**

Glukokortikoide (GCs) gehören zu den Steroidhormonen. Die körpereigenen GCs Cortisol und Corticosteron werden in der Nebennierenrinde gebildet und in einer zirkadianen Rhythmik ausgeschüttet. Physiologisch hat Cortisol eine katabole Stoffwechselfunktion, so fördert es beispielsweise die Glukoneogenese durch Induktion der Expression von Glukoneogeneseenzymen. Des Weiteren sind die endogenen GCs neben den Katecholaminen wichtige Stresshormone und sind außerdem an der Regulierung des Immunsystems beteiligt. Synthetische Glukokortikoide - wie Prednison, Methylprednison, Dexamethason und viele andere - werden vor allem als antiinflammatorische und immunsuppressive Medikamente verwendet. Die gute antiinflammatorische Wirkung wurde erstmals in den 1940er Jahren entdeckt und damals erstmalig zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis eingesetzt. Heute sind GCs die meist eingesetzte Medikamentenklasse zur Behandlung entzündlicher Autoimmunerkrankungen (Reichardt et al. 2006). Die meisten synthetischen GCs haben eine höhere Effizienz als das körpereigene Cortisol. Hier werden weitaus höhere Dosierungen, als physiologisch ausgeschüttet werden,

angewandt, was eine Verminderung der Proteinbiosynthese zur Folge hat sowie eine Verminderung der Antikörperproduktion und eine Suppression von Entzündungsreaktionen. Die immunmodulatorische Wirkung wird, wie bislang angenommen, vor allem über Apoptose-Induktion und Modulation inflammatorischer Zytokine in vielen verschiedenen Zelltypen, vor allem aber T-Lymphozyten, dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten, erreicht (Fischer et al. 2013, Tuckermann et al. 2005). Durch die deutlich höheren therapeutischen Dosierungen treten allerdings auch zahlreiche unerwünschte Wirkungen auf. Die diabetogene Wirkung der GCs führt zu Gewichtszunahme und Stammfettsucht, im schlimmsten Falle zur Entstehung eines GC-induzierten Diabetes mellitus. Über erhöhte Natriumretention kommt es zur Entwicklung einer Hypertonie. Des Weiteren finden sich bei den Nebenwirkungen die Verstärkung einer Osteoporose, Entwicklung eines Kataraktes oder Glaukoms, ein erhöhtes Risiko für die Bildung von Magengeschwüren und eine erhöhte Infektgefahr durch Suppression des Immunsystems (Karow und Lang-Roth 2011).

### **1.3.2 Glukokortikoidrezeptor (GR)**

Die verschiedenen Mechanismen der Wirkung von GCs auf die Zielzelle sind in Abbildung 2 dargestellt. Die Wirkung der GCs erfolgt vor allem genomisch über den zytosolischen Glukokortikoidrezeptor (cGR). Unligiert ist der cGR an einen Komplex aus Hitzeschockproteinen (HSP) gebunden. Nach der Bindung eines GCs, das dank seiner lipophilen Eigenschaften leicht über die Zellmembran diffundieren kann, an den Rezeptor erfährt dieser durch die Aktivierung eine Konformationsänderung und dissoziiert von dem Komplex aus HSPs. Vom Zytosol gelangt er in den Zellkern, wo er an sogenannte *glucocorticoid responsive elements* (GREs) bindet und hierdurch direkt zur Aktivierung oder Repression von Genen führt (Buttgereit et al. 1999). Zur Bindung an die GREs ist die Dimerisierung zweier Rezeptoren notwendig. Dies konnte in GR<sup>dim</sup>-knock-in-Mäusen, deren GR durch eine eingeführte Punktmutation nicht zur Ausbildung von Dimeren befähigt ist, gezeigt werden (Reichardt et al. 1998). Im Verlauf dieser Arbeit wird auf diese Tiere näher eingegangen werden. Nach Bindung des GR-Dimers an die GREs kommt es zur Transaktivierung von Genen. Dies führt im Falle der Behandlung mit GCs vor allem zu unerwünschten Nebenwirkungen des Medikamentes (Stahn und Buttgereit 2008). Des Weiteren findet sich eine indirekte genomische Wirkung des GRs, das heißt ohne die direkte Interaktion mit der DNA. Hierzu ist demzufolge auch keine Dimerisierung des Rezeptors notwendig. Vielmehr werden diese Effekte über Protein-Protein-Interaktionen vermittelt, also die Interaktion des GRs mit Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel AP-1 und NF- $\kappa$ B, wodurch indirekt auf die Expression verschiedener Gene Einfluss genommen wird. Die Hemmung von NF- $\kappa$ B beispielsweise führt unter Anderem zur verminderten Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-2 und TNF- $\alpha$ . Diese genomischen Effekte haben in der Regel eine Latenzzeit von mehreren Stunden bis Tagen.

Neben der genomischen Wirkung existieren auch nicht-genomische Effekte. Die Latenzzeit beträgt hier nur wenige Minuten. Folglich kann es sich hierbei nicht um Transkriptionsprozesse handeln. Sie erfolgen

unabhängig vom zytosolischen GR und führen zum Beispiel zur Membranstabilisierung. Der Mechanismus dieser nicht-genomischen Aktivität der GCs ist - trotz vieler Ansätze und Bemühungen - bis heute nicht geklärt. Angenommen wird jedoch, dass die nicht-genomischen Effekte zum einen über eine Bindung der GCs an membrangebundene GRs vermittelt werden und zum anderen über zytosolische Signalmoleküle wie PI3K (Buttgereit et al. 1999, Bartholome et al. 2004).

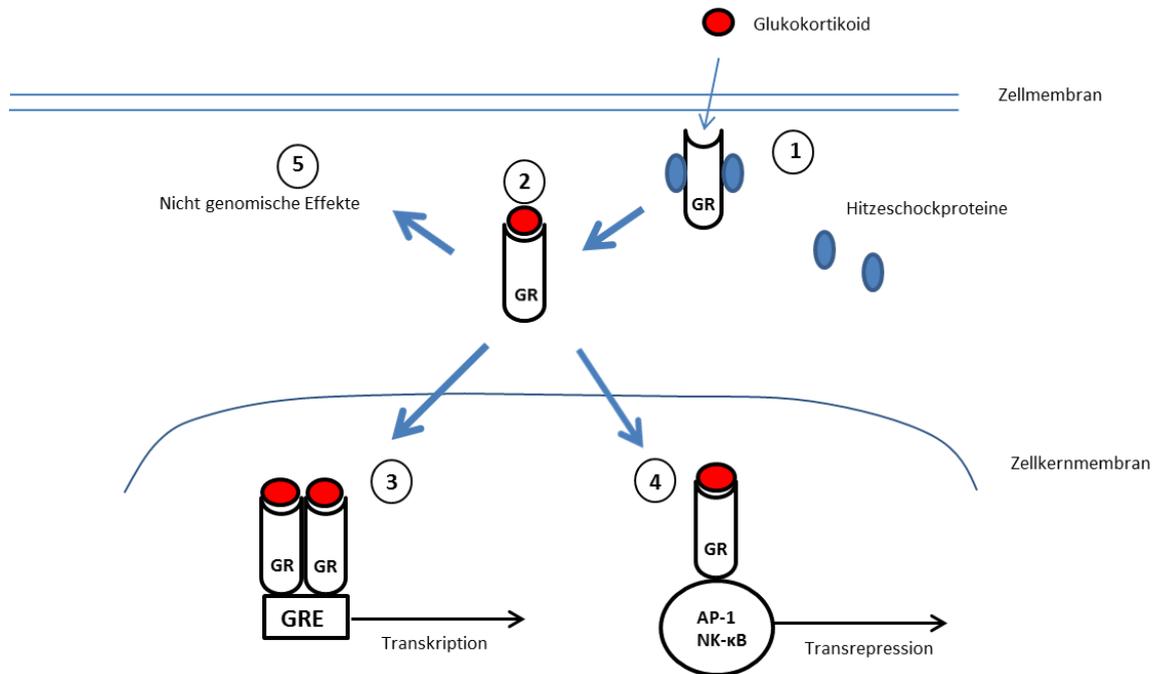


Abb. 2: **Die Wirkung von Glukokortikoiden am Glukokortikoidrezeptor.** GCs diffundieren passiv in die Zelle und binden an den GR (1). Daraufhin erfolgt die Dissoziation vom HSP-Komplex und die Translokation des Liganden-gebundenen GR in den Zellkern (2). Hier moduliert der GR die Transkription entweder über die Bindung an GREs (3) oder über die Bindung an andere Transkriptionsfaktoren (4). Nicht-genomische Effekte der GCs werden z.B. über die Interaktion des GR mit zytosolischen Signalmolekülen wie der PI3-Kinase vermittelt (5). (modifiziert nach Reichardt et al. 2006, Seite 1659)

### 1.3.3 Glukokortikoide in der MS und EAE

GCs werden bis heute standardmäßig und mit gutem Erfolg zur Therapie von akuten Schüben bei MS-Erkrankten eingesetzt. Trotz großer Bemühungen der Forschung ist bis heute der Mechanismus der Wirkung der GCs nicht vollständig geklärt. Seit den 1960er Jahren werden Studien mit GCs am Tiermodell EAE durchgeführt mit dem Ziel, die zugrundeliegenden Mechanismen der Wirksamkeit der GCs und die Hauptangriffspunkte der GCs zu klären. Viele zelluläre Effekte der GCs wurden mithilfe von Studien anhand der EAE bereits gefunden. Einige sind in Abbildung 3 zusammengefasst.

Zunächst wurde angenommen, dass GCs die T-Zell-Apoptose im ZNS induzieren und so zu einer verminderten Entzündungsreaktion führen (Nguyen et al. 1997). Wüst et al. zeigten 2008, dass nicht die Apoptose im ZNS zu einer verminderten Zellzahl an infiltrierenden Zellen, sondern die vermehrte

Apoptose vom peripheren T-Zellen zu einem verminderten Einstrom von weiteren T-Zellen an den Ort der Entzündung führt.

Zudem haben GCs einen indirekt positiven Effekt auf die Integrität der BHS (Wüst et al. 2008). Die Störung der normalen Funktion der BHS ist ein fundamentaler Teil des Beginns der Entzündungsreaktion sowohl in der MS als auch bei der EAE. Anhand von Studien mit Lewis-Ratten konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Dex bei Beginn der Erkrankung den weiteren Einstrom von enzephalitogenen Zellen in das ZNS verhindern kann. Dies geschieht zum einen durch direkte Effekte auf das Neuroendothel, zum anderen durch vermindertes Priming von enzephalitogenen T-Zellen und verminderte Sekretion von Entzündungsmediatoren, die zur erhöhten Permeabilität der BHS führen (Paul und Bolton 1995). Nach Applikation von Dex kommt es zu einer erhöhten Expression von Occludin im Neuroendothel, was zu einer Festigung der *tight junctions* zwischen den Endothelzellen und somit zu einer verminderten Durchlässigkeit der BHS führt (Forster et al. 2006). Dies erklärt auch den positiven Effekt bei der MS auf die, mit der Entzündungsreaktion einhergehenden, Bildung eines Ödems im Bereich der Läsion. Durch die Applikation von GCs wird die Bildung des Ödems unterdrückt und ein bereits entstandenes Ödem rasch abgebaut (Paul und Bolton 1995, Forster et al. 2006). Dabei wird angenommen, dass GCs die Expression von VEGF (*vascular endothelial growth factor*), der entscheidend an der Pathogenese des Ödems beteiligt ist, vermindern (Kaal und Vecht 2004). Ebenso greifen GCs in den Mechanismus der Migration der T-Zellen in das ZNS ein. Im Rahmen der Entzündungsreaktion im ZNS kommt es zu einer vermehrten Expression der Adhäsionsmoleküle *intercellular cell adhesion molecule-1* (ICAM-1) und *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) auf dem Neuroendothel, was zu einem vermehrten Einstrom von T-Zellen in das ZNS führt (Engelhardt 2006). Als Rezeptorliganden für ICAM-1 und VCAM-1 exprimieren Lymphozyten *very late antigen-4* (VLA-4) und *lymphocyte function associated antigen 1* (LFA-1) auf ihrer Zelloberfläche. Durch Interaktion der Adhäsionsmoleküle mit den Rezeptorliganden auf der Zelloberfläche der Lymphozyten kommt es zur Extravasation und Migration der Zellen über die BHS in das ZNS. Bei Patienten mit RR-MS konnte eine stark erhöhte Expression von LFA-1 und VLA-4 auf Immunzellen, die aus dem Blut und dem Liquor der Erkrankten gewonnen worden waren, gemessen werden. Nach Therapie mit intravenösem Methylprednisolon kam es zu einer deutlichen Reduktion der Rezeptorliganden (Elovaara et al. 2000, Wüst et al. 2008). Durch eine verminderte Produktion von Rezeptorliganden wie LFA-1 und VLA-4 nach GC-Therapie werden die T-Zellen folglich in ihrer Migrationsfähigkeit durch die BHS enorm eingeschränkt. Für die Migration der T-Zellen ist zudem die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, INF- $\gamma$  und TNF notwendig. Deren Sekretion wird durch GCs entscheidend eingeschränkt. Es kommt zu einem Th1/Th2-Shift und somit zu einer vermehrten Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 (Lieberman et al. 2007).

Nicht zuletzt haben GCs einen entscheidenden Einfluss auf die Mikroglia. Zum einen kommt es durch Downregulierung der iNOS (*inducible NO synthase*) zu einer verminderten Produktion von NO durch aktivierte Mikroglia, was zu einer geringeren Schädigung von Oligodendrozyten führt (Golde, Coles et al. 2003). Außerdem führen GCs zu einer verminderten Expression von MHC-II auf der Zelloberfläche der Mikroglia. Dies resultiert in einer Einschränkung des Primings und der Aktivierung von enzephalitogenen T-Zellen (Kiefer und Kreutzberg 1991).

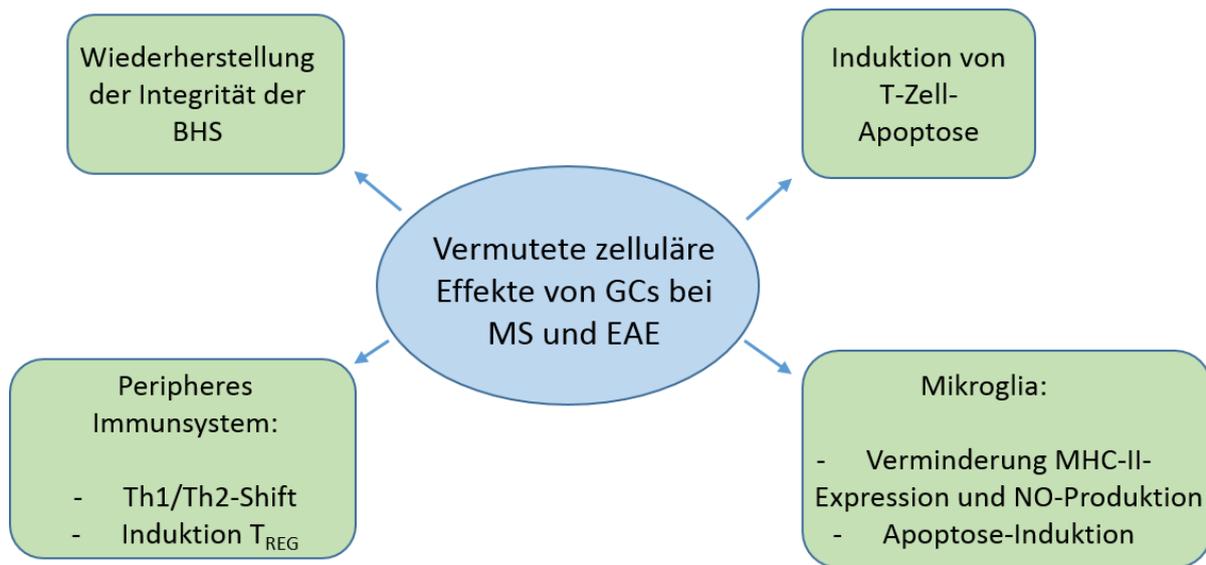


Abb. 3: **Vermutete zelluläre Effekte von Glukokortikoiden (GC)** bei der multiplen Sklerose (MS) und der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE); MHC-II = *major histocompatibility complex II*, NO = Stickstoffmonoxid, BHS= Bluthirnschranke, T<sub>REG</sub> = regulatorische T-Zellen (modifiziert nach Reichardt et al. 2006, Seite 1663)

#### 1.4 GR<sup>dim</sup>-Mäuse

Die bereits kurz angesprochenen GR<sup>dim</sup>-Mäuse wurden 1998 von Reichardt et al. generiert und beschrieben (Reichardt et al. 1998). Es handelt sich hierbei um Tiere, die einen genetisch veränderten GR exprimieren, der nicht zur Ausbildung von Dimeren befähigt ist. Heck et al. erzeugten diesen veränderten GR 1994 erstmals in Zellen durch ortsgerichtete Mutagenese. Durch Einbringen einer Punktmutation veränderten sie die Proteinstruktur der Dimerisierungsstelle des GRs. Die Ausbildung von GR-Dimeren erfolgt vor allem über die D-Schleife im zweiten Zinkfinger des GR (Dahlman-Wright et al. 1991). Durch die Punktmutation A458T ist die Struktur der D-Schleife dahingehend verändert, dass ein stabiles Dimer aus zwei GRs nicht mehr ausgebildet werden kann. Hierdurch ist eine Bindung an die DNA über GREs nicht mehr möglich. (Heck et al. 1994). In *In-Vitro*-Experimenten konnte so gezeigt werden, dass der Mechanismus der Transaktivierung von Genen ausschließlich von der Dimerisierung des GR

und der anschließenden Bindung an GREs in der DNA abhängig ist. Transrepression über die verminderte Expression von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF- $\kappa$ B hingegen war in den genetisch veränderten Zellen weiterhin möglich (Heck et al. 1994). Reichardt et al. generierten 1998 Mäuse, die in allen Zellen die beschriebene Punktmutation *in vivo* ausprägen. Tests bestätigten, dass die Mutation keine Auswirkung auf die Expression des GRs an sich hat. Im Gegensatz zu GR-knock-out-Mäusen sind die generierten Tiere (GR<sup>dim</sup>) überlebensfähig. Anhand verschiedener Versuche konnte die fehlende Dimerisierung des GR in den generierten Tieren bestätigt werden. Beispielsweise ist die Induktion verschiedener Enzyme der Glukoneogenese durch GCs in GR<sup>dim</sup> nicht möglich. Dieser Prozess ist streng von der Bindung des GRs an GREs abhängig (Reichardt et al. 1998). Auch Apoptose ist ein Prozess, der abhängig ist von der Bindung des GR an GREs. Dies konnte mithilfe der GR<sup>dim</sup> gezeigt werden. Thymozyten, die aus GR<sup>+/+</sup> und GR<sup>dim/+</sup> gewonnen worden waren, und solche, die aus GR<sup>dim/dim</sup> isoliert worden waren, wurden jeweils mit und ohne Dex inkubiert. Sowohl bei den Zellen aus GR<sup>+/+</sup> Tieren als auch bei den Zellen aus GR<sup>dim/+</sup> Tieren konnte eine enorm hohe Rate an apoptotischen Zellen gefunden werden. In den Thymozyten aus den GR<sup>dim/dim</sup>-Tieren hingegen konnte durch Dex keine Apoptose induziert werden (Reichardt et al. 1998).

### 1.5 T-Zell-spezifische GR<sup>dim</sup>

Diese T-Zell-spezifischen GR<sup>dim</sup>-Tiere wurden zur gezielten Untersuchung der GR<sup>dim</sup>-Mutation in T-Zellen in Eigenzucht erzeugt. Hierzu wurde das Cre/loxP-System verwendet. Tiere, deren GR gefloxed worden war und in die zusätzlich das Cre-Gen mit einem vorgeschalteten Promotor (Ick) eingebracht worden war, wurden mit heterozygoten GR<sup>dim</sup>-Mäusen gekreuzt (siehe Abb. 4). Bei einem Viertel der Nachkommen mit einem Genotyp GR<sup>flox/dim</sup>/Ick-Cre wurde nun durch die Cre-Rekombinase in Kombination mit dem zellspezifischen Promotor das gefloxtete GR-Allel in allen T-Zellen ausgeschaltet und es verblieb lediglich das GR<sup>dim</sup>-Allel. Folglich wird in eben diesen Nachkommen spezifisch auf T-Zellen der mutierte GR<sup>dim</sup>-Rezeptor exprimiert, während auf allen anderen Zellen der gefloxtete wt-GR erhalten bleibt, der sich wie ein normaler wt-GR verhält.

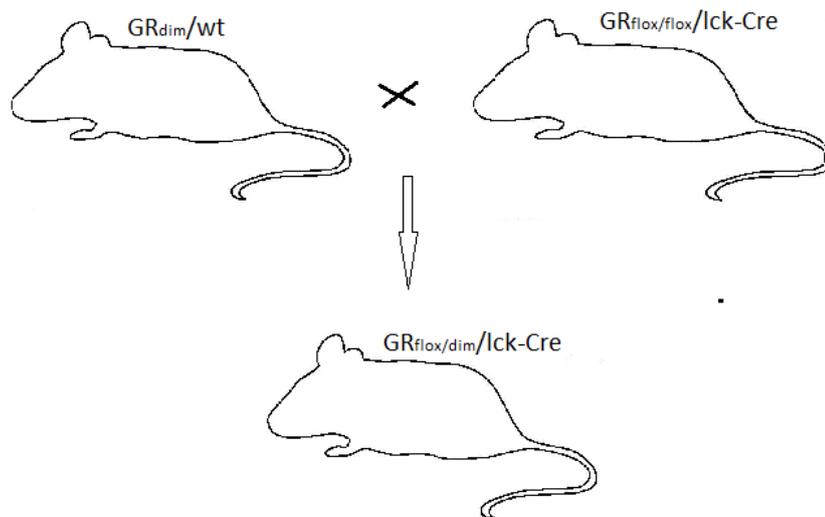


Abb. 4: **Kreuzungsschema zur Generierung T-Zell-Spezifischer GR<sup>dim</sup>-Mäuse.** Aus der Kreuzung von GR<sup>dim</sup>/wt-Mäusen mit GR<sup>flox/flox</sup>/Ick-cre-Mäusen gehen die abgebildeten GR<sup>flox/dim</sup>/Ick-Cre-Tiere hervor, die nur auf T-Zellen den GR<sup>dim</sup>-Rezeptor exprimieren.

## 1.6 Ziel der Arbeit

Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen Analysen, die mithilfe von immunologischer Grundlagenforschung am Beispiel der EAE zu einem besseren Verständnis der Wirkmechanismen der GC-Therapie bei der MS und somit zu einer Optimierung der Therapie führen sollten. Die Therapie der MS mithilfe von GCs birgt das Risiko erheblicher Nebenwirkungen für die Patienten. Würde der Mechanismus, über den GCs wirken besser verstanden werden, könnten neuere und bessere Medikamente entwickelt werden, die nur den tatsächlich notwendigen Wirkmechanismus besitzen, jedoch keine oder nur geringe Nebenwirkungen mit sich bringen würden. Hierzu wurden zwei verschiedene Fragestellungen bearbeitet:

1. Sind Effektor- oder Bystander-T-Zellen der Hauptangriffspunkt der GCs?

In den ZNS-Läsionen finden sich sowohl bei der EAE als auch bei der MS eine Vielzahl von verschiedenen Zellen. Hierzu zählen auch Effektor- und Bystander-T-Zellen. Wüst et al. zeigten 2008, dass periphere T-Zellen der Hauptangriffspunkt der GC-Therapie darstellen. Zur weiteren Differenzierung zwischen dem therapeutischen Effekt auf Effektor- und Bystander-T-Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst versucht, ein entsprechendes Tiermodell zu entwickeln. Hierzu wurde in unterschiedlichen experimentellen Ansätzen versucht, Mäuse zu generieren, bei denen jeweils eine der Zellpopulation einen kompetenten GR exprimierten, während die andere Zielzellpopulation ohne intakten GR

verbleiben sollte. So sollte in nachfolgenden klinischen Experimenten die Therapierbarkeit der Tiere unter den jeweils verschiedenen Szenarien beobachtet und untersucht werden.

2. Welcher Mechanismus ist neben der Induktion von Apoptose ein relevanter Faktor für die Therapierbarkeit der EAE durch GCs?

Für die Klärung dieser Frage wurden GR<sup>dim</sup>- und T-Zell-spezifische GR<sup>dim</sup>-Tiere verwendet. In früheren Arbeiten ist beschrieben, dass Apoptose von T-Zellen, zum einen im ZNS (Nguyen et al. 1997) und zum anderen in sekundären peripheren Lymphorganen (Wüst et al. 2008), ein wichtiger Ansatz im Wirkmechanismus der GCs bei der EAE und der MS sind. Im Rahmen eines klinischen Versuches mit T-Zell-spezifischen GR<sup>dim</sup>-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Tiere trotz fehlender Apoptose-Induktion in den T-Zellen therapierbar sind. Im Folgenden wurden mithilfe von Proliferations-Assays, ELISA, PCR und durchflusszytometrischen Analysen mögliche andere Angriffspunkte von GCs untersucht. Hierbei fokussierten wir uns vor allem auf Adhäsionsmoleküle, Zytokine und davon abhängende Migrationseigenschaften der enzephalitogenen T-Zellen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Geräte

---

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

---

### 2.2 Antikörper

---

AnnexinV-Cy 5	BD Pharmingen, Kalifornien, USA
Anti-GITR	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
Anti-rat-IgG (H+L) biotinyliert	Vector, Burlingame, USA
Anti-CD11a/Anti-CD3	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
Anti-CD4/Anti-CD44	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
Anti-IL-17	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
Anti-mouse GM-CSF (1:250)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Anti-mouse IFN $\gamma$ mAb (1:250)	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
Anti-mouse IL-17 (1:250)	R&D Systems, Minneapolis, USA
B220-bio + SA-Per-Cp	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
Biotinylierter Anti-mouse IL-17 (1:250)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Biotinylierter Anti-mouse GM-CSF (1:250)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Biotinylierter Anti-mouse IFN $\gamma$ mAb (1:250)	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
CD11b-Pe-Cy7	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
CD80-APC	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
F480-FITC	AbD Serotech, Puchheim, BRD
Fc-Block	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
GR1-APC-Cy7	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
MHC-II-PE	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
Mouse-IFN $\gamma$ /IL-10 ELISA-Set, BD OptEIA	BD Biosciences, Heidelberg, BRD

---

Pan T Cell Isolation Kit	MilentyiBiotec, Berg. Gladbach, BRD
Rat anti human CD3	AbD Serotech, Puchheim, BRD
Rat anti mouse Mac3 mAb	BD Biosciences, Heidelberg, BRD

### 2.3 Arzneimittel

Dexa-ratiopharm 100 mg Injektionslösung	Ratiopharm, Ulm, BRD
Ketamin Inresa 50mg/ml	Inresa, Freiburg, BRD
Rompun 2%	Bayer Leverkusen, BRD

### 2.4 Chemikalien

[ <sup>3</sup> H]-Thymidin	MP Biomedicals, Heidelberg, BRD
1% Penicillin/Strepomycin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, BRD
7-AAD	eBioscience, Oregon, USA
Bovines-Serum-Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, BRD
Concavalin A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
DAB Puffertabletten	Merck, Darmstadt, BRD
DEPC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
Dinatriumhydrogenphosphatwasserf./ · H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe, BRD
DMEM (0,1 g bzw. 4,5 g/l Glukose)	PAN Biotech, Aidenbach, BRD
DNase I	Roche Diagnostics, Basel, CH
EDTA Dinatriumsalz · H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe, BRD
Entellan/Eosin gelblich	Merck, Darmstadt, BRD
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, BRD
FIX/Perm-Lösung (1:4)	eBioscience, Oregon, USA
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe, BRD
General Caspase Inhibitor	R&D Systems, Wiesbaden, BRD
Glukose wasserfrei/ · H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, BRD
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Roth, Karlsruhe, BRD
Incomplete Freund Adjuvans	Difco, Kansas, USA
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Kaliumchlorid/Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, BRD
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe, BRD
Methanol	Roth, Karlsruhe, BRD

---

Mini RNA Isolation Kit	Zymo Research, Freiburg, BRD
MOG <sub>35-55</sub> -Petid	Charité, Berlin, BRD
Mycobacterium tuberculosis H37RA	Difco, Kansas, USA
Natriumazid/Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe, BRD
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, BRD
Natriumdihydrogenphosphat· H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe, BRD
Natriumhydrogencarbonat/Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe, BRD
Natriumpyruvat	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, BRD
Normal Rabbit Serum	Jackson Laboratories, Suffolk, UK
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, BRD
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, BRD
Percoll	GE Healthcare, Freiburg, BRD
Permeabilisierungspuffer (Perm-Puffer)	eBioscience, Oregon, USA
Pertussistoxin	List Biological Laborat., California, USA
Power SYBR® green	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
Qiagen RNeasy® Plus Universal Kit	Qiagen, Hilden, BRD
RPMI 1640	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, BRD
Streptavidin-Biotin-Komplex (Peroxidase-gekoppelt)	Dako, Hamburg, BRD
Taq-Polymerase	Eppendorf, Hamburg, BRD
Thioglykolat (4%)	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
TMB Substrate Reagent Set, BD OptEIA	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
TRIS-HCl/Ultra Qualität <99,9%	Roth, Karlsruhe, BRD
Trypsin-EDTA (0,05%)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, BRD
Tween 20/Wasserstoffperoxid/Zitronensäure	Roth, Karlsruhe, BRD
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, BRD

---

## 2.5 Medien

---

### **EH-Medium**

DMEM

2,5 mmol/l HEPES Puffer

1 % Penicillin/Streptomycin

### **RPMI-10 Medium**

RPMI 1640

10 % *heat inactivated* FCS (30 min bei 56°C)

1 % Penicillin/Streptomycin

---

---

**HEK-Zell-Medium**

DMEM (4,5 g/l Glukose + Glutamin)  
15 % FCS  
1 % Penicillin/Streptomycin

---

**2.6 Reagenzlösungen****Ketamin-Xylazin-Narkose**

16 % (V/V) Ketanest® [50 mg/ml]  
4 % (V/V) Rompun® 2 %  
80 % (V/V) Natriumchlorid (0,9 %)

**4 % PFA (pH 7,3)**

4 % (m/V) Paraformaldehyd  
1 x PBS

**Gries-Reagenz**

50 µl Naphthylethylendiamin  
50 µl Sulphanilamid

**Eosin-Lösung**

0,1 % (m/V) Eosin gelblich  
0,15 % (V/V) Essigsäure  
Ethanol (70 %)

**POD-Block**

71,4 % (V/V) Methanol  
1,4 % (m/V) Natriumazid  
17,9 % (V/V) Wasserstoffperoxid (3%)

---

**2.7 Pufferlösungen****10x AnnexinV-Bindungspuffer**

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

**10X PBS (pH 6,7)**

1,369 mol/l Natriumchlorid  
100 mmol/l Dinatriumhydrogenphosphat  
100 mmol/l Na-Dihydrogenphosphat H<sub>2</sub>O  
27 mmol/l Kaliumchlorid

**1x TBS**

50 mmol/l TRIS  
150 mmol/l Natriumchlorid

**Citratpuffer (pH 6,0)**

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

**FACS-Puffer**

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

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

7,13 g Natriumhydrogenphosphat  
1,59 g Natriumcarbonat  
10 M NaOH bis pH 9,5

**0,15 mol/l Phosphat-Puffer (pH 7,2-7,4)**

137 mM Natriumchlorid  
2,7 mM Kaliumchlorid  
8,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat  
1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat

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

83 mmol/l Natriumhydrogenphosphat  
117 mmol/l Na-Dihydrogenphosphat H<sub>2</sub>O

**EDTA-Lösung**

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

**Percoll-Verdünnungspuffer**

0,1 % BSA  
1,0 % Glukose  
1 x PBS

---

---

<b>Lysis-Puffer</b>		<b>Resuspensionspuffer</b>	
100 mmol/l	TRIS (pH 8,5)	0,1%	BSA
200 mmol/l	Natriumchlorid	1,0%	Glukose
5 mmol/l	EDTA (pH 8,0)	100 µg/l	DNase I
0,2%	Natriumdodecylsulfat	1x PBS	

---

## 2.8 Tierexperimente

### 2.8.1 Generierung und Zucht

Für die durchgeführten Experimente, die Induktion der EAE und die Therapie mit Glukokortikoiden wurden vorwiegend C57/Bl6-Mäuse und GR<sup>dim</sup>-Mäuse verwendet. Die Tiere stammten aus Eigenzucht. Die Generierung der GR<sup>dim</sup>-Mäuse ist in 1.4. beschrieben. Auch die in 1.5. beschriebenen T-Zell-spezifischen GR<sup>dim</sup>-Tiere stammten aus Eigenzucht.

