

Aus dem Institut für klinische Neuroimmunologie (INIM)

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Reinhard Hohlfeld

**Effekte des immunmodulatorischen
MS-Therapeutikums Fingolimod
und des Lipidmediators Sphingosin-1-phosphat
auf humane Astrozyten**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Johann Hofereiter

aus Leipzig

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Edgar Meinel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Magdalena Götz

Pof. Dr. med. Dieter Edbauer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Markus Krumbholz

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.2015

*gewidmet
meiner Mutter
und
meinem Vater*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Multiple Sklerose	1
1.1.1	Epidemiologie	2
1.1.2	Ätiologie und Pathogenese	3
1.1.3	Klinik, Verlaufsformen und Prognose	5
1.1.4	Diagnostik und Therapie	6
1.2	Das Sphingosin-1-phosphat-System	10
1.2.1	Das S1P-System im ZNS und bei der Multiplen Sklerose	12
1.3	Fingolimod (FTY-720)	13
1.4	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Zelllinien	16
2.1.2	Medien und Lösungen für Zellkultur	16
2.1.3	Material für RNA-Isolierung und Reverse Transkription	16
2.1.4	Material für TaqMan-PCR	17
2.1.5	Weitere Chemikalien und Reagenzien	18
2.1.6	Weitere Verbrauchsmaterialien	18
2.1.7	Geräte	19
2.2	Methoden	20
2.2.1	Zellkulturbedingungen	20
2.2.2	Splitten adhärenter Zellen	20
2.2.3	Isolierung von Gesamt-RNA	21
2.2.4	Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA	21
2.2.5	Synthese komplementärer DNA (cDNA)	22
2.2.6	Quantitative Echtzeit-PCR (<i>Real-Time-quantitative-PCR</i>)	23
2.2.7	Bestimmung der RNA-Integrität	27
2.2.8	Expressionsanalyse mittels Microarray	29

3	Ergebnisse	30
3.1	Expressionsprofil der S1P-Rezeptoren	30
3.2	Veränderung des S1P-Rezeptorexpressionsprofils unter dem Einfluss von Zytokinen	32
3.3	Veränderung des Expressionsprofils der Sphingosin-Kinasen und S1P- Phosphatasen sowie der Lyase unter dem Einfluss von Zytokinen	37
3.4	Die Effekte von Spingosin-1-phosphat und FTY-P	40
3.5	Die Kinetik der Expression von EGR1 und FGF2	43
3.6	Stimulation humaner Astrozyten mit S1P und FTY-P	45
3.7	Der Microarray und dessen statistische Analyse.....	47
3.8	Die Validierung der Microarray-Daten	50
4	Diskussion	55
4.1	Expressionsprofil der S1P-Rezeptoren und deren Bedeutung im Tiermodell der Multiplen Sklerose	55
4.2	Das S1P-Rezeptorexpressionsprofil unter dem Einfluss von Zytokinen	56
4.3	Das Expressionsprofil der Sphingosin-Kinasen, S1P-Phosphatasen und Lyase unter Zytokineinfluss	58
4.4	Effekte von S1P und FTY-P sowie DHS1P auf Transkriptionsebene	59
4.5	Ergebnisse des Microarray und dessen Validierung	61
4.6	Hypothese zur Wirkung von FTY und S1P auf Neurone und Gliazellen	66
4.7	Klinische Relevanz der Daten und Perspektive	68
5	Zusammenfassung.....	70
6	Literaturverzeichnis.....	72
7	Verzeichnis der Abkürzungen	85
8	Publikationen.....	87
9	Danksagung	88

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS, *Encephalomyelitis disseminata*) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), für die bis zum heutigen Tag keine kurative Therapie zur Verfügung steht. Der Auslöser ist ebenfalls unbekannt und es liegen eine Vielzahl von Theorien zur Pathogenese der MS vor. Derzeit geht man von einer multifaktoriellen Genese aus, die ein Zusammenspiel aus genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren berücksichtigt.

Bei der MS entstehen im Rahmen eines immunologischen Geschehens multifokale Entzündungsherde (Plaques), die im gesamten ZNS vorkommen können und häufig in enger Nachbarschaft zu den inneren Liquorräumen, insbesondere der Seitenventrikel, lokalisiert sind. Sie stellen das neuropathologische Hauptmerkmal der MS dar [Noseworthy et al., 2000]. Die Plaques unterliegen im Krankheitsverlauf einer gewissen Dynamik und sind gekennzeichnet durch Infiltration von Entzündungszellen, Verlust der Myelinscheide (Demyelinisierung), axonale Degeneration und einer reaktiven Astroglie. In der Histologie werden aber auch umschriebene Areale beobachtet, in denen im Sinne eines Heilungsprozesses Remyelinisierung stattfindet. Sie werden in der Fachliteratur als *shadow plaques* bezeichnet (**Abbildung 1**).

Aus dem Verlust der Myelinscheide und der axonalen Degeneration resultiert schließlich eine Beeinträchtigung der Informationsweiterleitung über die zentralen Nervenfasern (Axone) und kann je nach Lokalisation der Schädigung zu unterschiedlichen neurologischen Symptomen führen [Compston et al., 2002]. Zwar ist die Diagnose MS nicht gleichzusetzen mit der unweigerlichen Entwicklung einer schweren Behinderung, doch gibt es eine bedeutende Anzahl von Betroffenen, die einen sehr schweren Verlauf der Krankheit erleben müssen. Ein bekanntes Schicksal ist das der außergewöhnlichen Cellistin Jacqueline du Pré, die auf dem Höhepunkt ihrer Karriere an MS erkrankte. Schon nach wenigen Jahren führte dies zum Verstummen ihres einzigartigen Cellospiels und sie starb schließlich im Alter von nur 42 Jahren. Dieses und viele andere Patientenschicksale machen deutlich, wie wichtig die Bemühungen sind, die zentralen Fragen zu Ursache und Therapie dieser unberechenbaren Erkrankung aufzuklären.

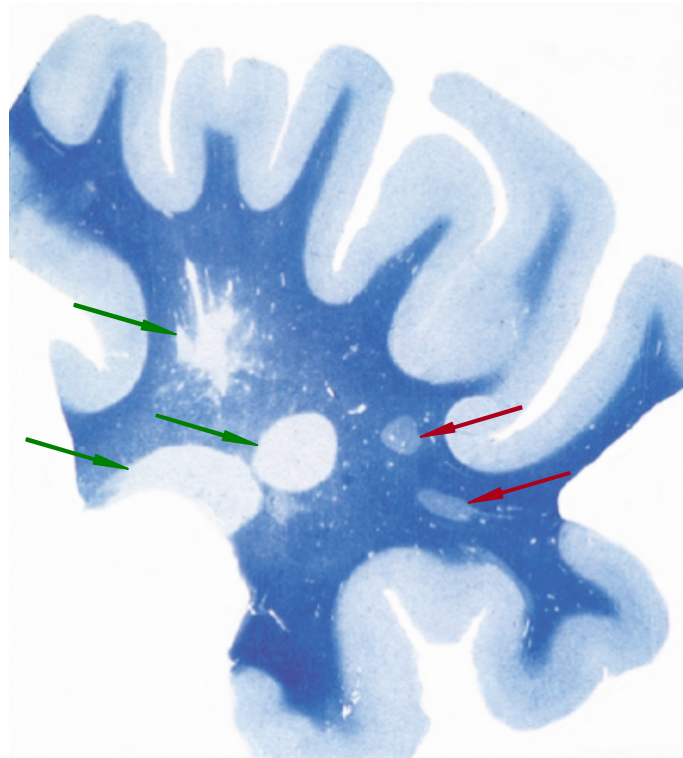


Abbildung 1: Histologisches Schnittpräparat eines Patienten mit MS. Das Präparat wurde mit *Luxol Fast Blue* (LFB) behandelt, um den Markscheiden (Myelin) eine türkisblaue Farbe zu geben. Die grünen Pfeile im linken Teil der Abbildung weisen auf Areale, in denen die Myelinfärbung mit LFB fehlt. Es handelt sich hierbei um typische MS-Plaques, die sich durch eine chronische Demyelinisierung auszeichnen. Die roten Pfeile zeigen auf Bereiche, in denen eine unvollständige Remyelinisierung stattgefunden hat, es handelt sich hierbei um sogenannte *shadow plaques*. (Abbildung aus der Zusammenfassung *Why does remyelination fail in multiple sclerosis* [Franklin, 2002]).

1.1.1 Epidemiologie

Die Multiple Sklerose ist die häufigste neurologische Ursache für eine bereits im jungen Erwachsenenalter erworbene körperliche Behinderung und hat damit erhebliche arbeits- und sozialmedizinische Relevanz. Derzeit geht die Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft (DMSG) von etwa 130.000 betroffenen Menschen in Deutschland aus, weltweit wird die Zahl der MS-Patienten auf etwa 2,5 Millionen geschätzt [Compston et al., 2002, Steinman 2014].

Typischerweise manifestiert sich die MS zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr mit einem Erkrankungsgipfel um das 30. Lebensjahr. Kinder und Säuglinge sind nur äußerst selten betroffen. Gleichermäßen wird die MS jenseits des 60. Lebensjahres kaum diagnostiziert. Frauen sind im Vergleich zu Männern etwa doppelt so häufig betroffen (Gynäkotropie).

Die Prävalenz der MS ist je nach Region sehr unterschiedlich. Generell ist die Erkrankungshäufigkeit in der äquatorialen Zone geringer als in den nördlichen und südlichen Breitengraden. Personen, die als Kinder oder Jugendliche von einem Land mit hoher MS-Prävalenz in ein Land mit vergleichsweise niedriger Prävalenz übersiedeln, übernehmen das Risiko des Einwanderungslandes. Demgegenüber nehmen ältere Personen das Erkrankungsrisiko ihres Herkunftslandes mit in die neue Heimat. Die im Rahmen von Migrationsstudien erhobenen Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass u. a. Umweltfaktoren einen entscheidenden pathogenetischen Einfluss haben könnten [Milo et al., 2010].

Die Lebenserwartung an MS erkrankter Personen ist im Durchschnitt um etwa 5-10 Jahre geringer als die der allgemeinen Bevölkerung [Hurwitz, 2011].

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der MS ist bis dato unklar. Demgegenüber hat das gute und kontinuierlich wachsende Verständnis zur Pathogenese in den letzten Jahren neue Therapieansätze möglich gemacht. Es wird davon ausgegangen, dass sowohl die genetische Prädisposition, als auch Umweltfaktoren für die Manifestation der Erkrankung eine entscheidende Rolle spielen. Zwar ist die MS keine Erbkrankheit im klassischen Sinne, die den Mendelschen Regeln folgt, jedoch wird durch die Analyse des Vererbungsmusters in betroffenen Familien die Rolle genetischer Faktoren deutlich. In Mitteleuropa liegt das MS-Risiko in der Gesamtbevölkerung bei durchschnittlich 0.1 % (jeder Tausendste erkrankt im Laufe seines Lebens an MS). Die Konkordanzrate für monozygote Zwillinge hingegen liegt bei ca. 30% (300-fach höheres Risiko) und bei dizygoten Zwillingen wird eine Rate von 5% (50-fach höheres Risiko) beobachtet.

Während der letzten zwei Jahrzehnte haben verschiedene Arbeitsgruppen genetische Polymorphismen identifiziert, die das Risiko an MS zu erkranken im Vergleich zur Gesamtbevölkerung signifikant erhöhen können. Zu einem der wichtigsten gehört das HLA-Klasse-II-Allel DRB1*15:01, welches das individuelle Erkrankungsrisiko um den Faktor 3-5 erhöht. Darüber hinaus wurden noch weitere Gen-Regionen identifiziert, die jedoch einen wesentlich geringeren Beitrag zur individuellen Suszeptibilität leisten [Fugger et al., 2009, Sawcer et al., 2014].

Im Zusammenhang mit Umweltfaktoren wird diskutiert, dass zum einen Infektionserreger durch molekulare Mimikry eine Autoimmunreaktion gegen Bestandteile der Myelinscheide auslösen. Zum anderen werden auch nicht-infektiöse Trigger in Erwägung gezogen, zu denen u. a. Vitamin-D-Mangel, Toxine, Zigarettenkonsum, sowie physischer und psychischer Stress gehören [Ascherio et al., 2007a, Ascherio et al., 2007b].

Neuro- und immunpathologisch lassen sich bei der MS, wie bei einer Vielzahl anderer neurologischer Erkrankungen, entzündliche Veränderungen und neurodegenerative Prozesse innerhalb des ZNS abgrenzen. Die für die MS typischen Plaques finden sich disseminiert im gesamten ZNS, mit häufiger Lokalisation im periventrikulären Marklager. Insgesamt vier verschiedene Typen von Entzündungsherden wurden bisher beschrieben. Typ I und II sind charakterisiert durch aktive Demyelinisierung bei einer T-Lymphozyten- und Makrophagen-dominierten entzündlichen Reaktion. Im Unterschied zum Typ I findet man beim Typ II zusätzlich Ablagerungen von Immunglobulinen und Komplementfaktoren. Typ III und IV enthalten ebenfalls ein entzündliches Infiltrat und sind darüber hinaus durch Degeneration und Untergang von Oligodendrozyten (myelinbildende Zellen) gekennzeichnet. Bemerkenswert war hierbei auch die Beobachtung, dass in ein und demselben MS-Patienten auch nur ein bestimmter Typ von Entzündungsherd histologisch zu identifizieren war, jedoch beim Vergleich verschiedener Patienten sich die entzündlichen Läsionen durchaus als heterogen erwiesen [Lucchinetti et al., 2000].

In Analogie zu einem etablierten Tiermodell der MS, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), wird davon ausgegangen, dass Episoden der Demyelinisierung durch enzephalitogene T-Zellen in Zusammenhang mit Autoantikörpern hervorgerufen werden. Vermutlich auf Grundlage einer Kreuzreaktivität von Komponenten der Myelinscheide mit viralen oder bakteriellen Proteinen werden T-Zellen in den sekundären Lymphorganen durch antigenpräsentierende dendritische Zellen aktiviert. Die T-Zellen exprimieren nun vermehrt Adhäsionsmoleküle, wie VLA-4 (*very late antigen-4*), das mit dem auf Kapillarendothelzellen des ZNS exprimierten VCAM-1 (*vascular adhesion molecule-1*) interagiert und so die Transmigration der T-Zellen über die Bluthirnschranke in das ZNS vermittelt. Kommen sie dort erneut mit dem mutmaßlichen Antigen bzw. Autoantigen in Kontakt, das durch antigenpräsentierende Zellen (Makrophagen, Astrozyten, Mikroglia) über einen trimolekularen Komplex bestehend aus T-Zell-Rezeptor, Antigen und HLA-Klasse-I/II-Molekül den infiltrierenden T-Zellen präsentiert wird, so werden diese aktiviert und expandieren klonal. Sie beginnen proinflammatorische Zytokine (Interferon- γ ,

Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-1 β) zu produzieren und setzen dadurch eine Entzündungskaskade in Gang, die zum Zusammenbruch der Bluthirnschrankenintegrität führt („*first hit*“). Nun können ungehindert Autoantikörper in das ZNS gelangen und in Verbindung mit den Immunzellen durch Bindung an ihr spezifisches Antigen schließlich zur Schädigung der Myelinscheiden und Axone führen („*second hit*“) [Krumbholz et al., 2012, Mayer et al., 2012].

Zu den mutmaßlichen Antigenen gehören das basische Myelinprotein (MBP, *myelin basic protein*), das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG), das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), das Proteolipidprotein (PLP), das S-100 Protein, Phosphodiesterasen, sowie das α B-Crystallin und Contactin-2 [Derfuss et al., 2009, Holmoy et al., 2008, Noseworthy et al., 2000].

Während des Entzündungsprozesses werden parallel auch antiinflammatorische Mechanismen initiiert und geschädigte Myelinscheiden durch endogene Remyelinisierung wieder regeneriert [Patrikios et al., 2006, Rodriguez, 2003]. Die entzündlichen Veränderungen werden zudem von einer reaktiven Astrozytenproliferation begleitet, die nach Abklingen der Entzündung als Gliose zu einer Vernarbung und Verhärtung (Sklerose) des Nervengewebes an unterschiedlichen Stellen (multipel) führt. Unter Bezugnahme auf diese histopathologischen Eigenschaften entstand der Name Multiple Sklerose.

1.1.3 Klinik, Verlaufsformen und Prognose

Bedingt durch die uneinheitlichen und disseminierten Lokalisationen der MS-Läsionen im ZNS weisen Patienten eine ausgesprochen variable klinisch-neurologische Symptomatik auf. Das breit gefächerte Spektrum beinhaltet Paresen, Parästhesien, Hypästhesien, Hyperreflexivität, Spastik, Koordinationsstörungen, Tremor, Abnahme der Sehschärfe, Nystagmus, Blasen- und Mastdarmstörungen, Beeinträchtigung der Sexualfunktion und weitere. Auch Symptome wie Konzentrationsstörungen, depressive Verstimmung oder allgemeine Erschöpfung (frz. *fatigue*) werden häufig beobachtet und haben ebenso einen bedeutenden Einfluss auf die gesundheitsbezogene Lebensqualität.

Von Patient zu Patient kann die MS in ihrem Ausmaß sehr unterschiedlich verlaufen, dennoch lassen sich typische klinische Verlaufsformen voneinander abgrenzen. Die meisten Patienten (etwa 80%) weisen initial einen schubförmigen Krankheitsverlauf auf. Dieser ist

charakterisiert durch das kurzfristige Auftreten oder die Verschlechterung bestehender neurologischer Symptome (Schub), die mindestens für eine Dauer von 24 Stunden bestehen. Um die Symptome von einem Pseudoschub abzugrenzen, müssen diese in Abwesenheit von Infektion und Fieber (Uhthoff-Phänomen) auftreten. Die neurologische Symptomatik kann sich vollständig oder nur unvollständig zurückbilden (schubförmig-remittierend). Die meisten Patienten gehen nach Jahren der Erkrankung in eine Verlaufsform über, die durch eine schleichende neurologische Verschlechterung gekennzeichnet ist (sekundär-progredient). Ein Teil der Patienten (etwa 20%) entwickelt bereits bei Erstmanifestation der Erkrankung einen chronisch fortschreitenden Verlauf (primär progredient). Für diese Verlaufsform ist kennzeichnend, dass keine isolierten Schübe abgrenzbar sind, sondern die neurologische Beschwerdesymptomatik ohne Rückbildungstendenz stetig zunimmt [Compston et al., 2002, Noseworthy et al., 2000, Steinman, 2014].

Die individuelle Prognose ist aufgrund des hochvariablen Krankheitsverlaufs schwer zu formulieren. Unter Berücksichtigung der Verlaufsform, des Schweregrades der klinischen Symptomatik (EDSS: *Expanded Disability Status Scale*), der Erkrankungsdauer, Schubfrequenz und Alter lassen sich dennoch gewisse Annahmen treffen. Faktoren, die sich prognostisch günstig auswirken sind ein geringes Alter bei Erstmanifestation der Erkrankung, weibliches Geschlecht, ein monosymptomatischer Beginn, Optikusneuritis und Sensibilitätsstörungen als Initialsymptom, ein rein schubförmig-remittierender Verlauf, niedrige Schubfrequenz und rasche Remission. Die Umkehrung der soeben angeführten Faktoren deutet auf einen eher ungünstigen Verlauf mit schlechter Prognose hin. Ganz allgemein lässt sich sagen, dass die MS bei fast der Hälfte der Patienten einen günstigen Verlauf nimmt. Nichtsdestotrotz erleiden bis zu 15 Prozent innerhalb kurzer Zeit einen Zustand schwerer Behinderung mit drastischer Beeinträchtigung der Lebensqualität [Compston et al., 2002].

1.1.4 Diagnostik und Therapie

Für die Diagnose der MS ist bisher kein definitiver Test bzw. Biomarker etabliert. Verschiedene Kriterien müssen daher erfüllt werden, bevor die Erkrankung endgültig festgestellt werden kann. Als Grundlage dienen die im Jahr 2010 überarbeiteten McDonald-Kriterien [McDonald et al., 2001, Polman et al., 2011]. Diese fordern in Kombination sowohl das Vorhandensein von Entzündungsherden an mehreren Stellen des ZNS (räumliche

Dissemination), als auch das Auftreten neuer Läsionen im zeitlichen Verlauf (zeitliche Dissemination). Die räumliche und zeitliche Dissemination wird auf der Basis von klinischen und paraklinischen Befunden nachgewiesen. Ein häufig eingesetztes und in den Vordergrund gerücktes apparatives Verfahren ist hierbei die Magnetresonanztomographie (MRT), anhand derer alte und neue Läsionen sowie deren räumliche Verteilung bildgebend dargestellt werden können.

Bei begründetem Verdacht auf MS kann die Untersuchung der Zerebrospinalflüssigkeit (lat. *Liquor cerebrospinalis*) zusätzliche Hinweise liefern und somit die Diagnose stützen. Bei MS-Patienten findet man im Liquor oft eine dezente lymphozytäre Pleozytose von weniger als 50 Zellen/mm³ und zu etwa 95% eine intrathekale Immunglobulinsynthese. Diese kann durch simultane Bestimmung der Immunglobulinklassen G, A und M (IgG, IgA, IgM) im Liquor und Serum quantitativ nachgewiesen werden (Reiber-Diagramm). Darüber hinaus können mittels isoelektrischer Fokussierung auf einem Agarosegel lokal gebildete IgG als oligoklonale Banden (OKB) nachgewiesen werden. Allerdings sind diese nicht rein spezifisch für die MS, sondern finden sich auch bei anderen entzündlichen Erkrankungen des ZNS und sind gelegentlich auch bei gesunden Menschen vorhanden. Schließlich lassen sich bei der MS auch häufig Antikörper gegen neurotrope Erreger wie Masern, Röteln und Varizella-Zoster-Viren nachweisen (MRZ-Reaktion) [Stangel et al., 2013].

Wird die Diagnose MS gestellt, so bieten sich verschiedene Möglichkeiten der Behandlung an. Zwar ist bis heute keine kausale und kurative Therapie verfügbar, dennoch existieren verschiedene Medikamente und Verfahren, welche die Symptomatik der Erkrankung effektiv abmildern können. Dabei unterscheidet man zwischen der zeitlich begrenzten Therapie des akuten MS-Schubes und einer vorbeugenden Langzeittherapie (Basistherapie). Versagt die Basistherapie, so wird die sogenannte Eskalationstherapie eingeleitet.