Die GR<sup>dim</sup>-Mäuse reproduzierten sich im Verlauf sehr schlecht, weswegen für die Fortführung der Experimente Knochenmarksstammzellchimären generiert und verwendet wurden. Für die Herstellung von GR<sup>dim</sup>-Stammzellchimären wurden CD45.1-C57/Bl6-Mäuse mit 12,5 Gy bestrahlt und mit Knochenmarksstammzellen CD45.2-GR<sup>dim</sup>-Mäuse rekonstituiert. Als Kontrollgruppe wurden Stammzellchimären verwandt, für die CD45.1-C57Bl/6-Mäuse mit 12,5 Gy bestrahlt wurden und anschließend mit Knochenmarksstammzellen von CD45.2-C57Bl/6-Mäusen rekonstituiert wurden.

Des Weiteren wurden bei einigen Experimenten RAG-1-defiziente Mäuse, die ebenfalls aus Eigenzucht stammten, eingesetzt. Diese wurden primär von *Jackson Laboratories* bezogen. Die RAG-1-defiziente Mauslinie wurde 1992 von Mombaerts et al. entwickelt. Die Tiere tragen eine Mutation im *recombination activation gene* (RAG-1) und besitzen keine reifen B- und T-Lymphozyten (Mombaerts et al. 1992).

Für die Gewinnung von grün-fluoreszierenden T-Zellen, die in einigen der ersten Experimente verwendet wurden, wurden 2D2/GFP<sup>+</sup>-Tiere verwendet. Für diese wurden 2D2-Mäuse und GFP<sup>+</sup>-Tiere in laboreigener Zucht gekreuzt. Die 2D2-Tiere stammten von Vijay Kuchroo (Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, USA). Diese C57/Bl6-Mäuse tragen einen transgenen T-Zell-Rezeptor (TCR), der spezifisch für das MOG<sub>35-55</sub> ist (Bettelli et al. 2003). Die GFP<sup>+</sup>-Mäuse wurden 1997 von Okabe et al. entwickelt. cDNA von *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) wurde hierzu unter Zuhilfenahme eines Beta-Actin-Promotors und eines Cytomegalievirus-Enhancers in das Erbgut von BCF1-Tieren eingebracht. Alle Gewebe dieser transgenen Mäuse, ausgenommen Erythrozyten und Haare, fluoreszierten grün unter anregendem Licht (Okabe et al. 1997).

Ebenso wurden 2D2-IckGR-Tiere als Zellspender für den T-Zell-Transfer in RAG-1-defiziente Mäuse verwendet. Die Tiere stammten aus Eigenzucht und exprimieren keinen GR auf MOG-spezifischen T-Zellen.

### 2.8.2 Induktion der EAE

Die Induktion der EAE erfolgte durch aktive Immunisierung der Tiere. Hierzu wurden die Mäuse mit einer Mischung aus Ketamin und Xylazin narkotisiert. Anschließend wurde ihnen eine Emulsion aus 50 µg MOG<sub>35-55</sub>-Peptid und 50 µg CFA subcutan rechts und links des Schwanzansatzes injiziert. Zudem

erhielten die Tiere am Tag der Immunisierung sowie am Tag 2 nach Immunisierung jeweils eine Dosis von 200 ng Pertussistoxin (in 200 µl PBS) intraperitoneal. (Siehe Abbildung 5)

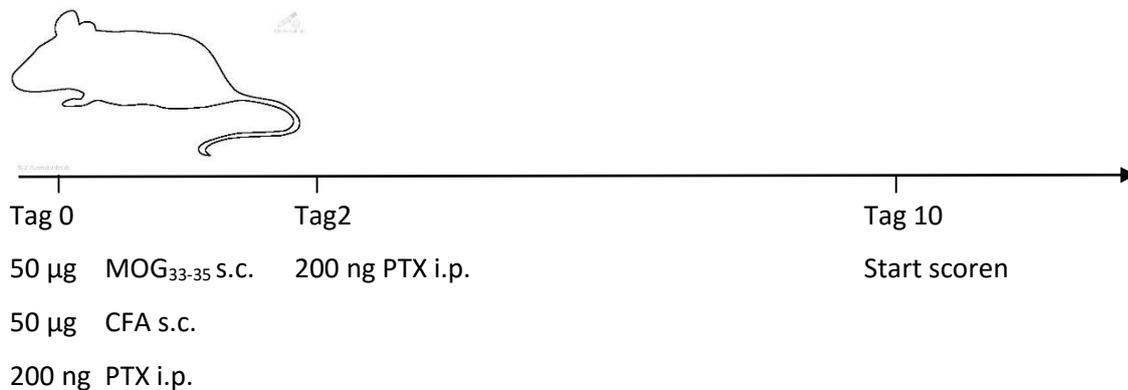


Abb. 5: **Zeitschema der aktiven Immunisierung der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE).** An Tag 0 erfolgt die Immunisierung der Mäuse mittels subcutaner (s.c.) Gabe von Myelinoligodendrozyten-Protein MOG<sub>33-35</sub> emulgiert im Kompletten Freundschens Adjuvans (CFA) sowie der intraperitonealen (i.p.) Gabe von Pertussistoxin (PTX). Die Gabe von PTX i.p. wird an Tag 2 wiederholt. Ab Tag 10 nach der Immunisierung beginnen die Tiere erste Symptome der EAE zu entwickeln.

Ab dem zehnten Tag nach Immunisierung wurden die Tiere täglich gewogen und ihr Krankheitsgrad anhand des folgenden EAE-Scores festgelegt und kontrolliert:

- |    |   |
|----|---|
| 0  | keine Symptome  |
| 1  | reduzierter Schwanztonus  |
| 2  | Schwanzlähmung  |
| 3  | Fehlen reflektorischer Ausgleichbewegungen beim Gehen             |
| 4  | Gangataxie  |
| 5  | leichte Lähmung der Hinterbeine                                   |
| 6  | Plegie eines Beines oder mittelgradige Lähmung beider Hinterbeine |
| 7  | Paraplegie mit kompletter Lähmung der Hinterbeine                 |
| 8  | Tetraparese mit (leichter) Lähmung auch der vorderen Extremitäten |
| 9  | moribund  |
| 10 | tot   |

Alle Versuche wurden nach den Vorschriften des Tierschutzgesetzes des Landes Niedersachsen durchgeführt und sind von der entsprechenden Behörde genehmigt worden (33.14-42502-04-107/08).

### **2.8.3 Therapeutische Behandlung**

Zur therapeutischen Behandlung wurde den Tieren bei einem EAE-Score zwischen 2 und 3 an drei aufeinanderfolgenden Tagen eine körperrgewichtsadaptierte Dosis Dexamethason von 100 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert.

## **2.9 Zellbiologische Methoden**

### **2.9.1 Einzelzellsuspension aus Lymphknoten und Milz**

Lymphknoten und Milzen wurden den Mäusen entnommen und in 15-ml-Falcons, gefüllt mit EH-Medium, überführt. Um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, wurden die Organe zusammen mit dem Medium auf jeweils ein Zellsieb gegeben und mit einem 1-ml-Spritzenstempel für die Lymphknoten und einem 5-ml-Spritzenstempel für die Milzen durch das Sieb in eine Petrischale passiert. Die Zellsuspension in der Petrischale wurde resuspendiert und zurück in die 15-ml-Falcons überführt. Anschließend wurden die erhaltenen Zellsuspensionen zentrifugiert (8 min, 1200 rpm, 4°C).

Die Überstände wurden abgesaugt, das Zellpellet in EH-Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach erneutem Absaugen des Überstandes wurden die aus Lymphknoten gewonnenen Zellpellets in jeweils 2 ml und die Milzzellpellets in jeweils 10 ml EH-Medium resuspendiert. Dann wurde die Zellzahl mithilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt.

### **2.9.2 Bestimmung der Zellzahl**

Für die Zellsuspensionen aus Lymphknoten wurden 10 µl Trypanblaulösung, für die Milzzellsuspension 90 µl eben dieser Lösung vorgelegt (Verdünnungsfaktor). Je 10 µl der Zellsuspensionen wurden in die jeweils vorgelegten Mengen an Trypanblaulösung gegeben. 10 µl der jeweiligen Mischungen wurden auf eine *Neubauer-improved*-Zählkammer überführt. 16 Kleinquadrate wurden unter dem Mikroskop ausgezählt und anschließend die Zellzahl wie folgt berechnet:

Zellzahl/ml = gezählte Zellen x Verdünnungsfaktor x 10<sup>4</sup> (Multiplikationsfaktor)

### **2.9.3 Perfusion**

Um Leukozyten aus dem Rückenmark isolieren zu können, wurden die Tiere perfundiert. Hierzu wurden sie mit einer Ketamin-Xylozin-Mischung narkotisiert. Anschließend wurde der Brustkorb eröffnet und mit einer Injektionskanüle der linke Ventrikel punktiert. Über die Injektionskanüle wurde eine Infusion mit 0,9%igem NaCl-Lösung angeschlossen und die Mäuse so über einen Zeitraum von ca. 10 Minuten perfundiert. Für die Präparation des Rückenmarks für Histologie und Immunhistochemie wurde der Perfusion mit 0,9%iger NaCl zur Fixierung der Gewebe eine Perfusion mit 4%iger PFA-Lösung angeschlossen.

#### **2.9.4 Isolierung von Leukozyten aus dem Rückenmark mittels Dichtezentrifugation**

Nach der Perfusion wurde das Rückenmark präpariert und in 1xPBS überführt. Das Rückenmark wurde mit einem 10-ml-Spritzenstempel in einer Petrischale passiert und in 20 ml Resuspensionspuffer gelöst. Die RM-Suspension wurde in ein Falcon überführt und zentrifugiert (10 min, 1600 rpm, 4°C). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 6 ml 30%iger Percoll-Lösung resuspendiert.

In der Zwischenzeit wurde ein Percoll-Gradient erstellt. Dazu wurden 4 ml einer 45%igen Percoll-Lösung in 15-ml-Falcons pipettiert. Anschließend wurden 2ml einer 70%igen Percoll-Lösung mit einer Spritze der 45%igen Percoll-Lösung unterlegt.

Im nächsten Schritt wurde die RM-Zellsuspension vorsichtig mit einer 2-ml-Spritze auf den Gradienten aufgetragen und die fertigen Gradienten zentrifugiert (20 min, 2300 rpm –ohne Bremse-, 4°C). Hierbei setzte sich das Myelin auf dem Gradienten ab, die Leukozyten sammeln sich in den beiden Interphasen. Das Myelin wurde abgesaugt und die Leukozyten mit einer Spritze in den Interphasen abgenommen. Die Leukozyten wurden in frische 50-ml-Falcons gegeben und mit 1xPBS gewaschen (10 min, 1200 rpm, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen. Das Zellpellet wurde für die weitere Verarbeitung in den entsprechenden Lösungen aufgenommen. Für eine anschließende FACS-Analyse wurde das Zellpellet in FACS-Puffer aufgenommen und die Zellzahl ermittelt. Für eine anschließende PCR-Analyse wurden die Zellen in EH-Medium aufgenommen und die Zellen mikroskopisch gezählt.

#### **2.9.5 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Unterscheidung von Zellen anhand ihrer Größe und Struktur sowie anhand extra- und intrazellulärer Antigene. Hierzu werden die zu untersuchenden Zellen mit Antikörpern inkubiert, die gegen bestimmte Oberflächenantigene der Zellen gerichtet sind. Die Antikörper sind entweder direkt oder über eine Biotin-Streptavidin-Verbindung an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt.

Die somit markierten Zellen werden im Durchflusszytometer einzeln an einem Laser vorbeigeleitet. Die gestreute und reflektierte Strahlung des Lasers wird vom Gerät wieder aufgenommen und ermöglicht eine Umrechnung des emittierten Lichtes in Größe und Granularität der Zellen und somit eine Zuordnung der Zellen in Subpopulationen. Zudem werden die fluoreszierenden Antikörper angeregt, wodurch Aussagen über die Beschaffenheit der Oberflächenantigene auf den jeweiligen Zellen gemacht werden können. Hierdurch können die Zellen in weitere kleinere Subpopulationen eingeordnet werden.

Auch eine intrazelluläre Markierung und somit Charakterisierung der Zellen ist möglich.

Für die extra- und intrazelluläre Färbung wurden 500.000 Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen (5 min, 1200 rpm, 4°C). Nach Abnehmen des Überstandes wurde eine Mischung aus den entsprechenden Antikörpern zu den Proben hinzu pipettiert. Die Proben wurden

gut vermischt und bei 4°C für 15 Minuten inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgte erneut ein Waschen der Zellen mit 3 ml FACS-Puffer und anschließendem Zentrifugieren.

Für die intrazelluläre Färbung (z.B. IL-17) wurden die Zellen mit je 250 µl FIX/Perm-Lösung (1:4) versetzt und für 30 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Hierdurch wurden die Zellen fixiert und die Zellmembran permeabel gemacht. Daraufhin folgten drei Waschschrte – einmal mit 3 ml FACS-Puffer und zweimal mit 1 ml 1x Permeabilisierungspuffer (1x Perm-Puffer). Im nächsten Schritt wurden die Proben für 15 Minuten im Dunkeln mit je 100 µl 2%igem Rattenserum/1xPerm-Puffer blockiert. Zuletzt wurde den Zellen eine Mischung aus je 100 µl 1xPerm-Puffer und den gewünschten Antikörpern zugesetzt, ein weiteres Mal für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert sowie anschließend zweimal mit je 1 ml 1xPerm-Puffer gewaschen. Die gefärbten Zellen wurden in 250 µl FACS-Puffer aufgenommen und mit den Geräten FACS *Calibur* beziehungsweise FACS *Canto* gemessen und mit dem Programm *CellQuest™* ausgewertet.

Für die Apoptose-Untersuchung mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen mit 7-Aminoactinomycin (7-AAD) sowie mit AnnexinV (AxV) gefärbt. 7-AAD ist ein Farbstoff, der mit der DNS interkaliert. AxV ist ein Protein, das kalziumabhängig an membranständige Phospholipide bindet. Durch die Färbung mit diesen zwei Substanzen ist eine Unterscheidung von lebenden Zellen (7-AAD negativ, AxV negativ) und Zellen möglich, die sich in einem frühen (7-AAD negativ, AxV positiv) und einem späten (7-AAD positiv, AxV positiv) Apoptose/Nekrose-Stadium befinden.

Die Apoptose-Untersuchung wurde sowohl an Zellen durchgeführt, die aus den Milzen von Dex- beziehungsweise PBS-behandelten Tieren gewonnen worden waren, als auch an Zellen die *in vitro* mit Dex beziehungsweise PBS inkubiert worden waren.

Die durchflusszytometrischen Analysen wurden zu großen Teilen in Kooperation mit Herrn Dr. Jens van den Brandt aus der Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie durchgeführt.

### **2.9.6 Proliferations-Assay**

Um die Frage zu klären, ob Dex unspezifisch auf die gesamte Funktionalität von Zellen wirkt, wurde ein Proliferations-Assay durchgeführt.

Zunächst wurden Einzellzellsuspensionen aus den Milzen der erkrankten Tiere hergestellt. Je 600.000 Milzzellen in 100 µl Medium wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert. Hierauf folgte die Stimulation mit 20 µg/ml MOG<sub>35-55</sub>, 20 µg/ml ConA oder Medium (Kontrolle) und die Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> über 48 Stunden. Nach der Inkubationszeit wurden pro Well 25 µl <sup>3</sup>H-Thymidin zu den Zellen gegeben und erneut - unter gleichen Bedingungen wie bei der ersten Inkubation - für 16 Stunden inkubiert. <sup>3</sup>H-Thymidin wird als radioaktiv markiertes Nukelosid im Rahmen der Zellteilung und Proliferation in die DNA der Zellen eingebaut und kann später mithilfe eines Counters gemessen werden. Von der Menge an in die DNA eingebautem <sup>3</sup>H-Thymidin kann dann auf die Proliferationsrate rückgeschlossen werden.

### 2.9.7 Zytokinbestimmung mittels ELISA

Der ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, basierend auf einer enzymatischen Farbreaktion und zählt zu den quantitativen Immunoassays. In dieser Arbeit wurde er genutzt, um die Konzentration von sezernierten Zytokinen in T-Zell-Suspensionen zu bestimmen.

Als Material für die Zytokinbestimmung wurden Einzelzellsuspensionen aus den Milzen erkrankter Tiere verwendet. Zunächst wurden je 6 Millionen Splenozyten in eine 24-Well-Platte pipettiert. Zur Stimulation wurden 20 µg/ml MOG<sub>35-55</sub>, 20 µg/ml ConA oder Medium (Kontrolle) hinzugegeben und die Proben bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 72 Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben bei 830g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und wie folgt für die Bestimmung der Zytokine GM-CSF, IL-17 und INF $\gamma$  via ELISA verarbeitet:

Zunächst wurden 96-Well-Flachbodenplatten ge-coated. Hierzu wurden die je 50µl des jeweiligen *Capture*-Antikörpers in dem dafür vorgesehenen Puffer (Tabelle 1) über Nacht inkubiert. Für GM-CSF erfolgte dies bei Raumtemperatur (RT), für IL-17 und INF $\gamma$  bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit PBS + 0,05 % Tween 20 wurden je 200 µl einer entsprechenden Blocking Reagenz (Tabelle 1) in jede Vertiefung gegeben und für 1 Stunde bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Es folgte ein erneuter dreimaliger Waschschrift mit 0,05% Tween 20 in PBS. Im nächsten Schritt wurden die Proben sowie Standardlösungen auf die Platten gegeben. Die Standardlösungen bestanden hierbei aus einer, vom Hersteller vorgegebenen, Verdünnungsreihe. Die Proben wurden nun für weitere 2 Stunden bei RT inkubiert und danach sechsmalig mit 0,05 % Tween 20 in PBS gewaschen. Hierauf wurden die Platten mit je 50 µl/Well Detektions-Antikörper (Tabelle 1) versetzt. Bei den Ansätzen für INF $\gamma$  wurden zusätzlich 50 µl/Well HRP-Reagenz hinzugegeben. Die INF $\gamma$ -Ansätze wurden bei RT für eine Stunde inkubiert. Zu den Ansätzen für GM-CSF und IL-17 wurden nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei RT und sechsmaligem waschen nun ebenfalls die HRP-Reagenz in die Wells gegeben und für weitere 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach einem erneuten sechsmaligen Waschschrift bei allen Ansätzen, erfolgte die Zugabe von 100 µl/Well TBM-Substanz und eine Inkubation für 30 Minuten bei RT im Dunkeln. Zum Stoppen der Farbentwicklung wurde einmolare Schwefelsäure verwendet (50 µl/Well). In einem letzten Schritt konnte nun die stattgehabte Farbreaktion mithilfe eines Photometers bei 450 nm Wellenlänge gemessen werden und hierdurch auf die Konzentration der jeweiligen Zytokine rückgeschlossen werden.

Zytokin	Capture-AK	Puffer	Blocking-Reagenz	Detektions-AK
IFN $\gamma$	Anti-mouse IFN $\gamma$ mAb (1:250), BD	0,1 mol/l Carbonat-Bicarbonat-Puffer, pH 9,5	PBS + 10 % FCS, pH 7,0	Biotinylierter Anti-mouse IFN $\gamma$ mAb (1:250), BD
IL-17	Anti-mouse IL-17 (1:250), R&D	0,15 mol/l Phosphat-Puffer pH 7,3	PBS + 1 % BSA	Biotinylierter Anti-mouse IL-17 (1:250), R&D
GM-CSF	Anti-mouse GM-CSF (1:250), R&D	1x PBS, pH 7,4	PBS + 5 % Sucrose + 1 % BSA + 0,05 % NaN <sub>3</sub>	Biotinylierter Anti-mouse GM-CSF (1:250), R&D

Tabelle 1: **Zytokinbestimmung mittels ELISA** - Auflistung der verwendeten Capture-AK, Puffer, Blocking-Reagenzen und Detektions-AK

### 2.9.8 Isolierung von Makrophagen aus dem Peritoneum

Zur Untersuchung der Wirkung von Dexamethason auf Makrophagen wurden diese im Peritoneum der Versuchstiere angereichert und nach einigen Tagen entnommen.

Zur Anreicherung der Makrophagen im Peritoneum wurde den Mäusen je 1 ml 4 %iges Thioglykolat intraperitoneal injiziert. 66 Stunden später wurden die Tiere mit Dexamethason (100 mg/kg Körpergewicht) oder PBS als Kontrolle behandelt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Makrophagen aus dem Peritoneum isoliert. Dazu wurden die Tiere getötet und der Bauchraum eröffnet. Anschließend wurde der Bauchraum 3 mal in Folge mit jeweils 2 ml eiskaltem, sterilem PBS über eine Plastikpipette gespült. Die so gewonnene Zellsuspension wurde in ein 15-ml-Falcon überführt und 2 mal mit PBS gewaschen (je 5 min, 1200 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in je 1 ml RPMI-10-Medium +FCS +P/S resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt.

### 2.9.9 NO-Test via Gries-Reaktion

Für den NO-Test wurden die gewonnenen Zellsuspensionen in 96er-Well-Platten mit Flachboden ausplattiert (je  $1 \times 10^6$  Zellen/Well in einem Endvolumen von je 200  $\mu$ l). Um eine möglichst reine Makrophagenpopulation zu erhalten, wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt für 3 Stunden inkubiert. Daraufhin wurden nichtadhärente Zellen durch dreimaliges Waschen mit sterilem PBS entfernt. Im nächsten Schritt wurden die Wells erneut mit 200  $\mu$ l Medium beziehungsweise 195  $\mu$ l Medium + 1  $\mu$ l IFN $\gamma$  (100  $\mu$ g/ml) + 4  $\mu$ l LPS (1 mg/ml) versetzt.

Weitere 48 Stunden später wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und in Eppendorf-Cups überführt.

Die Detektion und Konzentrationsbestimmung der gebildeten Menge an NO basiert auf einer Farbreaktion, die durch die Diazonisierung mit 100  $\mu$ l Gries-Reagenz (50  $\mu$ l Naphthylethylendiamin + 50  $\mu$ l Sulphanilamid) durchgeführt wird.

Hierzu wurden die Zellkulturüberstände in eine frische 96-Well-Platte pipettiert. In dieselbe Well-Platte wurden verschiedene Konzentrationen von NaNO<sub>2</sub> (1 µM, 3 µM, 7,5 µM, 15 µM, 31,3 µM, 62,5 µM, 125 µM) als Eichgrad für die spätere photometrische Bestimmung der NO-Konzentration in den zu untersuchenden Zellüberständen pipettiert. Im nächsten Schritt wurden sowohl die Zellüberstände als auch die Eichgrade mit je 50 µl Sulphonilamid versetzt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Daraufhin wurden je 50 µl Naphthylethylendiamin hinzugegeben, wodurch sich die Proben, je nach Konzentration an NO, in verschiedenen Pinktönen verfärbten. Der Farbumschlag der Proben wurde mittels eines Photometers bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen und konnte anhand der Eichgrade auf der Platte in die entsprechenden NO-Konzentrationen umgerechnet werden.

### **2.9.10 Stimulation der Makrophagen für FACS-Analyse**

Für eine weiterführende FACS-Analyse wurden die Zellsuspensionen nach Gewinnung aus dem Peritoneum der Tiere in 6er-Well-Platten ausplattiert (5 ml pro Well mit allen Zellen, die nach Entnahme der Zellen für den NO-Test übrig geblieben waren). Diese Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 6 Stunden inkubiert und anschließend die nicht adhären Zellen durch dreimaliges Waschen mit sterilem PBS entfernt. Anschließend wurden die gewonnenen Makrophagen von der Platte vorsichtig abgeschabt, die Platte mehrfach mit sterilem PBS gespült und die so entstehende Zellsuspension in einem 15-ml-Falcon gesammelt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (je 9 min, 1000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml PBS aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt.

500.000 Zellen wurden in je ein FACS-Röhrchen überführt und mit folgenden Antikörpern gefärbt:

Fc-Block, F480-FITC, MHCII-PE, B220-bio + SA-Per-Cp, CD11b-Pe-Cy7, CD80-APC, GR1-APC-Cy7

Die Messung erfolgte am *FACS Canto*.

### **2.9.11 Dex-Apoptose-Assay**

Zur Überprüfung der Apoptose in Splenozyten, die den GR<sup>dim</sup>-Rezeptor exprimieren, wurde ein Dex-Apoptose-Assay durchgeführt. Hierzu wurden die bereits beschriebenen IckGR<sup>dim</sup>-Tiere verwendet. Nach Entnahme der Milzen wurden aus diesen die Splenozyten isoliert und Einzelzellsuspensionen hergestellt. Aus einer Dex-Stammlösung (10<sup>-3</sup> M) wurde eine Verdünnungsreihe durch 1/10-Verdünnungen mit PBS hergestellt. Eine 96-Well-Platte wurde unter sterilen Bedingungen mit pro Well 200 µl RPMI-Medium, 3 x10<sup>5</sup> Zellen und 2 µl der Dex-Vorverdünnung befüllt, so dass am Ende die Dex-Verdünnungen 10<sup>-7</sup> bis 10<sup>-9</sup> M vorlagen. Es folgte eine Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 20 Stunden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und in FACS-Puffer aufgenommen. Es folgte ein Waschschrift mit FACS-Puffer und Zentrifugation mit 1500 rpm für 5 Minuten. Im nächsten Schritt folgte eine Färbung der Zellen mit Antikörpern (CD4, CD8, TCRβ), um bei der späteren FACS-Analyse die Zellpopulationen voneinander unterscheiden zu können. Nach Inkubation bei 4 °C für 15

Minuten in Dunkelheit zur Bindung der Antikörper folgte ein Waschschrift. Nun wurde je 100 µl Annexin-Bindungspuffer, 1 µl AxV-Cy5 und 3 µl 7-AAD zu den Proben gegeben und wiederum für 15 Minuten bei 4 °C und in Dunkelheit inkubiert. Die anschließende Messung erfolgte am BD-FACS *Canto*.

## **2.10 Histologie und Immunhistochemie**

### **2.10.1 Gewebefixierung und Paraffin-Konservierung**

Für die Gewinnung von Gewebe für die Histologie wurden die Tiere mittels einer Ketamin-Xylazin-Mischung narkotisiert und anschließend, wie bereits in 2.9.3 beschrieben, über die linke Herzkammer perfundiert. Das Rückenmark eines jeden Tieres wurde präpariert, die lumbalen Anteile mit einem Skalpell abgetrennt und für 2 Stunden in 4 %iger PFA-Lösung fixiert. Anschließend wurden die lumbalen RM-Anteile mehrmals mit PBS gewaschen und mithilfe des Skalpells in ca. 5 mm große Stücke geschnitten. Die RM-Teile wurden in Einbettungskästen gegeben und über Nacht in einer aufsteigenden Alkoholreihe (1 x Ethanol 50 %, 1 x Ethanol 70 %, 2 x Ethanol 80 %, 2 x Ethanol 96 %, 2 x Ethanol 100 %, 2 x Xylol, 2 x Paraffin) entwässert. Am nächsten Tag konnte dann die Einbettung in Paraffin erfolgen.

### **2.10.2 Immunhistochemische Färbungen**

Für die Herstellung von immunhistochemischen Färbungen wurden zunächst mithilfe eines Mikrotoms 3 µm dünne Schnitte der lumbalen RM-Querschnitte angefertigt. Diese wurde auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 50 °C getrocknet.

Vor den immunhistochemischen Färbungen sollte zunächst eine morphologische Beurteilung der Gewebe durchgeführt werden. Hierzu wurden die Schnitte mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt. Um die Färbung möglich zu machen, wurden die Schnitte in eine absteigende Alkoholreihe (2 x Xylol, 2 x Ethanol 99 %, 2 x Ethanol 96 %, 2 x Ethanol 70 %, 1 x Aqua dest.) gegeben, um eine Entparaffinierung zu erreichen. Daraufhin erfolgte die Färbung mit Hämalaun-Lösung für 10 Minuten. Die Schnitte wurde kurz mit destilliertem Wasser abgespült und danach für weitere 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser bewässert. Nach erneutem Waschen mit destilliertem Wasser folgte nun die Färbung mit Eosin-Lösung für 5 Minuten. Die Schnitte wurden erneut mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend zur erneuten Entwässerung eine aufsteigende Alkoholreihe (2 x Ethanol 70 %, 2 x Ethanol 96 %, 2 x Ethanol 99%, 2 x Xylol) durchgeführt. Am Ende folgte das Eindeckeln mit Entellan.

Es wurden immunhistochemische Färbungen zum Nachweis von T-Zellen und Makrophagen durchgeführt. Zunächst erfolgte hierzu das Entparaffinieren der Schnitte mittels der bereits oben beschriebenen absteigenden Alkoholreihe. Danach wurden die Schnitte für 30 Minuten in Citratpuffer gekocht,

um die durch PFA vernetzten Antigenbindungsstellen freizulegen. Nach einer Abkühlzeit von 15 Minuten erfolgte das Blocken von unspezifischen Bindungsstellen im RM mit 10 % BSA in PBS für 30 Minuten. Hierauf wurde der Primärantikörper in 1 % BSA in PBS auf die Schnitte gegeben und diese über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Primärantikörper für die T-Zellen wurde hier *Rat anti human CD3* von Serotec in einer Verdünnung von 1:200 verwendet, für die Färbung der Makrophagen *Rat anti mouse Mac-3 mAb* von BD, ebenfalls in einer Verdünnung von 1:200. Nach der nächtlichen Inkubation erfolgte der Block der endogenen Peroxidase mittels POD-Block für 13 Minuten. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 45 Minuten. In beiden Färbungen handelte es sich hierbei um *Anti rat IgG (H+L) biotinyliert* von Vector in einer Verdünnung von 1:200 in 1 % BSA in PBS. Die Bindung und somit Sichtbarmachung des Sekundärantikörpers erfolgte mit einem Peroxidase-gekoppelten Streptavidin-Biotin-Komplex für 35 Minuten bei RT (in PBS, Verdünnung 1:100 von Dako, Hamburg). Als Substrat für die Peroxidase fungierte Diaminobenzidin, mit dem die Schnitte 12 Minuten inkubiert wurden. Anschließend wurden die Schnitte zu Gegenfärbung für 20 Sekunden in Hämalaun-Lösung getaucht und dann für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Zuletzt folgte die aufsteigende Alkoholreihe und die Eindeckelung mit Entellan.

### **2.10.3 Quantifizierung immunhistochemischer Färbungen**

Die Zählung von T-Zellen und Makrophagen in den immunhistochemisch gefärbten Schnitten erfolgte geblindet. Je Tier wurden zwei bis drei Infiltrate in den lumbalen RM-Schnitten unter 400facher Vergrößerung am Lichtmikroskop aufgesucht und mithilfe eines Zähllokulars die Anzahl der darin vorkommenden T-Zellen beziehungsweise Makrophagen bestimmt. Die Darstellung der mittleren Infiltratdichte erfolgte als Zellen/mm<sup>3</sup>.

## **2.11 Molekularbiologische Methoden**

Die molekularbiologischen Untersuchungen wurden von Anna Karabinskaya (Immunologie Göttingen, AG Reichardt) durchgeführt. Zur Vollständigkeit wurde die nachfolgende Methodik ebenfalls durch sie beschrieben.

### **2.11.1 Isolation von RNA aus den Zellen**

Für die RNA-Isolation wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in 100 µl PBS resuspendiert. Die Isolation wurde mit dem *Mini RNA Kit II* durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst in 600 µl ZR-Puffer (Kit-Komponente) lysiert. Die Probe wurde auf eine Säule pipettiert (Kit-Komponente) und zentrifugiert (1 min, 14000 rpm, 4 °C). Hierauf wurde die Säule in ein neues Reaktionsgefäß gesteckt und 2 mal mit 350 µl RNA Wash Puffer (Kit-Komponente) zentrifugiert (1 min, 14000 rpm, 4 °C). Im nächsten Schritt wurde die Säule in ein RNA-freies Eppendorfgefäß gesteckt und mit 50 µl RNase/DNase freiem Wasser (Kit-Komponente) nach 2 Minuten Inkubation bei RT zentrifugiert (1 min, 14000 rpm, 4 °C). Die so erhaltene RNA wurde

mit 10 µl 10 x DNase I- Puffer und 1 µl Dnase I (Roche) in DEPC Wasser für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

### **2.11.2 Aufreinigung der RNA**

Die anschließende Aufreinigung der RNA erfolgte mit dem *RNeasy Mini Kit II* (Quiagen, Hilden, Deutschland). Zur RLT-Lösung (Kit-Komponente) wurden pro 1 ml 10 µl β-Mercaptoethanol gegeben. Von dem erhaltenen Gemisch wurden 350 µl und anschließend 250 µl absoluter Ethanol (96 %) zur Probe gegeben und dieses vorsichtig vermischt. Die Ansätze wurden je auf eine *RNeasy*-Säule pipettiert und zentrifugiert (20 Sekunden, 4 °C, 14000 rpm). Die Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß gesteckt und es erfolgte ein zweimaliger Waschschrift mit 500 µl RPE-Puffer (Kit-Komponente) (20 Sekunden, 4 °C, 14000 rpm). Der Durchfluss wurde nach jedem Zentrifugationsschritt verworfen. Am Ende erfolgte die Eluierung der RNA mit DEPC-Wasser, indem 30 µl DEPC-Wasser auf die Säulenmatrix aufgetragen, die Ansätze für 1 Minute inkubiert und danach zentrifugiert (1 Minute, 4 °C, 14000 rpm) wurden.

### **2.11.3 Umschreiben von mRNA in cDNA**

Zu der mit dem *RNeasy Mini Kit II* gereinigten mRNA wurden alle Komponenten des cDNA Synthese Kits gegeben (Bio-Rad Laboratories) und in einen Thermocycler (Eppendorf) gestellt. Hier wurde die cDNA durch folgendes Programm synthetisiert:

5 Minuten 25 °C (Bindung des Primers)

30 Minuten 42 °C (cDNA-Synthese durch die Reverse Transkriptase)

5 Minuten 85 °C (Inaktivierung der Reversen Transkriptase).

### **2.11.4 Real-Time qPCR**

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht auf der Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnittes zwischen zwei vorgegebenen Primern durch eine hitzestabile DNA-abhängige DNA-Polymerase. Mithilfe der quantitativen Real-Time-PCR (Real-Time qPCR) kann die Menge an mRNA quantifiziert werden, indem ein fluoreszierender Farbstoff (SYBR Green) hinzugegeben wird. Dieser Farbstoff bindet nur an doppelsträngige DNA. Der entstehende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex emittiert Licht bei 522 nm. Die gemessene Fluoreszenz korreliert mit der Menge an doppelsträngiger DNA. Die Kopienzahl eines Gens wird durch die Verwendung eines Genstandards mit bekannter Kopienzahl quantifiziert.

Der Ansatz für die Real-Time qPCR bestand aus folgenden Komponenten:

- 1 µl cDNA

- 0,5 µl aus 10 pM Primer (Mischung aus sense und antisense)

- 12,5 µl SYBR Green (AbGene) (Reaktionsgemisch inklusive Taq-Polymerase und Nukleotide)
- 11 µl Wasser

Die Proben wurden in einer speziellen 96-Well-Platte für Real-Time-PCR (AB) angesetzt. Als Kontrollgen diente  $\beta$ -Aktin. Die Amplifikation wurde mit einer Real-Time-qPCR Maschine durchgeführt. Das Programm für die Real-Time-qPCR bestand, wie eine normale PCR, aus mehreren Wiederholungen der DNA-Denaturierung, der Primeranlagerung und der Elongation. Zusätzlich erfolgte am Anfang eine 10-minütige Aktivierung der Enzyme bei 95°C. Zur Überprüfung der Schmelzkurve wurde am Ende der PCR die Temperatur langsam auf 95°C erhöht. Auf diese Weise konnten alle unspezifischen Amplifikate ausgeschlossen werden.

Cycler-Programm:

2 min 50°C	
10 min 95°C	Enzymaktivierung
15 sek 95°C	
1 min 60°C	
15 sek 95°C	Denaturierung der Gesamt-DNA
1 min 60°C	Hybridisierung
15 sek 95°C	Test der Schmelzkurve
15 sek 60°C	

## 2.12 Statistik

Die Statistik in dieser Arbeit wurde mit *Graph Pad Prism* Version 5 (GraphPad Software, La Jolla, USA) durchgeführt.

Für die Analyse der klinischen Verläufe der Tierexperimente, in denen mehr als 2 Gruppen miteinander verglichen werden mussten, wurde der *Kruskal-Wallis test*, gefolgt vom *Dunn's multiple comparison test* verwendet. Um die unterschiedlichen Krankheitsverläufe miteinander zu vergleichen, wurden die Verläufe der gesamten Kurven miteinander verglichen. In die Statistik floss hier also die gesamte Kurve am Tag 1 nach Beginn der Therapie mit Dex ein.

Alle anderen Daten wurden mittels dem ungepaarten T-Test analysiert.

Alle Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler angegeben. p-Werte  $> 0,05$  wurden als nicht signifikant betrachtet (ns); \*p  $\leq 0,05$ , \*\*p  $\leq 0,01$ , \*\*\*p  $\leq 0,001$ , \*\*\*\* p  $\leq 0,0001$ .

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung eines Modells für die Untersuchung des Einflusses von Dexamethason auf Effektor- und Bystander-T-Zellen

##### 3.1.1 Supplementierung mit 2D2/GFP<sup>+</sup>-T-Zellen

Im ersten Schritt der Arbeit sollte der Einfluss von Dex auf Effektor- und Bystander-T-Zellen getrennt voneinander untersucht werden. Zur Etablierung eines Tiermodells für die Untersuchung dieses Einflusses wurde versucht, durch Zelltransfer Tiere zu generieren, in welchen es möglich sein würde, Effektor- und Bystander-T-Zellen in anschließenden durchflusszytometrischen Untersuchungen differenzieren zu können. Hierzu sollten zunächst durch i.v.-Injektion ein Transfer von grün fluoreszierenden Effektor-T-Zellen in naive C57/Bl6-Mäuse erfolgen. Die enzephalitogenen T-Zellen sollten aus 2D2/GFP<sup>+</sup>-Tieren gewonnen und in C57/Bl6-Mäusen transferiert werden, um anschließend eine EAE bei diesen Tieren zu induzieren. Bei Erreichen eines hohen Krankheitscores sollte die Aufarbeitung der Tiere erfolgen, um via Durchflusszytometrie zu analysieren, wie viele der grünen Effektor-T-Zellen in der Milz und im RM, am Ort der eigentlichen Entzündungsreaktion, wiedergefunden werden konnten. Zudem sollte im gleichen Schritt analysiert werden, ob das gewünschte ausgeglichene Verhältnis zwischen Bystander- und Effektor-T-Zellen erreicht werden konnte.

Zunächst wurden hierzu die MOG-spezifischen T-Zellen aus den Milzen und mesenterialen Lymphknoten von vier 2D2/GFP<sup>+</sup>-Mäusen gewonnen. Aus den entnommenen Organen wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und die gewonnenen Zellen anschließend gepoolt. Um eine möglichst reine Population an T-Zellen zu erhalten, wurden die gepoolten Zellen mithilfe eines *MACS Pan T Cell Kit* von anderen Zellpopulationen separiert. Die separierten T-Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend für die Injektion in die wt-Mäuse in PBS aufgenommen. 5 wt-Mäuse erhielten je 10 Millionen 2D2/GFP<sup>+</sup>-T-Zellen via i.v.-Injektion in die Schwanzvene. 5 weiteren Empfängertieren wurden je 2 Millionen der grünen T-Zellen injiziert und 5 Tiere erhielten lediglich die äquivalente Menge an PBS und dienten somit als Kontrollgruppe. Dieser Versuchsaufbau mit unterschiedlichen Mengen an transferrierten Zellen wurde zur Evaluation der optimalen Zellzahl verwendet. Zwei Tage nach dem T-Zell-Transfer erfolgte die EAE-Immunisierung der Tiere. Am Tag 15 nach EAE-Induktion wurden die 7 Tiere mit den höchsten Scores (5,5 bis 7) ausgewählt und aufgearbeitet. Hierunter befanden sich 3 Tiere aus der Kontrollgruppe, 2 Tiere, die je 2 Millionen Zellen und 2 Tiere, die je 10 Millionen T-Zellen erhalten hatten. Die Tiere wurden narkotisiert und zunächst die Milzen entnommen. Nach Perfusion der Tiere mit PBS wurde ebenfalls das RM isoliert. Aus den Milzen erfolgte die Herstellung von Einzelzellsuspensionen, aus den RM wurden via Percoll-Gradient die Leukozyten extrahiert.

Die aus den Milzen gewonnenen Zellen wurden zur Differenzierung der T-Zellen von den B-Zellen mit einem Antikörper gegen die  $\beta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors (TCR $\beta$ chain-PE) gefärbt und eine FACS-

Analyse durchgeführt. Wie erwartet, konnten bei den Tieren aus der Kontrollgruppe keine GFP<sup>+</sup>-T-Zellen detektiert werden. Jedoch konnten, entgegen den Erwartungen, auch bei den Tieren, die einen Zelltransfer mit 2D2/GFP<sup>+</sup>-T-Zellen erhalten hatten, nur sehr geringe Mengen an grün-fluoreszierenden T-Zellen wiedergefunden werden. Das Durchflusszytometer detektierte hier lediglich bis zu maximal 0,43 % GFP<sup>+</sup>-T-Zellen in den Milzen. (Abb. 6) Dies würde also einem Verhältnis von Effektor-T-Zellen zu Bystander-T-Zellen von 0,43 % zu 99,57 % entsprechen.

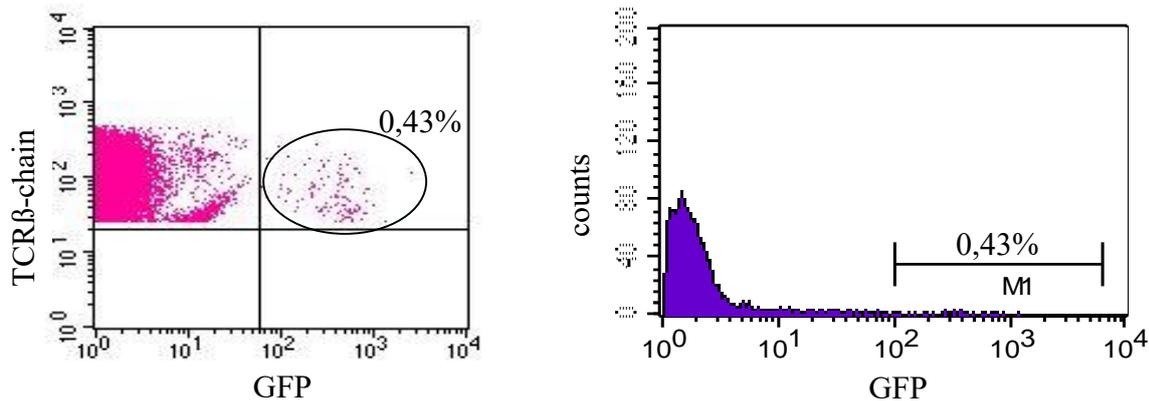


Abb 6: **FACS-Analyse der aus den Milzen gewonnenen T-Zellen.** MOG-spezifische T-Zellen wurden aus den mesenterialen Lymphknoten und Milzen von 2D2/GFP<sup>+</sup>-Mäusen gewonnen. Verschiedene Mengen dieser Zellen (2 Millionen und 10 Millionen Zellen) wurde in die Schwanzvene der Empfängertiere injiziert. Den Kontrolltieren wurden gleiche Volumina an PBS in die Schwanzvene verabreicht. Anschließend wurde eine EAE-Immunisierung durchgeführt. Nach Erreichen eines hohen Krankheitsscores (EAE-Score 5,5 – 7) wurden die Zellen aus den Milzen extrahiert, diese mit einem Antikörper gegen die  $\beta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors gefärbt und eine FACS-Analyse durchgeführt. Die maximale Menge an detektierten GFP<sup>+</sup>-Zellen betrug 0,43%.

GFP = grün-fluoreszierendes Protein, TCR $\beta$ chain =  $\beta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors.

Mit den aus dem RM gewonnenen Zellen wurden aufwändige Färbungen durchgeführt. Zum einen wurde extrazellulär gefärbt mit Antikörpern gegen CD44, CD3, CD11a, CD4 und CD25, um die Zellen im Vergleich zueinander hinsichtlich der Expression von Adhäsionsmolekülen (CD44, CD11a) und auf ihre Zugehörigkeit zu regulatorischen T-Zellen (T<sub>REGS</sub>, CD25) vergleichen zu können. Zudem wurden die Zellen intrazellulär mit Antikörpern gegen IL-17, INF $\gamma$ , CD4 und CD3 gefärbt. So sollte anhand der Zytokinsekretion der Aktivierungsgrad der T-Zellen verglichen werden. Insgesamt konnten jedoch auch im RM nur sehr geringe Mengen (0,61 %) an GFP<sup>+</sup>-T-Zellen wiedergefunden werden (Abb. 7). Somit scheiterte auch der Vergleich der T-Zellen hinsichtlich der Adhäsionsmolekülexpression, Zugehörigkeit zu den T<sub>REGS</sub> und des Aktivierungsgrades.

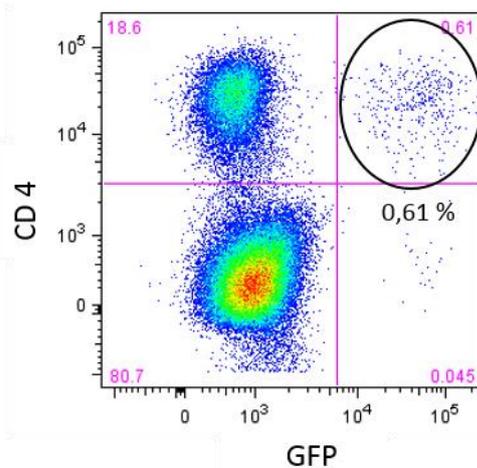


Abb. 7: **FACS-Analyse der aus dem RM gewonnenen Zellen.** Versuchsaufbau vgl. Abb. 6

Die maximale Menge der detektierten GFP<sup>+</sup>-Zellen im Rückenmark der erkrankten Tiere betrug 0,61%.

### 3.1.2 Supplementierung mit GFP<sup>+</sup>-T-Zellen nach Vorbehandlung mit Dexamethason

In einem nächsten Versuch zur Etablierung des Modells wurden die Tiere vor Transfer der antigenspezifischen T-Zellen mit Dex vorbehandelt. Die Vorbehandlung sollte die Zahl der endogenen T-Zellen senken, um so den transferierten T-Zellen eine bessere Möglichkeit zur Proliferation in den Empfängertieren zu bieten.

Vier Tiere wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen ( $d_1$ ,  $d_2$ ,  $d_3$ ) mit 100 mg/kg Körpergewicht Dex behandelt. Weitere vier Tiere erhielten eine äquivalente Dosis Dex an zwei aufeinanderfolgenden Tagen ( $d_1$ ,  $d_2$ ) und letztere vier wurden einmalig ( $d_1$ ) mit Dex behandelt. So sollte auch hier anhand der unterschiedlichen Dosen von Dex die optimale Vorbehandlung ermittelt werden. 5 Tage nach der ersten Gabe von Dex ( $d_5$ ) erfolgte der Transfer der antigenspezifischen T-Zellen, die wie im ersten Experiment via Aufarbeitung von Milz und mesenterialen Lymphknoten aus 2D2/GFP<sup>+</sup>-Tieren und Herstellung von Einzelzellsuspensionen gewonnen worden waren. Nach der erfolgreichen Isolation der Zellen aus den Spendertieren wurde in diesem Versuch zudem eine Reinheitskontrolle via FACS-Analyse durchgeführt. Die Reinheitskontrolle ergab, dass die gewonnene Zellsuspension zu 80 % aus T-Zellen bestand, von denen 2/3 GFP<sup>+</sup> waren. Aufgrund dieser neuen Erkenntnis, dass die hergestellten Einzelzellsuspensionen nicht zu 100 % aus GFP<sup>+</sup>-T-Zellen bestanden, wurde die Anzahl an transferierten Zellen im Vergleich zum ersten Experiment erhöht und den Mäusen jeweils 5 beziehungsweise 15 Millionen Zellen i.v. injiziert. So erhielten von den Tieren, die 3 Tage in Folge mit Dex behandelt worden waren, zwei Mäuse je 5 Millionen und die zwei anderen Mäuse je 15 Millionen Zellen. Ebenso wurde mit den Tieren verfahren, die zwei beziehungsweise einen Tag mit Dex vorbehandelt worden waren. 21 Tage nach dem T-Zell-Transfer ( $d_{26}$ ) wurde das Experiment beendet. Es erfolgte die Entnahme der Milzen

aus den Versuchstieren. Ebenso wurden die inguinalen Lymphknoten als erste Station im Lymphflussgebiet nach i.v. Injektion in die Schwanzvene isoliert. Die Organe wurden zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet und mit Antikörpern gegen CD4 und CD8 gefärbt.

Nach dieser gezielten Vorbereitung der Tiere auf den T-Zell-Transfer in Form einer Vorbehandlung mit Dex wurden in der folgenden FACS-Analyse etwas mehr GFP<sup>+</sup>-T-Zellen (4,98%) in den entnommenen Lymphknoten und Milzen wiedergefunden, als ohne Vorbehandlung (Abb. 8). Doch auch diese Anzahl an Zellen war nicht ausreichend für das gewünschte Modell.

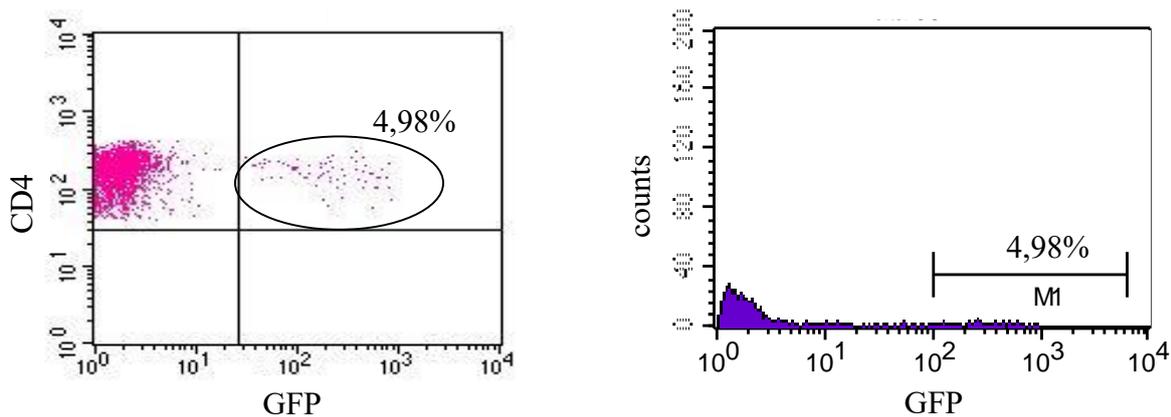


Abb. 8: **FACS-Analyse der aus den Milzen gewonnenen T-Zellen (Dex-vorbehandelte Tiere).** wt-Mäuse (Empfängertiere) wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit 100 mg/kg Körpergewicht Dex vorgehandelt. An Tag 5 erfolgte der Transfer von je 5 Millionen beziehungsweise 15 Millionen Zellen, die aus den Milzen und Lymphknoten von 2D2/GFP<sup>+</sup>-Tieren gewonnen worden waren. An Tag 21 wurden die Milzen und inguinalen Lymphknoten der Empfängertiere entnommen, Einzelzellsuspensionen hergestellt und eine FACS-Analyse durchgeführt. Färbung mit Antikörpern gegen CD4 und CD8. Die maximale Menge an detektierten GFP<sup>+</sup>-Zellen in den vorbehandelten Tieren betrug 4,98%.

### 3.1.3 Supplementierung von Knochenmark und 2D2-T-Zellen nach Bestrahlung

Da die alleinige Substitution von sowohl unbehandelten als auch vorbehandelten Mäusen mit 2D2/GFP<sup>+</sup>-T-Zellen nicht die gewünschten Ergebnisse erbracht hat, wurde im nächsten Schritt versucht, optimale Bedingungen für die transferierten Zellen zur Proliferation in den Empfängertieren zu schaffen. Hierzu wurden die Empfängertiere zunächst letal, das heißt mit einer Dosis von 12,5 Gy bestrahlt. Am Folgetag der Bestrahlung wurden die Tiere mit Knochenmark (KM) aus wt-Tieren rekonstituiert und in dieses Szenario die 2D2-T-Zellen injiziert. Hierzu wurde Knochenmark von CD45.1-Mäusen verwendet und 2D2-T-Zellen von CD45.2-Tieren, um anhand der Oberflächenmarker CD45.1 und CD45.2 im weiteren Verlauf die Bystander-T-Zellen aus dem Knochenmark und die dazu injizierten Effektor-T-Zellen via Durchflusszytometrie differenzieren zu können. Es wurde gezielt auf die Markierung der Zellen mit dem grün-fluoreszierenden Protein GFP verzichtet, unter der Annahme, dass eventuell die Expression eben dieses Proteins in den Zellen dazu geführt haben könnte, dass diese vom Immunsystem der Empfängertiere als fremd erkannt wurden und auf Grund dessen abgestoßen und eliminiert wurden.