Für die Behandlung des entzündlichen Schubes werden in der Regel hochdosiert Glucocorticoide über mehrere Tage intravenös als Infusion (Pulstherapie) eingesetzt. Für die langfristige Basistherapie und damit zur Schubprophylaxe stehen mehrere immunmodulatorische Substanzen (DMDs: *disease modifying drugs*) zur Verfügung. Dazu zählen die Beta-Interferone (Interferon beta-1a und -1b) und das synthetische Polypeptidgemisch Glatirameracetat. Für die Interferone konnte in doppelt-blinden, Placebo-kontrollierten Studien (Evidenzklasse I) eine signifikante Reduktion der Schubfrequenz von bis zu 35% und eine Reduktion neuer kontrastmittelaufnehmender Läsionen in der Kernspintomographie von

bis zu 80% nachgewiesen werden [Comi et al., 2001]. Für Glatirameracetat wurde eine vergleichbare Wirksamkeit nachgewiesen [Johnson et al., 1998]. Daher gelten Interferone und Glatirameracetat als Mittel der ersten Wahl für die Basistherapie der MS. Bei hochaktiver schubförmig-remittierender MS kommt neben den genannten Medikamenten auch der humanisierte, monoklonale Antikörper Natalizumab zum Einsatz. Die Wirksamkeit des Antikörpers beruht auf der Bindung an die α 4-Untereinheit des α 4 β 1-Integrins (VLA-4), das u. a. auf der Zelloberfläche von Lymphozyten exprimiert wird. Dadurch wird die Transmigration autoreaktiver T-Zellen über das Endothel der Bluthirnschranke in das ZNS supprimiert [Polman et al., 2006]. Ein weiterer monoklonaler Antikörper, der für die Behandlung der aktiven schubförmigen MS seit September 2013 zur Verfügung steht, ist Alemtuzumab. Dieser bindet spezifisch an das Glykoprotein CD52, welches auf der Zelloberfläche von B- und T-Lymphozyten exprimiert wird und führt dadurch zu deren selektivem Abbau [Hartung et al., 2014]

Erst kürzlich zugelassene, oral applizierbare Medikamente zur Basistherapie der MS sind Teriflunomid und Dimethylfumarat. Teriflunomid ist ein Wirkstoff aus der Gruppe der Immunmodulatoren und stellt die erste Behandlung in Tablettenform zur Basistherapie dar. Seine Wirksamkeit ist mit dem des hochdosierten IFN- β -1a vergleichbar [O'Connor et al., 2011, Sartori et al., 2014]. Unter der Behandlung mit Dimethylfumarat, welches auch zur Behandlung der Psoriasis eingesetzt wird, konnte die jährliche Schubrate je nach Dosis signifikant um etwa 50% gesenkt werden [Bomprezzi, 2015]. Als Reservemittel der Basistherapie gilt Azathioprin, ein Arzneistoff aus der Gruppe der Immunsuppressiva [Casetta et al., 2007].

Die primär progrediente Verlaufsform der MS ist sehr schwer zu behandeln. Es können Therapieversuche mit Glucocorticoiden oder dem Zytostatikum Mitoxantron unternommen werden.

Ein weiteres, vielversprechendes Medikament, das im März 2011 in der Europäischen Union für die Behandlung der hochaktiven schubförmigen MS zugelassen wurde, ist der Immunmodulator Fingolimod (FTY-720). Durch die orale Applikationsform ist es im Vergleich zu den *per injectionem* subkutan verabreichten Interferonen einfach in der Handhabung und trägt zu einer verbesserten Compliance bei [Cohen et al., 2007]. 2010 wurden in der renommierten Fachzeitschrift „*New England Journal of Medicine*“ zwei klinische Studien der Phase III veröffentlicht (FREEDOMS, TRANSFORMS), welche die

Wirksamkeit von Fingolimod an einem umfangreichen Patientenkollektiv eindeutig bestätigen [Cohen et al., 2010, Kappos et al., 2010]. Es zeigte sich hierbei, dass Fingolimod die jährliche Schubrate je nach Dosierung um bis zu 60% senken kann und das Risiko für eine bleibende Behinderung ebenfalls mindert. In der MRT fanden sich im Vergleich zur Placebo-Kontrollgruppe signifikant weniger kontrastmittelaufnehmende Läsionen [Kappos et al., 2010, Radue et al., 2012]. Fingolimod erwies sich bezüglich der eben angeführten Punkte effektiver als das klassische Interferon β -1a [Cohen et al., 2010]. Der Mechanismus, der für die Wirksamkeit von Fingolimod verantwortlich gemacht wird, ist die Sequestrierung von Lymphozyten in den sekundären Lymphorganen. Daraus folgt eine Reduktion der in der Blutbahn zirkulierenden Lymphozyten um 70% und führt schließlich zu einer verminderten Invasion autoreaktiver T-Zellen in das ZNS.

Es werden Fingolimod neben diesem Wirkmechanismus auch direkte protektive Effekte auf die Zellen des ZNS zugesprochen (siehe Abschnitt 1.3). Diese sogenannten neuroprotektiven Effekte sollen in der vorliegenden Arbeit auf Genexpressionsebene näher untersucht werden. Fingolimod aktiviert als Sphingosin-1-phosphat-Analogon vier von fünf Sphingosin-1-phosphat-Rezeptoren, deren System im folgenden Abschnitt 1.2 eingehend erläutert werden soll und zugleich die theoretische Grundlage für die im Ergebnisteil angeführten Experimente liefert.

1.2 Das Sphingosin-1-phosphat-System

Sphingosin-1-phosphat (S1P) ist ein bioaktives Signalmolekül, das zur Gruppe der Sphingolipide gehört. Es beeinflusst u. a. die Proliferation, Differenzierung, Migration und das Überleben vieler verschiedener Zelltypen. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Gefäßsystems, der Regulation des Gefäßtonus und der Grenzfunktion des Endothels. Außerdem fungiert es als Modulator des Immunsystems [Brinkmann, 2007].

Die Biosynthese von S1P erfolgt intrazellulär aus Sphingomyelin, das wichtiger, struktureller Bestandteil der eukaryotischen Zellmembran ist und zur Gruppe der Phospholipide gehört. Sphingomyelin wird enzymatisch über Ceramid zu Sphingosin umgewandelt. Ceramid kann auch de novo aus Palmitoyl-CoA und Serin synthetisiert werden. In einem ATP-abhängigen Reaktionsschritt wird aus Sphingosin durch die zwei Isoformen der Sphingosinkinase (SphK1/2) schließlich Sphingosin-1-phosphat generiert. Die Konzentration von S1P wird streng reguliert und kann entweder reversibel über S1P-Phosphatasen (SPP1/2) oder irreversibel durch die S1P-Lyase (SpL) abgebaut werden (**Abbildung 2**) [Mendelson et al., 2014, Olivera et al., 2013, Rosen et al., 2009, Spiegel et al., 2003, Takabe et al., 2008].

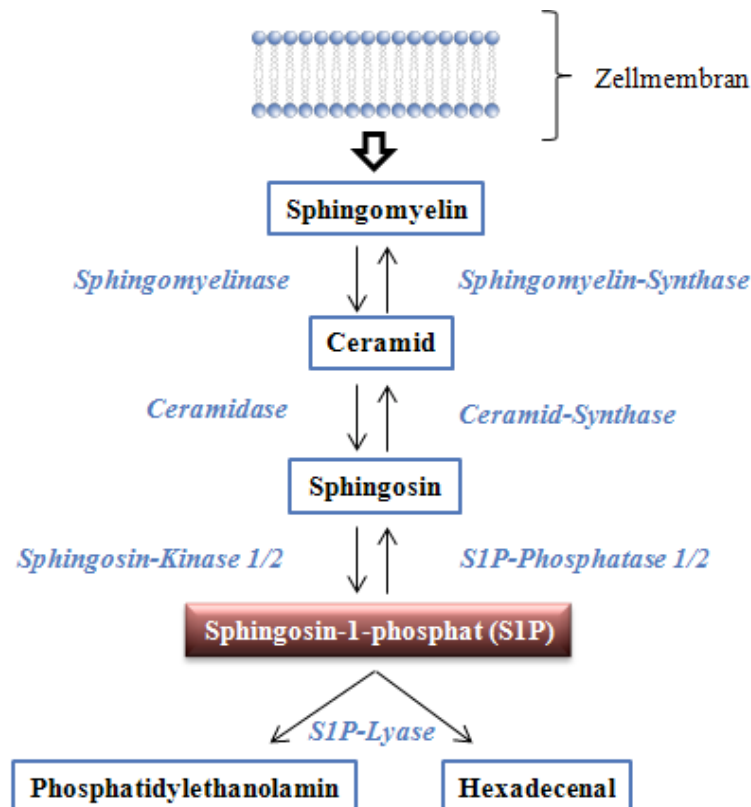


Abbildung 2: Intrazelluläre Biosynthese und Abbau von Sphingosin-1-phosphat [erstellt nach Rosen et al. 2009]

In Gang gesetzt wird die Biosynthese von S1P über die Aktivierung der Sphingosinkinase durch verschiedene, externe Zellstimuli. Neben Zytokinen spielen Wachstumsfaktoren dabei eine wichtige Rolle. Hierzu zählen vor allem *platelet-derived growth factor* (PDGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α), *nerve growth factor* (NGF), *epidermal growth factor* (EGF) und *basic fibroblast growth factor* (b-FGF/FGF2) [Spiegel et al., 2003]. Das neu synthetisierte S1P agiert entweder direkt intrazellulär als *second messenger* oder wird über ABC-Transporter nach extrazellulär transportiert. Dort kann es auto- oder parakrin als Agonist an fünf verschiedene Rezeptoren (S1P₁, S1P₂, S1P₃, S1P₄ und S1P₅, ehemals bezeichnet Edg1, Edg5, Edg3, Edg6 und Edg8) binden. Jeder dieser Rezeptoren ist mit einem oder mehreren G-Proteinen gekoppelt (G_{i/o}, G_q, G_{12/13}) und setzt bei Bindung eines Liganden (S1P) verschiedene Signalkaskaden in Gang, die in **Abbildung 3** schematisch wiedergegeben sind [Brinkmann, 2007, Obinata et al., 2012, Spiegel et al., 2003, Takabe et al., 2008].

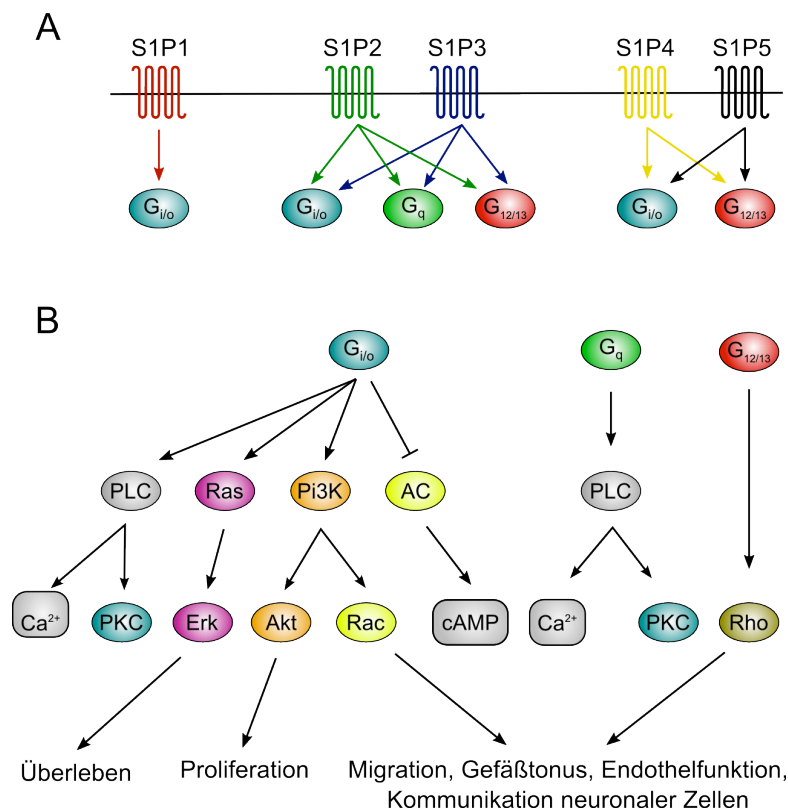


Abbildung 3: Fünf verschiedene S1P-Rezeptoren (S1P₁₋₅) sind beschrieben, die mit unterschiedlichen G-Proteinen (G_{i/o}, G_q, G_{12/13}) gekoppelt sind (A). Über diese werden zahlreiche Signalkaskaden in Gang gesetzt, die zur Aktivierung von Kinasen (PKC, Erk, Akt), GTPasen (Rac, Rho) und zum Anstieg von intrazellulärem Kalzium führen (B). Beeinflusst werden dadurch verschiedenste zelluläre Prozesse [erstellt nach Brinkmann et al. 2007].

1.2.1 Das S1P-System im ZNS und bei der Multiplen Sklerose

Es ist bekannt, dass S1P-Rezeptoren auf den Zellen des ZNS abundant exprimiert werden. Verschiedene Beobachtungen weisen darauf hin, dass über das S1P-System in Bezug auf die Pathogenese der MS vorteilhafte Effekte vermittelt werden. Beispielsweise fördert die Aktivierung des Rezeptors S1P₅ das Überleben von Oligodendrozyten und könnte somit relevant für die Regeneration der geschädigten Myelinscheide sein [Jaillard et al., 2005]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass S1P-Rezeptoren und deren Ligand S1P maßgeblich die Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen beeinflussen und somit eine wichtige Rolle bei der Neubildung von Neuronen aus Stammzellen (Neurogenese) spielen. Es ergaben sich bei Knockout-Mäusen, denen entweder S1P₁ oder beide Kinasen (SphK1/2) fehlten, deutliche strukturelle Defekte und eine geringere Mitoserate des sich in Entwicklung befindlichen ZNS [Mizugishi et al., 2005]. S1P wirkt zudem chemotaktisch auf neuronale Stammzellen und rekrutiert diese zu verletzten ZNS-Arealen [Kimura et al., 2007]. Beim Aussprossen von Nervenfortsätzen nimmt S1P eine wichtige Steuerfunktion ein (*axonal guidance*) [Strochlic et al., 2008]. Eine erst kürzlich publizierte Studie konnte nachweisen, dass mit S1P vorbehandelte Astrozyten die Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen maßgeblich vorantreibt und das Wachstum von Axonen *in vitro* stimuliert [Spohr et al., 2012]. Auf der anderen Seite gibt es Hinweise darauf, dass neurodegenerative Prozesse mit einer Verminderung der S1P-Konzentration im Nervengewebe einhergehen [Ceccom et al., 2014, Couttas et al., 2014].

Man könnte sich auf Grundlage der verfügbaren Literatur gut vorstellen, dass die beschriebenen Effekte bei der MS im Rahmen regenerativer Prozesse durchaus eine bedeutende Stellung einnehmen und sich eine medikamentöse Modulation der S1P-Rezeptoren möglicherweise positiv auf den Krankheitsverlauf auswirkt [Groves et al., 2013].

Ein in klinischer Hinsicht vielversprechender S1P-Rezeptormodulator ist das neue MS-Therapeutikum Fingolimod (FTY-720), das bereits im Abschnitt 1.1.4 eingehend beschrieben wurde. Seine Wirksamkeit wird primär auf die Modifikation des Immunsystems zurückgeführt. Ferner existieren Hinweise, dass Fingolimod direkte neuroprotektive Effekte auf die Zellen des ZNS ausübt (Abschnitt 1.3).

1.3 Fingolimod (FTY-720)

Das synthetisch hergestellte Fingolimod (Handelsname Gilenya®) leitet sich von dem natürlich vorkommenden Wirkstoff Myriocin aus dem Pilz *Isaria sinclairii* ab. Seit März 2011 ist es in der Europäischen Union für die verlaufsmodifizierende Therapie der hochaktiven, schubförmigen MS zugelassen (siehe Abschnitt 1.1.4). Fingolimod wird in vivo durch die Sphingosinkinase 2 (SphK2) zu FTY-P phosphoryliert und bindet in dieser Form hochaffin an S1P₁, S1P₄ und S1P₅, zeigt jedoch keine Wirkung an S1P₂ und ist ein partieller Agonist an S1P₃ [Brinkmann et al., 2010].

Der Wirkmechanismus von Fingolimod ist bei der MS bisher nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass immunmodulatorische Effekte eine wichtige Rolle spielen. Dabei hemmt Fingolimod die Migration von Lymphozyten aus den sekundären Lymphorganen (Lymphknoten) in die Blutzirkulation und es kommt konsekutiv zu einer Sequestrierung von T- und B-Zellen in den lymphoiden Organen. Sie können folglich ihren immunologischen Effektorfunktionen nicht mehr nachkommen. Die FREEDOMS Studie hat gezeigt, dass unter der täglichen Einnahme von Fingolimod sich die Anzahl der in der Blutzirkulation befindlichen Lymphozyten dosisabhängig um 73% (0,5mg) bzw. 76% (1,25mg) verringert [Kappos et al., 2010]. Fingolimod wirkt dabei in unterschiedlichem Maße auf die Lymphozytensubpopulationen. T-Lymphozyten werden effektiver aus der Blutzirkulation entfernt als B-Lymphozyten. Unter Ersteren sind besonders diejenigen betroffen, die den Chemokinrezeptor CCR7 und das Zelladhäsionsmolekül CD62L exprimieren [Mehling et al., 2008]. Dies sind vor allem naive und Gedächtnis-T-Zellen, die gewöhnlich zwischen der peripheren Blutbahn und den Lymphknoten zirkulieren. In der Population der Gedächtnis-T-Zellen befinden sich auch die entzündungsfördernden T_H17-Zellen, die bei der Immunpathogenese der MS womöglich eine wesentliche Rolle spielen [Mehling et al., 2011, Tzartos et al., 2008]. Die Wirksamkeit von Fingolimod kann somit über die Senkung der Anzahl autoreaktiver, entzündungsfördernder Lymphozytenpopulationen im Blut erklärt werden, die bei Infiltration in das ZNS potentiell schädigend wirken könnten. Auf diese Weise entfaltet Fingolimod durch Modulation des Immunsystems einen indirekt neuroprotektiven Effekt [Brinkmann, 2009, Cohen et al., 2011, Matloubian et al., 2004, Willis et al., 2013].

Demgegenüber gibt es Beobachtungen, die darauf hindeuten, dass Fingolimod auch einen direkten Einfluss auf die Zellen des ZNS ausübt [Dev et al., 2008]. Aufgrund seiner lipophilen Beschaffenheit kann Fingolimod ungehindert die Blut-Hirn-Schranke passieren und reichert

sich im ZNS-Gewebe an [Foster et al., 2007]. Zudem wird Fingolimod im ZNS effektiv zu FTY-P phosphoryliert und steht damit als Ligand an den S1P-Rezeptoren zur Verfügung. Damit sind wichtige Voraussetzungen für die zentralnervöse Wirkung von Fingolimod gegeben.

In vitro stimuliert Fingolimod die Myelinproduktion nach Demyelinisierung, wirkt, wie bereits für S1P beschrieben, zytoprotektiv auf Oligodendrozyten und fördert deren Reifung bzw. Entwicklung [Coelho et al., 2007, Miron et al., 2008]. In einem Tiermodell der MS, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), konnte gezeigt werden, dass Fingolimod bei direkter Applikation in das innere Liquorsystem die neurologischen Funktionseinschränkungen abmildern konnte. Histologisch korrelierte die Besserung der Symptomatik mit einer Reduktion der Demyelinisierung und des axonalen Schadens. Eine als Ursache in Frage kommende Lymphopenie konnte ausgeschlossen werden [Cohen et al., 2011]. Bei MS-Patienten beobachtet man im Verlauf der Erkrankung eine auf neurodegenerative Prozesse zurückzuführende Volumenabnahme der grauen und weißen Substanz des Gehirns. Eine Quantifizierung kann zuverlässig durch bildgebende Verfahren, wie beispielsweise die Kernspintomographie, erfolgen [Barkhof et al., 2009, Zivadinov et al., 2008]. Unter der Therapie mit Fingolimod konnte in den beiden klinischen Phase-III-Studien (FREEDOMS, TRANSFORMS) festgestellt werden, dass die mit der MS in der Regel einhergehende Atrophie der Hirnsubstanz deutlich reduziert werden konnte. Bei der immunmodulatorischen Therapie mit dem Antikörper Natalizumab (siehe Abschnitt 1.1.4) konnte dies nicht nachgewiesen werden, so dass auch dieser Befund einen direkten neuroprotektiven Effekt von Fingolimod nahe legt [Cohen et al., 2010, Kappos et al., 2010, Miller et al., 2007, Radue et al., 2012].

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Offenbar werden durch Fingolimod (FTY-720) und das physiologisch vorkommende Sphingosin-1-phosphat (S1P) direkt neuroprotektive Effekte vermittelt. Welche Faktoren hierbei im Einzelnen beteiligt sein könnten ist bis dato nur unzureichend geklärt. Es ist bekannt, dass Astrozyten unter pathologischen Bedingungen Substanzen sezernieren, die sowohl das Überleben und die Regeneration von Nervenzellen fördern, als auch die Differenzierung von Oligodendrozyten stimulieren und bei Schädigung der Nervenzellscheide die Remyelinisierung begünstigen [Barnett et al., 2012, Farina et al., 2007, Wang et al., 2014, Williams et al., 2007]. Dies führt schließlich zu der Frage, ob bei der Stimulation von Astrozyten mit den S1P-Rezeptorliganden Fingolimod oder S1P, womöglich neurotrophe bzw. neuroprotektive Faktoren exprimiert werden, die im Kontext der MS oder anderer Erkrankungen des ZNS regenerative Prozesse fördern könnten.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Effekte des MS-Therapeutikums Fingolimod und Sphingosin-1-phosphat auf primäre, humane Astrozyten genauer zu untersuchen und kennenzulernen, um schließlich in einem Microarray-basierten Ansatz die Frage beantworten zu können, ob bei Stimulation von humanen Astrozyten mit den beiden genannten S1P-Rezeptorliganden signifikant Faktoren mit neurotrophen/-protektiven Eigenschaften exprimiert werden.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden anhand von Modellzelllinien (immortalisierte Astrozytomzellen und Fibroblasten des Menschen) die entsprechenden Kulturbedingungen für Stimulationsexperimente mit FTY-P (metabolisch aktive Form von Fingolimod/FTY) und S1P optimiert. Schließlich konnten primäre humane Astrozyten für eine genomweite Microarray-Analyse präpariert werden, um unter der Stimulation mit S1P und FTY-P aussagekräftige Regulationsprozesse vor dem Hintergrund der Neuroregeneration bzw. Neuroprotektion zu identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Zellart	Bezeichnung	Bezugsquelle / Referenz
Humane Astrozytom-Zelllinie (Glioblastom, WHO °IV)	U-373 MG	Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried (Prof. Dr. Axel Ullrich)
Humane Vorhaut-Fibroblasten (<i>human foreskin fibroblasts</i>)	HFF	Institut für Virologie der Universität Erlangen (Dr. Klaus Korn)
Humane Astrozyten	-	Aloisi, J. Neurosci. Res. 1992

2.1.2 Medien und Lösungen für Zellkultur

Name	Hersteller
DMEM - <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	Gibco ® / Life Technologies
FBS (<i>fetal bovine serum</i>) superior	Biochrom AG
Panserin 401	PAN Biotech GmbH
Penicillin-Streptomycin	Gibco ® / Life Technologies
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS), pH 7.4	Gibco ® / Life Technologies
RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)	Gibco ® / Life Technologies
Trypsin-EDTA-Lösung	PAA Laboratories GmbH

2.1.3 Material für RNA-Isolierung und Reverse Transkription

Name	Hersteller
RNeasy® Mini Kit (50)	QIAGEN GmbH
QIAshredder™ (250)	QIAGEN GmbH
RNase-Free DNase Set (50)	QIAGEN GmbH
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems / Life Technologies

2.1.4 Material für TaqMan-PCR

Name	Hersteller
TaqMan® PCR Core Reagents Kit	Applied Biosystems / Life Technologies
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems / Life Technologies
ABI PRISM™ Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems / Life Technologies

Primer und Sonden der Referenz- und Zielgene / TaqMan® Gene Expression Assay:

Gen-Symbol	Gen-Name	Assay-ID	Referenzsequenz
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>	Hs00170014_m1	NM_001901.2
EGR1	<i>early growth response protein 1</i>	Hs00152928_m1	NM_001964.2
FGF2	<i>fibroblast growth factor 2</i>	Hs00266645_m1	NM_002006.4
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	4352934E	NM_002046.3
HB-EGF	<i>heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor</i>	Hs00961131_m1	NM_001945.2
IL11	Interleukin 11	Hs00174148_m1	NM_000641.2
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>	Hs00171455_m1	NM_002309.4
PPIA	Peptidylprolyl-Isomerase A (Cyclophilin A)	4326316E	NM_021130.3
S1PR1	Sphingosin-1-phosphat-Rezeptor 1	Hs00173499_m1	NM_001400.3
S1PR2	Sphingosin-1-phosphat-Rezeptor 2	Hs01003373_m1	NM_004230.3
S1PR3	Sphingosin-1-phosphat-Rezeptor 3	Hs01019574_m1	NM_005226.2
S1PR4	Sphingosin-1-phosphat-Rezeptor 4	Hs02330084_s1	NM_003775.2
S1PR5	Sphingosin-1-phosphat-Rezeptor 5	Hs00924881_m1	NM_030760.3
SGPL1	Sphingosine-1-phosphat-Lyase 1	Hs00900722_m1	NM_003901.3
SGPP1	Sphingosine-1-phosphat-Phosphatase 1	Hs00229266_m1	NM_030791.2
SGPP2	Sphingosine-1-phosphat-Phosphatase 2	Hs00544786_m1	NM_152386.2
SPHK1	Sphingosine-1-phosphat-Kinase 1	Hs00184211_m1	NM_182965.3
SPHK2	Sphingosine-1-phosphat-Kinase 2	Hs00219999_m1	NM_020126.4
SRF	Serum-Response-Faktor	Hs00182371_m1	NM_003131.2

alle TaqMan-Primer vom Hersteller Applied Biosystems® / Life Technologies

2.1.5 Weitere Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
Ethanol (98%, ultrarein)	Sigma-Aldrich
Destilliertes Wasser (DNase-, RNase-frei)	Gibco ® / Life Technologies
FTY 720 (Fingolimod)	Biozol Diagnostica
FTY 720-Phosphat (FTY-P)	Echelon Biosciences
Sphingosin (S)	Cayman Chemical
Sphingosin-1-Phosphat (S1P)	Cayman Chemical
Dihydro-Sphingosin-1-Phosphat (DHS1P)	Cayman Chemical
β -Mercaptoethanol (β -ME)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Methanol	Sigma-Aldrich
Interferon- γ (IFN- γ)	Roche Applied Science
Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)	R&D Systems
Interleukin-1 β	R&D Systems
Interferon- β 1b (Betaferon®)	Bayer Pharma
TGF- β (Transformierender Wachstumsfaktor- β)	R&D Systems

2.1.6 Weitere Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Combitips plus (Multipipetten-Aufsatz)	Eppendorf AG
Einmalhandschuhe (Semper Guard)	Semperit Technische Produkte
Kryoröhrchen (1,8ml)	Nunc / Thermo Fisher Scientific
RNeasy spin column	QIAGEN GmbH
Save-Lock-Tubes (PCR-rein)	Eppendorf AG
Sterile, RNase-freie Pipettenspitzen	Nerbe Plus GmbH
Steritop Filtereinheit	Merck Millipore
Zellkultur Multiwell-Platten	Becton Dickinson GmbH (BD)
Zellkulturflaschen 75cm ² (T75)	Nunc / Thermo Fisher Scientific
Zellkulturpipetten (Corning Costar Stripette)	Sigma-Aldrich
Zentrifugenröhrchen (Falcon-Typ)	Becton Dickinson GmbH (BD)

2.1.7 Geräte

Name	Hersteller
7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems® / Life Technologies
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies
Eppendorf Mastercycler gradient	Eppendorf AG
Eppendorf Mikrozentrifuge 5417C	Eppendorf AG
Hood, Safe 2020	Thermo Fisher Scientific
Inkubatoren (Heraeus)	Thermo Fisher Scientific
Kühlschrank 4°C (Liebherr Comfort)	Liebherr-International AG
Kühlschrank -20°C (Liebherr Premium)	Liebherr-International AG
Kühlschrank -80°C (Hera freeze)	Thermo Fisher Scientific
Magnetrührer (RCT basic)	IKA®-Werke GmbH & CO. KG
Mehrkanalpipette (Eppendorf Research)	Eppendorf AG
Multipipette (Xstream)	Eppendorf AG
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Pipette-Boy	INTEGRA Biosciences GmbH
Pipetten (Eppendorf Research)	Eppendorf AG
Präzisionswaage	Kern & Sohn GmbH
Tischzentrifuge	Carl Roth GmbH
VICTOR ² 1420 Multilabel Counter	Perkin Elmer Life Sciences
Vortex Mixer (MS2 Minishaker)	IKA®-Werke GmbH & CO. KG
Zellkulturmikroskop (Wilovert)	Helmut Hund GmbH
Zellkulturzentrifuge, Heraeus® Multifuge 3 S-R	Thermo Fisher Scientific
Zellzähler	VWR International GmbH

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturbedingungen

Die verschiedenen Zelllinien waren zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff bei -196°C eingefroren. Für die Kultivierung der Zellen wurden die entsprechenden Kryoröhrchen aus dem Flüssigstickstofftank entnommen und in einem Warmwasserbad bei 37°C kurz angetaut. Es erfolgte die Übernahme und Suspension der Zellen in ein mit kaltem Kulturmedium gefülltes Zentrifugenröhrchen, anschließend Zentrifugation für 10 Minuten bei 400g. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert, die Zellen in eine Kulturflasche überführt und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt, um tote Zellen und Debris zu entfernen.

Die Kultivierung der Astrozytomzelllinie U373 MG erfolgte in DMEM unter einer Atmosphäre mit 10 % CO_2 bei 37°C . Die HFF-Zellen und die humanen Astrozyten wurden in RPMI kultiviert, wobei die Atmosphäre entsprechend mit 5% CO_2 angereichert war. Die Kulturmedien enthielten jeweils 10% fetales Kälberserum (engl. *fetal bovine serum*, FBS) und einen Antibiotikazusatz aus Penicillin und Streptomycin, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Zellen wuchsen unter den genannten Bedingungen adhärent in Kulturflaschen aus Plastik mit einer Grundfläche von 75cm^2 .

Vor den einzelnen Stimulationsversuchen wurden die Zellen für einen Tag unter serumfreien Bedingungen in Panserin 401 kultiviert. Damit sollte einer unerwünschten Einflussnahme des lipidhaltigen Serums auf die Stimulationsexperimente vorgebeugt werden.

2.2.2 Splitten adhärenter Zellen

Zu Beginn des Verfahrens wurde das Medium aus den Kulturflaschen vollständig entfernt und die subkonfluenten Zellen mit steriler, Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Zum Ablösen der adhärent wachsenden Zellen vom Boden der Zellkulturflasche erfolgte die Zugabe von 5-7ml Trypsin-EDTA-Lösung und Inkubation für ca. drei Minuten bei 37°C . Der Trypsinierungsprozess wurde mechanisch durch leichtes, seitliches Beklopfen der Kulturflasche unterstützt und mikroskopisch engmaschig kontrolliert. Zu den sich

schließlich in Lösung befindlichen Zellen wurde dann ca. 14ml Kulturmedium mit FBS (doppelte Menge der Trypsin-EDTA-Lösung) hinzugegeben, um Trypsin durch das im Serum enthaltene α 1-Antitrypsin zu inaktivieren. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein Plastikröhrchen vom Falcon-Typ überführt und bei 4°C und 400g für 10min zentrifugiert. Zum Abschluss erfolgte die Resuspension des abzentrifugierten Zellpellets in frischem Medium und Überführung in eine neue Kulturflasche.

2.2.3 Isolierung von Gesamt-RNA

Mit dem RNeasy® Mini Kit von QIAGEN wurde die Gesamt-RNA aus Astrozytomzellen (U373 MG), humanen Fibroblasten (HFF) und humanen Astrozyten unter Anwendung des Protokolls aus dem RNeasy® Mini Handbuch (*Fourth Edition*, April 2006) isoliert. Nach Aspiration des Mediums wurden die adhärennten Zellen zunächst mit PBS gewaschen und im Anschluss durch die Zugabe von RLT-Puffer (enthält Protein-denaturierendes Guanidiniumthiocyanat) lysiert. Bei diesem Prozess werden u. a. die RNasen effektiv inaktiviert und damit die Aufreinigung intakter RNA sichergestellt. Das Lysat wurde dann zum Homogenisieren (Entfernung nicht löslicher Komponenten und Reduzierung der Lysatviskosität) auf eine QIAshredder Spinsäule pipettiert und abzentrifugiert. Um die RNA zu präzipitieren und damit die Bindungseigenschaften an die Kieselmembran der Spinsäule zu optimieren, wurde das homogenisierte Lysat mit 70%igem Ethanol versetzt. Anschließend wurde die Probe auf eine RNeasy® Spinsäule pipettiert und zentrifugiert. Bei diesem Schritt bindet die Gesamt-RNA an die Kieselmembran, während die übrigen Substanzen die Membran passieren und verworfen werden. Residuelle genomische DNA wurde anhand des optionalen DNase-Verdau (RNase-Free DNase Set, QIAGEN) entsprechend den Vorgaben des Herstellers entfernt. Nach mehrmaligem Waschen wurde die Gesamt-RNA schließlich in RNase-freiem Wasser eluiert und der photometrischen Konzentrations- und Reinheitsbestimmung zugeführt.

2.2.4 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA

Zur photometrischen Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit wurde von der eluierten Gesamt-RNA 1µl abgenommen und mit dem NanoDrop 1000 Spectrophotometer vermessen. Bei diesem Verfahren kann über die Absorption der RNA-Probe bei einer

Wellenlänge von 260nm (A_{260}) deren Konzentration rechnerisch bestimmt werden. Unter Berücksichtigung der Schichtdicke der durchstrahlten Probe (b) und Zuhilfenahme des spezifischen Extinktionskoeffizienten für RNA ($e = 40\text{ng} \cdot \text{cm/ml}$) ergibt sich folgende Formel zur Berechnung der RNA-Konzentration (c):

$$(1) \quad c = (A_{260} \cdot e) / b$$

Um eine eventuelle Kontamination der RNA-Probe durch Lösungsmittel, Proteine oder andere Substanzen rechtzeitig zu erkennen, wurde das Absorptionsspektrum in dem für die RNA-Reinheit relevanten Wellenlängenbereich (220nm-350nm) für jede einzelne Probe bestimmt und ergänzend der Absorptionsquotient A_{260}/A_{280} berechnet. Bei Messungen von RNA-Proben sollte das Verhältnis A_{260}/A_{280} über 2,0 liegen. Ein niedrigerer Wert deutet auf eine mögliche Verunreinigung hin. Proben mit dem Hinweis auf Verunreinigung wurden von weiteren Experimenten ausgeschlossen.

2.2.5 Synthese komplementärer DNA (cDNA)

Die Synthese der cDNA aus RNA mittels reverser Transkription erfolgte mit Hilfe des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits von Applied Biosystems unter Anwendung des Herstellerprotokolls.

Nach Präparation des Mastermix (10 μ l) auf Eis (Pipettierschema in **Tabelle 1**) wurde dieser mit der Gesamt-RNA einer Probe (10 μ l) durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren versetzt (Gesamtvolumen der Reaktion 20 μ l) und bei 4°C zentrifugiert.

Tabelle 1: Pipettierschema für den Mastermix der reversen Transkription (Einfachansatz)

Reagenzien	Volumen [μ l]
10-fach Reaktionspuffer	2
25-fach dNTP Mix (100mM)	0,8
10-fach Random Primer	2
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	1
RNase-Inhibitor	1
Nuklease-freies Wasser	3,2

Die Proben wurden anschließend im Thermocycler bei den in **Tabelle 2** angegebenen Temperaturintervallen in cDNA umgeschrieben.

Tabelle 2: Programmierung des Thermocyclers (optimiert für das Reverse Transcription Kit)

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur (°C)	25	37	85	4
Zeit	10 min	120 min	5 sek	∞

Die neu synthetisierte cDNA wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 1-3ng/μl verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.2.6 Quantitative Echtzeit-PCR (*Real-Time-quantitative-PCR*)

Die Bestimmung der Genexpression erfolgte anhand der quantitativen Echtzeit-PCR (im Folgenden *Real-Time* PCR). Basierend auf dem Prinzip der konventionellen PCR, findet neben der Primer-definierten Amplifikation zusätzlich eine Fluoreszenzfarbstoff-abhängige Detektion der Zielsequenz statt und erlaubt auf diese Weise unter Anwendung entsprechender Rechenmodelle eine Quantifizierung des Genprodukts. Für die Markierung der Zielsequenz mit einem Fluoreszenzfarbstoff stehen verschiedene Sonden zur Verfügung. Bei der vorliegenden Arbeit kamen sogenannte TaqMan-Sonden zur Anwendung, deren Aufbau und Funktionsprinzip im Folgenden erläutert werden soll.

Die fluorogenen TaqMan-Sonden bestehen aus einem Oligonukleotid, dessen 5'-Ende mit einem Reporter-Farbstoff (FAM) markiert ist und das 3'-Ende einen nicht-fluoreszenten Quencher-Farbstoff (*non-fluorescent quencher*, NFQ) trägt. Damit Anlagerung und Elongation durch die Polymerase an dieser Stelle vermieden werden, ist das 3'-Ende der Sonde zusätzlich mit einem blockierenden Phosphatrest besetzt. Wird der Reporter-Farbstoff mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, so sendet dieser ein Fluoreszenzsignal in Form elektromagnetischer Energie aus. Bei intakter Sonde wird das Fluoreszenzsignal jedoch vom Quencher-Farbstoff aufgrund seiner räumlichen Nähe zum Reporter (<10nm) unterdrückt. Dieses Phänomen wird als Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) bezeichnet, bei dem die elektromagnetische Energie des angeregten Reporter-Farbstoffs auf den Quencher-Farbstoff strahlungsfrei übertragen wird. Entfernen sich Reporter und

Quencher räumlich voneinander, so bricht der Energietransfer ab und der Reporter-Farbstoff kann nun das Fluoreszenzsignal ungehindert emittieren.

Zu Beginn der PCR-Reaktion wird der cDNA-Doppelstrang bei einer Temperatur von 95°C aufgeschmolzen (Denaturierung). Die Temperatur wird dann auf 60°C abgesenkt, damit Primer und TaqMan-Sonde an die Zielsequenz des Matrizenstrangs binden können (Hybridisierung / *annealing*). Die thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) lagert sich an den Primer an und beginnt mit der Amplifikation (Elongation) des Primer-determinierten Gens, indem sie beginnend am 3'-Ende des Primers die zum Matrizenstrang komplementären Basen anfügt. Trifft die DNA-Polymerase nun im Verlauf der Amplifikationsphase auf die ebenfalls an den Matrizenstrang gebundene TaqMan-Sonde, so wird Letztere durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase abgebaut und vom Matrizenstrang verdrängt. Die räumliche Nähe von Reporter- und Quencher-Farbstoff wird dadurch aufgehoben und es kann folglich ein Fluoreszenzsignal detektiert werden. Da die Taq-Polymerase ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität lediglich am DNA-Doppelstrang entfalten kann, werden ungebundene TaqMan-Sonden nicht gespalten, der FRET bleibt somit bei intakten, ungebundenen Sonden erhalten. Es lässt sich hieraus ableiten, dass mit der Akkumulation eines bestimmten PCR-Produkts auch in konstanter Korrelation das dazugehörige Fluoreszenzsignal des Reporter-Farbstoffs zunimmt. Ist ein PCR-Lauf beendet, kann mit Hilfe der erhaltenen Fluoreszenzsignale schließlich eine Quantifizierung der Expression eines Zielgens vorgenommen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Prinzip der relativen Quantifizierung angewendet. Bei diesem Rechenmodell wird die PCR-Produktmenge eines Zielgens mit der eines Referenzgens (endogene Amplifikationskontrolle) ins Verhältnis gesetzt und somit die Expression des Zielgens semiquantitativ beschrieben. Als endogene Amplifikationskontrolle eignen sich sogenannte Haushaltsgene (engl. *housekeeping genes*), die im Idealfall unbeeinflusst von äußeren Faktoren konstitutiv exprimiert werden. Als Haushaltsgene dienten bei dieser Arbeit Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Cyclophilin.

Um mit Hilfe des Fluoreszenzsignals ein Verhältnis zwischen den PCR-Produktmengen von Ziel- und Referenzgen herstellen zu können, wurden zunächst anhand der Gerätesoftware SDS Plate Utility 2.3 die jeweiligen C_T -Werte der PCR-Produkte bestimmt. Der C_T -Wert (engl. *cycle threshold*) ist diejenige PCR-Zykluszahl, bei der das Fluoreszenzsignal eines bestimmten PCR-Produkts zum ersten Mal aus dem Grundrauschen (engl. *background*)

signifikant hervortritt und beschreibt somit den Beginn der exponentiellen Phase der Amplifikation, in der die für die Quantifizierung optimalen Reaktionsbedingungen herrschen. Je größer zu Beginn der *Real-Time* PCR die Ausgangsmenge eines bestimmten Genprodukts ist, desto mehr Kopien entstehen auch während der Amplifikationszyklen. Dementsprechend steigt auch das sequenzspezifische Fluoreszenzsignal schneller an und übersteigt den Schwellenwert schon bei niedrigeren Zykluszahlen im Vergleich zu einem Genprodukt geringerer Ausgangsmenge. Der C_T -Wert verhält sich also reziprok proportional zur Ausgangsmenge eines Genprodukts. Die quantitative Auswertung beruht auf der Tatsache, dass in der exponentiellen Phase der PCR unter Berücksichtigung der Effizienz eine konstante Verdopplung der PCR-Produkte aus dem vorangegangenen Zyklus stattfindet. Mathematisch lässt sich dieser Zusammenhang anhand folgender Formel beschreiben:

$$(2) \quad N = N_0 \cdot (1+E)^n$$

N ist hierbei die Menge an synthetisiertem Amplifikat (PCR-Produkt), N_0 die Startkopienzahl eines Gens zu Beginn der PCR, E steht für die Effizienz der Reaktion und n für die Anzahl der abgelaufenen PCR-Zyklen. Unter der Annahme einer 100%igen Effizienz ($E=1$) lässt sich Formel 2 nun folgendermaßen vereinfachen:

$$(3) \quad N = N_0 \cdot 2^n$$

Setzt man für die Zykluszahl n , den anhand des Fluoreszenzsignals sich ergebenden C_T -Wert eines bestimmten Gens ein, so lautet Formel 3 nun:

$$(4) \quad N = N_0 \cdot 2^{C_T}$$

Dieser mathematische Zusammenhang kann sowohl für das Zielgen (C_T -Wert_{Zielgen}), als auch für das Referenzgen (C_T -Wert_{Referenzgen}) zugrunde gelegt werden. Das semiquantitative Verhältnis der beiden Gene lässt sich nun folgendermaßen beschreiben:

$$(5) \quad \text{Zielgen/Referenzgen} = 2^{\Delta C_T}$$

Wird beispielsweise angenommen, dass das Fluoreszenzsignal des Zielgens während des PCR-Laufs den Schwellenwert (C_T) zwei Zyklen später als das Referenzgen erreicht, so ergibt

dies einen ΔC_T -Wert von -2 ($\Delta C_T = C_T\text{-Wert}_{\text{Referenzgen}} - C_T\text{-Wert}_{\text{Zielgen}}$). Wird dieser Wert in Formel 5 eingesetzt, so lässt sich nun das Expressionsverhältnis errechnen: $2^{-2} = \frac{1}{4} = 0,25$. Dies ist gleichbedeutend mit der Aussage, dass das Zielgen im Vergleich zum Referenzgen lediglich ein Viertel so stark exprimiert wird oder anders ausgedrückt, die Expression des Zielgens beträgt im Vergleich zum Referenzgen 25%.

Das Volumen eines einzelnen Reaktionsansatzes der *Real-Time* PCR betrug 25 μ l. Um die Variationsbreite der Messergebnisse zu erfassen und eine adäquate Fehleranalyse durchführen zu können (Standardabweichung), wurde jeder Reaktionsansatz in Duplikaten pipettiert. Als Negativkontrolle wurde anstatt der zu amplifizierenden cDNA lediglich RNase-freies Wasser eingesetzt (*no template control*, NTC). Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in **Tabelle 3** aufgeführt.

Tabelle 3: Pipettierschema einer einzelnen Reaktion der *Real-Time* PCR (Einfachansatz)

Reagenzien	Endkonzentration	Volumen [μ l]
<u>Mastermix</u>		
Reaktionspuffer 10-fach	1-fach	2,5 μ l
MgCl ₂ 25mM	5mM	5,0 μ l
dNTPs 2,5mM	200 μ M	2,0 μ l
RNase-freies Wasser		0,13 μ l
Uracil-N-Glykosylase (UNG)	0,01 IU/ μ l	0,25 μ l
AmpliTaQ Gold Polymerase 5 U/ μ L	0,025 IU/ μ l	0,13 μ l
		Gesamtvolumen Mastermix: 10 μ l
<u>Primermix</u>		
Primer 20-fach	5-fach	1,25 μ l
RNase-freies Wasser		3,75 μ l
		Primermixvolumen: 5 μ l
cDNA-Vorlage (<i>template</i>) <u>oder</u> <i>no template control</i> (NTC)		
cDNA-Template		10 μ l
NTC (RNase-freies Wasser)		10 μ l
		Gesamtvolumen Reaktionsansatz: 25 μ l

Die Amplifikation und Detektion der PCR-Produkte erfolgte mit dem 7900HT Fast Real-Time PCR System von Applied Biosystems. Die Programmierung des integrierten Thermocyclers ist in **Tabelle 4** wiedergegeben. Der eigentlichen PCR wurde ein Verdau mit Uracil-N-Glykosylase (UNG) vorangestellt, um eine erneute Amplifikation von kontaminierenden PCR-Produkten aus vorangegangenen Reaktionen zu vermeiden. Die rekombinante DNA-Polymerase (AmpliTaq Gold) muss zunächst durch einen ebenfalls der PCR vorangestellten Inkubationsschritt bei hoher Temperatur aktiviert werden, was u. a. den Vorteil bietet, dass eine vorzeitige Amplifikation dadurch ausgeschlossen wird.

Tabelle 4: Programmierung des *Real-Time* PCR Thermocyclers

Reaktionsschritt	UNG-Inkubation	AmpliTaq Gold-Aktivierung	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	
	halten	halten	40 Zyklen	
			Denaturierung	Annealing & Extension
Temperatur (°C)	50	95	95	60
Zeit	2min	10min	15sek	1min
Reaktionsvolumen	25µl			

2.2.7 Bestimmung der RNA-Integrität

Die Degradierung von RNA durch Kontamination mit Ribonukleasen (RNasen) ist eine häufige Ursache für Fehlmessungen bei konsekutiven Genexpressionsanalysen. Um sicherzustellen, dass für die Microarray-basierte Expressionsanalyse dieser Arbeit Ausgangsmaterial von einwandfreier Qualität zum Einsatz kam, wurde die RNA-Integrität bzw. -Qualität mit Hilfe eines von der Firma Agilent Technologies entwickelten Systems (RNA 6000 Pico Kit) und dem dazugehörigen Gerät (Agilent 2100 Bioanalyzer) bestimmt. Diese Methode basiert auf der Mikrofluidtechnik, bei der sehr kleine Flüssigkeitsmengen einer RNA-Probe in ein System aus untereinander verbundenen Mikrokanälen eingespritzt und die Probenkomponenten nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch separiert werden. Die RNA-Fragmente werden nachfolgend anhand eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs detektiert. Aus den am Ende eines Messvorgangs gewonnenen Fluoreszenzdaten werden durch die Gerätesoftware Agilent Expert 2100 virtuelle Gelbanden

und Elektropherogramme generiert. **Abbildung 4** zeigt beispielhaft den Datensatz einer RNA-Probe der vorliegenden Arbeit, die für die Microarray-Analyse aus humanen Astrozyten extrahiert wurde.