Insgesamt wurden 7 Tiere letal bestrahlt. Eine der Mäuse erhielt weder KM noch T-Zellen und diente somit als Bestrahlungskontrolle. Drei Mäuse erhielten 2 Millionen KM-Zellen und zusätzlich 5 Millionen 2D2-T-Zellen. Den drei verbleibenden Tieren wurde dieselbe Menge an KM und zusätzlich 15 Millionen 2D2-T-Zellen injiziert.

Nach sechs Wochen Beobachtungszeit und somit Proliferationszeit für das KM hatten nur 3 Tiere überlebt, die somit aufarbeitet werden konnten, um das Verhältnis der CD45.1 zu CD45.2-T-Zellen zu ermitteln.

Bei der Aufarbeitung der Tiere wurden jeweils die Milz und die mesenterialen Lymphknoten entnommen. Aus den Organen wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und anschließend die Zellen für die FACS-Analyse gefärbt. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte eine ausgeglichene Zellzahl zwischen CD45.1 und CD45.2-Zellen (Abb. 9). Doch bei der näheren Differenzierung der CD45.2-Zellen, die eigentlich zu einem großen Teil aus 2D2-T-Zellen hätten bestehen müssen, konnten wiederum nur sehr geringe Mengen der injizierten antigenspezifischen T-Zellen (2,32 %) mithilfe einer Färbung gegen Vβ11 wiedergefunden werden (Abb. 10).

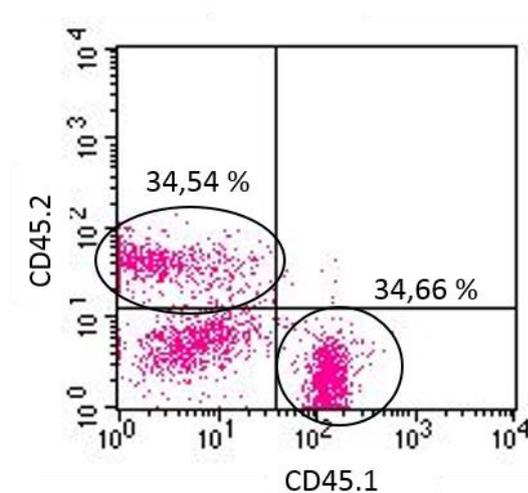


Abb. 9: **FACS-Analyse der aus den Milzen gewonnenen T-Zellen (letal bestrahlte Tiere).** wt-Tiere (CD 45.2) wurden zunächst letal (12,5 Gy) bestrahlt. Am Folgetag erfolgte eine Rekonstitution der Tiere mit Knochenmark (KM) aus wt-Tieren (CD 45.1) und die Injektion der je 5 bzw. 15 Millionen Zellen 2D2-T-Zellen (CD45.2). Sechs Wochen danach zeigt sich in der FACS-Analyse der aus den Milzen gewonnenen Zellen ein annähernd gleiches Verhältnis von CD45.2 und CD 45.1 T-Zellen (34,54 % vs. 34,66 %).

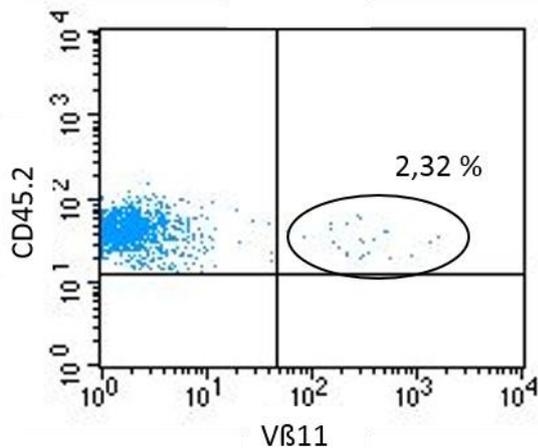


Abb. 10: **Nähere Differenzierung der CD45.2-Zellen (Splenozyten aus bestrahlten Tieren).** Versuchsaufbau vgl. Abb. 9  
Nur 2,32 % der CD45.2-T-Zellen aus den initial letal bestrahlten wt-Tieren sind antigenspezifische T-Zellen (2D2-T-Zellen). Färbung mit einem Antikörper gegen die  $\beta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors (V $\beta$ 11).

Interessanterweise wiesen 2 der 3 Mäuse Zeichen einer EAE auf, obwohl die Tiere nicht immunisiert worden waren.

### 3.1.4 Supplementierung von RAG-1-defizienten Mäusen mit Bystander- und Effektor-T-Zellen

Als weitere Möglichkeit, um die Etablierung des gewünschten Modells zu erreichen, wurde die Supplementierung von RAG-1-defizienten Mäusen mit T-Zellen gesehen.

Diese Tiere tragen eine Mutation im *recombination activation gene* (RAG-1), welches für die VDJ-Rekombination in der Produktion von T-Zell-Rezeptoren benötigt wird. Aufgrund der großen benötigten Variabilität an T-Zell-Rezeptoren werden verschiedene Gensequenzen im Rahmen der VDJ-Rekombination zusammengesetzt, um so für die Vielzahl an T-Zell-Rezeptoren zu kodieren. Durch die Mutation in den RAG-1-Tieren ist die VDJ-Rekombination unterbrochen, so dass nur unreife T-Zellen gebildet werden (Mombaerts et al. 1992).

Die RAG-Mäuse sollten mit der jeweils gleichen Menge an Effektor- und Bystander-T-Zellen supplementiert werden. Vier RAG-1-defiziente Mäuse wurden zunächst mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt, da aus empirischen Daten bekannt ist, dass dies die Aufnahme der injizierten T-Zellen verbessert. Zwei Tage nach Bestrahlung erfolgte der Transfer der T-Zellen. Als Effektor-T-Zellen wurden die bereits bekannten 2D2/GFP<sup>+</sup>-T-Zellen verwendet, als Bystander-T-Zellen solche, die aus CD45.1-Mäusen gewonnen worden waren. Jedes Empfängertier erhielt definierte Mengen an Effektor- und Bystander-T-Zellen, wie der folgenden Tabelle zu entnehmen ist.

Tier	injizierte Zellen
1	10 Millionen 2D2/GFP+-T-Zellen (CD45.2)
2	10 Millionen CD45.1-T-Zellen
3+4	10 Millionen 2D2/GFP+-T-Zellen + 10 Millionen CD45.1-T-Zellen

Tabelle 2: **i.v.-Injektionsplan** für die im Versuch verwendeten vier RAG-1-defizienten Tiere.

Nach 3 Wochen wurden die Tiere aufgearbeitet. Aus den Milzen wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und diese für die Analyse per Durchflusszytometrie gefärbt. Es konnten annähernd gleiche Prozentzahlen an Bystander- und Effektor-T-Zellen ermittelt werden. Daher sollte dieser Versuchsaufbau im Weiteren als Modell für die Untersuchung des Einflusses von Dex auf Effektor- und Bystander-T-Zellen genutzt werden.

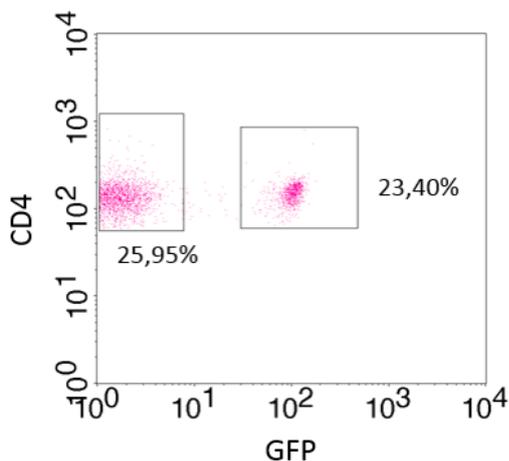


Abb. 11: **FACS-Analyse der Zellen aus den Milzen von RAG-1-Mäusen.** Die RAG-1-Mäuse wurden zunächst mit 2 Gy bestrahlt. 2 Tage nach der Bestrahlung wurden den Tieren bestimmte Mengen an Zellen aus 2D2/GFP+-Tieren und CD45.1-Tieren injiziert (Schema siehe Tabelle 2). Nach 3 Wochen erfolgte die Entnahme der Milzen aus den RAG-1-Mäusen sowie deren Aufbereitung zu Einzelzellsuspensionen und durchflusszytometrische Analyse. Es zeigte sich ein annähernd gleiches Verhältnis von 2D2/GFP+- (CD45.2) und CD45.1-T-Zellen (23,40 vs. 25,95 %).

Zunächst musste jedoch getestet werden, ob die mit T-Zellen substituierten, RAG-defizienten Mäuse zum einen nach EAE-Immunisierung einen normalen Verlauf der Erkrankung entwickelten und ob sie sich mit Dex behandeln ließen.

In einem neuen Versuch wurden nun sechs RAG1-defiziente Mäuse mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt und am darauffolgenden Tag mit je 3,8 Millionen T-Zellen sowohl aus wt-Mäusen als auch aus 2D2-transgenen Mäusen supplementiert. Zwei Wochen nach Transfer der T-Zellen erfolgte die Immunisierung der Tiere. Die Tiere entwickelten nach 14 Tagen erste Symptome einer EAE, die sich allerdings nur bis zu einem maximalen Score von 4 ausprägten. An Tag 16 nach Immunisierung wurde die Behandlung

mit Dex vs. PBS eingeleitet. Da jedoch der Verlauf der EAE nicht typisch war und auch die mit PBS behandelten Tiere nur einen End-Score von 4 entwickelt hatten, konnte nicht ausreichend beurteilt werden, ob die Tiere auf Dex ansprachen und behandelbar waren.

### **3.1.5 Supplementierung von RAG-1-defizienten Mäusen mit Effektor- und Bystander-T-Zellen aus GR-knock-out-Tieren**

Trotz der nur mäßig beurteilbaren Ergebnisse aus dem vorhergehenden Experiment sollte nun der erste Versuch verwirklicht werden, um der Antwort auf die Frage näher zu kommen, ob die Therapie mit Dex und die daraus resultierende klinische Besserung der Tiere von der Wirkung auf Effektor- oder auf Bystander-T-Zellen ausgeht. Hierzu wurden 25 RAG-1-defiziente Mäuse mit 2 Gy bestrahlt und am Folgetag mit unterschiedlichen Zusammensetzungen an T-Zellen supplementiert. 10 Mäuse erhielten je 5 Millionen wt- und 2D2/GFP<sup>+</sup>-T-Zellen. Diese Mäuse würden später als positiv Kontrolle dienen, da sowohl Bystander- (wt) als auch Effektor- (2D2/GFP<sup>+</sup>) T-Zellen den GR exprimierten und die Mäuse somit behandelbar sein müssten. 5 Mäuse erhielten je 5 Millionen 2D2/lckGR und lckGR T-Zellen und sollten somit als negativ Kontrolle fungieren, da weder Bystander- (lckGR) noch Effektor- (2D2/lckGR) T-Zellen den GR exprimierten. Die Mäuse dürften also laut bereits publizierter Ergebnisse nicht behandelbar sein (Wüst et al. 2008). 10 weitere Mäuse erhielten einen Transfer von je 5 Millionen 2D2- (Effektor) und lckGR- (Bystander) T-Zellen. In diesem Fall würde Dex also nur auf die Effektor-T-Zellen wirken. Im Gegensatz dazu blieben die Bystander-T-Zellen aufgrund des nicht exprimierten GRs unbeeinflusst. Zwei Wochen nach Transfer der Zellen erfolgte die Immunisierung der Tiere nach bekanntem EAE-Protokoll. Leider kam es bei den Tieren zur Entwicklung einer Infektion, so dass im Verlauf der Tage 21 Tiere verstarben. Nur insgesamt 4 Tiere aus der Positivkontrollgruppe überlebten. Diese wurden 14 Tage nach Induktion der EAE aufgearbeitet. Die gewonnenen Einzelzellsuspensionen aus Milz und RM wurden für die FACS-Analyse mit anti-CD3 und anti-CD4 gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Hierdurch konnte nochmals das ausgeglichene Verhältnis zwischen Bystander- und Effektor-T-Zellen gezeigt, jedoch keine weiteren neuen Erkenntnisse gewonnen werden.

Der Versuch wurde unter gleichen Bedingungen und wie oben beschrieben wiederholt, mit dem einzigen Unterschied, dass dieses Mal jede Maus je 10 Millionen Effektor-T-Zellen und 10 Millionen Bystander-T-Zellen injiziert bekamen, um sicher zu stellen, dass ausreichend T-Zellen für die EAE-Immunisierung und Einwanderung in das ZNS zur Verfügung stünden. Die Tiere wurden zwei Wochen nach Zelltransfer EAE immunisiert. Trotz erhöhter Anzahl an transferierten Zellen entwickelten die Tiere, bis auf wenige Ausnahmen, keine Symptome der Erkrankung. Die Tiere, die Symptome einer EAE ausbildeten, erlangten maximal einen EAE-Score von 4. Der Krankheitsverlauf war sehr untypisch und unterschied sich deutlich von dem normal beobachteten Verlauf der EAE nach aktiver Immunisierung. Die Symptome entwickeln sich schleichend, eher dem Verlauf einer primär progredienten MS entsprechend.

Auch auf diesem Wege konnte also die Frage nach der Wirkung von Dex auf Effektor- und Bystander-T-Zellen nicht beantwortet werden.

### **3.2 Analyse von möglichen Wirkmechanismen der GCs in der Therapie der EAE anhand von Experimenten mit T-Zell-spezifischen GR<sup>dim</sup>- und GR<sup>dim</sup>-Mäusen**

#### **3.2.1 T-Zell-spezifische GR<sup>dim</sup>-Mäuse sind mit Dexamethason therapierbar**

Periphere T-Zellen sind das Hauptziel in der Therapie der EAE mit GCs, so berichteten Wüst et al. 2008. Der Haupteffekt der Therapie mit Dex beruht auf der Induktion von Apoptose in den peripheren T-Zellen und auf der verminderten Expression von Adhäsionsmolekülen auf deren Zelloberfläche (Wüst et al. 2008). Um die zentrale Rolle der Apoptose-Induktion in T-Zellen als Therapieeffekt von Dex zu bestätigen wurde ein klinisches Experiment mit T-Zell-spezifischen GR<sup>dim</sup>-Mäusen (IckGR<sup>dim</sup>) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um Tiere, die durch den Einsatz des cre/loxP-Systems nur in den T-Zellen den veränderten GR (GR<sup>dim</sup>) exprimieren, der nicht zur Dimerisierung befähigt ist. In diesen Tieren ist folglich die Apoptose-Induktion durch Dex in T-Zellen nicht möglich, während Dex auf alle anderen Zellpopulationen unverändert wirkt. Wenn die Apoptose-Induktion in T-Zellen wirklich von entscheidender Bedeutung für den Therapieeffekt von Dex wäre, würde erwartet werden, dass die Tiere gar nicht oder nur sehr schlecht behandelbar sind.

In dem durchgeführten klinischen Versuch wurden insgesamt 5 IckGR<sup>dim/-</sup>-Tiere und 5 Kontrolltiere (GR<sup>dim +/-</sup>) aktiv EAE immunisiert. Ab dem Erreichen eines durchschnittlichen EAE-Scores von 2-3 wurde die standardmäßige Therapie eingeleitet. Hierbei erhielten drei Tiere der IckGR<sup>dim/-</sup>-Gruppe Dex als Therapeutikum (100 mg/kg Körpergewicht für drei Tage). Die zwei verbleibenden IckGR<sup>dim/-</sup>-Tiere erhielten ein äquivalentes Volumen an PBS intraperitoneal appliziert. In der GR<sup>dim+/-</sup>-Kontrollgruppe wurden ebenfalls je 3 Tiere mit Dex bzw. 2 Tiere mit PBS behandelt.

Überraschenderweise zeigte sich, dass die IckGR<sup>dim/-</sup>-Tiere ebenso gut behandelbar waren wie die Kontrolltiere (GR<sup>dim+/-</sup>) (Abb. 12). Auch ein erneuter Versuch mit gleichem Versuchsaufbau erbrachte das selbe Ergebnis. T-Zell-spezifische GR<sup>dim</sup>-Mäuse sind trotz ihrer nicht vorhandenen Fähigkeit, durch die Therapie mit Dex Apoptose in T-Zellen zu induzieren, genauso gut behandelbar wie Kontrolltiere.

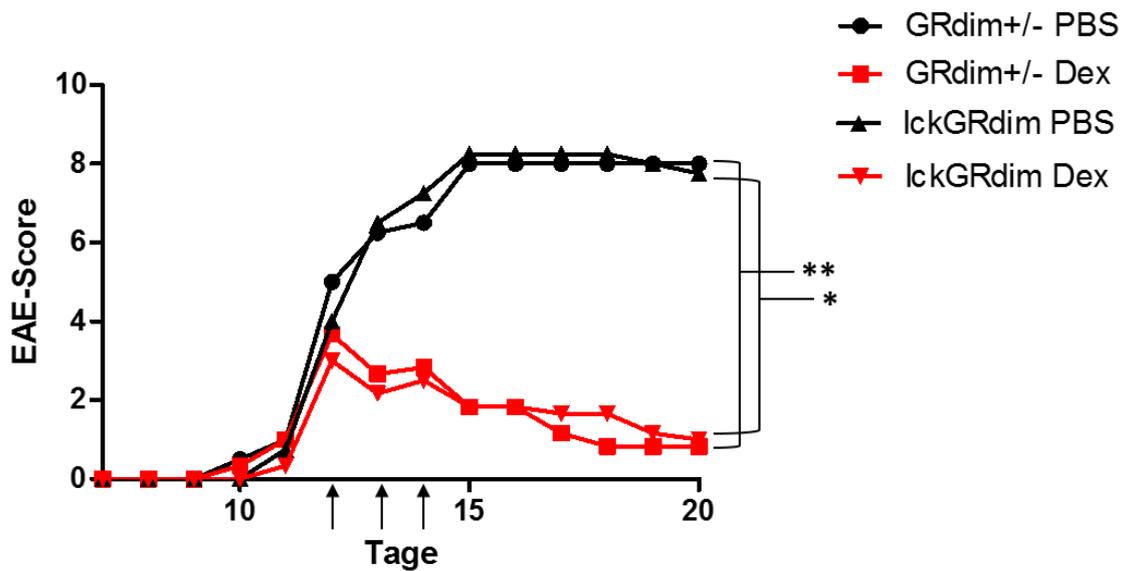


Abb. 12: **Klinischer Verlauf der EAE bei IckGR<sup>dim</sup>- und Kontrolltieren.** Die Behandlung mit 100 mg/kg Körpergewicht Dex beziehungsweise PBS erfolgte an den Tagen 12, 13 und 14 nach Immunisierung mit MOG<sub>33-35</sub> (Pfeile). N= 2-3. Im Rahmen der statistischen Analyse wurde der gesamte Kurvenverlauf, beginnend ab Tag 13 bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes, miteinander verglichen. Hierzu wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Test als nachgeschaltetem Test verwendet.

\* p<0,05, \*\* p<0,01.

### 3.2.2 Makrophagenfunktion

Um sicher zu gehen, dass die Punktmutation in den T-Zellen der IckGR<sup>dim</sup>-transgenen Mäuse keinen indirekten Effekt auf die Makrophagen in den Tieren hat, wurden hierzu einige spezifische Tests durchgeführt. Da von Makrophagen angenommen wird, dass sie ebenfalls eine Rolle in der Entstehung der Krankheit und der Therapierbarkeit durch Dex spielen, war es wichtig nachzuweisen, dass die Makrophagenfunktion in IckGR<sup>dim</sup>-Tieren uneingeschränkt ist und der Defekt ausschließlich T-Zellen betrifft. Zu diesem Zwecke wurden Makrophagen *in vivo* aus dem Peritoneum von Dex- beziehungsweise PBS-behandelten IckGR<sup>dim</sup>-/- und Kontrolltieren (IckGR<sup>dim</sup>+/-) isoliert. Mit einem Teil der gewonnenen Zellen wurde ein NO-Test durchgeführt. Der andere Teil der Makrophagen wurde stimuliert und daraufhin via Durchflusszytometrie analysiert.

Beide Tests zeigten, dass die Makrophagenfunktion durch den Defekt auf den T-Zellen nicht beeinflusst war. So sank die Produktion von NO in IckGR<sup>dim</sup>-Tieren nach Dex-Gabe ebenso wie in den Kontrollen (Abb. 14). Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, bestätigte auch die FACS-Analyse die uneingeschränkte Makrophagenfunktion. Nach Dex-Gabe kam es zu einer verminderten Expression von MHCII auf den Makrophagen, sowohl in den Tieren mit dem T-Zell-Defekt als auch in den Kontrolltieren.

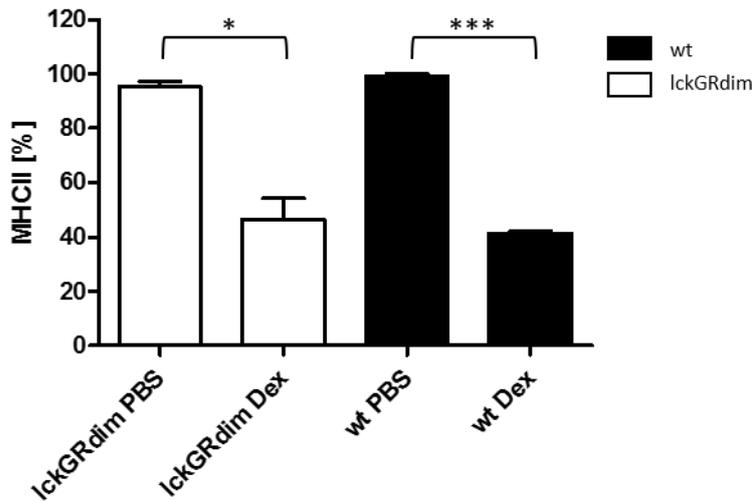


Abb. 13: **MHC-II-Expression auf Makrophagen.** Die untersuchten Makrophagen wurden aus dem Peritoneum von wt- und IckGR<sup>dim</sup>-Tieren gewonnen. Nach Anreicherung der Makrophagen im Peritoneum der Mäuse mittels i.p.-Injektion von 4%igem Thioglykolat wurden die Tiere 66 Stunden später mit Dexamethason (100 mg/kg Körpergewicht) oder PBS als Kontrolle behandelt. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Entnahme der Zellen aus dem Peritoneum. Anschließend wurden die Zellen inkubiert und nach entsprechender Antikörperfärbung einer FACS-Analyse zugeführt. Die MHC-II-Expression angegeben in Prozent bezieht sich auf die Kontrolle (wt/PBS), die gleich 100% gesetzt wurde.

N = 2-3, ungepaarter t Test, \*p<0,05, \*\*\* p<0,001

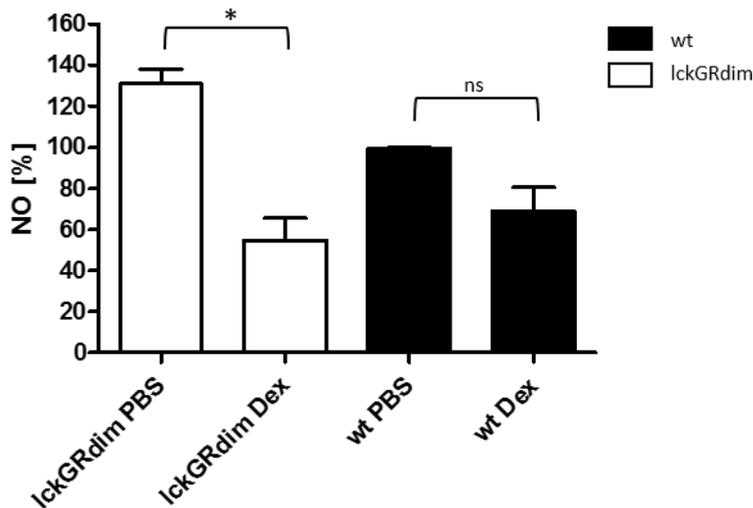


Abb. 14: **NO-Produktion der Makrophagen.** Gewinnung der mit Dex- beziehungsweise PBS-behandelten Makrophagen aus dem Peritoneum von wt- und IckGR<sup>dim</sup>-Mäusen vgl. Abb. 13. Nach anschließender Inkubation der Makrophagen wurde ein NO-Test zur Quantifizierung der produzierten NO-Menge durchgeführt. Die Detektion und Konzentrationsbestimmung der gebildeten Menge an NO basiert auf einer Farbreaktion, die durch die Diazonisierung mit Gries-Reagenz (Naphthylethylendiamin + Sulphanilamid) durchgeführt wird. Die Messung erfolgte am Photometer.

N = 2-3, ungepaarter t Test, ns = nicht signifikant, \*p<0,05

### 3.2.3 Auch GR<sup>dim</sup>-Tiere sind mit Dex behandelbar

Zur Bestätigung der unerwarteten Ergebnisse aus den Versuchen mit den IckGR<sup>dim</sup>-Tieren wurden nun ebenfalls klinische Versuche mit GR<sup>dim</sup>-Tieren durchgeführt, die den nicht dimerisierungsfähigen GR auf allen Zellreihen exprimieren. In drei voneinander unabhängigen und zeitlich versetzten Experimenten wurden jeweils 10 homozygote knock-in-Tiere (GR<sup>dim/-</sup>) und dieselbe Menge an Kontrolltieren (GR<sup>dim+/-</sup>) aktiv immunisiert. Nach Erreichen eines durchschnittlichen Krankheits-Scores von 2-3 erfolgte die Behandlung mit 100 mg/kg Körpergewicht Dex bzw. 200 µl PBS an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Während der Behandlung und für weitere vier Tage nach Abschluss der Behandlung wurde das Gewicht und der Score der Tiere täglich geprüft und dokumentiert.

In allen drei Experimenten konnte eindeutig gezeigt werden, dass GR<sup>dim</sup>-Tiere ebenso gut behandelbar sind wie die Tiere der Kontrollgruppe (Abb. 15).

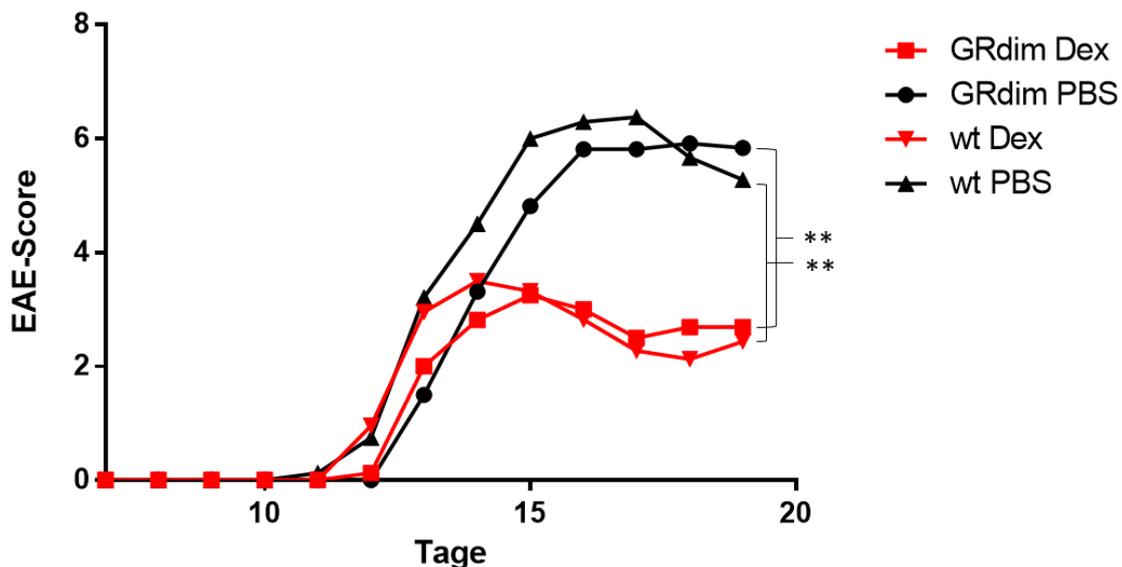


Abb. 15 : **Klinischer Verlauf der EAE bei GR<sup>dim</sup>- und Kontrolltieren.** Die Behandlung mit 100 mg/kg Körpergewicht Dex bzw. PBS erfolgte an den Tagen 13, 14 und 15 nach Immunisierung mit MOG<sub>33-35</sub> (Pfeile). Es wurden 3 voneinander unabhängig durchgeführte Experimente miteinander gepoolt. N= 11-12. Im Rahmen der statistischen Analyse wurde der gesamte Kurvenverlauf, beginnend ab Tag 14 bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes, miteinander verglichen. Hierzu wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Test als nachgeschaltetem Test verwendet. \*\* p<0,01.