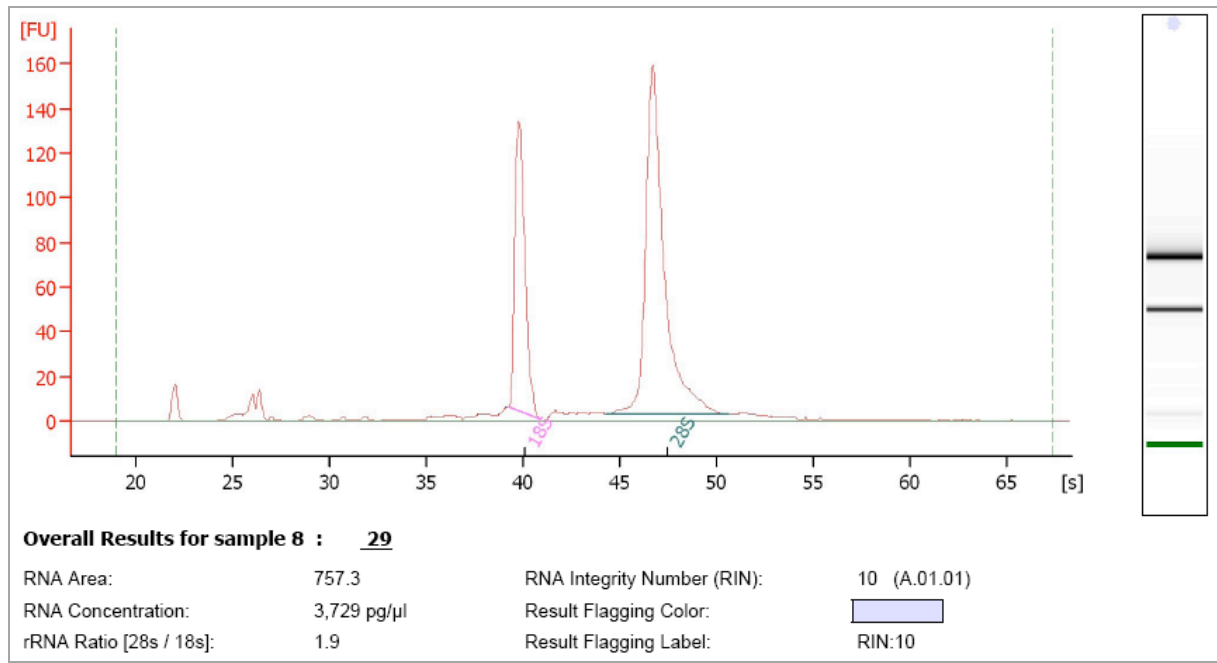


Abbildung 4: Elektropherogramm und virtuelle Gelbande einer RNA-Probe

Zur Evaluierung der RNA-Integrität kann u. a. das Verhältnis der beiden in **Abbildung 4** deutlich erkennbaren Peaks der ribosomalen RNA (28S-, 18S-rRNA) herangezogen werden. Eine intakte Gesamtzell-RNA-Probe sollte ein 28S/18S-rRNA-Verhältnis (Ratio) von etwa 2:1 aufweisen. Einem speziellen Algorithmus folgend errechnet die Gerätesoftware (Agilent Expert 2100) anhand der detektierten Fluoreszenzdaten ein weiteres Maß für die RNA-Integrität, die sogenannte RNA-Integritätsnummer (engl. *RNA integrity number*, RIN). Die RIN kann einen ganzzahligen Wert zwischen 1 (RNA vollständig degradiert) und 10 (RNA intakt) annehmen, wobei die RNA-Integrität umso größer ist, je höher auch die RIN ist. RIN-Werte größer als 8 gelten im Allgemeinen als ideal für konsekutive Genexpressionsanalysen (*Real-Time* PCR, Microarray etc.).

Für die Analyse wurde der Chip (RNA Pico LabChip) nach den Vorgaben des Herstellerprotokolls (Agilent RNA 6000 Pico Kit Guide) mit den entsprechenden Reagenzien

(Gel-Farbstoff-Mix, Konditionierungslösung, RNA 6000 Pico Marker, RNA-Leiter) beladen und in die 12 Proben-Vertiefungen (engl. *wells*) je 1 µl der zu messenden RNA-Lösung pipettiert. Im Anschluss wurde der Chip durch den Agilent 2100 Bioanalytiker ausgelesen und jede einzelne RNA-Probe mit einer RIN bewertet. Für den Microarray der vorliegenden Arbeit wurden RNA-Proben mit einer RIN zwischen 9,8 und 10 eingesetzt.

2.2.8 Expressionsanalyse mittels Microarray

Gen-Chips, sogenannte Microarrays, erlauben eine parallele Analyse fast aller Gene eines zu untersuchenden Organismus. Sie bestehen aus einem Trägermaterial, das mit tausenden genspezifischen Sonden (Oligonukleotide) bedruckt ist. Die Sonden weisen eine zum Untersuchungsmaterial (RNA-Probe) komplementäre Nukleotidsequenz auf und dienen auf diese Weise als spezifische Andockstellen für RNA-Moleküle des entsprechenden Gens. Unmittelbar nach Zugabe der RNA-Probe erfolgt ein Hybridisierungsschritt, in dem zueinander komplementäre Moleküle eine chemische Bindung eingehen. Da die RNA-Probe mit einem Fluoreszenzmarker versehen ist, kann der Microarray mit Hilfe eines Scanners ausgelesen werden. Über das Fluoreszenzmuster wird anhand geeigneter Software ein vordefiniertes Gitter gelegt, das die Zuordnung der einzelnen Fluoreszenzpunkte zu ihren genspezifischen Sonden erlaubt. Je stärker das Fluoreszenzsignal eines Punktes ist, desto größer ist auch die Menge der Transkriptionsprodukte eines bestimmten Gens.

Bei dieser Arbeit kamen für die genomweite mRNA-Expressionsanalyse Human HT 12.0 v3 BeadChips der Firma Illumina zur Anwendung. Bei der BeadArray-Technologie wird eine Siliziumplatte mit mikroskopisch kleinen Siliziumkügelchen (engl. *beads*) bestückt. Die Beads haben einen Durchmesser von lediglich 3 µm und sitzen in einem konstanten Abstand von ~5,7 µm in kleinen Vertiefungen auf der Siliziumplatte. Jeder Bead ist mit tausenden von Kopien eines genspezifischen Oligonukleotids besetzt und dient wie beschrieben als Fänger für die komplementäre Zielsequenz (Transkriptionsprodukt eines Gens).

Als Ausgangsmaterial für die genomweite Expressionsanalyse diente die Gesamt-RNA humaner Astrozyten. Sowohl die Präparation des Microarray, als auch die Messung und statistische Auswertung der Rohdaten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. med. Hans Faber, Dr. rer. nat. Peter Weber und Dr. rer. nat. Benno Pütz (Max-Planck-Institut für Psychiatrie München) realisiert.

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsprofil der S1P-Rezeptoren

Um eine Grundlage für weiterführende Experimente mit den S1P-Rezeptorliganden Sphingosin-1-phosphat und FTY-P zu schaffen, galt es zunächst zu untersuchen, ob überhaupt bzw. in welchem Ausmaß S1P-Rezeptoren in den verwendeten Zelltypen exprimiert werden. Zunächst wurde die Expressionsanalyse mittels *Real-Time* PCR an der immortalisierten Astrozytomzelllinie U373 MG und den humanen Vorhautfibroblasten (*human foreskin fibroblasts*, HFF) etabliert. Für die Astrozytomzelllinie ergab sich ein im Ausmaß absteigendes Expressionsmuster der S1P-Rezeptoren 1, 2 und 3 (S1P1>S1P2>S1P3, **Abbildung 5A**). Die Vorhautfibroblasten zeigten eine etwa gleich starke Expression der S1P-Rezeptoren 1, 2 und 3 (S1P1~S1P2~S1P3, **Abbildung 5B**). In beiden Zelllinien wurden die S1P-Rezeptoren 4 und 5 nur sehr gering bzw. überhaupt nicht exprimiert (unterhalb der Nachweisgrenze für die *Real-Time* PCR).

Schließlich wurde das Expressionsprofil der S1P-Rezeptoren auch in humanen Astrozyten bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass der S1P-Rezeptor 1 am stärksten exprimiert wurde. Der S1P-Rezeptor 3 war etwas schwächer exprimiert, gefolgt vom S1P-Rezeptor 2 (S1P1>S1P2<S1P3, **Abbildung 5C**). Vergleichbar mit den Astrozytomzellen und den Vorhautfibroblasten wiesen die S1P-Rezeptoren 4 und 5 eine vernachlässigbar geringe Expression auf.

Zusammengefasst waren die S1P-Rezeptoren 1-3 auf allen drei soeben vorgestellten Zelltypen gut exprimiert, sodass für weiterführende Stimulationsexperimente mit entsprechenden S1P-Rezeptorliganden eine funktionelle Grundlage existierte.

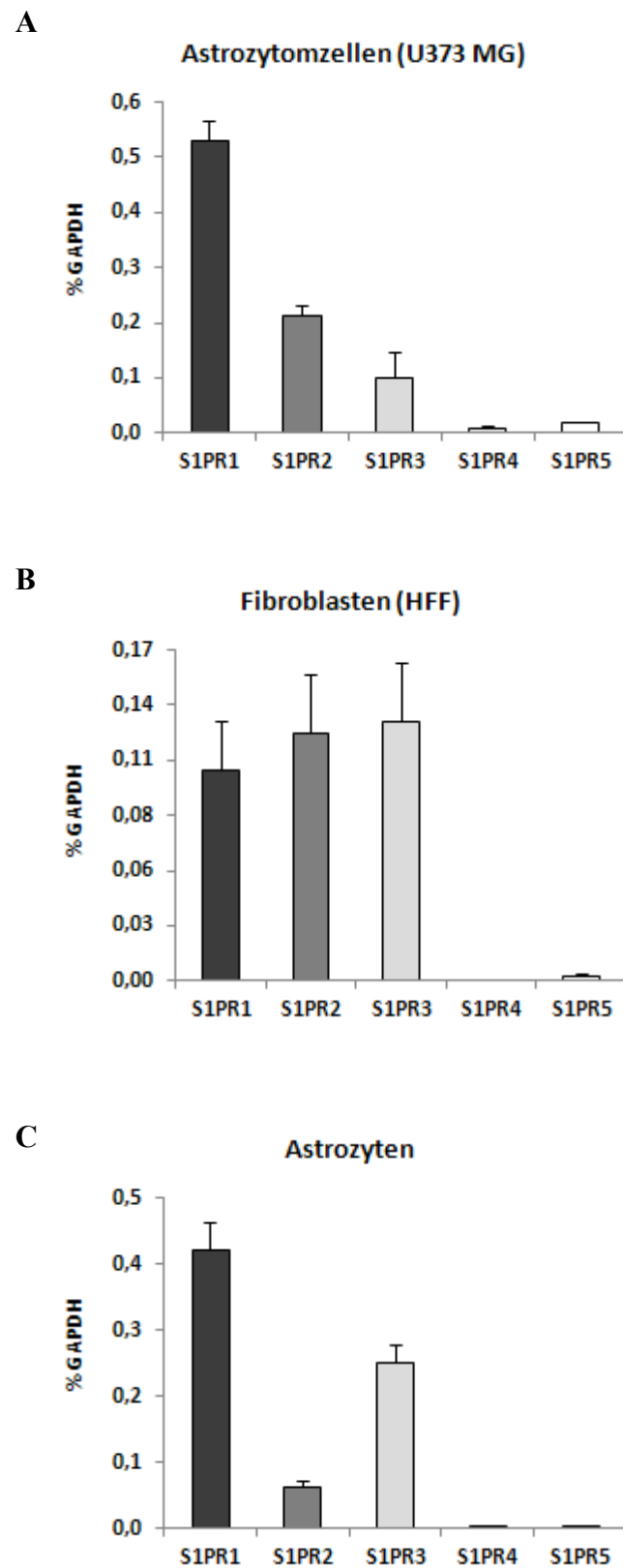


Abbildung 5: In den Säulendiagrammen A-C ist das S1P-Rezeptorexpressionsprofil von Astrozytomzellen (A), Vorhautfibroblasten (B) und Astrozyten (C) dargestellt, allesamt humanen Ursprungs. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der technischen Replikate wieder.

3.2 *Veränderung des S1P-Rezeptorexpressionsprofils unter dem Einfluss von Zytokinen*

Typischerweise werden bei der MS im zentralen Nervensystem Zytokine ausgeschüttet, die sowohl das entzündliche Geschehen fördern (proinflammatorisch) oder auch abmildern (antiinflammatorisch) können. Für die Zelllinien U373 MG, HFF und in humanen Astrozyten wurde untersucht, ob sich das S1P-Rezeptorexpressionsprofil unter dem Einfluss der Zytokine INF- γ , TNF- α , IL-1 β und TGF- β verändert. Auch das zur Immunmodulation in der Therapie der MS eingesetzte Interferon- β 1b (IFN- β 1b) wurde in diesem Zusammenhang berücksichtigt.

Astrozytomzellen (U373 MG) und Fibroblasten (HFF) dienten wie im vorangegangenen Abschnitt (3.1) zur Etablierung der Versuchsbedingungen, bevor humane Astrozyten mit den Zytokinen stimuliert wurden. In **Tabelle 5** sind die eingesetzten Konzentrationen der Zytokine erfasst. Die RNA-Isolation erfolgte jeweils nach 20-stündiger Inkubation der Zellenkultur mit den entsprechenden Zytokinen.

Tabelle 5: Zytokine und deren Konzentrationen

Zytokin	Konzentration	
Interferon- γ (IFN- γ)	100	U/ml
Interferon- β 1b (IFN- β 1b)	1000	IU/ml
Interleukin-1 β (IL-1 β)	50	ng/ml
Transformierender Wachstumsfaktor- β (TGF- β)	10 (1)*	ng/ml
Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)	25 (10)*	ng/ml

IU $\hat{=}$ Internationale Einheit, U $\hat{=}$ Enzymeinheit, * humane Astrozyten

Der Einfluss der Zytokine auf die S1P-Rezeptorexpression von humanen Astrozytomzellen, Fibroblasten und Astrozyten lässt sich nicht verallgemeinern und ergibt in diesem Falle für jeden einzelnen Zelltyp ein individuelles Profil (**Abbildung 6A-C**). Dennoch zeigen sich einige wesentliche Übereinstimmungen, die im Folgenden mit dem Fokus auf die humanen Astrozyten beschrieben werden sollen.

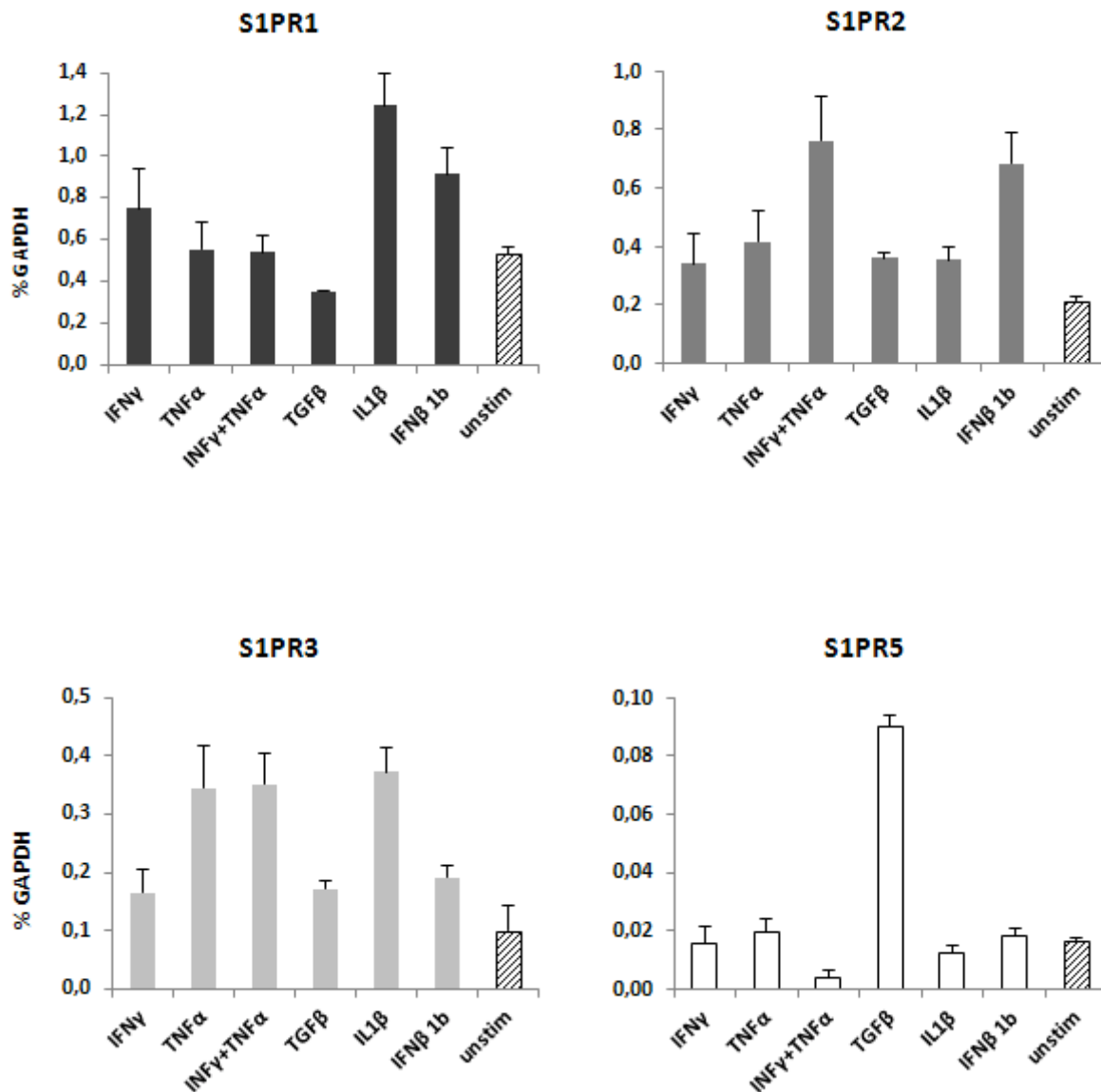


Abbildung 6A: Die Säulendiagramme zeigen die Expression der S1P-Rezeptoren (S1PR1/2/3 und S1PR5) bei Astrozytomzellen (U373 MG) in Abhängigkeit von der vorherigen Inkubation mit verschiedenen Zytokinen. Der S1P-Rezeptor 4 ließ sich in der *Real-Time* PCR nicht suffizient nachweisen. Kontrollen, die dem Einfluss der Zytokine nicht ausgesetzt waren, sind in den Diagrammen mit „unstim“ gekennzeichnet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der technischen Replikate wieder.

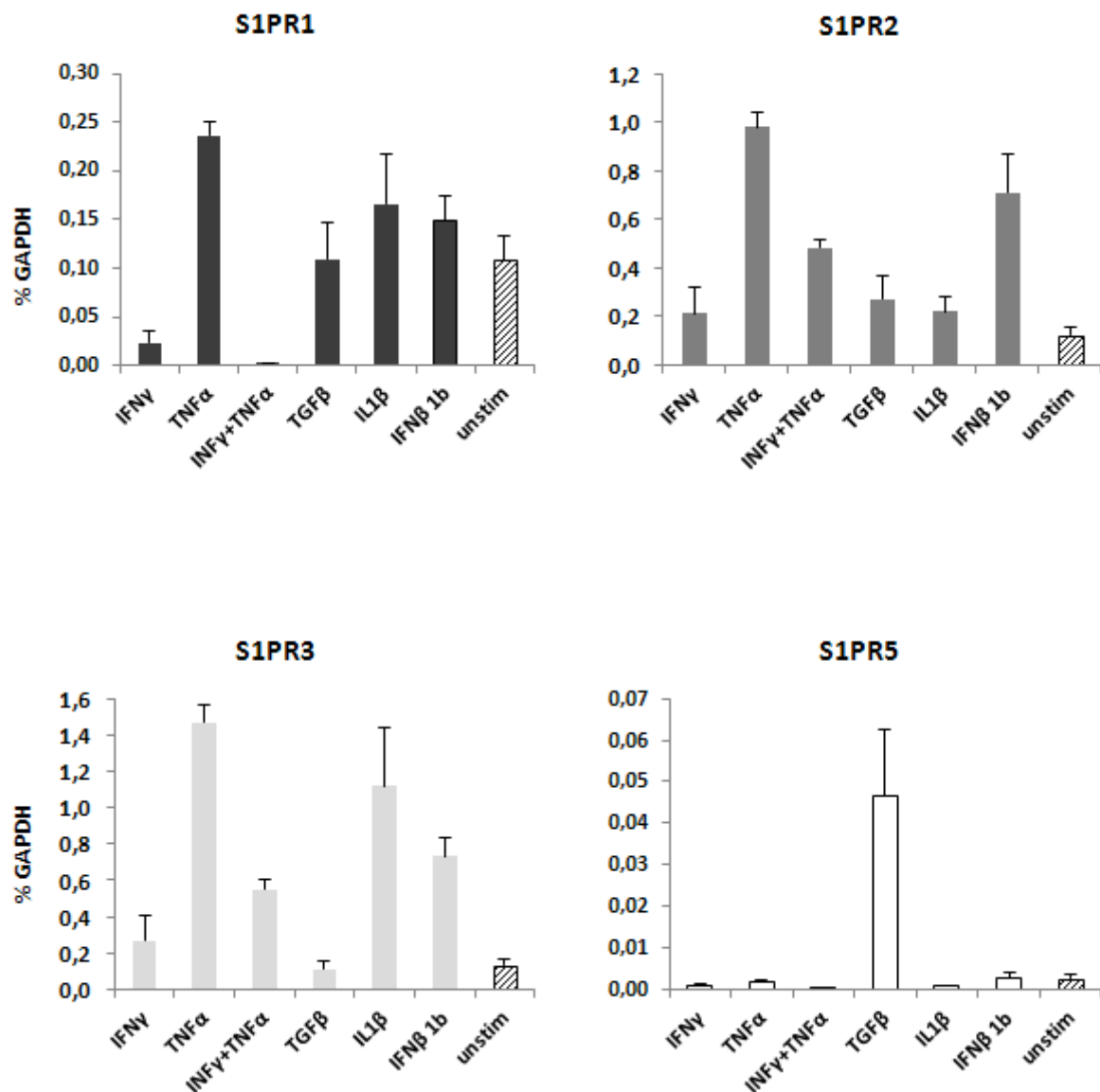


Abbildung 6B: Die Säulendiagramme zeigen die Expression der S1P-Rezeptoren (S1PR1/2/3 und S1PR5) bei humanen Vorhautfibroblasten (HFF) in Abhängigkeit von der vorherigen Inkubation mit verschiedenen Zytokinen. Der S1P-Rezeptor 4 ließ sich in der *Real-Time* PCR nicht suffizient nachweisen. Kontrollen, die dem Einfluss der Zytokine nicht ausgesetzt waren, sind in den Diagrammen mit „unstim“ gekennzeichnet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der technischen Replikate wieder.

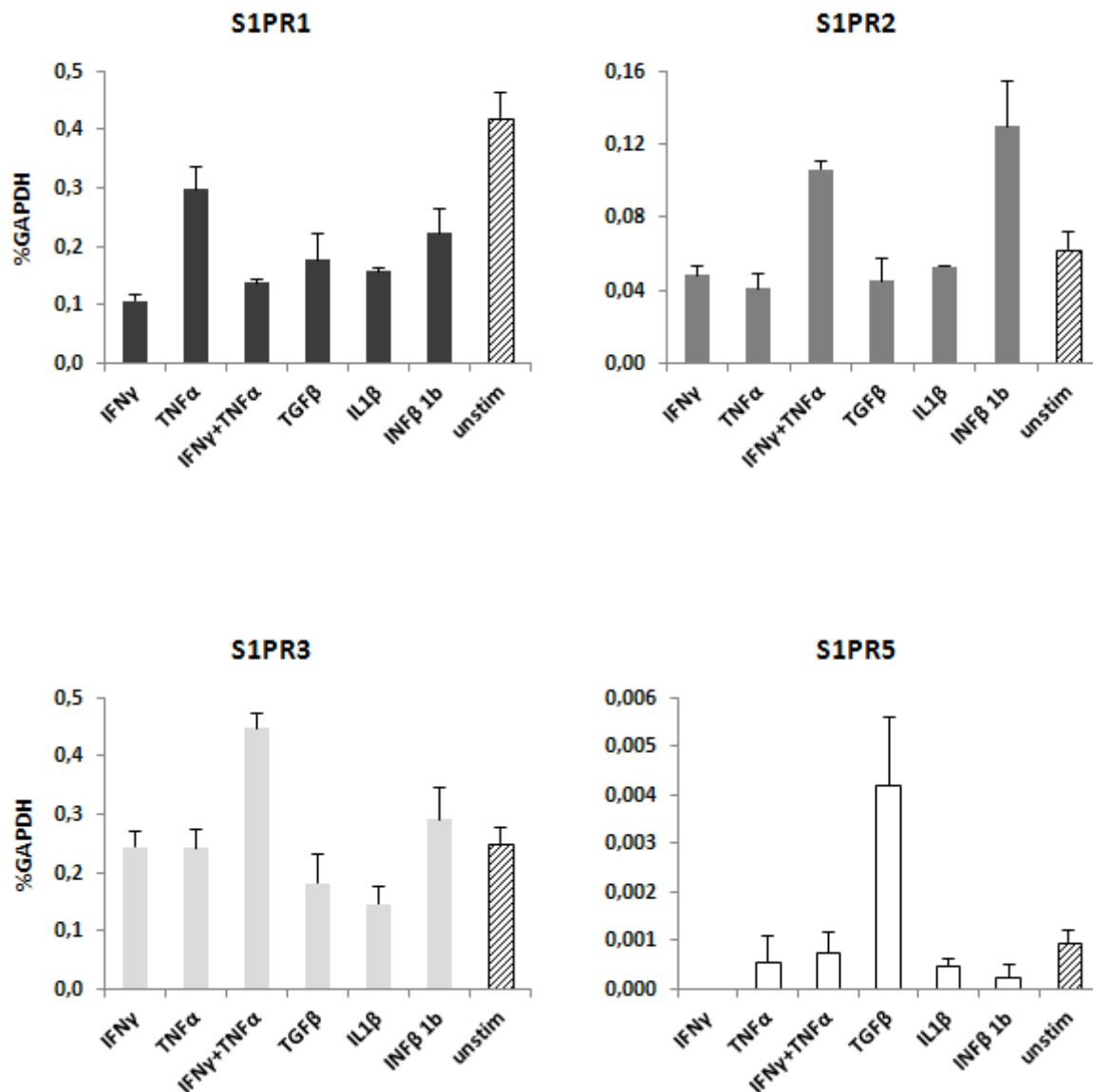


Abbildung 6C: Die Säulendiagramme zeigen die Expression der S1P-Rezeptoren (S1PR1/2/3 und S1PR5) bei humanen Astrozyten in Abhängigkeit von der vorherigen Inkubation mit verschiedenen Zytokinen. Der S1P-Rezeptor 4 ließ sich in der *Real-Time* PCR nicht suffizient nachweisen. Unter der Stimulation mit IFN γ ließ sich zudem der S1PR5 nicht mehr nachweisen. Kontrollen, die dem Einfluss der Zytokine nicht ausgesetzt waren, sind in den Diagrammen mit „unstim“ gekennzeichnet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der technischen Replikate wieder.

Der S1P-Rezeptor 1 (S1PR1) wurde in humanen Astrozyten durch alle applizierten Zytokine herunterreguliert (**Abbildung 6C**). Den deutlichsten Effekt zeigte hierbei Interferon- γ , dass zu einer Reduktion der S1PR1-Expression auf etwa 25% ($\frac{1}{4}$) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle führte. Auch bei den HFF-Zellen resultierte aus der Stimulation mit Interferon- γ und bei dessen Anwendung in Kombination mit TNF- α die Herunterregulation des S1P1-Rezeptors (**Abbildung 6B**).

Der S1P2-Rezeptor wurde in humanen Astrozyten sowohl durch die Zytokinkombination von Interferon- γ und TNF- α , als auch durch Interferon- β 1b bis um das Zweifache heraufreguliert (**Abbildung 6 C**). Dieser Effekt ließ sich auch bei den Fibroblasten und Astrozytomzellen nachweisen und war in diesen Zelllinien sogar noch deutlich stärker ausgeprägt (**Abbildung 6A und 6B**).

Der S1P-Rezeptor 3 wurde in allen drei Zelllinien durch die Kombination von Interferon- γ und TNF- α heraufreguliert, wobei dies bei den humanen Astrozyten in einer Größenordnung von etwa dem 1,8-fachen lag (**Abbildung 6A-C**).

Der S1P-Rezeptor 4 war wie im Abschnitt 3.1 bereits beschrieben nur äußerst gering exprimiert (**Abbildung 5**). Die *Real-Time* PCR ergab in diesem Zusammenhang keine verwertbaren Ergebnisse, folglich wird der S1P4-Rezeptor in den **Abbildungen 6A-C** auch nicht berücksichtigt.

TGF- β , das immunregulatorische Eigenschaften besitzt, führte einheitlich in allen betrachteten Zelltypen zu einer deutlichen Induktion des S1P5-Rezeptors, in humanen Astrozyten um etwa das 4-fache (**Abbildung 6A-C**). Demgegenüber zeigte sich bei Vorinkubation der Astrozyten mit dem MS-Therapeutikum Interferon- β 1b eine Reduktion der Expression des S1P-Rezeptors 5 auf etwa $\frac{1}{4}$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.3 *Veränderung des Expressionsprofils der Sphingosin-Kinasen und S1P-Phosphatasen sowie der Lyase unter dem Einfluss von Zytokinen*

An der Biosynthese sowie dem Abbau von Sphingosin-1-phosphat sind verschiedene Enzyme beteiligt (**Abbildung 2**). Um die Frage zu klären, wie sich das Expressionsprofil dieser Faktoren unter inflammatorischen Bedingungen in Anlehnung an pathologische Zustände ändert, wurde der vorangegangene Versuch (siehe Abschnitt 3.2) in analoger Weise durchgeführt und hierbei die Expression der Sphingosin-Kinasen (SPHK 1/2), der S1P-Phosphatasen (SGPP 1/2), sowie der S1P-Lyase (SPL) nach 20-stündiger Inkubation mit den entsprechenden Zytokinen (**Tabelle 5**) bestimmt. Die Ergebnisse hierzu sind in der **Abbildung 7A** für Astrozytomzellen und in **Abbildung 7B** für Vorhautfibroblasten wiedergegeben.

Bei der Astrozytomzelllinie (U373 MG) und den Vorhautfibroblasten (HFF) zeigt sich generell eine deutliche Induktion der Sphingosin-Kinase 1 (SPHK1). Lediglich die vorherige Inkubation mit $\text{INF}\gamma$ ergibt in beiden Zelllinien keinen wesentlichen Effekt auf die Expression der SPHK1. Die Sphingosin-Kinase 2 (SPHK2) wird kaum reguliert, die Expression bleibt weitgehend stabil. Die am Abbau von S1P beteiligten Phosphatasen sowie die Lyase werden im Unterschied zu den biosynthetischen Kinasen tendenziell herunterreguliert. Die S1P-Phosphatase 2 ließ sich in HFF-Zellen mittels *Real-Time* PCR nicht nachweisen und ist dementsprechend in **Abbildung 7B** nicht aufgeführt.

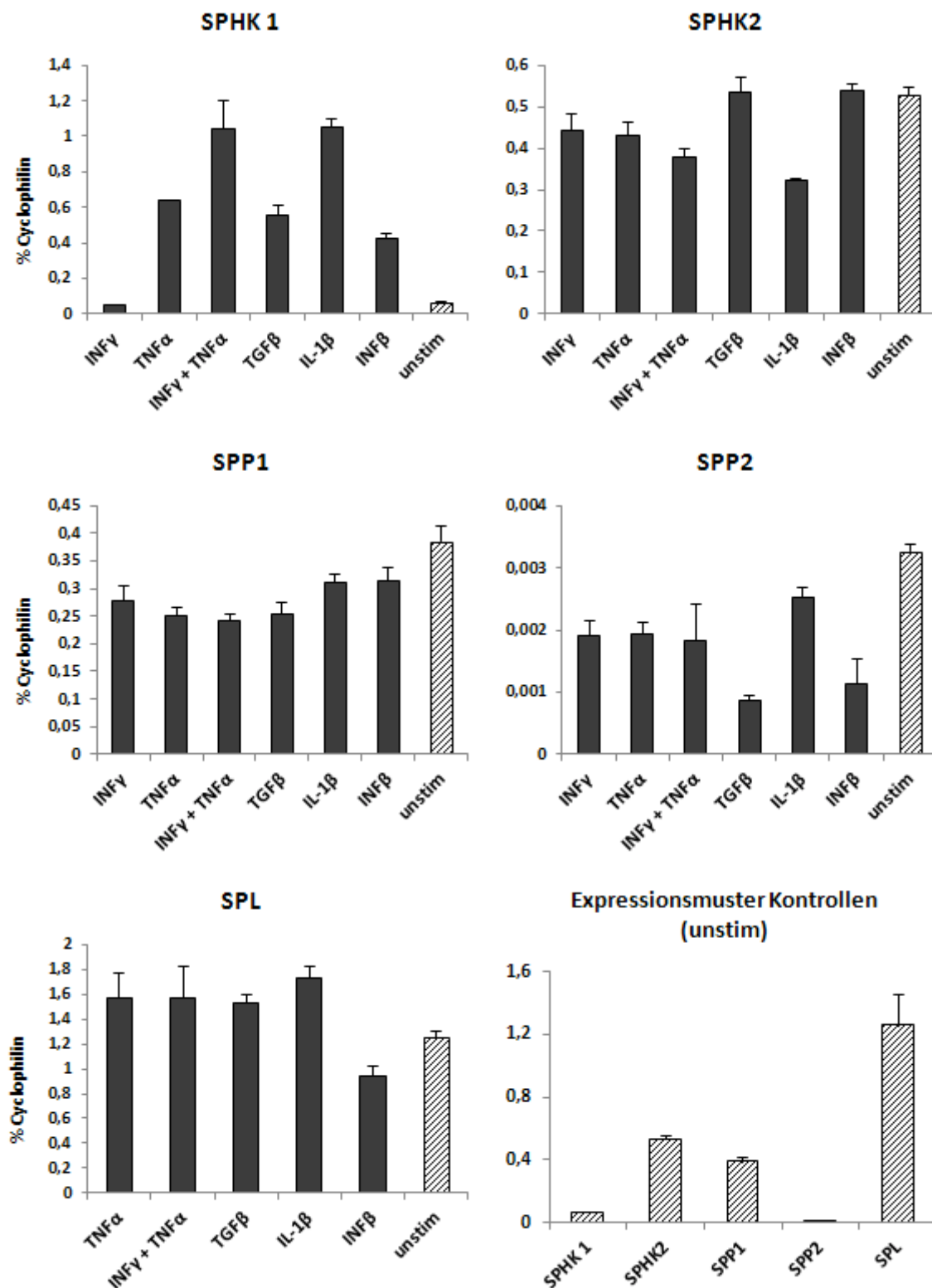


Abbildung 7A: Expressionsprofil der an der Biosynthese und Abbau von Sphingosin bzw. Sphingosin-1-phosphat beteiligten Kinasen (SPHK 1/2), Phosphatasen (SPP1/2) und der Lyase (SPL) bei Vorinkubation mit verschiedenen Zytokinen sowie deren Grundexpression (unstim) in der Astrozytomzelllinie U373 MG. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der technischen Replikate wieder.

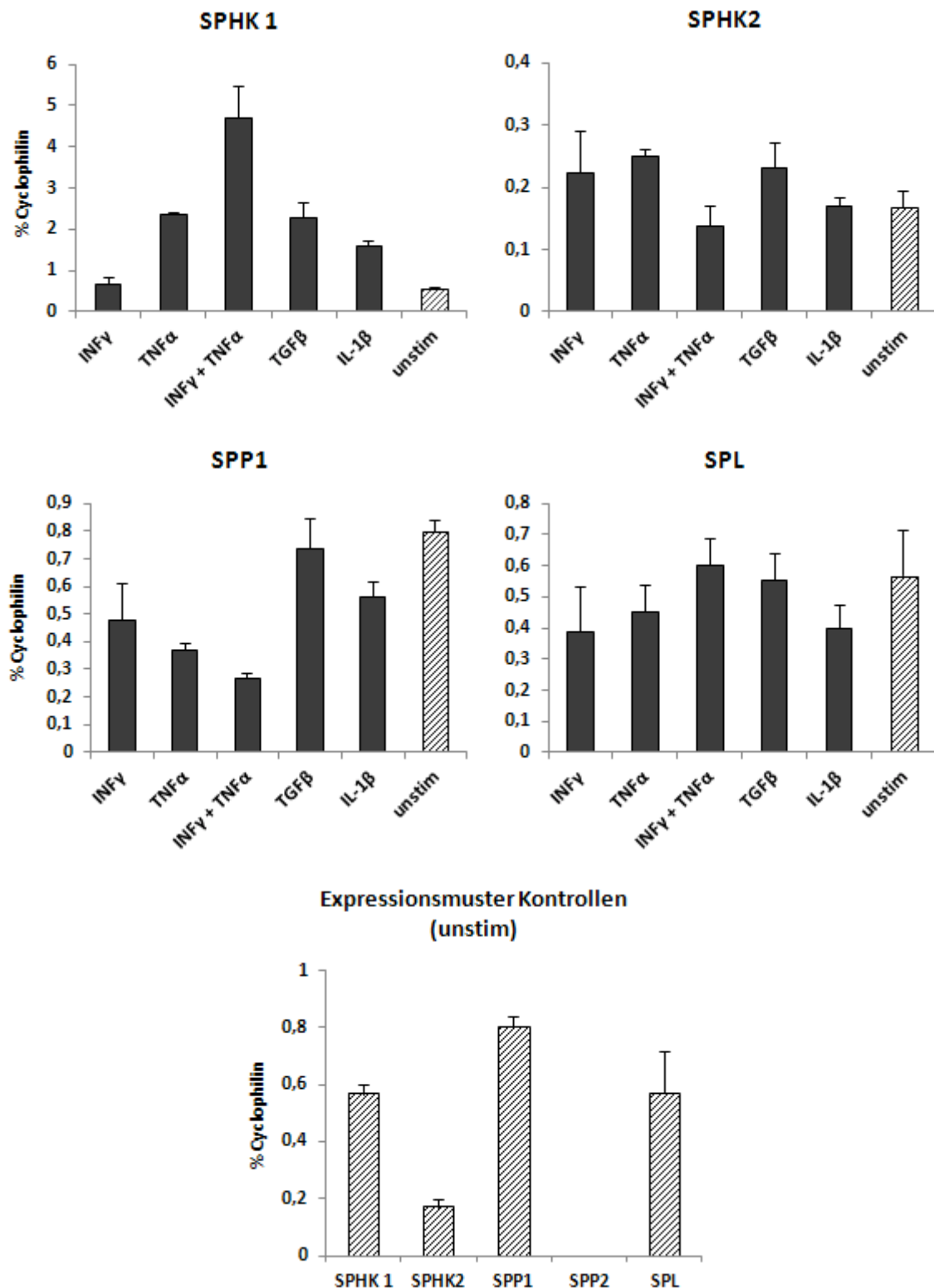


Abbildung 7B: Expressionsprofil der an der Biosynthese und Abbau von Sphingosin bzw. Sphingosin-1-phosphat beteiligten Kinasen (SPHK 1/2), Phosphatase (SPP1) und der Lyase (SPL) bei Vorinkubation mit verschiedenen Zytokinen sowie deren Grundexpression (unstim) in Vorhautfibroblasten (HFF). SGPP2 wird von HFF-Zellen nicht exprimiert und wird daher in der Abbildung auch nicht berücksichtigt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der technischen Replikate wieder.

3.4 Die Effekte von Spingosin-1-phosphat und FTY-P

Hauptgegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung der Effekte von Spingosin-1-phosphat (S1P) und FTY-P auf humane Astrozyten. Zunächst galt es die Versuchsbedingungen anhand der immortalisierten Astrozytomzelllinie (U373 MG) und den primären Vorhautfibroblasten (HFF) zu etablieren. Hierzu wurden die soeben genannten Zelllinien entweder mit S1P oder FTY-P stimuliert und die Effekte mit Hilfe geeigneter Gene auf Transkriptionsebene ausgelesen. Aus der gegenwärtigen Literatur zum S1P-System ist bekannt, dass durch S1P der Transkriptionsfaktor EGR1 (*early growth response protein 1*) und der Wachstumsfaktor FGF2 (*fibroblast growth factor 2*) in Astrozyten und Gliomzellen von Ratten signifikant induziert werden (siehe Abschnitt 4.4). Unter der Annahme einer vergleichbaren Signaltransduktion in humanen Zelllinien, wurde EGR1 und FGF2 zur Messung der Effekte von S1P und FTY-P für die im Folgenden beschriebenen Stimulationsexperimente ausgewählt. Um auf Transkriptionsebene sowohl kurzfristige, als auch Effekte über einen längeren Zeitraum erfassen zu können, wurden die Zellen 1 Stunde bzw. 8 Stunden mit den S1P-Rezeptoragonisten (S1P, FTY-P) stimuliert.

Repräsentative Ergebnisse von fünf unabhängigen Versuchen sind für die Astrozytomzelllinie (U373 MG) in der **Abbildung 8** dargestellt und lassen sich wie folgt beschreiben: EGR1 wurde nach einstündiger Stimulation sowohl mit S1P, als auch mit FTY-P deutlich induziert. Hierbei zeigte S1P einen wesentlich stärkeren Effekt auf die Expression von EGR1 im Vergleich zu FTY-P. Nach einer Stimulationsdauer von 8 Stunden hingegen konnte für S1P kein Effekt mehr nachgewiesen werden, die Expression von EGR1 fiel in etwa auf das Niveau der unstimulierten Kontrolle (unstim) ab. Demgegenüber war der Effekt von FTY-P auch noch langfristig nach einer Stimulationsdauer von 8 Stunden nachvollziehbar (**Abbildung 8A**).

Ein etwas anderes Bild ergab sich bei dem Wachstumsfaktor FGF2. Bei einstündiger Stimulation ließ sich lediglich für S1P ein überzeugender Effekt auf dessen Expression beobachten. Bezüglich FTY-P zeigte sich aber nach einer Stimulationsdauer von 8 Stunden eine ausgeprägte Induktion von FGF2, die das Expressionsniveau der einstündigen S1P-Stimulation erreichte. Im Unterschied dazu fiel die Expression von FGF2 nach einer achtstündigen Stimulation mit S1P wie bei EGR1 etwa auf das Niveau der nicht stimulierten Kontrolle ab (**Abbildung 8B**).

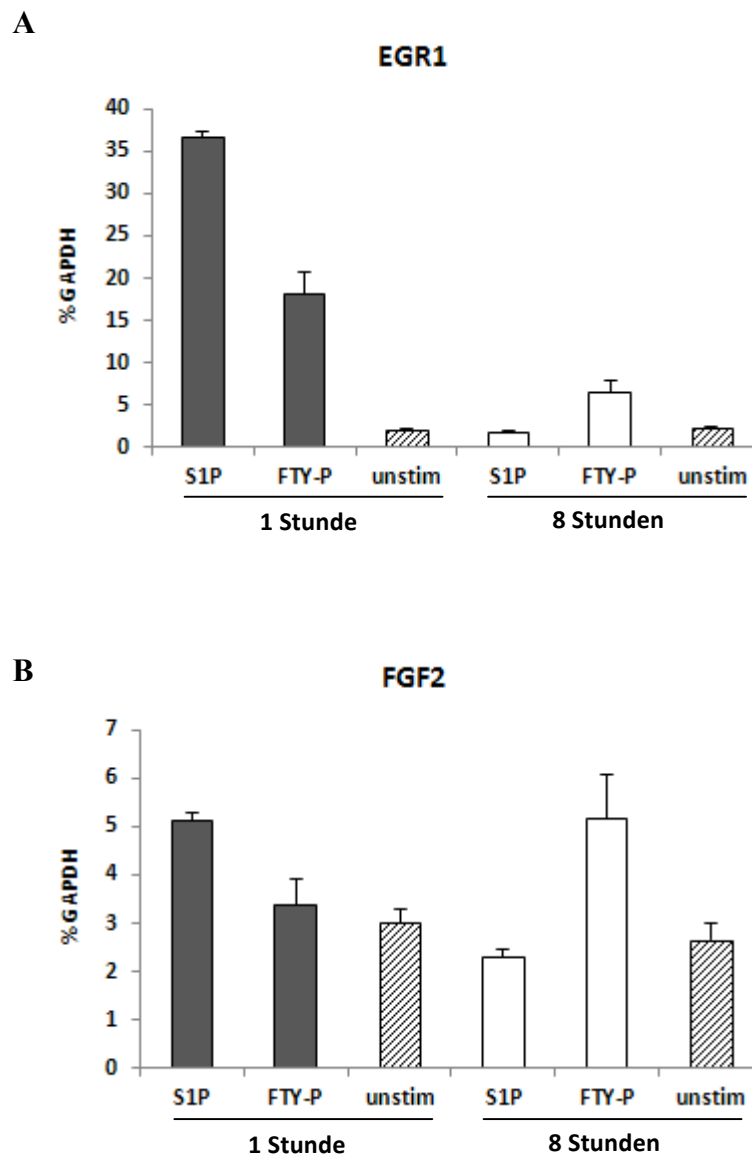


Abbildung 8: Stimulation humaner Astrozytomzellen (U373 MG) mit S1P (50nM) bzw. FTY-P (100nM). Die Stimulationsdauer betrug 1 Stunde und 8 Stunden. Die Effekte wurden auf Transkriptionsebene anhand der Gene EGR1 (*early growth response protein 1*) (A) und FGF2 (*fibroblast growth factor 2*) (B) ausgelesen und sind im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen (unstim) dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der technischen Replikate an.