### 3.2.4 Weitere Tests zur Apoptoseinduktion

In den vorangehend beschriebenen Versuchen war nachgewiesen worden, dass die T-Zell-Apoptose nicht, wie bislang angenommen, einer der entscheidenden Mechanismen für die Wirkung von GCs in der Therapie der EAE ist. Daher drängte sich nun die Frage auf, welche anderen Mechanismen der Therapierbarkeit der EAE durch Dex zugrunde liegen könnten. Um dieser Frage nachzukommen sollte

zunächst die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass in den transgenen IckGR<sup>dim</sup>- und GR<sup>dim</sup>-Mäusen die Applikation von Dex wider Erwarten doch zur Induktion von Apoptose in den T-Zellen führte. Hierzu wurden zum einen *Ex-Vivo*-Daten per Zellzahlbestimmung und FACS-Analyse erstellt. Zum anderen wurde ein *In-Vitro*-Apoptose-Assay durchgeführt.

### 3.2.4.1 Zellzahl

Für die Zellzahlbestimmung und FACS-Analyse wurden 10 GR<sup>dim</sup>-knock-in-Mäuse und 10 Kontrolltiere EAE immunisiert und an den Tagen 14, 15 und 16 nach Immunisierung mit Dex beziehungsweise PBS behandelt. Am Folgetag nach abgeschlossener Behandlung wurden den Tieren die Milz sowie das RM entnommen, Einzelzellsuspensionen erstellt und zunächst die Zellzahl bestimmt. Wie erwartet war die Zahl der Zellen in der Milz in den Dex-behandelten Kontrolltieren im Gegensatz zu den PBS-behandelten Kontrolltieren stark gesunken. Diese Differenz zwischen Dex- und PBS-behandelten Tiere konnte in GR<sup>dim</sup>-Mäusen nicht beobachtet werden (Abb. 16). Die Zellzahl im RM hingegen war sowohl in Kontrolltieren als auch in GR<sup>dim</sup>-Tieren nach der Therapie mit Dex gesunken (Abb. 17). Signifikante Ergebnisse konnten hier nur für die wt-Tiere gewonnen werden, da für die Analyse der GR<sup>dim</sup>-Tiere eine nur sehr geringe Anzahl an Tieren zur Verfügung stand. Visuell zeigt sich jedoch auch bei den GR<sup>dim</sup> ein deutlicher Trend zur Reduktion der Zellzahl im RM nach Dex-Therapie (Abb. 17).

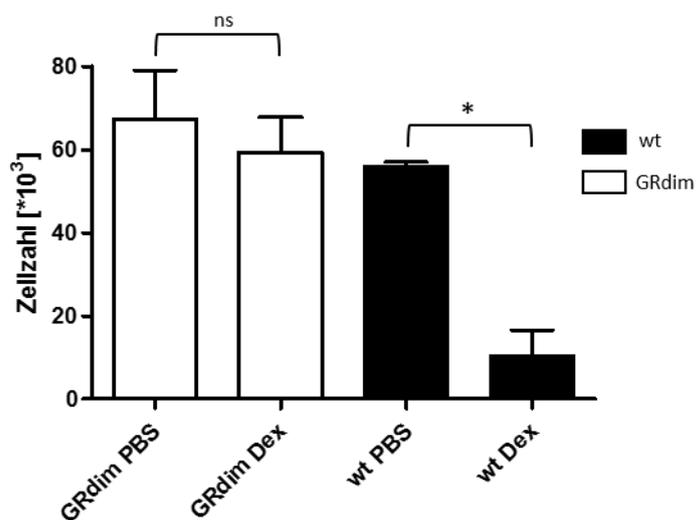


Abb. 16: **Quantitative Analyse der Zellzahlen (Milz) in GR<sup>dim</sup>- und Kontrolltieren.** Nach Immunisierung von wt- und GR<sup>dim</sup>-Tieren mit MOG<sub>33-35</sub> erfolgte bei einem durchschnittlichen EAE-Score von 2-3 die Einteilung in Therapie- und Placebo-Gruppe. Die Behandlung mit 100 mg/kg KG Dex bzw. einer äquivalenten Menge an PBS wurde an den Tagen 14-16 durchgeführt. Am Tag 17 wurden die Milzen der Tiere entnommen und nach Herstellung einer Einzelzellsuspension die Zellzahl ermittelt. N = 2-5. Statistik mittels ungepaartem t Test. \* p<0,05

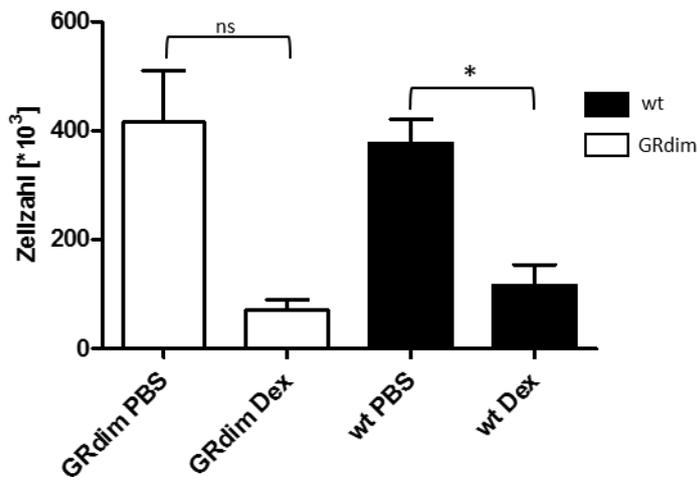


Abb. 17: **Quantitative Analyse der Zellzahlen (RM) in GR<sup>dim</sup>- und Kontrolltieren.** Versuchsaufbau siehe Abb. 16.

An Tag 17 erfolgte die Entnahme des Rückenmarkes der Tiere sowie nach Herstellung einer Einzelzellsuspension mittels Percoll-Gradient die Auszählung der Zellen zur Bestimmung der Zellzahl.

N = 2-3. Statistik mittels ungepaartem t Test. \*p<0,05.

Bei der Zellzahlbestimmung aus den Milzen von IckGR<sup>dim</sup>-Mäusen fiel ein deutlicher Abfall der absoluten Gesamtzellzahl an CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nach Behandlung mit Dex in beiden Gruppen auf, wobei diese in den wt-Tieren stärker ausgeprägt war als in den IckGR<sup>dim</sup>-Tieren (Abb. 18). Da in den IckGR<sup>dim</sup>-Tieren die T-Zellen als einzige Zellpopulation mit der Mutation im GR versehen sind, kommt es in allen anderen Zellreihen nach der Applikation von Dex zur Apoptose, nicht jedoch in T-Zellen. Vermutlich folgt kompensatorisch eine Verminderung der T-Zellzahl, so dass trotz fehlender Apoptose in T-Zellen deren Zahl im Rahmen eines Kompensationsmechanismus mit absinkt.

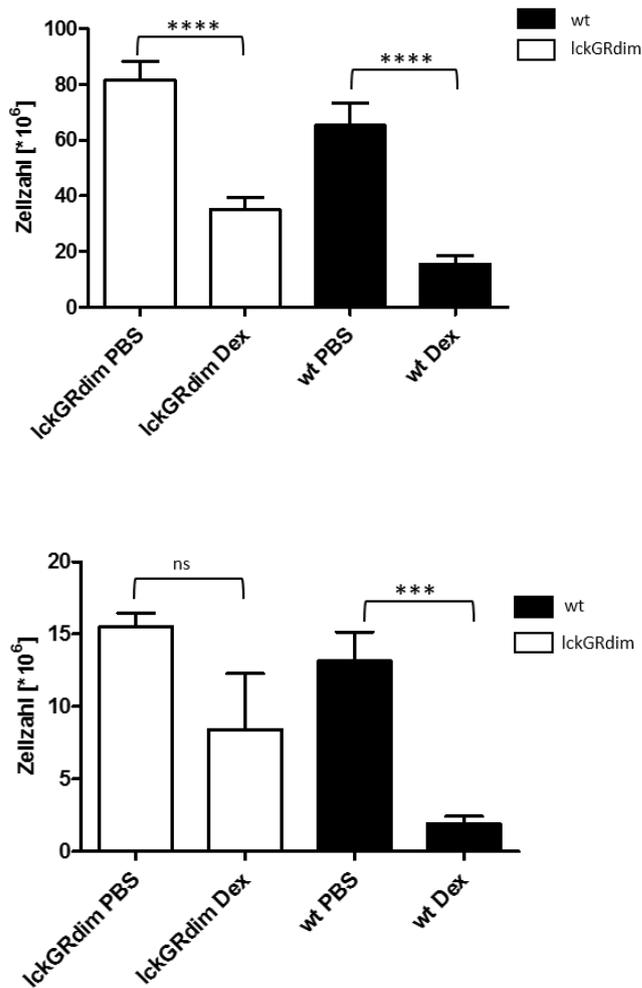


Abb. 18: Zellzahl (Milz) in lckGR<sup>dim</sup>- und Kontrolltieren nach dreitägiger Dex-Behandlung.

Oben: **Gesamtzellzahl aller Splenozyten.** Nach Immunisierung von wt- und lckGR<sup>dim</sup>-Tieren erfolgte bei einem durchschnittlichen EAE-Score von 2-3 die Behandlung mit 100 mg/kg KG Dex bzw. einer äquivalenten Menge an PBS an den Tagen 13-15. An Tag 16 wurden die Milzen der Tiere entnommen und nach Herstellung einer Einzelzellsuspension die Zellzahl ermittelt.

Unten: **Zellzahl der T-Zellen in der Milz.** Zur weiteren Differenzierung der Splenozyten erfolgte eine Antikörperfärbung sowie eine anschließende FACS-Analyse.

N = 6-9. Statistik mittels ungepaartem t Test. \*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001

### 3.2.4.2 Bestimmung von apoptotischen Zellen in der Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrisch konnte anhand einer Färbung mit AxV gezeigt werden, dass in den Zellen der Milzen der Kontrolltiere durch die Behandlung mit Dex Apoptose induziert wurde. Die mit Dex behandelten Zellen aus den GR<sup>dim</sup>-Mäusen hingegen zeigten eine sehr viel geringere Bindung von AxV. Hier wurde also eine deutlich geringere Anzahl an apoptotischen Zellen gefunden wie in Abb. 19 zu erkennen ist.

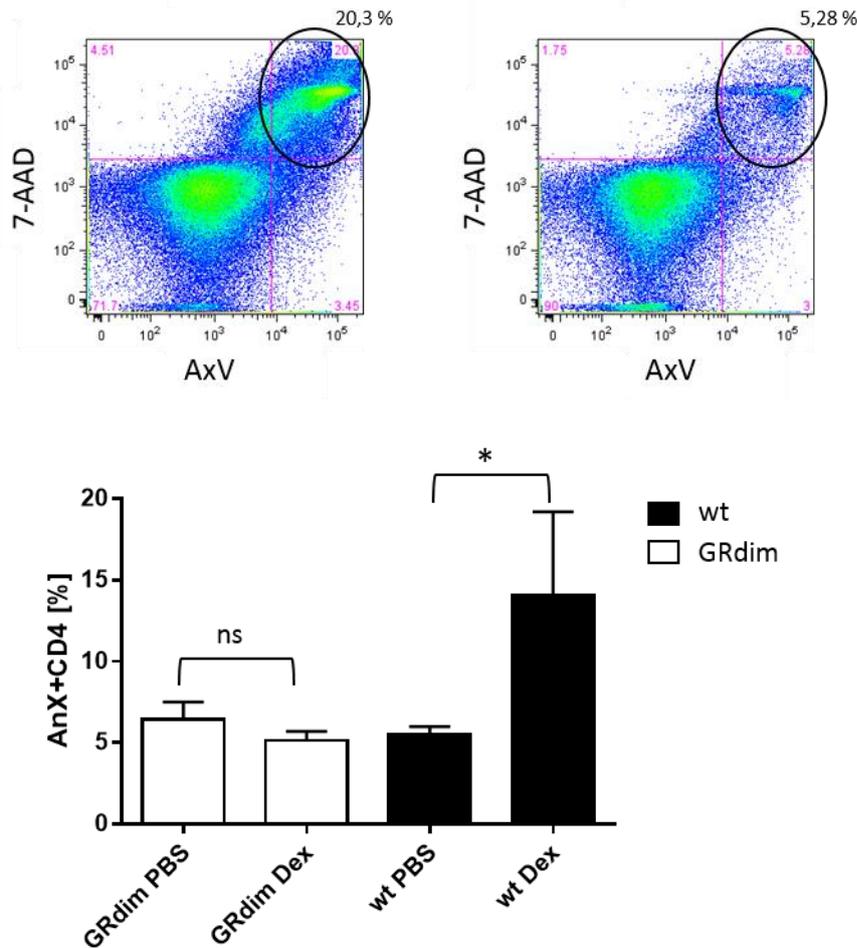


Abb. 19: FACS-Analyse von T-Zellen aus der Milz aus GR<sup>dim</sup>- und Kontrolltieren. Die EAE-immunisierten Tiere wurden nach Ausbruch der Erkrankung nach bekanntem Schema mit Dex bzw. PBS behandelt. Anschließend erfolgte die Entnahme der Milzen, die Extraktion der Splenozyten und anschließend die Färbung mit CD4 und AxV. In der durchflusszytometrischen Untersuchung zeigt sich eine große Zahl an apoptotischen Zellen in den mit Dex behandelten Kontrolltieren: 20.3% (Graphik oben links), hingegen eine geringe Anzahl an apoptotischen Zellen in den mit Dex behandelten GR<sup>dim</sup>-Tieren: 5,28% (oben rechts).

Dies wird ebenso in der Quantifizierung (unten) verdeutlicht. Statistik mittels ungepaartem t Test. \*p<0,05

Sowohl die Ergebnisse der Zellzählung als auch die Färbung mit AxV und folgender Durchflusszytometrie im Rahmen der *In-Vivo*-Experimente wiesen darauf hin, dass in den T-Zellen der transgenen Tiere keine Apoptose durch die Behandlung mit Dex hervorgerufen wurde.

### 3.2.4.3 Dex-Apoptose-Assay *in vitro*

Die Bindung von AxV in der FACS-Färbung von *In-Vivo*-Experimenten ist fehleranfällig. Häufig werden Zellen bei der Aufarbeitung geschädigt und binden daraufhin AxV. Um sicher zu belegen, dass der erhöhte Anteil an apoptotischen Zellen bei den Kontrolltieren tatsächlich aufgrund der Dex-Therapie

entstanden war, wurde zusätzlich ein Dex-Apoptose-Assay *in vitro* durchgeführt. Zur genauen Differenzierung zwischen der Apoptose-Induktion zwischen den verschiedenen Zellreihen wurden hierzu IckGR<sup>dim</sup>-Mäuse verwendet. Aus 3 IckGR<sup>dim</sup>-Tieren und 3 Kontrolltieren wurden Splenozyten isoliert und für 20 Stunden mit PBS beziehungsweise mit Dex in verschiedenen Konzentrationen ( $10^{-9}$ M,  $10^{-8}$ M und  $10^{-7}$ M) *in vitro* inkubiert. Im Folgenden wurde eine Zellzählung sowie eine FACS-Analyse zur Differenzierung der CD4-, CD8- und nicht-T-Zellen durchgeführt.

In Abb. 20 wird deutlich, dass in den Kontrolltieren mit zunehmender Dex-Konzentration ein deutlicher Abfall der Zellzahlen in allen Zellreihen (CD4<sup>+</sup>-Zellen, CD8<sup>+</sup>-Zellen, Nicht-T-Zellen) zu beobachten ist. Bei den Zellen aus IckGR<sup>dim</sup>-Tieren hingegen verändert sich erwartungsgemäß die T-Zellzahl mit zunehmender Dex-Konzentration nicht. Die Zellzahl der Nicht-T-Zellen hingegen zeigt den gleichen deutlichen Abfall, der bereits in den Kontrolltieren dokumentiert worden war.

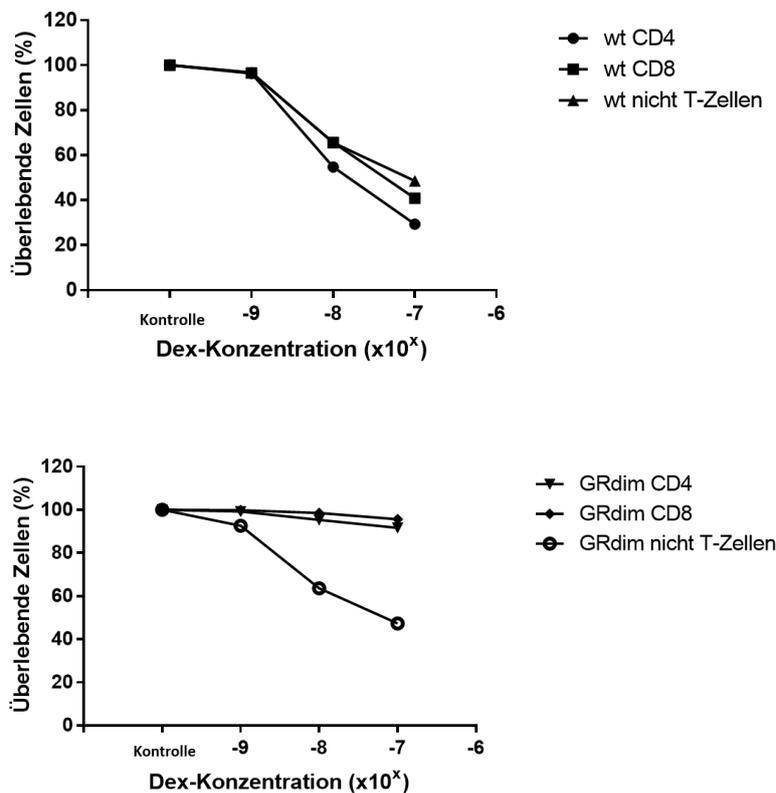


Abb. 20: Zellzahl von CD4-, CD8- und Nicht-T-Zellen im Dex-Apoptose-Assay. Gezeigt wird hier der prozentuale Anteil an überlebenden Zellen der verschiedenen Splenozyten.

Aus 3 IckGR<sup>dim</sup>-Tieren und 3 Kontrolltieren wurden Splenozyten isoliert und für 20 Stunden mit PBS beziehungsweise mit Dex in verschiedenen Konzentrationen ( $10^{-9}$ M,  $10^{-8}$ M und  $10^{-7}$ M) *in vitro* inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zellzählung. Die Differenzierung der Zellen in CD4-, CD8- und Nicht-T-Zellen erfolgte via FACS-Analyse.

Versuch in Zusammenarbeit mit Dr. Jens van den Brandt.

Oben: Zellen aus wt- (Kontroll-) Tieren

Unten: Zellen aus IckGR<sup>dim</sup>-Tieren

Zusammenfassend belegen diese Versuche, dass die Zellen, die den veränderten GR<sup>dim</sup> exprimieren, auf die Applikation von Dex tatsächlich nicht mit Apoptose-Induktion reagieren. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der klinischen Experimente, die eine sehr gute Behandelbarkeit der IckGR<sup>dim</sup>- und GR<sup>dim</sup>-Tiere gezeigt hatten, konnte so belegt werden, dass die Induktion von Apoptose in T-Zellen nicht essentiell für die GC-Behandlung in der EAE ist.

### **3.2.5 Migration der Zellen ins ZNS**

#### **3.2.5.1 Zellzahl (FACS-Analyse)**

Es wurde bereits durch verschiedene Arbeitsgruppen publiziert, dass Dex unter anderem die Migration der peripheren T-Zellen ins ZNS vermindert, zum einen über die Festigung der Integrität der BHS (Forster et al. 2006), zum anderen über die verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen wie CD44, LFA-1 und VLA-4 (Wüst et al. 2008). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnten weitere Hinweise darauf gefunden werden, dass Dex die Migration der Zellen in das ZNS behindert. So ergaben Zellzahlbestimmungen im RM von GR<sup>dim</sup>-Tieren (hier trotz fehlender Apoptose) und Kontrolltieren nach standardmäßiger Behandlung mit Dex eine deutlich abnehmende Gesamtzellzahl im ZNS (siehe Abb. 17). Zur weiteren Untersuchung der Migration der T-Zellen in das ZNS von erkrankten Tieren wurde ein neuer Versuchsaufbau durchgeführt. Nach aktiver Immunisierung und Behandlung der Tiere nach bekanntem Schema erfolgte zunächst die Perfusion der narkotisierten Tiere mit PBS. Das RM wurde präpariert und in den üblichen Schritten eine Leukozyten-Isolation mithilfe eines Percoll-Gradienten durchgeführt. Nach Aufnahme der Zellen in FACS-Puffer erfolgte eine Färbung mit Trypanblau, Zählung unter dem Mikroskop und Errechnung der Zellzahl. Zusätzlich konnte mithilfe einer später durchgeführten FACS-Analyse zwischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und Makrophagen differenziert werden und diese so als wichtige Zellreihen aus der Masse der Gesamtzellen distinguiert betrachtet werden.

Abb. 21 zeigt, ähnlich wie Abb. 17, die sinkenden Zellzahlen in beiden Gruppen, hier jedoch fokussiert auf die T-Zellen im RM der behandelten Tiere. Eine Signifikanz konnte nicht gezeigt werden, da auch hier eine zu geringe Zahl an Tieren verwendet wurde.

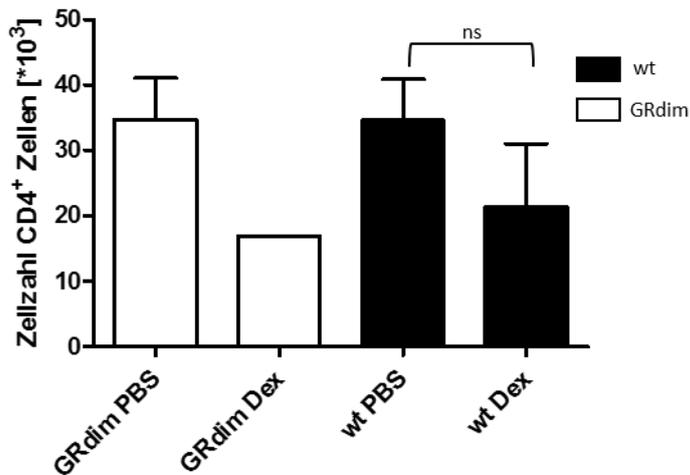


Abb. 21: T-Zellzahl im Rückenmark von Dex- bzw. PBS-behandelten GR<sup>dim</sup>- und Kontrolltieren. Nach Immunisierung erfolgte die Behandlung der Tiere nach bekanntem Schema. Nach Abschluss der Behandlung wurden die Tiere narkotisiert und das RM, nach Perfusion der Tiere mit PBS, präpariert. Die Herstellung der Einzelzellsuspensionen erfolgte via Percoll-Gradient, die Auszählung der Zellen mikroskopisch nach Anfärbung mit Trypanblau, die Differenzierung in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mittels FACS-Analyse. N = 1-3. Statistik mittels ungepaartem t Test. ns = nicht signifikant

Eine deutlich verminderte Anzahl von Makrophagen im Rückenmark nach Dex-Behandlung konnte sowohl in GR<sup>dim</sup>- als auch in Kontrolltieren gezeigt werden, wobei auch hier eine Signifikanz bei den GR<sup>dim</sup>-Tieren nachzuweisen misslang aufgrund der geringen Anzahl an Versuchstieren in diesem Experiment (Abb. 22).

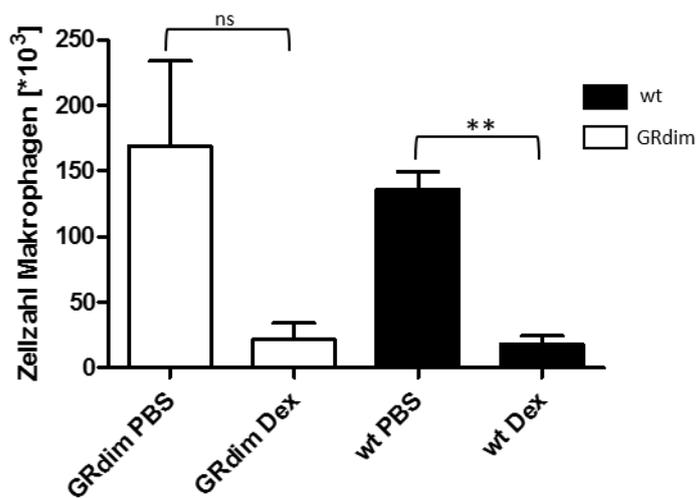


Abb. 22: Zellzahl Makrophagen (RM) von Dex- bzw. PBS-behandelten GR<sup>dim</sup>- und Kontrolltieren. Versuchsaufbau vgl. Abb. 22, Differenzierung der Makrophagen aus den RM-infiltrierenden Zellen mittels FACS-Analyse. N = 2-3, Statistik mittels ungepaartem t Test. ns = nicht signifikant, \*\*p<0,01

### 3.2.5.2 Histologie (CD3- und MAC3-Färbung RM)

Auch histopathologisch konnten die beschriebenen Ergebnisse zu den ZNS-infiltrierenden Zellen nach therapeutischer Dex-Gabe in GR<sup>dim</sup>- und Kontrolltieren nachvollzogen werden. Im Zuge der Isolation des RM aus erkrankten und therapierten GR<sup>dim</sup>- und Kontrolltieren wurden Teile des lumbalen RM abgetrennt und zur Fixierung in Paraformaldehyd (PFA) gelegt. Nach entsprechender Vorbereitung der Schnitte erfolgte eine Färbung für CD3 und Mac3. Die Zählung der Zellen wurde mit einem 40er Objektiv und mithilfe eines quadratischen Rasters durchgeführt. Je Tier wurden 3 Infiltrate ausgezählt und hieraus der Mittelwert errechnet. Es ließ sich mikroskopisch eine deutliche Abnahme der Größe der Infiltrate im RM beobachten. Die erstellten Graphen (Abb. 23) zeigen einen signifikanten Abfall der ZNS-infiltrierenden Zellen, zumindest für die Makrophagen. Für die infiltrierenden T-Zellen kann nur visuell ein Hinweis auf die absinkende Zellzahl gewonnen werden. Hier war erneut die Tierzahl zu gering, um signifikante Ergebnisse zu erlangen. Vorläufig korrelieren diese mikroskopisch erhobenen Werte aber sehr gut mit den Daten aus den anderen durchgeführten Analysen bezüglich der Abnahme der Anzahl an ZNS-infiltrierenden Zellen in Dex-behandelten und Kontrolltieren und bestätigen die Annahme, dass die Migration der Zellen ins ZNS der erkrankten Tiere durch die Therapie mit Dex eingeschränkt wird.

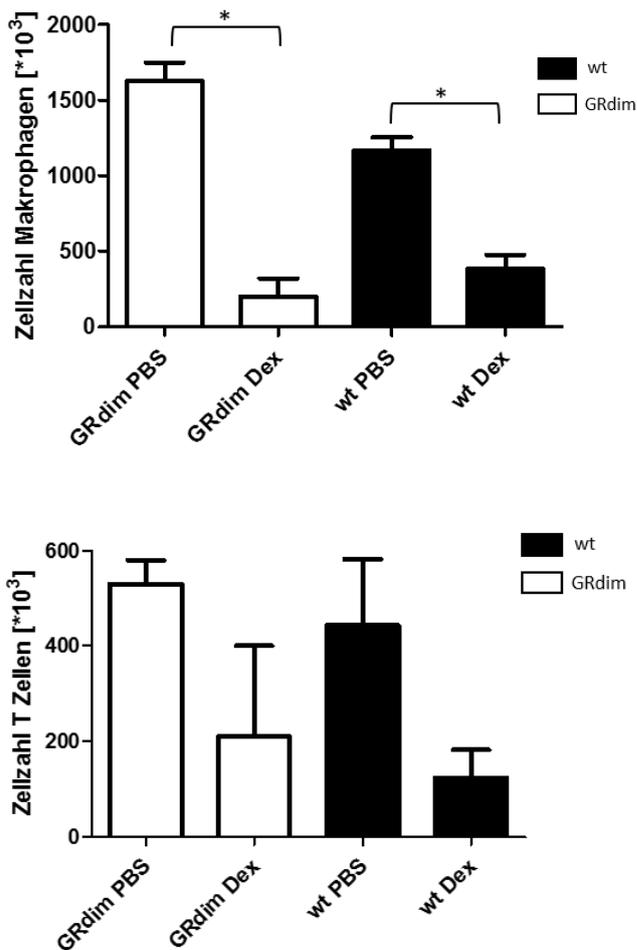


Abb. 23: **Histologie der ZNS-infiltrierenden Zellen.** Im Rahmen der Präparation des Rückenmarkes der erkrankten und behandelten Tiere für die Zellzahl- und FACS-Analysen wurde jeweils der lumbale Anteil des RM abgetrennt und in Paraformaldehyd fixiert. Es wurde Schnitte hergestellt, die nach entsprechender Vorbereitung für CD3 und Mac3 gefärbt wurden. Nach der Färbung erfolgte die mikroskopische Auszählung der infiltrierenden Zellen.