Der zuvor beschriebene Versuch wurde in gleicher Weise mit humanen Vorhautfibroblasten (HFF) durchgeführt. Repräsentative Ergebnisse von zwei unabhängigen Versuchen sind in **Abbildung 9** dargestellt und lassen folgende Schlüsse zu: Die HFF-Zelllinie verhält sich bezüglich der Expression von EGR1 sehr ähnlich zu den Astrozytomzellen. S1P und FTY-P führen bei einstündiger Stimulation zu einer deutlichen Induktion von EGR1, wobei auch hier

S1P einen stärkeren Effekt im Vergleich zu FTY-P zeigt. Anders als bei den Astrozytomzellen ist der Effekt von S1P über die Zeit stabiler, d.h. nach einer Stimulationsdauer von 8 Stunden noch deutlich erkennbar. FTY-P zeigt nach achtstündiger Stimulation nur einen äußerst geringen Effekt (**Abbildung 9A**). Die Expression von FGF2 wird in den Vorhautfibroblasten durch S1P und FTY-P offenbar nicht beeinflusst, wie in **Abbildung 9 B** zu erkennen ist.

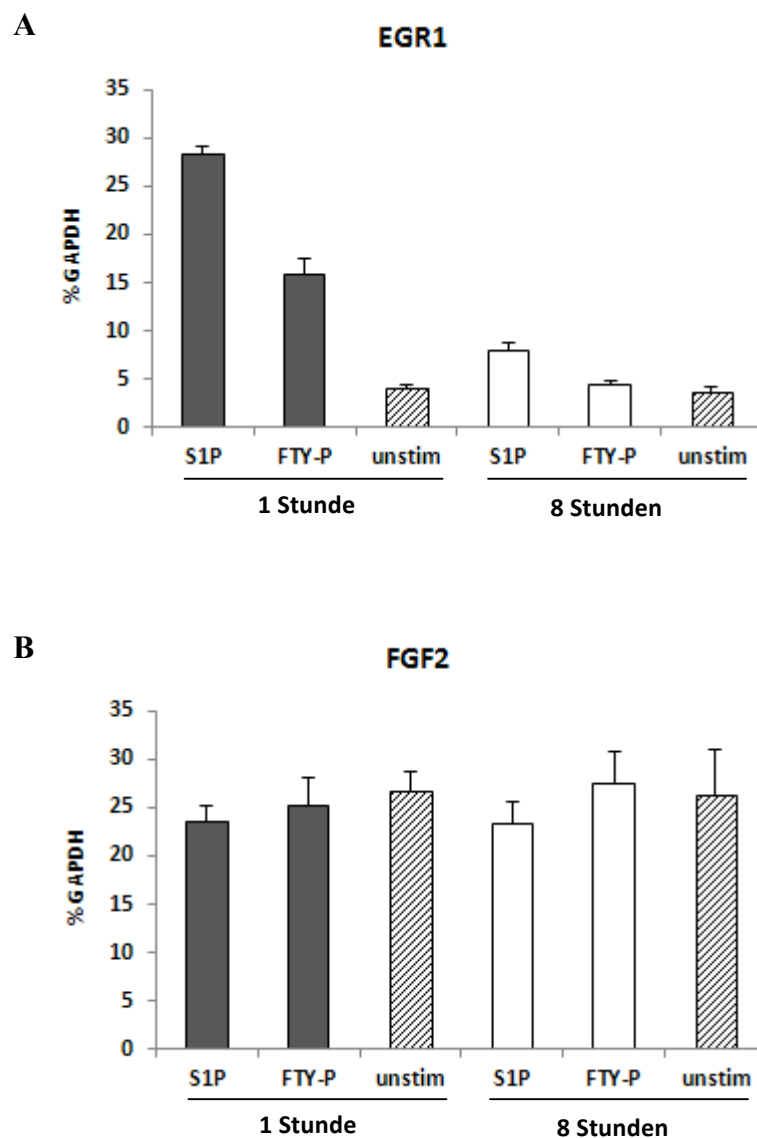


Abbildung 9: Stimulation humaner Vorhautfibroblasten (HFF) mit S1P (50nM) bzw. FTY-P (100nM). Die Stimulationsdauer betrug 1 Stunde und 8 Stunden. Die Effekte wurden auf Transkriptionsebene anhand der Gene EGR1 (*early growth response protein 1*) (A) und FGF2 (*fibroblast growth factor 2*) (B) ausgelesen und sind im Vergleich mit unstimulierten Kontrollen (unstim) dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der technischen Replikate an.

3.5 Die Kinetik der Expression von EGR1 und FGF2

Zur umfassenderen Bestimmung der Kinetik der Expression von EGR1 und FGF2 nach der Stimulation mit S1P bzw. FTY-P wurden noch weitere zeitliche Abstände ergänzend zum vorangegangenen Versuch berücksichtigt (1, 3, 8, und 24 Stunden). Neben S1P und FTY-P wurde der S1P-Rezeptorligand Dihydrosphingosin-1-phosphat (DHS1P) mit in die Untersuchung einbezogen. Bekanntermaßen können via S1P im Sinne eines *second messenger* auch direkt intrazelluläre Signalwege aktiviert werden, ohne dass die Bindung an membranständige Rezeptoren erfolgen muss. DHS1P bindet zwar an die S1P-Rezeptoren, vermittelt jedoch keine intrazellulären Effekte und kann diesbezüglich als Negativkontrolle herangezogen werden. Hiermit soll überprüft werden, ob die durch S1P hervorgerufenen Effekte auf die Expression von EGR1/FGF2 möglicherweise auch Ergebnis einer nicht-rezeptorgebundenen Signalwegaktivierung sind. Repräsentative Ergebnisse hierzu von insgesamt 7 unabhängigen Versuchen sind in der **Abbildung 10A und 10B** wiedergegeben und werden im Folgenden kurz beschrieben. Es ist darauf hinzuweisen, dass in diesem Versuchsaufbau die eingesetzten Konzentrationen der S1P-Rezeptorliganden höher gewählt wurden (jeweils 1 μ M), um insbesondere auch für S1P und DHS1P bei längerer Stimulationszeit Effekte auf die Expression von FGF2 adäquat erkennbar machen zu können.

EGR1 wurde bei einer Stimulationsdauer von 1 Stunde sehr stark heraufreguliert, etwa um den Faktor 50 mit S1P und um den Faktor 16 mit FTY-P. Generell fällt die Expression von EGR1 bereits nach 3 Stunden wieder sehr deutlich ab. Allerdings lässt sich erneut ein abweichender Einfluss auf die Kinetik von EGR1 durch FTY-P feststellen. Trotz seines anfangs weniger ausgeprägten Effekts auf die Induktion von EGR1 nach 1 Stunde, führt es bei längerfristiger Stimulation (3, 8 und 24 Stunden) stets zu einer höheren Expression im Vergleich zu S1P und auch DHS1P.

FGF2 erreicht sein Expressionsmaximum im Rahmen der berücksichtigten Zeitspanne nach 8 Stunden wesentlich später im Vergleich zu EGR1. Nach 24 Stunden Stimulationsdauer ist für beide Gene kein signifikanter Unterschied mehr zur nicht stimulierten Kontrolle (unstim) gegeben. Der Einfluss von DHS1P auf die Expression von EGR1 und FGF2 ist mit S1P nahezu identisch und unterstreicht damit einen im Wesentlichen rezeptorvermittelten Wirkmechanismus von S1P.

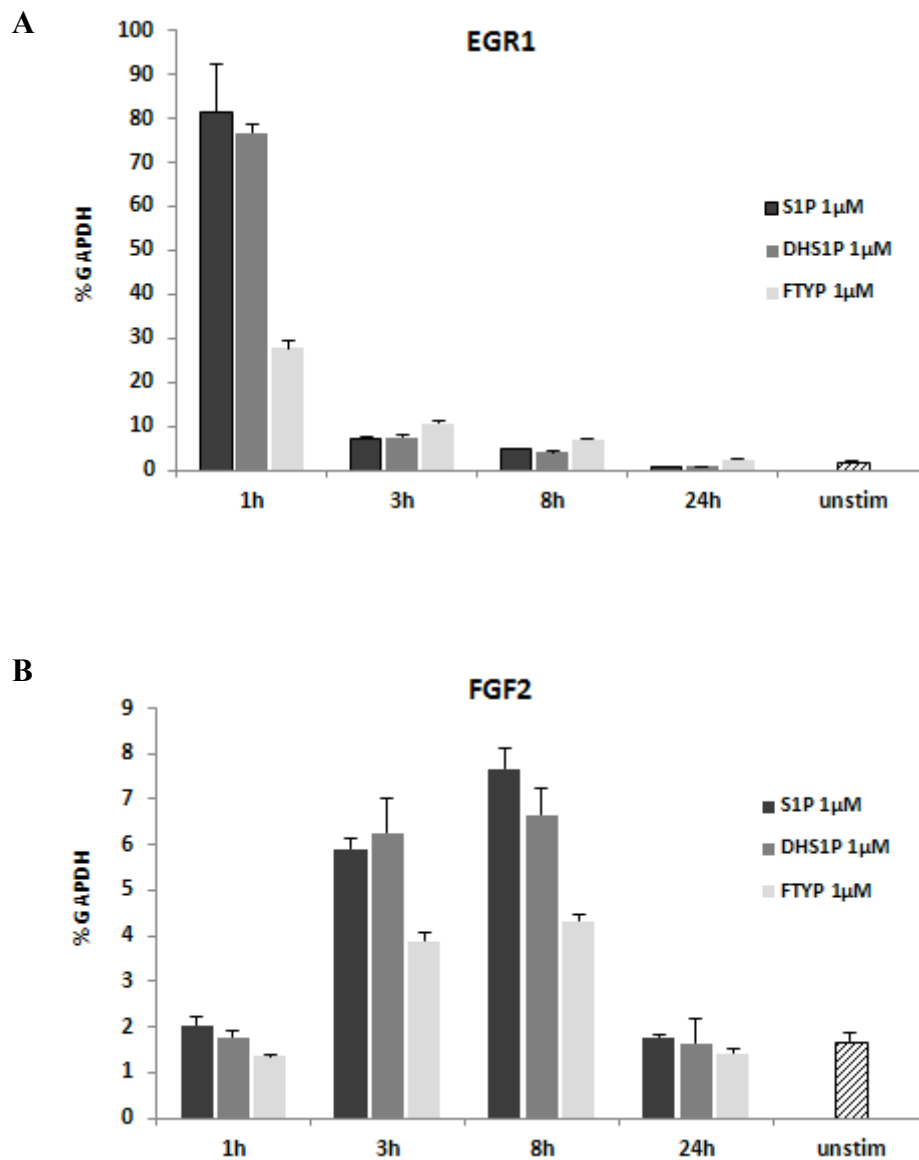


Abbildung 10: Kinetik von EGR1 (A) und FGF2 (B) bei Stimulation von Astrozytomzellen (U373 MG) mit Sphingosin-1-phosphat (S1P), Dihydrosphingosin-1-phosphat (DHS1P) und FTY-P in einer jeweiligen Konzentration von 1µM. Auf der x-Achse ist die Stimulationsdauer in Stunden (h) aufgetragen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der technischen Replikate an.

3.6 *Stimulation humaner Astrozyten mit S1P und FTY-P*

In Hinblick auf die genomweite Expressionsanalyse mittels Microarray (Illumina Human HT 12.0 Version 3 BeadChips) wurden schließlich humane Astrozyten mit S1P und FTY-P stimuliert. Die vorangehenden Versuche mit humanen Astrozytomzellen (U373 MG) und Vorhautfibroblasten (HFF) haben u. a. gezeigt, dass die Expression von EGR1 und FGF2 erheblich von der Stimulationsdauer abhängt. Aus diesem Grund wurden die Astrozyten sowohl für 1 Stunde, als auch für 8 Stunden dem jeweiligen S1P-Rezeptoragonisten (S1P, FTY-P) ausgesetzt, bevor die Gesamt-RNA zur Expressionsanalyse isoliert wurde. In **Abbildung 11** sind die Ergebnisse dieses Stimulationsexperiments wiedergegeben. Zu allen Stimulationsbedingungen wurden jeweils vier biologische Replikate erzeugt (siehe Abschnitt 3.7).

Wie in den Vorversuchen wurde EGR1 durch die Stimulation mit S1P und FTY-P nach einer Stimulationsdauer von 1 Stunde in humanen Astrozyten stark induziert. Im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle stieg die Expression von EGR1 bei Stimulation mit S1P um den Faktor 17 an, wohingegen bei Stimulation mit FTY-P eine Induktion von EGR1 um den Faktor 8 erreicht wurde. Nach achtstündiger Stimulation sowohl mit S1P, als auch mit FTY-P fiel die Expression von EGR1 annähernd auf den Wert der nicht stimulierten Kontrolle wieder ab. FGF2 wird ebenfalls durch die S1P-Rezeptoragonisten induziert. Nach 1 Stunde Stimulationsdauer ist noch kein Effekt erkennbar, wobei nach achtstündiger Stimulation sowohl S1P, als auch FTY-P die Expression von FGF induzieren und dabei vergleichbare Werte erzielen.

Die Daten der *Real-Time* PCR zeigen, dass die Stimulation humaner Astrozyten mit S1P bzw. FTY-P erkennbare Effekte auf die Genexpression hat und bilden damit die Grundlage für eine anschließende, genomweite Expressionsanalyse mittels Microarray (siehe Abschnitt 3.7).

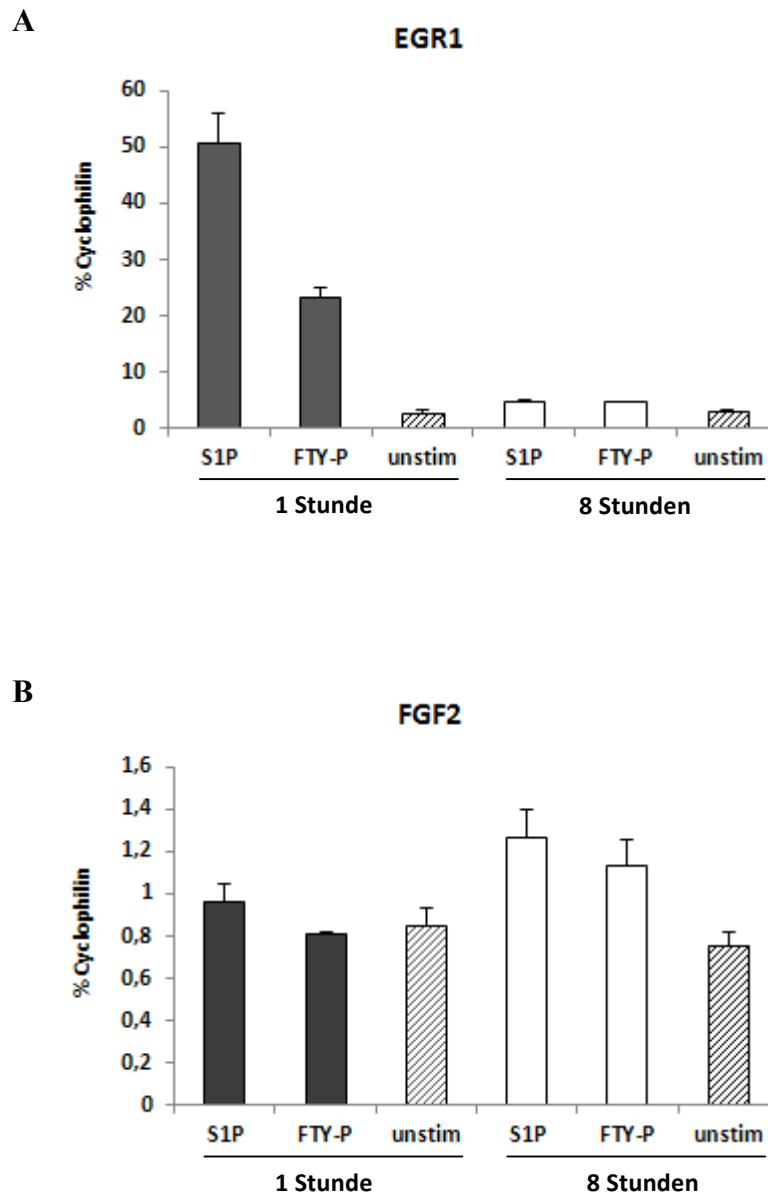


Abbildung 11: Stimulation humaner Astrozyten mit S1P (50nM) bzw. FTY-P (1 μ M) im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen (unstim). Die Stimulationsdauer betrug entweder 1 Stunde oder 8 Stunden. EGR1 (*early growth response protein 1*) (A) und FGF2 (*fibroblast growth factor 2*) (B) dienten als Auswertesystem für die Effekte von S1P und FTY-P auf Transkriptionsebene. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der technischen Replikate an.

3.7 *Der Microarray und dessen statistische Analyse*

Die Gesamt-RNA der humanen Astrozyten aus dem im Abschnitt 3.6 beschriebenen Versuch diente als Ausgangsmaterial für die genomweite Expressionsanalyse. Vor entsprechender Aufbereitung der RNA für den Microarray (*Labeling* etc.) wurde deren Integrität mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers (siehe Abschnitt 2.2.7) evaluiert. Sämtliche RNA-Proben der mit S1P und FTY-P stimulierten humanen Astrozyten wiesen eine RIN (*RNA-Integrity-Number*) zwischen 9,8 und 10 auf.

Die Microarray-Daten wurden daraufhin untersucht, ob sich unter den durch FTY-P oder S1P induzierten Genen auch solche befanden, die mit neurotropher bzw. neuroprotektiver Wirkung in Verbindung stehen. Die statistische Auswertung (t-Tests mit anschließender Korrektur für multiples Testen und Angabe als *false discovery rates* nach der Methode von Benjamini und Hochberg) ergab diesbezüglich neben dem bekannten FGF2 die signifikante Induktion ($p < 0,05$) von HB-EGF (*heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor*), IL-11 (Interleukin 11) und LIF (*leukemia inhibitory factor*).

Das Ergebnis des Microarray ist zusammenfassend in einem Streudiagramm (engl. *scatter plot*) dargestellt. Berücksichtigt wurden erneut die beiden Stimulationszeiträume über 1 bzw. 8 Stunden. Die Abszisse beschreibt die relative Änderung der Genexpression nach Stimulation mit S1P, die Ordinate die relative Änderung der Genexpression nach Stimultaion mit FTY-P. Alle signifikant regulierten Gene sind farblich hervorgehoben, wobei die Positionen der neurotrophen/-protektiven Faktoren gesondert markiert sind (**Abbildung 12A und 12B**).

Zusätzlich lässt sich aus dem Streudiagramm entnehmen, dass S1P insbesondere nach einstündiger Stimulation insgesamt den stärkeren Effekt auf die Genexpression ausübt. Es werden mehr Gene allein durch S1P (blaue Punkte) als allein durch FTY-P (grüne Punkte) signifikant reguliert.

Betrachtet man das Streudiagramm für die Stimulationsdauer von 8 Stunden, so ergibt sich ein etwas anderes Bild, FTY-P zeigt nun deutlichere Effekte, S1P verliert hingegen an Wirkstärke. Es werden im Vergleich zur Stimulationsdauer von 1 Stunde zunehmend mehr Gene allein durch FTY-P signifikant reguliert. Außerdem zeigt sich zwischen S1P und FTY-P eine größere Ähnlichkeit bezüglich ihrer Effekte auf die Genexpression. Berechnet man die

Stärke der Korrelation zwischen den Datenpunkten von S1P/FTY-P nach Pearson, so ergibt sich für die einstündige Stimulation ein Korrelationskoeffizient von 0,71 und nach achtstündiger Stimulationsdauer ein Wert von 0,84 entsprechend einer zunehmenden Korrelation. Keines der Gene wurde durch S1P bzw. FTY-P in die entgegengesetzte Richtung reguliert.

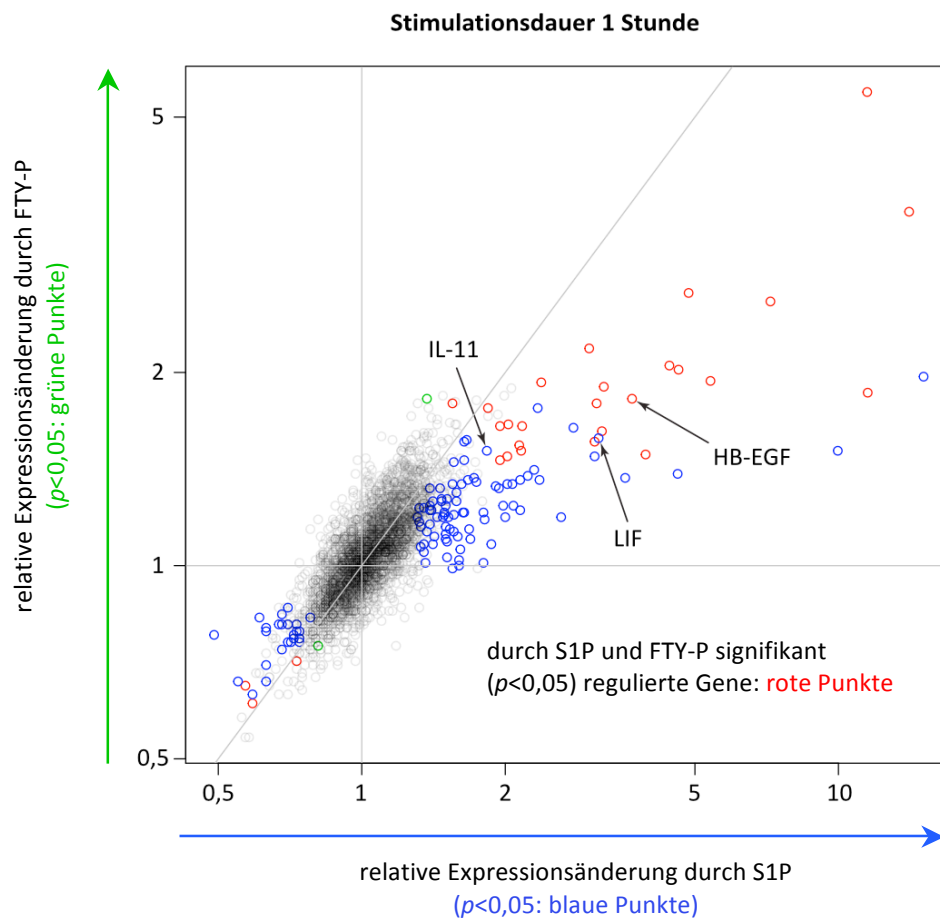


Abbildung 12A: Streudiagramm mit den durch S1P bzw. FTY-P signifikant regulierten Genen ($p < 0,05$). Auf den Koordinatenachsen ist die relative Änderung der Genexpression nach 1 Stunde Stimulationsdauer aufgetragen (1=keine Änderung, 2=Verdopplung usw.). Blaue Punkte zeigen Gene an, die nur durch S1P signifikant reguliert werden, grüne Punkte zeigen Gene an, die allein durch FTY-P signifikant reguliert werden, rote Punkte Gene, die jeweils durch beide Substanzen signifikant reguliert werden, in grau sind diejenigen Gene dargestellt, die nicht signifikant reguliert werden.

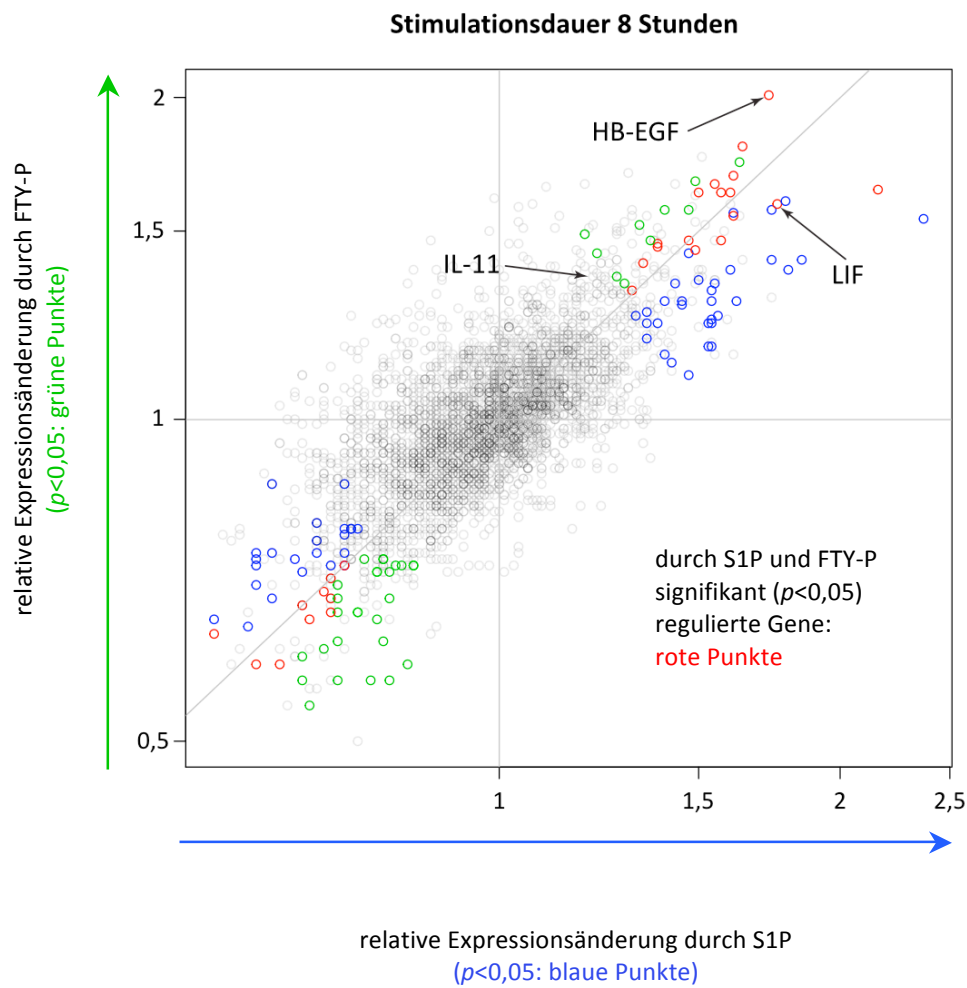


Abbildung 12B: Streudiagramm mit den durch S1P bzw. FTY-P signifikant regulierten Genen ($p < 0,05$). Auf den Koordinatenachsen ist die relative Änderung der Genexpression nach 8 Stunden Stimulationsdauer aufgetragen (1=keine Änderung, 2=Verdopplung usw.). Blaue Punkte zeigen Gene an, die nur durch S1P signifikant reguliert werden, grüne Punkte zeigen Gene an, die allein durch FTY-P signifikant reguliert werden, rote Punkte Gene, die jeweils durch beide Substanzen signifikant reguliert werden, in grau sind diejenigen Gene dargestellt, die nicht signifikant reguliert werden.

3.8 Die Validierung der Microarray-Daten

Die im Rahmen der Analyse des Microarray signifikant regulierten neurotrophen/-protektiven Faktoren wurden anhand der *Real-Time* PCR validiert (**Abbildung 13**).

Diesen Daten zufolge wurde HB-EGF bei einstündiger Stimulation mit S1P um den Faktor 4,4 induziert. Die Induktion durch FTY-P fiel zunächst etwas schwächer aus (Faktor 1,7). Nach einer Stimulationsdauer von 8 Stunden hingegen, steigerte FTY-P die Expression von HB-EGF im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle um den Faktor 3. S1P hatte nach dieser Zeit bezüglich seiner Wirkung auf Expressionsebene deutlich nachgegeben und erreichte nicht ganz den Effekt von FTY-P (**Abbildung 13A**).

IL-11 wurde weniger stark durch die S1P-Rezeptoragonisten reguliert. Dabei bewirkte S1P nach kurzer Stimulationsdauer eine Induktion von IL-11 um das 1,8-fache. Sowohl der S1P-Rezeptorligand FTY-P bei einstündiger Stimulation, als auch eine längere Stimulationsdauer mit S1P oder FTY-P hatten nur sehr geringe Effekte auf die Expression (**Abbildung 13B**).

LIF wurde wiederum deutlicher reguliert und zeigte eine Expressionssteigerung bei einstündiger Stimulation mit S1P um das 3,5-fache. Erneut war der Effekt von FTY-P bei kurzer Stimulationsdauer etwas schwächer (Faktor 1,4), nach 8 Stunden stieg die Expression von LIF auf das 1,7-fache. Der Effekt von S1P fiel vergleichbar zu HB-EGF nach längerer Stimulationsdauer deutlich schwächer als im Vergleich zu einer kurzen Stimulationsdauer aus (**Abbildung 13C**).

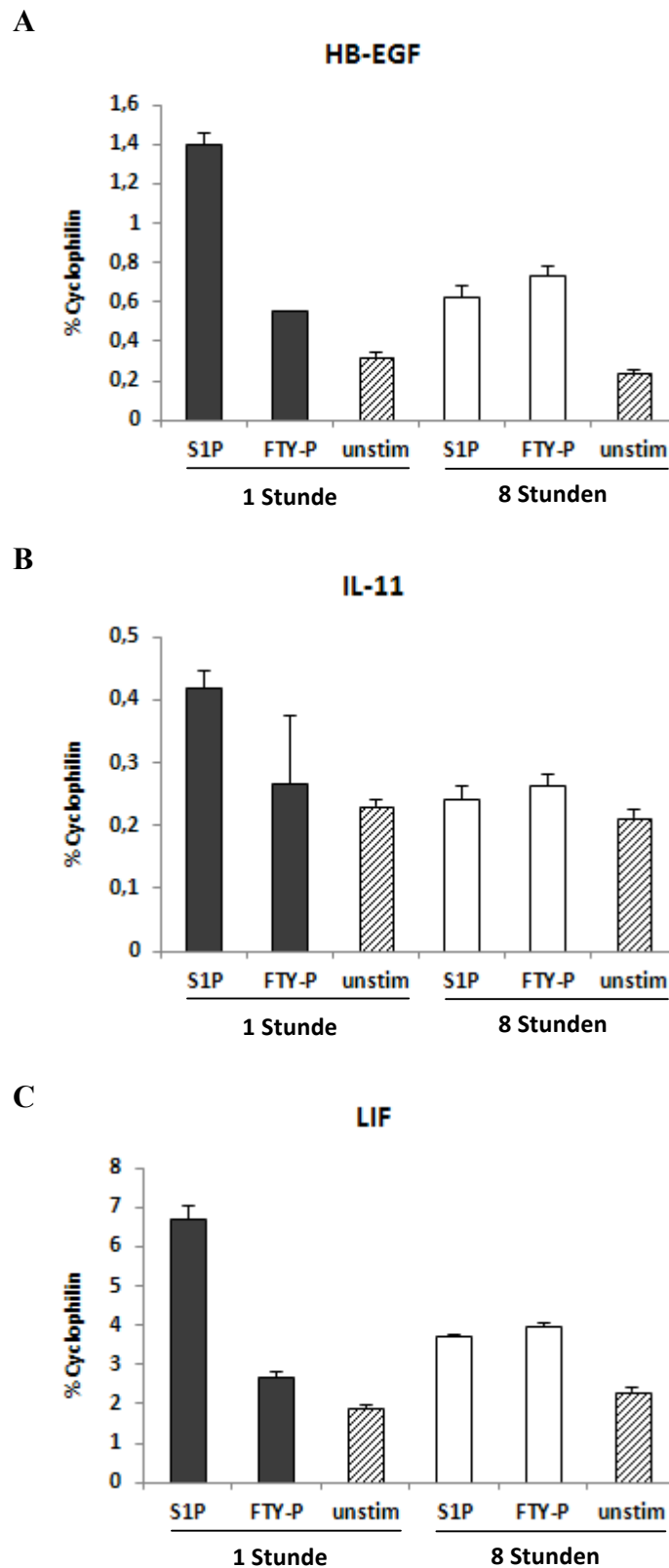


Abbildung 13: Validierung der Microarray-Daten mittels *Real-Time* PCR. Dargestellt ist die Expression der potentiell neurotrophen bzw. neuroprotektiven Gene HB-EGF (A), IL-11 (B) und LIF (C) nach Stimulation humaner Astrozyten mit S1P (50nM) bzw. FTY-P (1 μ M) im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen (unstim). Die Stimulationsdauer betrug entweder 1 Stunde oder 8 Stunden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der technischen Replikate an.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass HB-EGF, IL-11 und LIF von den S1P-Rezeptoragonisten in humanen Astrozyten signifikant induziert wurden. S1P erwies sich auch hier, wie in den vorangehenden Versuchen, bei kurzer Stimulationsdauer als der potentere Agonist. FTY-P hingegen scheint einen nachhaltigeren Effekt auf die Expression zu haben. Nach einer Stimulationsdauer von 8 Stunden überstieg die Effektstärke von FTY-P bei allen drei Kandidatengen die von S1P.

Ergänzend wurden die mittels Microarray identifizierten Kandidatene auch in Astrozytomzellen (U373 MG) und Vorhautfibroblasten (HFF) validiert. Erwartungsgemäß zeigten sich auch hier deutliche Regulationseffekte nach Stimulation mit S1P bzw. FTY-P (**Abbildung 14 und 15**).

In der U373 MG-Zelllinie ergab die einstündige Stimulation mit S1P insbesondere für LIF einen ausgeprägten Effekt, wobei das Gen um das 19-fache induziert wurde. FTY-P hatte erneut bei kurzer Stimulationsdauer einen geringeren Effekt auf die Genexpression, führte aber bei achtstündiger Stimulationsdauer zu einer deutlich höheren Genexpression im Vergleich zu S1P bei allen Kandidatengen (**Abbildung 14**).

Bei Betrachtung der Ergebnisse zu den HFF-Zellen kann der soeben beschriebene Effekt von FTY-P nicht nachvollzogen werden. Auch S1P vermittelt offenbar in dieser Zelllinie bei längerer Stimulationsdauer über mehrere Stunden einen Effekt auf die Expression der Kandidatene. Grundsätzlich lässt sich feststellen, dass auch in HFF-Zellen Gene mit neuroprotektiven bzw. neurotrophen Eigenschaften durch S1P und FTY-P induziert werden können (**Abbildung 15**).

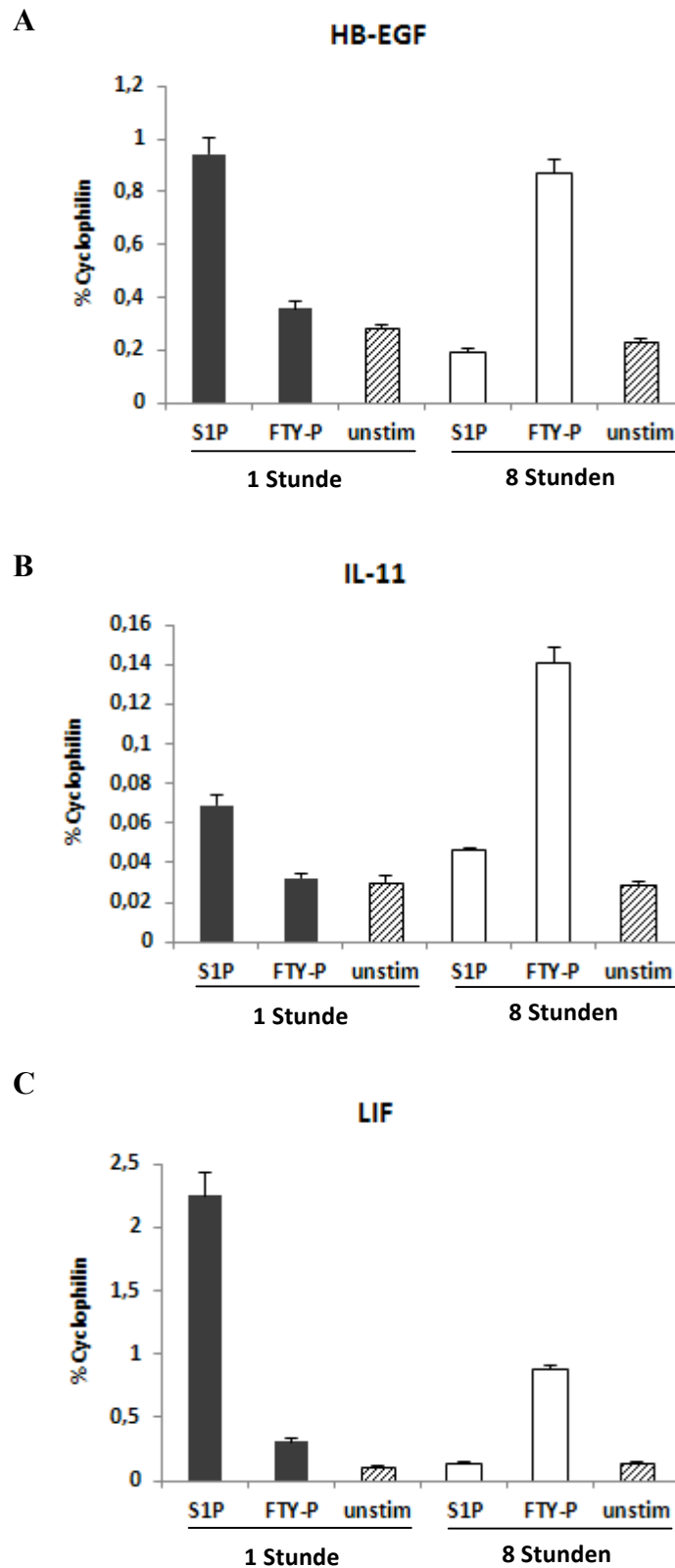


Abbildung 14: Validierung der Microarray-Daten mittels *Real-Time* PCR. Dargestellt ist die Expression der Kandidatengene HB-EGF (A), IL-11 (B) und LIF (C) nach Stimulation humaner Astrozytomzellen (U373) mit S1P (50nM) bzw. FTY-P (1 μ M) im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen (unstim). Die Stimulationsdauer betrug entweder 1 Stunde oder 8 Stunden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der technischen Replikate an.

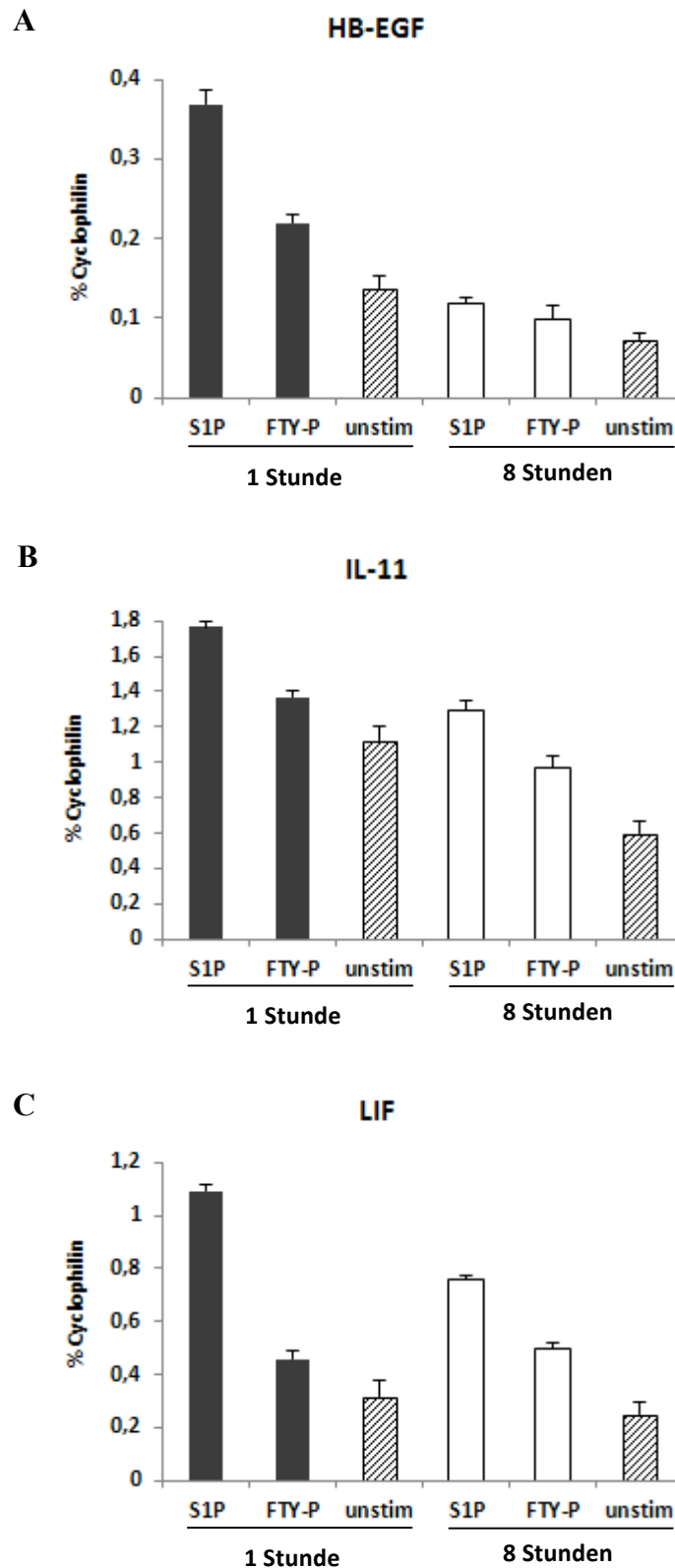


Abbildung 15: Validierung der Microarray-Daten mittels *Real-Time* PCR. Dargestellt ist die Expression der Kandidatengene HB-EGF (A), IL-11 (B) und LIF (C) nach Stimulation humaner Vorhautfibroblasten (HFF) mit S1P (50nM) bzw. FTY-P (1 μ M) im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen (unstim). Die Stimulationsdauer betrug entweder 1 Stunde oder 8 Stunden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der technischen Replikate an.

4 Diskussion

4.1 *Expressionsprofil der S1P-Rezeptoren und deren Bedeutung im Tiermodell der Multiplen Sklerose*

Eine grundlegende Voraussetzung für die Wirkungsentfaltung von S1P und FTY-P ist das Vorhandensein entsprechender Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Daher wurde für die in dieser Arbeit verwendeten Zelltypen (U373 MG, HFF, Astrozyten) jeweils das Rezeptor-Expressionsprofil bestimmt (siehe Abschnitt 3.1). Zusammenfassend ergab sich in jeder Zelllinie ein individuelles Muster, bei dem die Rezeptoren S1P₁, S1P₂ und S1P₃ unterschiedlich stark exprimiert waren. Untereinander vergleichbar war jedoch die äußerst geringe Expression der Rezeptoren S1P₄ und S1P₅.

Die bisher veröffentlichten Studien zum Expressionsprofil der S1P-Rezeptoren auf Astrozyten umfassen zumeist Zellkulturen tierischen Ursprungs oder betrachten immortalisierte Astroglia des Menschen [Anelli et al., 2005, Malchinkhuu et al., 2003, Mullershausen et al., 2007, Pebay et al., 2001, Rao et al., 2003, Rao et al., 2004, Sorensen et al., 2003]. Das in der vorliegenden Arbeit erstellte Expressionsprofil liefert die Grundlage für einen direkten rezeptorvermittelten Effekt von FTY-P und S1P auf astrozytäre Gliazellen des menschlichen ZNS. Der S1P₁-Rezeptor wurde in den primären humanen Astrozyten am stärksten exprimiert, gefolgt von S1P₃ und S1P₂ (S1P₁>S1P₃>S1P₂). In vitro Studien legen nahe, dass FTY-P und S1P ihre Effekte hauptsächlich über die Rezeptoren S1P₁ und S1P₃ vermitteln [Mullershausen et al., 2007, Osinde et al., 2007].

In einem Tiermodell für die MS, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), führt die Applikation von Fingolimod zu einer Reduktion des klinischen Schweregrades der neurologischen Defizite. Diese Beobachtung geht einher mit einer Abnahme der Demyelinisierung und der Neurodegeneration [Papadopoulos et al., 2010]. Die Arbeitsgruppe um Ji Woong Choi konnte in diesem Zusammenhang bei Mäusen mit EAE nachweisen, dass bei Verlust (Gen-Knockout) des S1P₁-Rezeptors auf Astrozyten, die Effektivität von Fingolimod verloren geht [Choi et al., 2011]. Diese Beobachtung unterstreicht die Rolle der S1P-Rezeptoren bzw. des S1P-Systems im Allgemeinen bei der Vermittlung neuroprotektiver Effekte und identifiziert dabei Astrozyten in diesem Zusammenhang als eine wesentlich daran beteiligte Zellpopulation.

4.2 *Das S1P-Rezeptorexpressionsprofil unter dem Einfluss von Zytokinen*

Die MS ist charakterisiert durch die Anwesenheit entzündlicher Veränderungen im gesamten ZNS (siehe Abschnitt 1.1.2). Es kommt dabei zur Ausschüttung sowohl pro- als auch antiinflammatorischer Zytokine. Insbesondere im Bereich der MS-Plaques finden sich vor allem die Zytokine Interferon- γ (IFN- γ), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) und der transformierende Wachstumsfaktor- β (TGF- β). Sie regulieren die Immunprozesse und nehmen dabei entscheidend Einfluss auf den Metabolismus bzw. die Genexpression ihrer Zielzellen [Baranzini et al., 2000, Cannella et al., 1995, Rohowsky-Kochan et al., 2000]. Die Genexpression der S1P-Rezeptoren wurde daher unter dem Einfluss der genannten Zytokine untersucht. Das regulär und erfolgreich in der Therapie der MS eingesetzte Medikament Interferon- β 1b (IFN- β 1b) wurde in diese Betrachtung mit einbezogen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben wieder, dass das Expressionsprofil der S1P-Rezeptoren in Gegenwart von Zytokinen maßgeblich moduliert wird. Dabei zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede zwischen den betrachteten Zelllinien (**Abbildung 6**), so dass eine zusammenfassende Aussage zum Einfluss der Zytokine auf die S1P-Rezeptorexpression an dieser Stelle nur schwer möglich scheint und die Betrachtung daher überwiegend deskriptiv bleiben muss. Gerade die S1P-Rezeptorexpression der humanen Astrozyten weicht unter dem Einfluss der Zytokine deutlich von den beiden anderen Zelllinien (U373 MG, HFF) ab. Auffällig ist hierbei, dass die separate Behandlung der Astrozyten mit INF- γ bzw. TNF- α entweder zu einer Herunterregulation oder unveränderten Expression der S1P-Rezeptoren führt, abweichend davon jedoch die kombinierte Gabe der beiden proinflammatorischen Zytokine zu einer Heraufregulation der S1P-Rezeptoren 2 und 3 führt. Offenbar spielt die genaue Zusammensetzung des entzündlichen Milieus für die Expression der S1P-Rezeptoren eine entscheidende Rolle. Bei den Astrozytomzellen (U373 MG) und den Vorhautfibroblasten (HFF) werden unter dem Einfluss von INF- γ und TNF- α die S1P-Rezeptoren tendenziell heraufreguliert und auch hier ergibt sich bei kombinierter Gabe ein teilweise abweichendes Bild (**Abbildung 6A und 6B**).