Oben: Zellzahl der ins ZNS infiltrierten Makrophagen, N = 2-3, Statistik mittels ungepaartem t Test. \*p<0,05

Unten: Zellzahl der ins ZNS infiltrierenden Z-Zellen, N =1-3, keine sinnvoll statistische Analyse möglich.

### 3.2.6 Proliferation

Nachdem die T-Zell-Apoptose in verschiedenen Experimenten nun eindeutig als entscheidender Parameter der Grundlage für die Therapierbarkeit der EAE durch Dex ausgeschlossen worden war, wurden im nächsten Schritt der Arbeit weitere Ideen und Ansätze entwickelt, um die Wirkweise der GC-Therapie zu eruieren.

Zunächst sollte als Grundlage für die weitere Forschung in dieser Arbeit ausgeschlossen werden, dass Dex völlig unspezifisch alle Parameter der Zelle wie Zellteilung, Expression von Adhäsionsmolekülen und Zytokinproduktion beeinflusst. Hierzu wurde zunächst ein Proliferations-Assay durchgeführt. Die Zellen für die Analyse wurden aus Milzen von erkrankten und daraufhin behandelten beziehungsweise unbehandelten Tieren isoliert. Es folgte die Stimulation mit MOG und ConA *in vitro* und die Inkubation

der Zellen mit dem Nukleosid  $^3\text{H}$ -Thymidin. Anschließend wurde die Proliferationsrate anhand des in die Zellen eingebauten radioaktiv markierten Nukelosids mithilfe eines Counters gemessen. Für die Analyse wurden GR<sup>dim</sup>-Chimären verwendet. Dieses war notwendig, da die in den früheren Experimenten verwendeten GR<sup>dim</sup>-Tiere sich sehr schlecht reproduzierten und so keine ausreichende Anzahl dieser Versuchstiere mehr zur Verfügung stand.

Aus Abb. 24 wird ersichtlich, dass sowohl die Zellen aus GR<sup>dim</sup>-Chimären sowie auch aus den Kontrolltieren nach Dexbehandlung weiterhin gut proliferierten. Die Zellen sind also nach Therapie weiterhin funktionell aktiv, was die Proliferation betrifft. Somit konnte als Ausgangspunkt für die folgenden Experimente gezeigt werden, dass Dex nicht unwillkürlich die Funktionalität der gesamten Zelle beeinflusst.

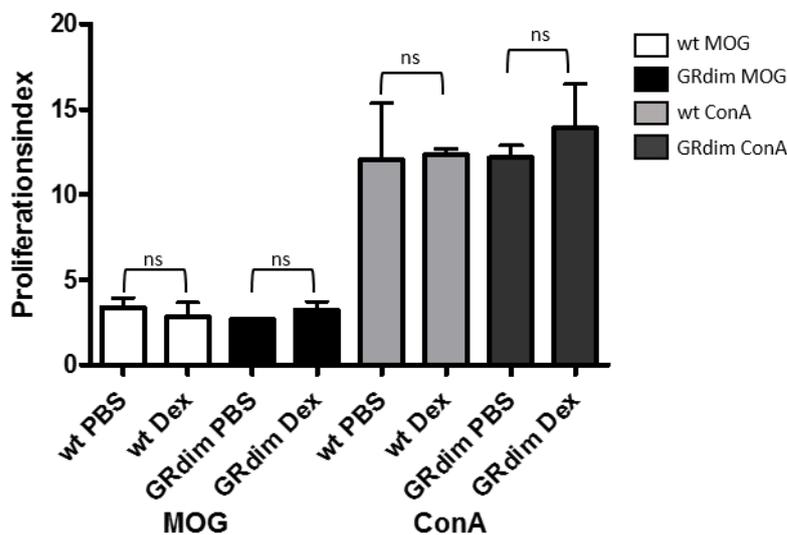


Abb. 24: **Proliferations-Assay**. Splenozyten wurden aus immunisierten und behandelten Tieren isoliert. Es folgte eine *in vitro* Stimulation der gewonnenen Zellen mit MOG und ConA sowie eine anschließende Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin. Die Proliferationsrate wurde anhand des in die Zellen eingebauten radioaktiv markierten Nukelosids mithilfe eines Counters gemessen. N = 3-8, Statistik mittels ungepaartem t Test. ns = nicht signifikant.

### 3.2.7 Adhäsionsmoleküle

Im Hinblick auf die Tatsache, dass eine verminderte Migration der Zellen in das RM beobachtet worden war, sollte im Folgenden die Expression von Adhäsionsmolekülen näher betrachtet werden. In mehreren voneinander unabhängigen Versuchen wurde vor allem wiederholt die Expression des Adhäsionsmoleküls LFA-1 auf den peripheren T-Zellen via FACS-Analyse bestimmt. Hierzu wurden Splenozyten aus EAE-immunisierten, behandelten und unbehandelten GR<sup>dim</sup>- und Kontrolltieren isoliert und diese in einer FACS-Analyse mit dem Antikörper gegen LFA-1 (CD11a) gefärbt. Ebenso erfolgte diese Analyse in Versuchen mit IckGR<sup>dim</sup>-Mäusen. Es zeigte sich in beiden Fällen, dass die verminderte Expression von LFA-1 durch Dex auch über den GR<sup>dim</sup> vermittelt wird und dass dieses Adhäsionsmolekül somit in den

behandelten Tieren deutlich weniger exprimiert wird als in unbehandelten Tieren (Abb. 25). Diese Ergebnisse zur verminderten Expression von Adhäsionsmolekülen gehen konform mit jenen, die von Wüst et al. 2008 in wt-Tieren beschrieben worden waren.

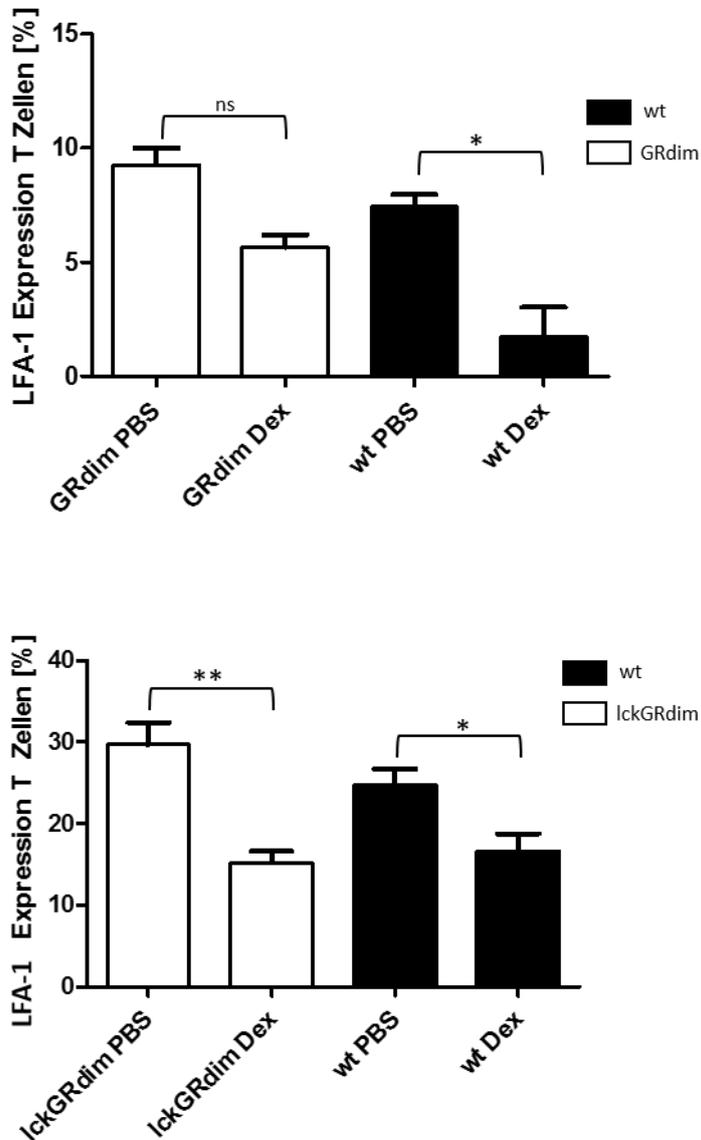


Abb. 25: **Expression von Adhäsionsmolekülen.** Für die Untersuchung der Expression von Adhäsionsmolekülen auf peripheren T-Zellen in sowohl GR<sup>dim</sup>- als auch lckGR<sup>dim</sup>-Mäusen wurde exemplarisch LFA-1 gewählt. Nach Immunisierung und Behandlung der Tiere wurden die Splenozyten aus den Milzen der Tiere isoliert, aufgereinigt und einer FACS-Analyse zugeführt.

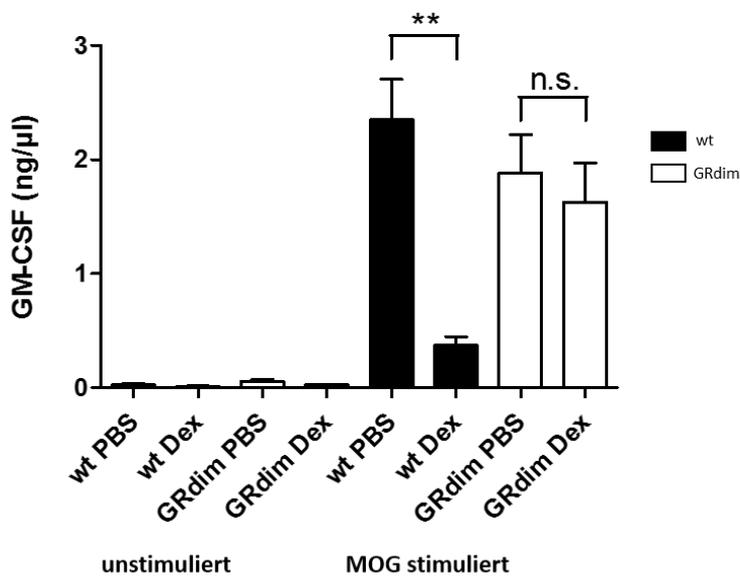
Oben: LFA-1 Expression in GR<sup>dim</sup>, N = 2-3, Statistik mittels ungepaartem t Test. ns = nicht signifikant, \*p<0,05

Unten: LFA-1 Expression in lckGR<sup>dim</sup>, N = 5-6, Statistik mittels ungepaartem t Test. \*p<0,05, \*\*p<0,01

### 3.2.8 Zytokine

#### 3.2.8.1 Bestimmung der Zytokinsekretion von Splenozyten mittels ELISA

Neben den Adhäsionsmolekülen wird auch der Zytokinproduktion eine mögliche Rolle bei der GC-Therapie zugesprochen. Im Zuge des oben beschriebenen Proliferations-Assays wurde neben der Messung der Proliferationsrate ein ELISA bezüglich der Produktion einiger, für die EAE relevanter, Zytokine durchgeführt. Hierzu wurden die aus behandelten und unbehandelten Tieren (wt-Mäuse und GR<sup>dim</sup>-Chimären) isolierten Splenozyten zunächst *in vitro* mit MOG, ConA oder Medium – als Kontrolle - stimuliert. Anschließend erfolgte die Messung der Zytokine *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), Interferon- $\gamma$  (INF $\gamma$ ) und Interleukin-17 (IL-17) mittels ELISA. Die Zytokinbestimmung wurde in mehreren, voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt und die Ergebnisse anschließend gepoolt. Es zeigte sich, dass die Produktion von GM-CSF in den Kontrolltieren durch die Behandlung mit Dex signifikant gesenkt wird. Bei den GR<sup>dim</sup>-Chimären konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Die Produktion der Zytokine IL-17 und INF- $\gamma$  wird sowohl in den Zellen der Kontrolltiere als auch in den aus GR<sup>dim</sup>-Chimären isolierten Zellen deutlich durch Dex supprimiert. (Abb. 26)



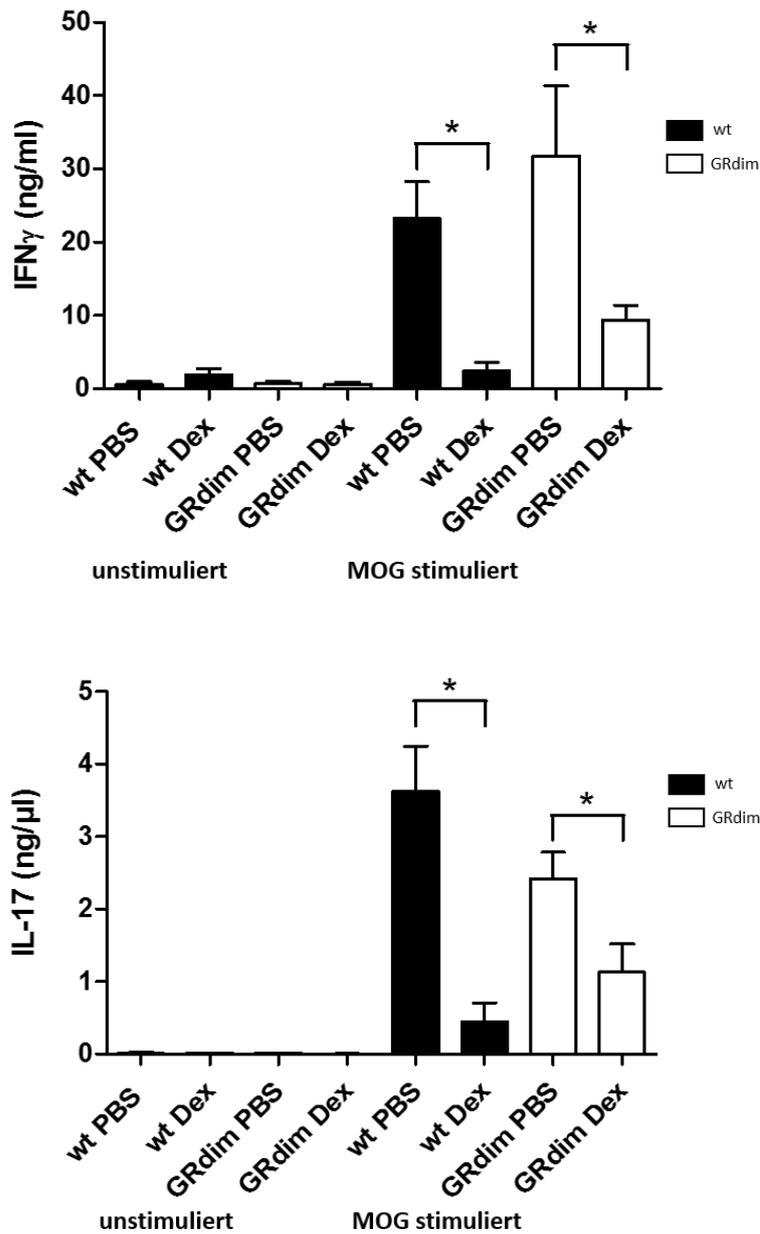


Abb. 26: **Quantitative Bestimmung der Zytokinproduktion in Splenozyten mittels ELISA.** Zur Bestimmung der Produktion von Zytokinen in den Splenozyten nach Therapie mit Dex wurden Zellen aus den Milzen von behandelten und unbehandelten wt-Tieren und GR<sup>dim</sup>-Chimären isoliert. Nachfolgend wurden die Zellen mit MOG stimuliert. Als Kontrolle dienten in Medium inkubierte Zellen. Exemplarisch wurde die Produktion der Zytokine GM-CSF (oben), IFN $\gamma$  (Mitte) und IL-17 (unten) mittels ELISA gemessen. 2 voneinander unabhängig durchgeführte Experimente wurden gepoolt, N= 3-8. Statistik mittels ungepaar-tem t Test. ns = nicht-signifikant, \*p<0,05, \*\*p<0,01

### 3.2.8.2 Bestimmung von Zyto- und Chemokinen aus RM-infiltrierenden Lymphozyten mittels PCR

Zur Bestätigung der Ergebnisse zur Zytokinproduktion in peripheren Zellen wurde zudem eine quantitative Bestimmung der Zytokin- und Chemokinproduktion aus in das RM eingewanderten Zellen durchgeführt. Hierbei wurden Zellen betrachtet, die aus dem RM von erkrankten Tieren nach Dex- bzw. PBS-Behandlung isoliert worden waren. Die Messung erfolgte mittels quantitativer PCR, die von Dr. Anna Karabinskaya (Experimentelle Immunologie Göttingen, AG Reichardt) durchgeführt wurde. Die Zellen wurden auf die Expression von GILZ, Annexin-1, RANTES, GM-CSF, IL-17 und IFN $\gamma$  untersucht. (Abb. 28) Die Daten für IL-17 und IFN $\gamma$  erwiesen sich aus technischen Gründen als fehlerhaft und können nicht beurteilt werden. Sie werden im weiteren Verlauf wiederholt werden müssen.

Das GILZ-Gen (*Glucocorticoid-induced leucin-zipper*) wird in Lymphozyten von gesunden Mäusen und in menschlichen lympho- und hämatopoetischen Zellen exprimiert (D'Adamio et al. 1997). Es interferiert mit der Funktion von AP-1 und NF- $\kappa$ B. Durch die Gabe von GCs wird GILZ induziert und inhibiert AP-1 und NF- $\kappa$ B (Mittelstadt und Ashwell 2001, Ayroldi et al. 2001). Im Rahmen der quantitativen PCR zeigte sich, dass GILZ in wt-Tieren induziert wurde, nicht jedoch in GR<sup>dim</sup>-Mäusen. Hierdurch bestätigte sich erneut, dass typische GRE-abhängige Gene in GR<sup>dim</sup>-Mäusen nicht induziert werden können. GILZ scheidet jedoch aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse in GR<sup>dim</sup>- und Kontrolltieren als wichtiger Angriffspunkt von GCs in der EAE aus.

GM-CSF und RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*) zeigten sich in wt-Tieren supprimiert, in GR<sup>dim</sup>-Tieren jedoch nicht. Für GM-CSF korrelieren diese Ergebnisse sehr gut mit den Ergebnissen aus dem durchgeführten ELISA. RANTES, ebenso bekannt als CCL5, ist ein Chemokin, das an der Chemotaxis von T-Zellen, Eosinophilen und Basophilen Leukozyten beteiligt ist. Es spielt eine entscheidende Rolle in der Adhäsion von Leukozyten an die Mikrozirkulation des Gehirns (Dos Santos et al. 2008). Durch die Repression des Gens durch GCs kommt es zu einer verminderten Rekrutierung dieser Zellen zum Entzündungsherd. Da es in GR<sup>dim</sup>-Mäusen zu keiner Repression nach GC Gabe kommt, scheint auch RANTES kein wichtiges Target der GC-Therapie zu sein.

Annexin-1 befindet sich auf der zytosolischen Seite der Zellmembran und vermag Phospholipase 2 zu inaktivieren. Phospholipase 2 wiederum wird für die Biosynthese von potenten Entzündungsmediatoren wie Leukotrienen und Prostaglandinen benötigt. Somit kann man Annexin-1 als potentiell antiinflammatorisches Protein bezeichnen (Perretti und D'Acquisto 2009). In der durchgeführten PCR konnte eine Induktion von Annexin-1 sowohl in wt als auch in GR<sup>dim</sup>-Mäusen beobachtet werden. Annexin-1 stellt somit einen möglichen wichtigen Angriffspunkt in der Therapie der EAE durch GCs dar.

All diese Daten sind präliminär, da sie an einer nur sehr geringen Anzahl von Tieren erhoben wurden, geben aber erste wichtige Hinweise auf den Einfluss von GCs auf die infiltrierenden Zellen im ZNS.

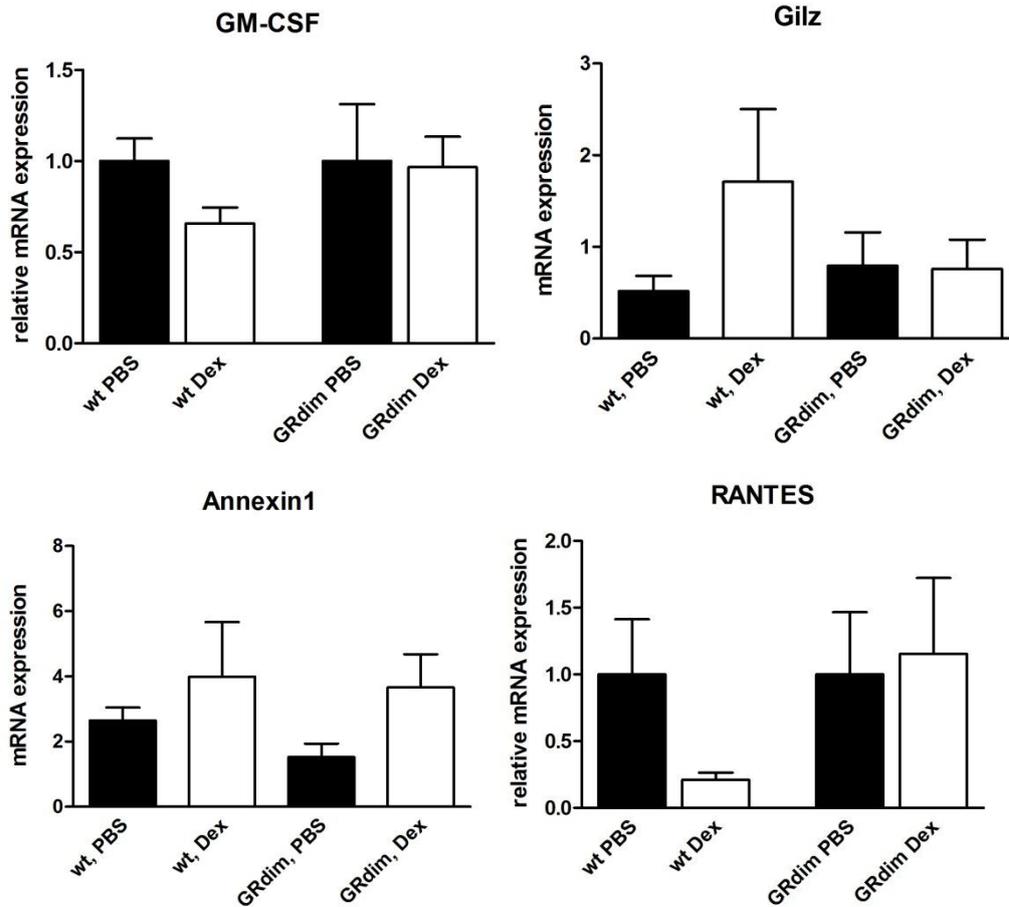


Abb. 27: **Quantitative PCR aus ZNS-infiltrierenden Zellen.** Neben der Zytokinproduktion peripherer T-Zellen wurde die Zytokin- und Chemokinproduktion ZNS-infiltrierender Zellen untersucht. Hierzu wurden wt- und GR<sup>dim</sup>-Tiere immunisiert und behandelt. Nach abgeschlossener Behandlung erfolgte die Entnahme des Rückenmarkes sowie die Isolation der ZNS-infiltrierenden Zellen via Percoll-Gradient. Die anschließende quantitative PCR wurde von Dr. Anna Karabiskaya durchgeführt. Betrachtet wurde die Expression von GM-CSF (oben links), GILZ (oben rechts), Annexin-1 (unten links) und RANTES (unten rechts). Statistische Analysen konnten hier aufgrund der sehr geringen Menge an Tieren nicht sinnvoll durchgeführt werden. Die Ergebnisse sind präliminär und bedürfen einer Überprüfung und Verifizierung.

## **4. Diskussion**

### **4.1 Bystander- und Effektor-T-Zellen**

#### **4.1.1 GCs in der Therapie der MS und EAE**

GCs werden aufgrund ihrer starken immunmodulierenden Eigenschaften seit vielen Jahrzehnten in der Therapie einer Vielzahl von Krankheitsbildern eingesetzt. So zählen GCs heute zur Standardtherapie bei der Behandlung allergischer Erkrankungen wie dem Asthma bronchiale und bei Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis und der MS. Zudem werden sie standardmäßig in der Tumorthherapie eingesetzt. Allein in den USA werden jährlich rund 10 Millionen Rezepte für orale GCs neu ausgestellt (Buttgereit et al. 2004). Doch die positiven Eigenschaften der GCs und die daraus resultierende Möglichkeit der Therapie vieler Erkrankungen werden überschattet von einer Vielzahl an Nebenwirkungen. So leidet eine nicht unbeträchtliche Anzahl von Patienten unter GC induziertem Diabetes mellitus, Osteoporose, Gewichtszunahme, Stammfettsucht und vielen weiteren unerwünschten Wirkungen (Pozzilli et al. 2004).

In der Behandlung der Multiplen Sklerose werden GCs seit vielen Jahren eingesetzt. Im akuten Schub wird heute eine hochdosierte intravenöse Therapie mit 500-1000 mg Methylprednisolon über 3 – 5 Tage durchgeführt (Milligan et al. 1987). Diese Therapie ist hocheffektiv, doch bis heute ist der Mechanismus über den GCs wirken weitestgehend unverstanden. In den vergangenen Jahren wurden diesbezüglich viele Fortschritte anhand des Tiermodells der MS, der EAE, gemacht. Trotzdem konnte die Wirkweise nicht gänzlich geklärt werden. Es wird davon ausgegangen, dass GCs vor allem über die Induktion von Apoptose in T-Lymphozyten wirkt (Nguyen et al. 1997). Insbesondere periphere T-Zellen in sekundären Lymphorganen werden als der Hauptangriffspunkt der GCs beschrieben. Hierbei wird neben der Apoptose der peripheren T-Zellen auch eine Modulation der Sekretion von Zytokinen, der Expression von Adhäsionsmolekülen und somit ein indirekt positiver Effekt auf die Integrität der BHS angenommen (Wüst et al. 2008).

#### **4.1.2 Der Einfluss von Dexamethason auf Effektor- und Bystander-T-Zellen: Suche nach einem geeigneten Tiermodell**

Bei früheren Untersuchungen wurden die T-Zellen, die nach Aktivierung in das RM einwandern und dort die für MS typische Entzündungsreaktion hervorrufen, im Gesamten betrachtet. Die Tatsache, dass die T-Zell-Aktivierung dem Mechanismus der Apoptose-Induktion entgegenwirkt, führt zu der Annahme, dass die Wirkung von Dex auf Bystander- und Effektor-T-Zellen nicht die gleiche sein kann, da diese sich zu bestimmten Zeitpunkten der Entzündungsreaktion in unterschiedlichen Stadien der Aktivierung befinden. Es kommt zunächst zur Migration von Effektor-T-Zellen in das ZNS, welche im Nachfolgenden die Rekrutierung einer großen Menge an Bystander-T-Zellen nach sich zieht (Steinman 1996). Daher sollte ein Modell etabliert werden, mit dem es möglich wäre die Frage zu beantworten,

ob die Therapierbarkeit mit Dex vor allem auf der Wirkung des GCs auf Effektor- oder auf Bystander-T-Zellen zurückzuführen ist. Tischner et al. zeigten 2009 in Studien an Lewis-Ratten, dass die EAE erfolgreich durch GCs auch in Ratten therapiert werden konnte, bei denen die enzephalitogenen Effektor-T-Zellen keinen GR exprimierten. Sie zogen die Schlussfolgerung, dass Bystander-T-Zellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese und der GC-Therapie der EAE spielen. Da es sich bei der EAE in der Lewis-Ratte jedoch um eine AT-EAE handelt, ist nicht sicher auszuschließen, dass es Unterschiede im Model der aktiven Immunisierung der EAE in der C75Bl/6-Maus gibt (Tischner et al. 2009). Dies sollte in dieser Arbeit überprüft werden. Ziel war es also ein Model zu etablieren in dem es möglich sein würde, Effektor-T-Zellen von Bystander-T-Zellen zu unterscheiden zu können und zum anderen gezielt zwei Szenarien darstellen zu können: Effektor-T-Zellen mit intaktem GR sowie gleichzeitig Bystander-T-Zellen, die keinen GR exprimieren. Als zweites Szenario sollten Mäuse betrachtet werden, deren Effektor-T-Zellen keinen GR tragen, deren Bystander-T-Zellen jedoch mit einem GR ausgestattet sind. Wichtig dabei war, dass die jeweiligen Zellen ein in etwa gleiches Verhältnis zueinander hatten, so dass eine hinreichende Aussage bezüglich der Fragestellung getroffen werden konnte. Im Folgenden sollte in den Tieren eine EAE induziert werden und anschließend eine Dex-Behandlung durchgeführt werden, um zu eruieren, ob und wie gut die Mäuse behandelbar sind. So könnte eine Aussage getroffen werden, ob die Dex-Wirkung auf die Bystander- oder auf die Effektor-T-Zellen für die GC-Therapie wichtiger ist.

Als Effektor-T-Zellen wurden hierbei T-Zellen aus 2D2/GFP<sup>+</sup>-transgenen Mäusen verwendet. Die T-Zellen dieser Tiere exprimieren einen antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor für das MOG-Protein, das sich zu 2% in den Myelinscheiden befindet (Bettelli et al. 2003). Zudem sind die Mäuse transgen für GFP, ein fluoreszierendes Protein, das durchflusszytometrisch detektiert werden kann. Somit wären die Effektor-T-Zellen später bei der Aufarbeitung und FACS-Analyse von anderen T-Zellen zu unterscheiden (Okabe et al. 1997).

#### **4.1.3 Mögliche Ursachen für das Scheitern bei der Suche nach einem Modell**

Es wurden verschiedene Ansätze verfolgt, um ein Modell zu entwickeln, in dem Bystander- und Effektor-T-Zellen in gleichem Verhältnis zueinander in den Tieren nachgewiesen werden können. Keines der Modelle konnte alle erforderlichen Kriterien erfüllen. Nach Scheitern des ersten Versuches, in dem verschiedene Mengen an 2D2/GFP<sup>+</sup>-T-Zellen in Empfängertiere transferiert worden waren, wurde zunächst angenommen, dass die injizierten 2D2/GFP<sup>+</sup>-T-Zellen nicht potent genug waren, um sich in einem vollständig ausgeprägten Immunsystem den notwendigen Raum zur Proliferation zu schaffen. Aufgrund dessen wurde im weiteren Verlauf versucht, das Immunsystem der Empfängertiere soweit zu schwächen, dass die injizierten Zellen mit höherer Wahrscheinlichkeit im Empfängertier proliferieren konnten. Zunächst wurde dies mit der Vorbehandlung der Empfängertiere mit Dexamethason nach

unterschiedlichen Schemata getestet. Doch auch nach Vorbehandlung mit Dex ließen sich die transferrierten T-Zellen in nur sehr geringen Mengen wiederfinden. Dies gab Grund zu der Annahme, dass eventuell nicht die Zellen selber das Problem darstellten, sondern das exprimierte GFP. Eine Ursache, das Protein mithilfe des Durchflusszytometers nicht detektieren zu können, könnte die unzureichende Expression von GFP in den transferrierten Zellen sein (Tsien 1998). Anhand von Reinheitskontrollen wurden die T-Zellen vor Transfer auf ihre Expression von GFP hin untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass 2/3 der untersuchten Zellen das Protein GFP in ausreichendem Maße exprimierten. Eine unzureichende Expression des Proteins konnte somit nicht die Fehlerquelle und die Ursache für die enttäuschenden Resultate sein. Auch die Vermutung, dass GFP immunogen sei, und die injizierten Zellen aufgrund dessen vom Immunsystem des Empfängertieres als fremd erkannt und beseitigt wurden, konnte nicht als Ursache für das Scheitern der Versuche diskutiert werden, da es möglich ist eine Transfer-EAE in C57BL/6-Mäusen mit MOG-spezifischen T-Zellen, die zudem mit GFP exprimieren, zu induzieren (Yura et al. 2001). Das Protein GFP konnte somit nicht das Problem darzustellen.

Der Versuch das Modell zu etablieren, indem Knochenmarkschimären generiert wurden in die zusätzlich die antigenspezifischen Zellen transferriert wurden, blieb ebenso erfolglos. Hier wurden optimale Bedingungen für das Anwachsen und Proliferieren der injizierten T-Zellen geschaffen, da das Immunsystem der Empfängertiere durch die letale Bestrahlung radikal beseitigt worden war und es somit nicht zu einer Immunantwort gegenüber der 2D2-T-Zellen kommen konnte. Möglicherweise wurde eine zu geringe Menge an T-Zellen injiziert. Dagegen spricht, dass verschiedene Mengen an T-Zellen in die letal bestrahlten Tiere injiziert wurde und man keinen Anstieg der detektierten Zellen in den Tieren wiederfinden konnte, die eine größere Menge an Zellen erhalten hatten. Eine bessere Antwort auf die Frage, warum die 2D2/GFP<sup>+</sup>-T-Zellen in keinem der Versuche in ausreichender Anzahl detektiert werden konnten, lieferten spätere Experimente. Im Zuge einer anderen Experimentalreihe unserer Arbeitsgruppe wurden GFP<sup>+</sup>-T-Zellen in Empfängertiere transferriert und anschließend eine aktive EAE-Immunisierung durchgeführt. Nachfolgend wurden 3, 10 und 13 Tage nach Immunisierung der Tiere Milz, Lymphknoten und RM entnommen und deren Zellen isoliert. Es konnte gezeigt werden, dass die GFP<sup>+</sup>-T-Zellen in den entnommenen Organen ihr Zellzahlmaximum an unterschiedlichen Tagen hatten. Der höchste Peak für die Lymphknoten lag bei Tag 4 nach Immunisierung, der für das RM an Tag 10. Und die höchste Konzentration an GFP<sup>+</sup>-T-Zellen in der Milz konnte am Tag 13 nach Immunisierung nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten, Lühder, 2011). In dem ersten durchgeführten Versuch zur Etablierung des Modells wurden die Tiere immunisiert. Sie erkrankten durchschnittlich ab Tag 10 nach Immunisierung. Zu diesem Zeitpunkt würde sich das Maximum an GFP<sup>+</sup>-T-Zellen im RM finden. Die Experimente wurden jedoch nicht zu diesem Zeitpunkt beendet und die Zellzahlen in den Organen beurteilt. Sondern zunächst wurde gewartet, bis die Tiere einen hohen EAE-Score von 5-7 entwickelt hatten. Die Überlegung hierbei war, dass die entzündlichen Infiltrate im RM bei diesen hohen Scores

besonders ausgeprägt sind und somit viele Zellen aus dem RM isoliert werden konnten. Das Erreichen dieser Scores ist jedoch frühestens um den Tag 15 nach Immunisierung zu erwarten. Wie aus den unpublizierten Daten hervorgeht ist jedoch an Tag 15 nach Immunisierung das Maximum an Zellkonzentration der transferierten Zellen in LN, RM und Milz längst überschritten, so dass es nicht verwundert, dass nur noch wenige Zellen nach Isolation der Organe in der FACS-Analyse detektiert werden konnten. Das Priming in LN und Milz hat längst stattgefunden und die Zellen haben sich zu diesem Zeitpunkt (Tag 15 nach Immunisierung) entweder in anderen Geweben verteilt oder sind bereits nicht mehr existent. Bei den Experimenten, in denen das Immunsystem der Empfängertiere vor Transfer der Zellen durch Dex bzw. Bestrahlung, supprimiert worden war, wurden die Tiere zwar nicht immunisiert, trotzdem wurde den transferierten T-Zellen ein langer Zeitraum gewährt, um anzuwachsen und zu proliferieren. Auch hier lässt sich also erklären, warum sowohl nach 26 Tagen nach Transfer als auch nach 6 Wochen nach Transfer kaum noch GFP<sup>+</sup>-Zellen in den entnommenen Organen wiedergefunden werden konnten.

#### **4.1.4 EAE in RAG-1-defizienten Mäusen**

Das Modell der RAG-1-defizienten Mäuse konnte zwar dem Anspruch an das Modell gerecht werden, ein gleiches Verhältnis zwischen Effektor-T-Zellen und Bystander-T-Zellen zu erreichen, doch ein weiteres entscheidendes Kriterium, um die Fragestellung beantworten zu können, ist die Ausbildung einer typischen EAE nach Immunisierung. Dieses Ziel konnte mit dem Modell der RAG-1-defizienten Tiere nicht erreicht werden. Die Tiere entwickelten größtenteils keinerlei Symptome der Erkrankung. Die wenigen Tiere, die erkrankten, hatten einen sehr schleichenden Verlauf und entwickelten maximale EAE-Scores von 4. Dies war nicht ausreichend, um eine eindeutige Aussage zur Therapierbarkeit mit Dex treffen zu können. Im ersten Versuch waren aus technischen Gründen nur je 3,8 Millionen der zwei verschiedenen Zelltypen pro Maus injiziert worden. Hier bestand die Möglichkeit, dass die Anzahl an transferierten Zellen schlichtweg nicht ausreichend war, um eine ausgeprägte EAE zu entwickeln. Im zweiten und dritten Versuchsaufbau jedoch wurden je 10 Millionen Zellen der beiden Zelltypen injiziert. Trotzdem zeigte sich der gleiche Effekt wie zuvor. Die Tiere erkrankten nicht. Technische Defekte wie die schlechte Zubereitung der Reagenzien können ausgeschlossen werden. Ebenso kann ausgeschlossen werden, dass die Tiere aufgrund der Jahreszeit nicht krank werden. Empirischen Beobachtungen zufolge gibt einen bestimmten Zeitraum im Sommer, in dem die Tiere sehr schlecht auf die Immunisierung ansprechen und kaum Symptome entwickeln. Die Versuche mit den RAG-1-defizienten Mäusen wurden allesamt im Winter durchgeführt. Zu derselben Zeit wurden auch andere Tiere in demselben Labor immunisiert, die gut auf die Immunisierung ansprachen und einen typischen EAE Verlauf entwickelten. Ebenso war es nicht der Fall, dass die injizierten Zellen in den Mäusen nicht überlebt hätten und sich aufgrund des Mangels an T-Zellen keine EAE bilden konnte, denn in der Zellzählung

nach Organentnahme und in der Durchflusszytometrie konnten große Mengen an T-Zellen isoliert werden. Diese konnten nur den transferierten Zellen entsprechen, da die RAG-1-defizienten Mäuse aufgrund ihrer Genmutation nicht im Stande sind, eigene T-Zellen zu bilden. Letztlich bleibt also ungeklärt, warum die Tiere keine typischen Symptome der EAE entwickelten.

#### **4.1.5 Mögliche Hinweise auf die Wichtigkeit von Effektor- und Bystander-T-Zellen in der Entwicklung und Behandlung der EAE**

Bislang gibt es kaum Publikationen, die sich mit der Differenzierung von Bystander- und Effektor-T-Zellen im Bezug auf die Therapie mit GCs in der EAE beschäftigen. Auch in dieser Arbeit konnten wir aufgrund des Scheiterns in der Findung eines geeigneten Modells keine weiteren Antworten erlangen. Einen möglichen Hinweis, um die Antwort auf die Frage zumindest in eine Richtung zu lenken, lieferten Tischner et al 2009. Hier werden Versuche an Lewis-Ratten beschrieben, die mittels Transfer von enzephalitogenen T-Zellen EAE immunisiert wurden. Die enzephalitogenen T-Zellen waren vor Transfer in die Lewis-Ratten genetisch verändert worden, so dass sie keinen funktionellen GR exprimierten. Zunächst konnte gezeigt werden, dass die so veränderten T-Zellen weiterhin ohne Einschränkungen eine EAE in den Lewis-Ratten hervorrufen konnten. Im Folgenden wurden die Tiere mit Dex behandelt. Erstaunlicherweise waren die Tiere, deren EAE durch Transfer von enzephalitogenen T-Zellen ohne funktionalen GR induziert worden war, ebenso gut behandelbar wie Kontrolltiere. Es scheint also, dass die Anwesenheit eines GR auf Effektor-T-Zellen kein wichtiger Parameter in der GC-Therapie ist. Sicher sind diese Ergebnisse nicht bedingungslos auf die Fragestellung dieser Arbeit zu übertragen, da zum einen mit Ratten gearbeitet und zum anderen eine AT-EAE induziert wurde, aber man kann dies als einen Hinweis sehen, der darauf hindeutet, dass vorrangig die Bystander-T-Zellen für die Therapierbarkeit der EAE durch Dex wichtig sind (Tischner et al. 2009).

## **4.2 GR<sup>dim</sup>**

### **4.2.1 Bereits beschriebene Ergebnisse aus Versuchen mit GR<sup>dim</sup>-Mäusen**

GR<sup>dim</sup>-Tiere exprimieren, wie bereits in 1.4 beschrieben, einen veränderten und funktionseingeschränkten GR. Dieser GR ist aufgrund einer genetisch manipulierten D-Schleife nicht dazu fähig, Dimere auszubilden. Somit entfällt bei diesen Tieren die Bindung des GR an GREs in der DNA, wodurch der Mechanismus der Transaktivierung von Genen über die direkte Interaktion mit der DNA nicht mehr möglich ist. Transrepressionsprozesse hingegen, zum Beispiel über die verminderte Expression von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF-κB, bleiben unverändert erhalten (Reichardt et al. 1998). Es wird davon ausgegangen, dass die immunsuppressiven Effekte von GCs auf Mechanismen der Transrepression zurückzuführen sind, wohingegen die unerwünschten Arzneimittelnebenwirkungen über eine Dimerisierung des GRs und Transaktivierung vermittelt werden (Stahn und Buttgerit 2008). Im

Rahmen dieser Überlegungen sind GR<sup>dim</sup>-Tiere ein erwünschtes Hilfsmittel zur Optimierung der GC-Therapie, da hier die Wirkungen - therapeutische Wirkungen und unerwünschte Nebenwirkungen - von GCs genauer und distinkter untersucht werden können. So wurden in den folgenden Jahren nach der Erstbeschreibung 1998 (Reichardt et al. 1998) viele Experimente mithilfe der GR<sup>dim</sup>-Tiere durchgeführt, um die durch GC-induzierten Transrepressionsprozesse näher zu untersuchen. Es wurde beispielsweise nachgewiesen, dass die antiinflammatorischen Effekte durch GCs vor allem von der negativen Beeinflussung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B herrühren (Reichardt et al. 2001). Ebenso kam man zu dem Ergebnis, dass auch die verminderte Expression des Transkriptionsfaktors AP-1, nicht von der Dimerisierung des GRs abhängig ist (Tuckermann et al. 1999, Reichardt et al. 2006, González et al. 2000). Mithilfe von GR<sup>dim</sup>-Mäusen konnten zudem wichtige Gene und Signalübertragungswege in der Leber, die durch GR-Dimerisierung reguliert werden, identifiziert werden (Frijters et al. 2010). In dieser Arbeit wurden die GR<sup>dim</sup>-Tiere zur genaueren Eruiierung der GC-Mechanismen in der Therapie der EAE verwendet.

#### **4.2.2 Die Therapierbarkeit mit GCs beruht nicht auf der Einleitung von Apoptose**

Lange Zeit wurde die durch GCs induzierte Apoptose als einer der wichtigsten Mechanismen der GC-Therapie in der EAE gesehen. So gibt es viele Autoren, die das Phänomen der Apoptose näher untersuchten und immer wieder zu dem Schluss kamen, dass diese zweifelsohne einen großen Anteil zur Effizienz der GC-Therapie in der EAE beisteuert (Reichardt et al. 2006, Gold et al. 2006). Doch es gab auch Zweifel daran, ob die Induktion von Apoptose tatsächlich ein so wichtiger Aspekt der GC-Therapie darstellte (Schweingruber et al. 2011). Nguyen et al. fanden bei ihren Versuchen mit Lewis-Ratten, dass bei einer Applikation von nur geringen Dosen Dex über 5 Tage keine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zu den Kontrolltieren zu finden war. Bei höheren Dosen von Dex fanden sich mehr apoptotische T-Zellen und Makrophagen. Trotzdem zeigten die Tiere, die die Niedrigdosis-Therapie erhalten hatten, ebenfalls klinische Besserung nach Dex-Applikation (Nguyen et al. 1997). Tischner et al. beschrieben 2011 Versuche mit *Acid-Sphingomyelinase-(aSMase)* knock-out-Mäusen. aSMase ist ein Enzym, das maßgeblich an der Induktion von Apoptose durch GCs involviert ist. Überraschenderweise sprachen aSMase-knock-out-Mäuse in zwei verschiedenen Modellen inflammatorischer Erkrankungen (EAE, *Graft versus host disease*) ebenso gut auf die GC-Therapie an wie die Kontrollgruppe. Auch hier ergab sich also der Hinweis, dass Apoptose-Induktion keine wichtige Rolle bei der Therapie mit GCs zu spielen scheint (Tischner et al. 2011). Weiterhin zeigen Tiere, die das antiapoptotische Protein bcl-2 in T-Zellen überexprimieren, also resistent gegenüber GC-induzierter Apoptose sind, einen ähnlichen klinischen Verlauf der EAE nach Dex-Therapie, also ein ähnlich gutes Ansprechen wie wt-Tiere (Schweingruber et al. 2014). Wüst et al. zeigten 2009, dass die Behandlung von erkrankten Tieren mit Compound A den klinischen Verlauf der EAE verbessert ohne Apoptose zu induzieren (Wüst et al. 2009).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit IckGR<sup>dim</sup>- und GR<sup>dim</sup>-Mäusen lieferten einen weiteren entscheidenden Hinweis darauf, dass die Rolle der GC-induzierten Apoptose erheblich überschätzt wurde und für die Effektivität der GC-Therapie in der EAE nicht entscheidend zu sein scheint. Primär wurden IckGR<sup>dim</sup>-Tiere verwendet, also Mäuse, in welchen der GR<sup>dim</sup> lediglich in T-Zellen exprimiert wird, während alle anderen Zellen einen normalen GR besitzen. Wäre die Induktion von Apoptose der entscheidende Mechanismus der Wirksamkeit der Dex-Therapie, hätten die IckGR<sup>dim</sup>-Tiere nicht behandelbar sein dürfen. Überraschenderweise zeigte sich in klinischen Experimenten jedoch ein sehr gutes Ansprechen der erkrankten IckGR<sup>dim</sup>-Tiere auf die medikamentöse Therapie mit Dex. Und auch GR<sup>dim</sup>-Mäuse waren ebenso gut wie Kontrolltiere behandelbar. Zunächst wurde also geklärt, ob in IckGR<sup>dim</sup>-Tieren und auch in GR<sup>dim</sup>-Tieren, entgegen den vorherigen Beschreibungen, doch Apoptose über die Applikation von Dex induziert werden konnte. Es wurden Zellzahlzählungen, FACS-Analysen und ein Dex-Apoptose-Assay durchgeführt, um das Ausbleiben von Apoptose nach Dex-Gabe in den Zellen aus IckGR<sup>dim</sup>- und GR<sup>dim</sup>-Tieren nachzuweisen. In allen Versuchen konnten die von Reichardt et al. 1998 beschriebenen Ergebnisse, dass die Apoptose nach Therapie mit Dex in den GR<sup>dim</sup>-Tieren ausbleibt, bestätigt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die erzielten Ergebnisse zu dem Schluss führen, dass Apoptose nicht essentiell für die Therapierbarkeit der EAE mit Dex ist.

#### **4.2.3 Zytokine**

Das Eindringen von Zellen des Immunsystems in das ZNS wird von einem komplexen Zusammenspiel zwischen Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen vermittelt (McQualter et al. 2001). Bezüglich der Zytokine sind bei der EAE vor allem GM-CSF, IL-17 und INF $\gamma$  relevant (McQualter et al. 2001, Hofstetter et al. 2005, El-Behi et al. 2010, Linker et al. 2001).

INF $\gamma$  ist ein proinflammatorisches Zytokin, das von Th1-Zellen ausgeschüttet wird (Elenkov und Chrousos 1999). Neben der Behinderung des Wachstums von Th2-Zellen führt es zu einer ausgeprägten Aktivierung von Makrophagen. Es wird als wichtiger Bestandteil der Entstehung der EAE beschrieben (McQualter et al. 2001) und ist an der Entwicklung der demyelinisierenden Läsionen im ZNS von EAE-erkrankten Tieren beteiligt (Kroenke und Segal 2011). Jedoch gibt es hierzu auch widersprüchliche Publikationen, die INF $\gamma$  eine Rolle an der Pathogenese der EAE absprechen (Ferber et al. 1996).

IL-17 wird von Th17-Zellen ausgeschüttet, die entscheidend an der Entwicklung der EAE und vieler weiterer Autoimmunerkrankungen wie dem Morbus Crohn und der rheumatoiden Arthritis beteiligt sind (Sallusto und Lanzavecchia 2009). Th17-Zellen werden sogar für die einzig enzephalitogenen Zellen in der EAE gehalten (Park et al. 2005). In IL-17-knock-out-Mäusen ist die Immunisierung einer EAE nur sehr schwer möglich. Es entwickeln sich nur sehr gering ausgeprägte Symptome der Erkrankung, die Erkrankung beginnt verspätet und die Tiere erholen sich sehr schnell wieder von den Symptomen (Komyama et al. 2006). In EAE-erkrankten Tieren findet sich eine hohe Produktion von IL-17, sowohl

in peripheren Organen als auch im ZNS. Die therapeutische Neutralisation des IL-17 mit einem IL-17-Rezeptor-Fc-Protein führte zu einer Verbesserung der Symptome und insgesamt einem milderen klinischen Verlauf der EAE (Hofstetter et al. 2005). Andererseits gibt es auch Berichte, dass primär nur Th1-Zellen zur Migration ins ZNS befähigt sind und dass erst hierdurch die Rekrutierung und Migration von Th17-Zellen stattfindet (O'Connor et al. 2008). Die eindeutige Rolle von Th17-Zellen bleibt weiterhin ungeklärt (El-Behi et al. 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte im Rahmen eines ELISA für beide Zytokine, sowohl für INF $\gamma$  als auch für IL-17, signifikant erniedrigte Werte nach Therapie mit Dex gefunden werden, sowohl in wt- als auch in GR<sup>dim</sup>-Mäusen. Leider ließen sich aufgrund von Prozessfehlern in der PCR diese Ergebnisse für IL-17 und INF $\gamma$  nicht entgültig bestätigen. Es konnten hier keine aussagekräftigen Daten gewonnen werden, da die PCR bei vielen der Proben nicht funktioniert hatte. Die Daten aus dem ELISA weisen jedoch darauf hin, dass die Herunterregulierung beider Zytokine nach Dex-Gabe am Therapiemechanismus beteiligt sein könnte.

Untermauert wird diese Annahme für IL-17 durch Versuche mit dem natürlich vorkommenden GR-Modulator Compound A. Wüst et al. beschrieben 2009 eine deutlich verminderte Produktion von IL-17 in erkrankten Mäusen, die mit Compound A therapiert worden waren und deren klinischer Verlauf sich hierauf deutlich gebessert hatte. Für INF $\gamma$  lassen sich die Ergebnisse aus dieser Arbeit durch die Versuche von Wüst et al. nicht bekräftigen. Die INF $\gamma$ -Produktion blieb nach Gabe von Compound A in den erkrankten Tieren unverändert. Trotzdem zeigten die Mäuse eine Besserung ihrer Symptomatik (Wüst et al. 2009). Die hier gleichbleibende INF $\gamma$ -Produktion im Gegensatz zur sinkenden Produktion in dem für diese Arbeit durchgeführten ELISA ist somit widersprüchlich und weist darauf hin, dass INF $\gamma$  möglicherweise keine entscheidende Rolle in der GC-Therapie der EAE spielt.

Zumindest für IL-17 scheint es jedoch einen Zusammenhang zwischen der verminderten Produktion und dem Ansprechen auf die GC-Therapie zu geben, der auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

GM-CSF wird vorwiegend in Th1-Zellen produziert und führt zur Differenzierung von B-Zellen, zur Aktivierung von Makrophagen und vor allem zu gesteigerter Produktion von Makrophagen, Granulozyten und dendritischen Zellen. Es führt nicht nur zur Aktivierung von Mikroglia, die für die Re-Aktivierung von ZNS-infiltrierenden T-Zellen wichtig ist (Reddy et al. 2009), sondern wird vor allem benötigt zur Stimulation der inflammatorischen Funktionen von Th17-Zellen. In der EAE wird ihm eine herausragende Rolle zugeschrieben und als einziges Zytokin beschrieben, das alle Kriterien erfüllt, um enzephalitogen zu sein. Der knock-out von GM-CSF in Mäusen, beziehungsweise die pharmakologische Neutralisation desselben führen, im Gegensatz zum Verlust von IL-17 oder INF- $\gamma$ , zu einer kompletten Resistenz gegenüber der Induktion einer EAE (McQualter et al. 2001, Becher et al. 2001). Ebenso wird hier von Becher et al. beschrieben, dass GM-CSF benötigt wird, um die Entzündungsreaktion, nach der

ZNS-Invasion der Zellen, zu fördern und zu unterhalten. In einem Modell, das den Transfer von Splenozyten aus vorher immunisierten Tieren in naive Empfängertiere beinhaltet, wurde beobachtet, dass die transferierten Zellen in hohem Maße enzephalitogen waren und vor allem GM-CSF in großen Mengen produzierten. Für INF $\gamma$  stagnierten die produzierten Werte. IL-17 wurde eher als negativ mit der Suszeptibilität für eine EAE assoziiert (Cravens et al. 2011). El-Behi et al. zeigten 2011, dass GM-CSF zwingend für die Enzephalogenität von Th1- und Th17-Zellen notwendig ist. Dies ließe stark vermuten, dass es eine möglicherweise sehr erfolgreiche therapeutische Strategie wäre, GM-CSF spezifisch zu blockieren (El-Behi et al. 2011).

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit weisen eher auf das Gegenteil hin. Hier scheint es so zu sein, dass GM-CSF in der Therapie der EAE keine Rolle spielt. Die Ergebnisse der wt-Tiere könnten eventuell noch den Anschein erwecken, da hier GM-CSF in den behandelten Tieren signifikant weniger exprimiert wird, als in den unbehandelten Tieren. Bei Betrachtung der GR<sup>dim</sup>-Tiere allerdings fällt auf, dass diese keine Veränderung in der Expression von GM-CSF zeigen. Da sie aber auch behandelbar sind, kann folglich die verminderte Expression von GM-CSF nicht wichtig sein für die Effizienz der Therapie. Die Ergebnisse für GM-CSF konnten anhand einer durchgeführten PCR von Zellen aus Milz und RM bestätigt werden. Auch hier zeigt sich die Repression dieses Zytokins in wt-Tieren, nicht jedoch in GR<sup>dim</sup>-Mäusen. So mag GM-CSF in der Entwicklung der EAE eine große Rolle spielen, doch für die Therapie mit GCs scheint es nicht von Bedeutung zu sein.

In der PCR-Analyse wurde zudem die Expression von GILZ untersucht. GILZ wird in Lymphozyten und Makrophagen exprimiert und inhibiert die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- $\kappa$ B (Mittelstadt und Ashwell 2001, Ayroldi et al. 2001). GCs induzieren über einen GRE-abhängigen Prozess sehr stark die Produktion von GILZ. Wie zu erwarten wird GILZ in Dex-behandelten wt-Tieren induziert, in GR<sup>dim</sup>-Tieren jedoch nicht, weswegen es in dieser Arbeit als Kontrolle für die Transaktivierung verwendet wurde.

#### **4.2.4 Adhäsionsmoleküle**

Auch der Herunterregulierung von Adhäsionsmolekülen auf peripheren T-Zellen wird eine entscheidende Rolle in der Therapie der EAE mit Glukokortikoiden zugeschrieben (Wüst et al. 2008). Dies konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. So zeigte sich in durchflusszytometrischen Untersuchungen von Splenozyten aus behandelten und unbehandelten GR<sup>dim</sup>- und IckGR<sup>dim</sup>-Mäusen, dass hier, genauso wie in Splenozyten aus wt-Tieren, das Adhäsionsmolekül LFA-1 nach Dex-Therapie deutlich vermindert exprimiert wurde. Dieser Effekt lässt sich allerdings nur in peripheren T-Zellen beobachten. Dex hat bezüglich LFA-1 keinen Effekt auf T-Zellen im RM (Wüst et al. 2008, personal communication Reichardt 2014). LFA-1 ist ein Adhäsionsmolekül aus der Gruppe der Integrine ( $\alpha_L\beta_2$ ). Es findet sich auf der Zelloberfläche von T-Zellen, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen. Es ist ein wichtiger Bestandteil im Mechanismus der Extravasation von Zellen. Nach dem *Rolling* ans Endothel gehen die Zellen über LFA-1 mit ICAM-1 und ICAM-2 im Endothel eine feste Bindung ein und leiten so

den entscheidenden Schritt ein, um durch das Endothel in das Gewebe zu migrieren (Engelhardt und Ransohoff 2012). Es konnte bereits gezeigt werden, dass GCs einen direkten Einfluss auf die Regulierung der Expression des Gens für LFA-1 und auch ICAM-1 haben (Pitzalis et al. 1997, Cronstein et al. 1992). Außerdem ist die Migration von Th17-Zellen ausschließlich abhängig von dem Vorhandensein von LFA-1 (Rothhammer et al. 2011). Ebenso verhindert Euphol, ein tetracyclischer Triterpen-Alkohol, die Migration von encephalitogenen Th17-Zellen ins ZNS über die verminderte Expression von LFA-1 (Dutra et al. 2013). Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse zur verminderten Expression von LFA-1 nach Dex-Gabe in wt- und GR<sup>dim</sup>-Tieren gehen konform mit bereits beschriebenen Daten und geben Hinweise auf eine wichtige Rolle der Adhäsionsmoleküle in der GC-Therapie der EAE.

#### **4.2.5 Chemokine**

Chemokine sind entscheidend an der Fortbewegung von Leukozyten und deren Eindringen in die entzündeten Areale im ZNS beteiligt (Moser und Willmann 2004). Sie wirken auf die Leukozyten über spezifische Rezeptoren (Baggiolini 1998). Als ein Vertreter der Chemokine wurde im Rahmen der qPCR aus Lymphozyten aus dem RM von erkrankten Tieren die Expression von RANTES bestimmt. RANTES oder auch CCL5 genannt ist neben CCL3 und CCL4 ein Vertreter der proinflammatorischen Chemokine, von denen bekannt ist, dass sie reichlich in entzündlichen ZNS Läsionen der MS und der EAE gebildet werden (Yang et al. 2012) und die eine wichtige Rolle für die Adhäsion von Leukozyten in der Mikrozirkulation des Gehirns spielen (Dos Santos et al. 2008). Der zugehörige Rezeptor CCR5 wird vor allem auf Th1-Zellen exprimiert (Baggiolini 1998). Aufgrund des Vorhandenseins in MS-Läsionen wird ihm eine Rolle in der MS zugeschrieben (D'Ambrosio et al. 2003).

Die verminderte Expression von Chemokinen führt zu einem verminderten Einstrom von Leukozyten in das ZNS von erkrankten Mäusen, woraus eine Verbesserung der Symptomatik resultiert (Dos Santos et al. 2008). Die Ergebnisse aus dieser Arbeit erwecken den Anschein, dass die Modulation von Chemokinen, vor allem RANTES, nicht essentiell für die GC-Therapie ist, da RANTES zwar in wt-Mäusen durch Dex supprimiert wird, nicht jedoch in GR<sup>dim</sup>-Tieren. Dies steht im Gegensatz zu anderen Publikationen wie der von Dos Santos et al aus dem Jahr 2008. Möglicherweise ist also RANTES hier als Vertreter der Chemokine schlecht gewählt worden, da es gerade bei RANTES zu keiner Herunterregulierung durch Dex in GR<sup>dim</sup>-Tieren kommt. Möglich ist ebenfalls, dass der entscheidende Mechanismus bei der Beeinflussung der Chemokine über die Herunterregulierung der Rezeptoren auf den peripheren T-Zellen stattfindet, die in den Versuchen dieser Arbeit nicht untersucht wurden. In Studien an peripheren T-Zellen aus dem Blut von MS-Patienten zeigte sich eine deutliche Herunterregulierung von CCR5 nach Therapie mit Methylprednisolon (Elovaara et al. 2006).

#### **4.2.6 Möglicher Mechanismus Migration – ein komplexes Zusammenspiel von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen**

Nachdem die Induktion von Apoptose sich als nicht essentiell für die GC-Therapie in der EAE gezeigt hatte, waren in dieser Arbeit weitere mögliche Mechanismen der GC-Therapie in der EAE verfolgt worden. Das komplexe Zusammenspiel von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen führt schlussendlich zur Migration der Zellen ins ZNS. Hinsichtlich der Zytokine hatten sich Hinweise ergeben, dass zumindest einige der Zytokine und deren Herunterregulierung am gesuchten Mechanismus beteiligt sein könnten. Ebenso zeigte sich bei den Adhäsionsmolekülen ein Absinken von LFA-1 in GR<sup>dim</sup>- und wt-Mäusen, so dass auch hier eine Beteiligung am Mechanismus nicht ausgeschlossen werden kann. Bei näherer Betrachtung des Chemokins RANTES konnte zunächst kein einheitliches Ergebnis zwischen GR<sup>dim</sup>- und wt-Tieren gefunden werden, es gibt jedoch Beschreibungen, die den Chemokinen eine entscheidende Bedeutung beimessen.

Alle Ergebnisse zusammengenommen weisen darauf hin, dass die verminderte Migration von Zellen ins ZNS der erkrankten Tiere der entscheidende Mechanismus der GC-Therapie sein könnte.

In Zellzählungen im Rahmen von FACS-Analysen war in den Milzen der Tiere gesehen worden, dass in den GR<sup>dim</sup>-Tieren im Gegensatz zu den wt-Tieren die Zahl der Splenozyten nach Dexbehandlung nicht abnahm. Dieser Effekt ist einfach mit der mangelnden Apoptose in GR<sup>dim</sup>-Tieren zu erklären. Des Weiteren konnte aber auch gezeigt werden, dass die Zellzahl der ZNS-infiltrierenden Zellen sowohl bei GR<sup>dim</sup>- als auch in wt-Tieren sank. Dies konnte sowohl anhand einer Zellzählung als auch in einer durchgeführten Histologie mit immunhistochemischer Färbung von T-Zellen und Makrophagen gesehen werden. Die Daten aus der Histologie sind zwar als präliminär zu betrachten, da eine sehr geringe Anzahl an Tieren für diesen Versuch verwendet wurde, in Zusammenschau mit den anderen Ergebnissen bezüglich der Abnahme der Zellen im RM, passen aber auch die Befunde der Histologie gut ins Bild. Es finden sich also in wt- sowie in GR<sup>dim</sup>-Tieren nach Dex-Therapie eine deutlich Abnahme der Infiltrate im ZNS, obwohl in GR<sup>dim</sup>-Tieren keine Apoptose stattfindet. Demzufolge liegt die Annahme nahe, dass Dex die Migration der Zellen über die BHS ins ZNS behindert.

Zusammen mit der Tatsache, dass Dex einen indirekt positiven Effekt auf die Integrität der BHS hat (Wüst et al. 2008), kann deshalb vermutet werden, dass die in der Peripherie verbliebenen Zellen an ihrer Migration ins ZNS gehindert werden und dort folglich den Schaden, der durch bereits eingewanderte Zellen entstanden ist, nicht mehr vergrößern können. Die Infiltrate werden also nicht größer, der Score der EAE stagniert zunächst und sinkt im Folgenden, da das RM sich regeneriert und die eingewanderten T-Zellen sterben.

Zusammenfassend erhärtet sich also die Annahme, dass die verminderte Rekrutierung von neuen, ins ZNS-infiltrierenden Zellen der entscheidende Effekt der Dex-Therapie ist. Neueste Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe zum Thema Migration untermauern diese Annahme (Schweingruber et al. 2014).

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die grundlegenden Mechanismen der Glukokortikoidtherapie bei der MS anhand des Tiermodells der MS, der EAE, untersucht. Hierzu wurde die EAE aktiv mithilfe von MOG<sub>35-55</sub> in C57Bl/6-Mäusen sowie GR<sup>dim</sup>- und IckGR<sup>dim</sup>-Mäusen induziert.

Zum einen sollte die Wirkung von Dexamethason auf Bystander- und Effektor-T-Zellen gesondert voneinander betrachtet werden. Hierzu sollte zunächst ein Modell etabliert werden, bei dem die GCs nur auf die Bystander- beziehungsweise nur auf die Effektor-T-Zellen wirkten. Trotz zahlreicher Experimente konnte kein Modell etabliert werden, das den Ansprüchen für die Beantwortung der Frage genügte.

Zum anderen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass IckGR<sup>dim</sup>-Mäuse trotz fehlender Dimerisierungsfähigkeit des GRs und somit fehlender Apoptose-Induktion in T-Zellen auf die GC-Therapie ebenso gut ansprachen wie Kontrolltiere. Ebenso konnte dies bei reinen GR<sup>dim</sup>-Tieren beobachtet werden. Zunächst wurde mithilfe von Zellzählungen, FACS-Analysen nach Anfärben der Splenozyten mit AxV und einem Apoptose-Assay ausgeschlossen, dass es in den Tieren mit dem veränderten GR doch zu einer Induktion von Apoptose kam. So konnte bestätigt werden, dass Apoptose nicht essentiell für die Therapie der EAE ist.

Anhand eines Proliferations-Assays konnte ebenso ausgeschlossen werden, dass GCs unspezifisch die gesamte Funktionalität der Zellen beeinflussen. Im Folgenden wurden weitere mögliche Mechanismen der Wirkung von GCs in der EAE untersucht.

Anhand von FACS-Analysen und qPCR sowie histologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die eingeschränkte Migration der Zellen in das RM nach Dex-Gabe eine wichtige Rolle zu spielen scheint. So sahen wir eine Herunterregulierung von Adhäsionsmolekülen sowie die verminderte Expression von einigen Zytokinen. Im Falle der Chemokine, die jedoch nur als Nebenschauplatz in dieser Arbeit betrachtet werden, konnte keine Herunterregulierung von RANTES in GR<sup>dim</sup>-Tieren beobachtet werden. Andere Publikationen geben jedoch Hinweise darauf, dass auch die Beeinflussung der Chemokine entscheidend am Mechanismus der GC-Therapie beteiligt ist.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass Transaktivierungsprozesse, im Speziellen die Induktion von Apoptose, keinen entscheidenden therapeutischen Effekt von Dex darstellen. Der tatsächliche Mechanismus konnte auch im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Durch die Versuche an GR<sup>dim</sup>-Tieren gibt es jedoch entscheidende Hinweise darauf, dass vor allem repressive Effekte als Wirkungsmechanismus der Kortisontherapie entscheidend sind. Hierzu zählen zum Beispiel die verminderte Expression von Adhäsionsmoleküle sowie die verminderte Ausschüttung von Zytokinen bzw. Sekretion von Chemokinen. Zusammengenommen also Prozesse, die die Migration von T-Zellen ins ZNS beeinflussen und steuern.

Dieser Aspekt hat eine große Bedeutung für die Therapie der MS, da gerade die Gene, die durch Transaktivierung induziert werden, zu den unerwünschten Nebenwirkungen der Therapie führen. Da diese keine Bedeutung in der Wirksamkeit der GC-Therapie zu haben scheinen, könnten Medikamente entwickelt werden, die selektiv die Gene, die durch Transrepression aktiviert werden, ansteuern. Dies würde ein großes Benefit für MS-Patienten nach sich ziehen, die im Rahmen der notwendigen Therapie ihrer Erkrankung mit teilweise gravierenden Nebenwirkungen zu kämpfen haben.

## 6. Literaturverzeichnis

Ayroldi E, Migliorati G, Bruscoli S, Marchetti C, Zollo O, Cannarile L, D'Adamio F, Riccardi C (2001). Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB. *Blood* 98(3): 743-753.

Baggiolini M (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392(6676): 565-568.

Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, Bienert M, Radbruch A, Burmester GR, Lauster R, Scheffold A, Buttgereit F (2004). Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J* 18(1): 70-80.

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

Becher B, Durell BG, Miga AV, Hickey WF, Noelle RJ (2001). The clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis and inflammation is controlled by the expression of CD40 within the central nervous system. *J Exp Med* 193(8): 967-974.

Bettelli E, Pagany M, Weiner HL, Linington C, Sobel RA, Kuchroo VK (2003). Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med* 197(9): 1073-1081.

Brousil JA, Roberts RJ, Schlein AL (2006). Cladribine: an investigational immunomodulatory agent for multiple sclerosis. *Ann Pharmacother* 40(10): 1814-1821.

Buttgereit F, Brand MD, Burmester GR (1999). Equivalent doses and relative drug potencies for non-genomic glucocorticoid effects: a novel glucocorticoid hierarchy. *Biochem Pharmacol* 58(2): 363-368.

Buttgereit F, Straub RH, Wehling M, Burmester GR (2004). Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis Rheum* 50(11): 3408-3417.

Cravens PD, Hussain RZ, Zacharias TE, Ben LH, Herndon E, Vinnakota R, Lambracht-Washington D, Nessler S, Zamvil SS, Eagar TN (2011). Lymph node-derived donor encephalitogenic CD4+ T cells in C57BL/6 mice adoptive transfer experimental autoimmune encephalomyelitis highly express GM-CSF and T-bet. *J Neuroinflammation* 8: 73.

Cronstein BN, Kimmel SC, Levin RI, Martiniuk F, Weissmann G (1992). A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(21): 9991-9995.

D'Adamio F, Zollo O, Moraca R, Ayroldi E, Bruscoli S, Bartoli A, Cannarile L, Migliorati G, Riccardi C (1997). A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity* 7(6): 803-812.

D'Ambrosio D, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F (2003). Chemokine receptors in inflammation: an overview. *J Immunol Methods* 273(1-2): 3-13.

Dahlman-Wright K, Wright A, Gustafsson JA, Carlstedt-Duke J (1991). Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids. *J Biol Chem* 266(5): 3107-3112.

Dos Santos AC, Roffe E, Arantes RM, Juliano L, Pesquero JL, Pesquero JB, Bader M, Teixeira MM, Carvalho-Tavares J (2008). Kinin B2 receptor regulates chemokines CCL2 and CCL5 expression and modulates leukocyte recruitment and pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice. *J Neuroinflammation* 5: 49.

Dutra MS, Bela SR, Peixoto-Rangel AL, Fakiola M, Cruz AG, Gazzinelli A, Quites HF, Bahia-Oliveira LM, Peixe RG, Campos WR (2013). Association of a NOD2 gene polymorphism and T-helper 17 cells with presumed ocular toxoplasmosis. *J Infect Dis* 207(1): 152-163.

El-behi M, Rostami A, Ciric B (2010). Current views on the roles of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmune Pharmacol* 5(2): 189-197.

El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, Zhang GX, Dittel BN, Rostami A (2011). The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol* 12(6): 568-575.

Elenkov IJ, Chrousos GP (1999). Stress, cytokine patterns and susceptibility to disease. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 13(4): 583-595.

Elovaara I, Ukkonen M, Leppakynnas M, Lehtimaki T, Luomala M, Peltola J, Dastidar P (2000). Adhesion molecules in multiple sclerosis: relation to subtypes of disease and methylprednisolone therapy. *Arch Neurol* 57(4): 546-551.

Elovaara I, Kuusisto H, Paalavuo R, Sarkijarvi S, Lehtimaki T, Huhtala H, Vilpo J (2006). Effect of high-dose methylprednisolone treatment on CCR5 expression on blood cells in MS exacerbation. *Acta Neurol Scand* 113(3): 163-166.

Engelhardt B (2006). Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J Neural Transm* 113(4): 477-485.

Engelhardt B, Ransohoff RM (2012). Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol* 33(12): 579-589.

Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, Dalton D, Fathman CG (1996). Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol* 156(1): 5-7.

Fernandez O (2011). Oral laquinimod treatment in multiple sclerosis. *Neurologia* 26(2): 111-117.

Fischer HJ, Schweingruber N, Luhder 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(1-2): 99-107.

Forster C, Waschke J, Burek M, Leers J, Drenckhahn D (2006). Glucocorticoid effects on mouse microvascular endothelial barrier permeability are brain specific. *J Physiol* 573(Pt 2): 413-425.

Frijters R, Fleuren W, Toonen EJ, Tuckermann JP, Reichardt HM, van der Maaden H, van Elsas A, van Lierop MJ, Dokter W, de Vlieg J (2010). Prednisolone-induced differential gene expression in mouse liver carrying wild type or a dimerization-defective glucocorticoid receptor. *BMC Genomics* 11: 359.

- Furtado GC, Marcondes MC, Latkowski JA, Tsai J, Wensky A, Lafaille JJ (2008). Swift entry of myelin-specific T lymphocytes into the central nervous system in spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 181(7): 4648-4655.
- Gold R, Hartung HP (2003). Aktueller Überblick und zukünftige Therapiestrategien der Multiplen Sklerose. *Zeitschrift für interdisziplinäre Fortbildung Nervenheilkunde* 22(4a): 16-24.
- Gold R, Hartung HP, Toyka KV (2000). Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Mol Med Today* 6(2): 88-91.
- 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(Pt 8): 1953-1971.
- Golde S, Coles A, Lindquist JA, Compston A (2003). Decreased iNOS synthesis mediates dexamethasone-induced protection of neurons from inflammatory injury in vitro. *Eur J Neurosci* 18(9): 2527-2537.
- González MV, Jiménez B, Berciano MT, González-Sancho JM, Caelles C, Lafarga M, Muñoz A (2000). Glucocorticoids antagonize AP-1 by inhibiting the activation/phosphorylation of JNK without affecting its subcellular distribution. *J of Cell Biol* 150(5): 1199-1207.
- Hafler DA (2004). Multiple sclerosis. *J Clin Invest* 113(6): 788-794.
- Hafler DA, Slavik JM, Anderson DE, O'Connor KC, De Jager P, Baecher-Allan C (2005). Multiple sclerosis. *Immunol Rev* 204: 208-231.
- Hayashi T, Morimoto C, Burks JS, Kerr C, Hauser SL (1988). Dual-label immunocytochemistry of the active multiple sclerosis lesion: major histocompatibility complex and activation antigens. *Ann Neurol* 24(4): 523-531.
- Heck S, Kullmann M, Gast A, Ponta H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P, Cato AC (1994). A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *EMBO J* 13(17): 4087-4095.
- Hofstetter HH, Karulin AY, Forsthuber TG, Ott PA, Tary-Lehmann M, Lehmann PV (2005). The cytokine signature of MOG-specific CD4 cells in the EAE of C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol* 170(1-2): 105-114.
- Kaal EC, Vecht CJ (2004). The management of brain edema in brain tumors. *Curr Opin Oncol* 16(6): 593-600.
- Kabat EA, Wolf A, Bezer AE (1948). Studies on acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in rhesus monkeys. *J Exp Med* 88(4): 417-426.
- Kappos L, Radue EW, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, Selmaj K, Agoropoulou C, Leyk M, Zhang-Auberson L, Burtin P, Group FS (2010). A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 362(5): 387-401.
- Kiefer R, Kreutzberg GW (1991). Effects of dexamethasone on microglial activation in vivo: selective downregulation of major histocompatibility complex class II expression in regenerating facial nucleus. *J Neuroimmunol* 34(2-3): 99-108.

- Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y (2006). IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 177(1): 566-573.
- Koritschoner RS, Schweinburg F (1925). Induktion von Paralyse und Rückenmarksentzündung durch Immunisierung von Kaniinchen mit menschlichem Rückenmarksgewebe. *Z Immunitätsf Exp Therapie* 42: 217-283.
- Kroenke MA, Segal BM (2011). IL-23 modulated myelin-specific T cells induce EAE via an IFN $\gamma$  driven, IL-17 independent pathway. *Brain Behav Immun* 25(5): 932-937.
- Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti CF (2007). The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol* 17(2): 210-218.
- Lieberman AC, Druker J, Perone MJ, Arzt E (2007). Glucocorticoids in the regulation of transcription factors that control cytokine synthesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 18(1-2): 45-56.
- Linker RA, Toyka KV, Gold R (2001). Genetically modified animal studies in MS - Pathogenesis and therapeutic targets. *Int. MSJ* 9(1): 7-16.
- McQualter JL, Darwiche R, Ewing C, Onuki M, Kay TW, Hamilton JA, Reid HH, Bernard CC (2001). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *J Exp Med* 194(7): 873-882.
- 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(5): 511-516.
- Mittelstadt PR, Ashwell JD (2001). Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ. *J Biol Chem* 276(31): 29603-29610.
- Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68(5): 869-877.
- Moser B, Willmann K (2004). Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum Dis* 63 Suppl 2: ii84-ii89.
- Munari L, Lovati R, Boiko A (2004). Therapy with glatiramer acetate for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev*(1): CD004678.
- Nguyen KB, McCombe PA, Pender MP (1997). Increased apoptosis of T lymphocytes and macrophages in the central and peripheral nervous systems of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis treated with dexamethasone. *J Neuropathol Exp Neurol* 56(1): 58-69.
- Nicholas R, Giannetti P, Alsanousi A, Friede T, Muraro PA (2011). Development of oral immunomodulatory agents in the management of multiple sclerosis. *Drug Des Devel Ther* 5: 255-274.
- O'Connor RA, Prendergast CT, Sabatos CA, Lau CW, Leech MD, Wraith DC, Anderton SM (2008). Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 181(6): 3750-3754.

- Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y (1997). 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407(3): 313-319.
- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6(11): 1133-1141.
- Paul C, Bolton C (1995). Inhibition of blood-brain barrier disruption in experimental allergic encephalomyelitis by short-term therapy with dexamethasone or cyclosporin A. *Int J Immunopharmacol* 17(6): 497-503.
- Perretti M, D'Acquisto F (2009). Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 9(1): 62-70.
- Pitzalis C, Pipitone N, Bajocchi G, Hall M, Goulding N, Lee A, Kingsley G, Lanchbury J, Panayi G (1997). Corticosteroids inhibit lymphocyte binding to endothelium and intercellular adhesion: an additional mechanism for their anti-inflammatory and immunosuppressive effect. *J Immunol* 158(10): 5007-5016.
- Polman CH, O'Connor PW, Havrdova H, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A (2006). A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 354(9): 899-910.
- Pozzilli C, Marinelli F, Romano S, Bagnato F (2004). Corticosteroids treatment. *J Neurol Sci* 223(1): 47-51.
- Reddy PH, Manczak M, Zhao W, Nakamura K, Bebbington C, Yarranton G, Mao P (2009). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor antibody suppresses microglial activity: implications for anti-inflammatory effects in Alzheimer's disease and multiple sclerosis. *J Neurochem* 111(6): 1514-1528.
- Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, Bock R, Gass P, Schmid W, Herrlich P, Angel P, Schutz G (1998). DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 93(4): 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(24): 7168-7173.
- Reichardt HM, Gold R, Luhder F (2006). Glucocorticoids in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Expert Rev Neurother* 6(11): 1657-1670.
- Rivers TM, Schwentker FF (1935). Encephalomyelitis Accompanied by Myelin Destruction Experimentally Produced in Monkeys. *J Exp Med* 61(5): 689-702.
- Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP (1933). Observations on Attempts to Produce Acute Disseminated Encephalomyelitis in Monkeys. *J Exp Med* 58(1): 39-53.
- Rothhammer V, Heink S, Petermann F, Srivastava R, Claussen MC, Hemmer B, Korn T (2011). Th17 lymphocytes traffic to the central nervous system independently of alpha4 integrin expression during EAE. *J Exp Med* 208(12): 2465-2476.
- Sallusto F, Lanzavecchia A (2009). Human Th17 cells in infection and autoimmunity. *Microbes Infect* 11(5): 620-624.

Schweingruber N, Haine A, Tiede K, Karabinskaya A, van den Brandt J, Wüst S, Metselaar JM, Gold R, Tuckermann JP, Reichardt HM, Lühder F (2011). Liposomal encapsulation of glucocorticoids alters their mode of action in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 187(8): 4310-4318.

Schweingruber N, Fischer HJ, Fischer L, van den Brandt J, Karabinskaya A, Labi V, Villunger A, Kretzschmar B, Huppke P, Somins M (2014). Chemokine-mediated redirection of T cells constitutes a critical mechanism of glucocorticoid therapy in autoimmune CNS responses. *Acta Neuropathol* 127(5):713-729

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

Stahn C, Buttgereit F (2008). Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4(10): 525-533.

Stangel M, Lassmann H (2003). Multiple Sklerose: Pathologie und Regeneration. *Nervenheilkunde, Zeitschrift für interdisziplinäre Fortbildung* 22(4a): 9-12.

Steinman L (1996). Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 85(3): 299-302.

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

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

Karow T, Lang-Roth R. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 19. Auflage. Thomas Karow (Verlag), Puhlheim 2011

Tischner D, van den Brandt J, Weishaupt A, Lühder F, Herold MJ, Reichardt HM (2009). Stable silencing of the glucocorticoid receptor in myelin-specific T effector cells by retroviral delivery of shRNA: insight into neuroinflammatory disease. *Eur J Immunol* 39(9): 2361-2370.

Tischner D, Theiss J, Karabinskaya A, van den Brandt J, Reichardt SD, Karow U, Herold MJ, Lühder F, Utermohlen O, Reichardt HM (2011). Acid sphingomyelinase is required for protection of effector memory T cells against glucocorticoid-induced cell death. *J Immunol* 187(9): 4509-4516.

Tsien RY (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67: 509-544.

Tuckermann JP, Reichardt HM, Arribas R, Richter KH, Schutz G, Angel P (1999). The DNA binding-independent function of the glucocorticoid receptor mediates repression of AP-1-dependent genes in skin. *J Cell Biol* 147(7): 1365-1370.

Tuckermann JP, Kleiman A, McPherson KG, Reichardt HM (2005). Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 42(1): 71-104.

Wüst S, van den Brandt J, Tischner D, Kleiman A, Tuckermann JP, Gold R, Lühder F, Reichardt HM (2008). Peripheral T cells are the therapeutic targets of glucocorticoids in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 180(12): 8434-8443.

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(12): e8202.

Yang J, Yan Y, Ma CG, Kang T, Zhang N, Gran B, Xu H, Li K, Ciric B, Zangaladze A (2012). Accelerated and enhanced effect of CCR5-transduced bone marrow neural stem cells on autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol* 124(4): 491-503.

Yura M, Takahashi I, Serada M, Koshio T, Nakagami K, Yuki Y, Kiyono H (2001). Role of MOG-stimulated Th1 type "light up" (GFP+) CD4+ T cells for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Autoimmun* 17(1): 17-25.

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Multiple-Sklerose-Forschung (IMSF), Gemeinnützige Hertie-Stiftung, der Universität Göttingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Alexander Flügel in Kooperation mit der AG Reichardt (Leitung der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Holger Reichardt) am Institut für Zelluläre und Molekulare Immunologie unter der Leitung von Prof. Dr. Jürgen Wienands durchgeführt.

Meinem Betreuer PD Dr. Fred Lühder danke ich von Herzen für die großartige und immerwährende Unterstützung und die ausgezeichnete und ausführliche Betreuung meiner Arbeit. Ebenso gilt mein spezieller Dank Prof. Dr. Holger Reichardt für Rat und Tat während der Zeit meiner Arbeit.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des IMSF, im Besonderen Frau Martina Weigl für die tatkräftige Unterstützung bei all meinen Versuchen und Dr. Simone Wüst für die ausgezeichnete Einarbeitung. Spezieller Dank gilt auch Dr. Jens van den Brandt und Dr. Anna Karabinskaya, Institut für Zelluläre und Molekulare Immunologie, für die hervorragende Zusammenarbeit bei den gemeinsamen Projekten.

## Lebenslauf

Ich heiße Lisa Maria Müller, geborene Fischer, und wurde am 25. Mai 1984 in Wesel geboren. Derzeit bin ich wohnhaft in der Arndtstraße 4 in 90419 Nürnberg. Seit Oktober 2013 bin ich verheiratet.

Meine Eltern sind Herr Edmund Fischer, geboren am 5. Juli 1957, und Frau Heidi Fischer, geb. Tellmann, geboren am 8. September 1957.

Mein Vater ist gelernter Bankkaufmann und arbeitet als Vertriebsmitarbeiter einer Leasinggesellschaft in Augsburg. Meine Mutter ist ebenfalls gelernte Bankkauffrau und arbeitet derzeit als Verwaltungsangestellte der Stadt Bobingen.

Ich habe zwei Brüder, Niklas und Jan Torben Fischer.

Von September 1990 bis Juli 1994 besuchte ich die Grundschule der Laurentius Volksschule Bobingen in Oberottmarshausen. Im September 1994 wechselte ich auf das Gymnasium bei St. Anna in Augsburg. Nach der 10. Klasse, von August 2000 bis Juli 2001, war ich für ein Jahr Schülerin des Colegio Domingo Savio in Santa Cruz de la Sierra in Bolivien im Rahmen eines Austauschprogramms des AFS-Interkulturelle Begegnungen e.V. Nach meinem Auslandsaufenthalt besuchte ich von September 2001 bis Juni 2004 weitere drei Jahre das Gymnasium bei St. Anna in Augsburg und legte dort im Juni 2004 meine allgemeine Hochschulreife ab.

Von April 2005 bis März 2006 besuchte ich die Berufsfachschule für Gesundheits- und Krankenpflege am Klinikum Nürnberg.

Von April 2006 bis März 2008 studierte ich die ersten vier Fachsemester an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg und legte dort im März 2008 den Ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung ab.

Zum Sommersemester 2008 wechselte ich an die Georg-August-Universität Göttingen, an der ich im Juli 2012 meine Approbation zur Ärztin erlangte.

Bereits im Oktober 2008 begann ich studienbegleitend meine wissenschaftliche Arbeit am Institut für Multiple-Sklerose-Forschung in Göttingen im Rahmen meiner angestrebten Promotion.

Seit September 2012 bin ich als Assistenzärztin in Weiterbildung zur Inneren Medizin am Krankenhaus Martha-Maria in Nürnberg tätig.