Die in der vorliegenden Arbeit generierten Expressionsergebnisse zu den humanen Astrozyten scheinen im Gegensatz zu einer Studie zu stehen, die eine Heraufregulation der S1P-Rezeptoren 1 und 3 unter dem Einfluss von TNF- α in primären humanen Astrozyten beschreibt [Van Doorn et al., 2010]. Unter kritischer Betrachtung der in dieser Arbeit

erzielten Ergebnisse scheint die Beobachtung van Doorns eher plausibel, da bei Versuchsreihen zu den Astrozytomzellen und den Fibroblasten eine übereinstimmende Beobachtung gemacht wurde und auf Grundlage bisheriger Erfahrungen mit diesen beiden Zelllinien (U373 MG, HFF) eine derartige Abweichung der astrozytären Ergebnisse nicht zu erwarten war. In derselben Studie konnte interessanter Weise im histologischen Schnittpräparat nachgewiesen werden, dass die Rezeptoren S1P₁ und S1P₃ in aktiven und chronisch inaktiven MS-Läsionen auf Astrozyten heraufreguliert sind und unterstreicht damit eine mögliche funktionelle Relevanz der S1P-Rezeptoren bzw. des S1P-Systems bei der Immunpathogenese der MS. Es sollte jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass sich die Untersuchungen van Doorns bezüglich der Zytokine allein auf TNF- α beschränken. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wird, ist jedoch für ein umfassendes Verständnis der S1P-Rezeptorexpression unter pathologischen Bedingungen die Betrachtung auf weitere relevante Zytokine auszuweiten und dabei deren kombinierte Gabe ebenfalls zu berücksichtigen.

Hervorzuheben bleibt die in allen Zelllinien gleichermaßen zu beobachtende, verstärkte Expression des S1P5-Rezeptors unter dem Einfluss des immunregulatorischen Zytokins TGF- β . Die Rolle des S1P5-Rezeptors bei humanen Astrozyten ist bisher nicht bekannt, zumal dieser Rezeptor wie bereits beschrieben unter normalen Zellkulturbedingungen so gut wie nicht exprimiert wird. Die bis dato existierende Literatur zur Expression der S1P-Rezeptoren unter pathologischen Bedingungen ist noch recht übersichtlich [Fischer et al., 2011, Nishimura et al., 2010, Van Doorn et al., 2010] und verdeutlicht auch die Komplexität dieses Themas. Wie aus der Arbeit von Hirotake Nishimura hervorgeht, ist beispielsweise die Expression des S1P1-Rezeptors abhängig von der jeweils betrachteten Pathologie. Interessanterweise ist die S1P1-Expression im subakuten Infarktreal des ZNS deutlich vermindert, jedoch im Bereich chronischer Infarktareale erhöht. Im Umfeld von ZNS-Metastasen ist die Expression des S1P1-Rezeptors ebenfalls vermindert, wohingegen in Läsionen bei Patienten mit Multisystematrophie der S1P1-Rezeptor überexprimiert wird. Es bedarf daher ohne Zweifel weiterer Untersuchungen, um die variable Expression der S1P-Rezeptoren unter pathologischen bzw. inflammatorischen Bedingungen genauer beschreiben zu können.

4.3 *Das Expressionsprofil der Sphingosin-Kinasen, S1P-Phosphatasen und Lyase unter Zytokineinfluss*

Es wurde bereits in den Abschnitten 1.2 und 1.3 beschrieben, dass Sphingosin oder FTY noch keine Wirkung an den S1P-Rezeptoren entfalten können. Sie müssen zuerst durch die SPHK1/2 zu S1P bzw. FTY-P phosphoryliert werden. Ebenso können die S1P-Rezeptorliganden auch wieder inaktiviert werden (**Abbildung 2**). Durch diese Mechanismen wird die zur Verfügung stehende Menge des entsprechenden S1P-Rezeptorliganden streng reguliert und nachgeschaltete zelluläre Effekte dadurch beeinflusst [Hait et al., 2006, Spiegel et al., 2011, Spiegel et al., 2003]. Sphingosin wird suffizient durch beide Kinasen phosphoryliert. SPHK2 besitzt jedoch eine etwas niedrigere Substratspezifität und kann dadurch auch FTY mit hoher Effektivität phosphorylieren [Billich et al., 2003, Hannun et al., 2008, Paugh et al., 2003]. Außerdem besitzen die Kinasen eine unterschiedliche Gewebsverteilung, wobei beide Formen im ZNS nachweisbar sind [Bryan et al., 2008, Hait et al., 2006].

Wie für die S1P-Rezeptoren, wurde auch die Expressionsänderung der Kinasen, Phosphatasen und der Lyase unter dem Einfluss verschiedener, im Rahmen der MS relevanter, Zytokine in der U373 MG Zelllinie und den HFF untersucht (siehe Abschnitt 3.3). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Sphingosin-Kinase 1 unter Zytokineinfluss deutlich heraufreguliert wird. Die Sphingosin-Kinase 2 bleibt bezüglich ihrer Expression recht stabil. Demgegenüber werden die Phosphatasen herunterreguliert, die Lyase wird kaum reguliert (**Abbildung 7**). Den Ergebnissen zufolge ist anzunehmen, dass unter Zytokineinfluss bzw. inflammatorischen Bedingungen Sphingosin, als auch FTY durch die entsprechenden Kinasen verstärkt phosphoryliert werden und somit als S1P-Rezeptorliganden zur Verfügung stehen. Speziell die SPHK1 scheint eine kritische Rolle im Rahmen pathologischer Zustände des ZNS zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass beim Gen-Knockout der SPHK1 in Mäusen die Entzündungsreaktion des ZNS (Neuroinflammation) nach intraventrikulärer Applikation von bakteriellem LPS (Lipopolysaccharid) deutlich exazerbierte im Vergleich zum Wildtyp. SPHK1-Knockout-Mäuse zeigten nach LPS-Applikation u. a. ein ausgedehnteres Hirnödem, eine vermehrte Astrogliose und einen vermehrten Verlust an Oligodendrozyten [Grin'kina et al., 2012]. Es ist daher denkbar, dass der Einfluss der SPHK1 auf die Neuroinflammation im Rahmen der MS ebenfalls eine wichtige Rolle spielt. Eine Heraufregulation der SPHK1 durch Zytokine mit konsekutiv gesteigerter Synthese von S1P1 könnte sich positiv auf den Krankheitsverlauf auswirken.

4.4 Effekte von S1P und FTY-P sowie DHS1P auf Transkriptionsebene

Zunächst galt es zur Darstellung der Effekte der S1P-Rezeptorliganden auf Transkriptionsebene geeignete Gene ausfindig zu machen, die bei Applikation von S1P bzw. FTY-P verlässlich reguliert werden. Unter Berücksichtigung der gegenwärtigen Literatur zum S1P-System wurden EGR1 (*early growth response protein 1*) und FGF2 (*fibroblast growth factor 2*) dafür ausgewählt [Dev et al., 2008, Sato et al., 1999]. EGR1 ist ein Transkriptionsfaktor und wird mit Zelldifferenzierung und -proliferation in Zusammenhang gebracht. Seine Induktion im ZNS ist mit neuronaler Aktivität und Plastizität assoziiert [Knapska et al., 2004, Silverman et al., 1999]. Die Kinetik der EGR1-Expression wurde im Ergebnisteil 3.5 eingehender untersucht. Hierbei wird deutlich, dass EGR1 vor allem frühzeitige Effekte der S1P-Rezeptorstimulation abbildet. Die Expression von EGR1 erfolgt durch Aktivierung des MAP-Kinase/ERK-Signalwegs, der über die G-Protein-Subfamilie G_i an alle fünf S1P-Rezeptoren ($S1P_{1-5}$) gekoppelt ist. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, lässt sich bei Bindung eines Liganden (S1P, FTY-P) an die S1P-Rezeptoren EGR1 zuverlässig induzieren und ist damit für die Messung der transkriptionellen Effekte von S1P und FTY-P gut geeignet.

FGF2, auch bekannt unter der Bezeichnung bFGF (*basic fibroblast growth factor*), weist ein anderes kinetisches Profil auf. Wie aus der **Abbildung 10** hervorgeht, bildet FGF2 zeitlich verzögerte Effekte von S1P und FTY-P ab. FGF2 gehört zur Gruppe der Wachstumsfaktoren und ist ein wichtiger Regulator von Zelldifferenzierung und -proliferation. Wie EGR1 wird er bei Aktivierung des MAP-Kinase/ERK-Signalwegs induziert [Sato et al., 1999]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass bei allen verwendeten Zelltypen (U373 MG, HFF, humane Astrozyten) die Stimulation mit S1P und FTY-P auf Transkriptionsebene zu klaren Effekten führt. Dabei stellte sich S1P im Vergleich zu FTY-P als der potentere Agonist heraus, da er fast regelhaft zu einer stärkeren Expression von EGR1 und FGF2 führt. Bei Betrachtung der Astrozytomzellen scheint jedoch der Effekt von FTY-P über die Zeit stabiler zu sein und führt bei einer Stimulationsdauer von 8 Stunden zu einer wesentlich stärkeren Induktion von EGR1 und FGF2 als S1P (siehe Abschnitt 3.3). Eine mögliche Erklärung dazu liefert die Arbeitsgruppe um Mullershausen, die zeigen konnte, dass bei Bindung von FTY-P an den $S1P_1$ -Rezeptor, die dabei durch G_i -Proteine in Gang gesetzten Signalkaskaden über viele Stunden aktiviert bleiben [Mullershausen et al., 2009].

S1P kann auch unabhängig von den S1P-Rezeptoren als *second messenger* verschiedene Signalwege aktivieren und bewirkt dadurch beispielsweise den Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration [Hopson et al., 2011, Meyer zu Heringdorf et al., 2003, Olivera et al., 1993]. Alvarez beschreibt in seiner Arbeit, dass S1P auch als intrazellulärer Cofaktor für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B eine entscheidende Rolle spielt [Alvarez et al., 2010]. Um sicherzustellen, dass die beobachteten Transkriptionseffekte rezeptorvermittelt sind, wurde im Ergebnisteil 3.5 ergänzend zu S1P auch Dihydro-S1P (DHS1P) in den Versuchsaufbau mit einbezogen. DHS1P bindet wie S1P an die S1P-Rezeptoren, kann allerdings bezüglich intrazellulärer Effekte als Negativkontrolle verwendet werden [Alvarez et al., 2010, Berger et al., 1996, Van Brocklyn et al., 1998]. Da die Expressionsergebnisse von S1P im Vergleich zu DHS1P bis auf eine geringe Schwankungsbreite annähernd identisch sind, ist davon auszugehen, dass bei den Stimulationsexperimenten intrazelluläre Effekte von S1P keinen wesentlichen Beitrag leisten.

Aus den Ergebnissen zu EGR1 und FGF2 lässt sich schlussfolgern, dass die Stimulation mit S1P bzw. FTY-P in allen drei Zelltypen (U373 MG, HFF, humane Astrozyten) deutliche Effekte auf die Genexpression hat und damit die Grundlage für eine genomweite Expressionsanalyse mittels Microarray gegeben ist. Es wurde hierbei ein besonderes Augenmerk auf die differenzielle Expression neurotropher und potentiell die Remyelinisierung fördernder Faktoren gelegt.

4.5 *Ergebnisse des Microarray und dessen Validierung*

Die mit S1P und FTY-P unterschiedlich lang (1 Stunde bzw. 8 Stunden) stimulierten humanen Astrozyten wurden einer genomweiten Expressionsanalyse mittels Microarray zugeführt. Unter den neurotrophen bzw. neuroprotektiven Faktoren erwiesen sich bei der statistischen Auswertung HB-EGF (*heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor*), IL-11 (Interleukin 11) und LIF (*leukemia inhibitory factor*) als weitere potentielle Kandidatengene neben FGF2. Bei Stimulation mit S1P wurden sie allesamt signifikant induziert ($p < 0,05$). Die wissenschaftliche Literatur bietet zahlreiche Hinweise für deren neuroprotektives Potential.

HB-EGF wird im ZNS regelhaft von Neuronen, Oligodendrozyten und Astrozyten exprimiert [Nakagawa et al., 1998]. Es konnte festgestellt werden, dass in den Gehirnen von Ratten kurz nach der Geburt HB-EGF stark exprimiert wird. Bei erwachsenen Tieren war dies nicht der Fall. Man geht daher davon aus, dass HB-EGF bei der Entwicklung des ZNS eine wichtige Rolle spielt. Dieselbe Arbeitsgruppe fand heraus, dass nach Kainat-induziertem exzitotoxischem Krampfanfall die Expression von HB-EGF im ZNS ebenfalls stark ansteigt und die Vorbehandlung von hippocampalen Neuronen mit HB-EGF diese vor dem toxischen Effekt von Kainat schützt [Opanashuk et al., 1999]. In einer anderen Studie konnte am Tiermodell für Schlaganfall gezeigt werden, dass HB-EGF die Bildung neuer Nervenzellen aus neuronalen Stammzellen (Neurogenese) nach fokaler zerebraler Ischämie fördert. Zudem führte die Behandlung mit HB-EGF bei Rückbildung des neurologischen Defizits zu einem deutlich verbesserten funktionellen Ergebnis im Vergleich zu nicht behandelten Kontrollen [Sugiura et al., 2005]. Gestützt wird diese Beobachtung durch eine weitere Arbeit, die zeigen konnte, dass bei Applikation von HB-EGF in die Seitenventrikel des ZNS im Bereich der subventrikulären Zone und des Hippocampus die Neubildung von Nervenzellen stimuliert wird [Jin et al., 2002].

Die hier angeführten Studien belegen das neuroprotektive Potential von HB-EGF und geben dabei eine wichtige Rolle dieses Wachstumsfaktors bei der Entstehung neuer Nervenzellen (Neurogenese) wieder. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei Stimulation humaner Astrozyten mit S1P oder FTY-P ein signifikanter Anstieg der Expression von HB-EGF (**Abbildung 13A**). Dieser Effekt war bei einstündiger Stimulationsdauer am stärksten ausgeprägt, aber auch nach einer Zeit von 8 Stunden noch deutlich vorhanden. Der pharmakologische Ligand FTY-P erscheint bei kurzer Stimulationsdauer zunächst als der

weniger potente Agonist im Vergleich zum physiologischen Liganden S1P. Allerdings erweist sich der Effekt von FTY-P bei einer längeren Stimulationsdauer von 8 Stunden als beständiger. Eine Erklärung hierfür liefert erneut die Arbeit von Florian Müllershausen, die bei der Diskussion zur Genexpression der Astrozytomzelllinie bereits Erwähnung fand. Dort beschreibt er, dass entgegen der Annahme FTY-P sei ein funktioneller Antagonist, die G-Protein-gekoppelten S1P-Rezeptoren nach Bindung von FTY-P zwar internalisiert werden, jedoch die Signaltransduktion noch über viele Stunden aufrecht erhalten bleibt [Müllershausen et al., 2009].

IL-11 wird hingegen bezüglich seiner Wirkung mit einer anderen Zellpopulation des ZNS in Verbindung gebracht, den Oligodendrozyten. Sie sind verantwortlich für die Bildung der Myelinscheide im ZNS und spielen daher gerade bei der Immunpathogenese der MS eine besondere Rolle. Im Gewebeschnittpräparat konnte nachgewiesen werden, dass IL-11 im Vergleich zur normal erscheinenden weißen Substanz (*normal appearing white matter*, NAW) vermehrt von Astrozyten am Rand einer aktiven Plaque exprimiert wird [Zhang et al., 2006]. Andere Zelltypen des ZNS zeigten hingegen in der Immunhistochemie keine Reaktivität mit dem IL-11-Antikörper. Interessanterweise fand sich der Rezeptor für IL-11 (IL-11-R α) auf Oligodendrozyten verschiedener Reifestufen. In derselben Arbeit konnte gezeigt werden, dass IL-11 die Reifung, Proliferation und das Überleben von Oligodendrozyten fördert. Darüber hinaus wird in Anwesenheit von IL-11 die Neubildung von Myelin stark gesteigert, so dass anzunehmen ist, dass IL-11 womöglich bei der Remyelinisierung von Entmarkungsherden (Plaques) eine bedeutende Rolle zukommt. Im Tiermodell der MS konnte gezeigt werden, dass zum einen beim Gen-Knockout des IL-11-Rezeptors (IL-11-R α ^{-/-}) in Mäusen der klinische Schweregrad der EAE stark zunimmt. Zum anderen wird bei Behandlung von an EAE erkrankten Tieren mit IL-11 eine signifikante Besserung der neurologischen Symptome beobachtet. Auf neuropathologischer Ebene spiegelt sich dies in einer Abnahme der Demyelinisierung und einem geringeren Untergang von Oligodendrozyten im Vergleich zu Kontrolltieren wider [Gurfein et al., 2009]. Aufgrund der soeben genannten Eigenschaften von IL-11 lässt sich schlussfolgern, dass dieses Zytokin insbesondere bei demyelinisierenden Erkrankungen, wie der MS, durchaus therapeutisch von großem Nutzen sein kann.

IL-11 wird bei einstündiger Stimulation der humanen Astrozyten mit S1P stark induziert, wohingegen dieser Effekt nach 8 Stunden nicht mehr zu beobachten ist. FTY-P zeigt hingegen nur eine schwache Induktion von IL-11. Denkbar wäre, dass IL-11 in Verbindung

mit FTY-P einer anderen Kinetik folgt, als beispielsweise das zuvor erwähnte HB-EGF, und daher eine Stimulationsdauer von mehr als 8 Stunden notwendig ist, um deutlichere Effekte von FTY-P auf Transkriptionsebene zu beobachten. Ein weiterer Grund dafür könnten die etwas unterschiedlichen Rezeptoraffinitäten von S1P und FTY-P sein. Unter Berücksichtigung der komplexen Kopplung der S1P-Rezeptoren an verschiedene G-Proteine ist es gut vorstellbar, dass bei einem unterschiedlichen Aktivierungsmuster der S1P-Rezeptoren dementsprechend auch andere Signalkaskaden zum Tragen kommen, das sich wiederum in einer alternativen Genexpression widerspiegelt. Weiterführend ist es daher von Interesse, welcher S1P-Rezeptor bzw. welche S1P-Rezeptoren ausschlaggebend für die Expression von IL-11 sind. Um diese Frage zu klären, könnten Untersuchungen mit selektiven S1P-Rezeptorliganden durchgeführt werden. Ein Beispiel hierfür wäre die Substanz SEW2871, die ein reiner Agonist am S1P1-Rezeptor ist [Herr et al., 2007]. Im Hinblick auf das regenerative Potential von IL-11 erscheint es erstrebenswert einen Weg der therapeutischen Nutzbarmachung zu finden.

Auch das dem IL-11 verwandte Zytokin LIF, beide gehören zur IL-6 Familie, wurde bei Stimulation der humanen Astrozyten mit S1P und FTY-P signifikant induziert. Einen Anhaltspunkt für das neuroprotektive Potential von LIF geben u. a. die Arbeiten von Banner und Pineau. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass LIF nach traumatischer Verletzung des Gehirns oder auch des Rückenmarks von Astrozyten im Bereich der Läsion bzw. Kontusion vermehrt exprimiert wird. Der entsprechende Rezeptor für LIF, LIF-R β , konnte auf Neuronen nachgewiesen werden [Banner et al., 1997, Pineau et al., 2007]. Im Tiermodell für den Schlaganfall konnte gezeigt werden, dass es bei Applikation von LIF zu einer deutlichen Verminderung des postischämischen, neurologischen Defizits kommt [Suzuki et al., 2005]. Darüber hinaus stimuliert LIF nach zerebraler Hypoxie die Proliferation neuronaler Stammzellen in der subventrikulären Zone [Covey et al., 2007]. Das neuroregenerative Potential wird auch in der Arbeit von Blesch deutlich, in welcher LIF die axonale Regeneration nach traumatischer Verletzung des kortikospinalen Trakts fördert [Blesch et al., 1999].

Im Hinblick auf die MS sind zudem Ergebnisse bedeutsam, die sich auf die myelinbildenden Oligodendrozyten beziehen. Im bereits mehrfach erwähnten Tiermodell der MS, der EAE, zeigte sich, dass bei Applikation von LIF der apoptotische Zelltod von Oligodendrozyten verhindert werden kann [Butzkueven et al., 2002]. In derselben Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass der LIF-Rezeptor (LIF-R β) auch auf Oligodendrozyten exprimiert wird, vor

allem wenn sich diese in räumlicher Nähe zu entzündlichen Infiltraten befinden. Eine weitere Arbeit konnte nachweisen, dass Astrozyten in Reaktion auf neuronale Aktivität LIF freisetzen und dadurch die Myelinisierung von Axonen fördern [Ishibashi et al., 2006]. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass LIF bei Läsion des ZNS verstärkt exprimiert wird, LIF die axonale Regeneration induziert, vor Demyelinisierung schützt, die Remyelinisierung fördert und im Tiermodell für Schlaganfall und MS zu einer deutlichen Besserung der neurologischen Defizite führt [Slaets et al., 2010].

LIF wird durch die Stimulation mit S1P und FTY-P stark induziert, wobei auch hier vergleichbar zu HB-EGF die Stimulation mit FTY-P erst bei einer Stimulationsdauer von 8 Stunden deutlicher zum Tragen kommt. Möglicherweise ist das Expressionsmaximum von LIF nach achttündiger Stimulation mit FTY-P noch nicht erreicht und es muss mit einem weiteren Anstieg bei noch längerer Stimulationsdauer gerechnet werden. Auch hier offenbart sich S1P initial als der potentere Agonist, jedoch nach einer Stimulationsdauer von 8 Stunden liegt die Expression von LIF bei den mit FTY-P stimulierten Astrozyten etwas höher und weist damit erneut auf eine Aufrechterhaltung der Signaltransduktion durch FTY-P hin.

Hervorzuheben ist das Ergebnis zur Expression von FGF2 in humanen Astrozyten. Bei einer Stimulationsdauer von 8 Stunden führt sowohl S1P, als auch FTY-P zu einer deutlichen Expressionssteigerung von FGF2 in humanen Astrozyten. Studien haben gezeigt, dass der Wachstumsfaktor FGF2 neuroprotektive Eigenschaften besitzt. Die Expression der mRNA von FGF2 und des entsprechenden Proteins wird nach Verletzung des Nervengewebes stark heraufreguliert, wobei sich Gliazellen als eine wesentliche Quelle herausstellten [Leadbeater et al., 2006]. Es konnte nachgewiesen werden, dass FGF2 im Tiermodell die Proliferation neuronaler Stammzellen stimuliert und die Rekrutierung dieser Zellpopulation zu geschädigten Bereichen des ZNS bewirkt [Jin et al., 2005, Mudo et al., 2009]. Im Tiermodell der MS konnte nachgewiesen werden, dass FGF2 im Bereich von Läsionen in Astrozyten exprimiert wird und diese Expression sein Maximum zu Beginn des Remyelinisierungsprozesses aufweist [Albrecht et al., 2003, Messersmith et al., 2000]. Zudem ist FGF2 ein potentes Mitogen für Oligodendrozyten-Vorläuferzellen [McKinnon et al., 1990]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass FGF2 im Tiermodell die endogene Remyelinisierung signifikant steigern konnte [Dehghan et al., 2012]. Die Induktion von FGF2 in humanen Astrozyten durch FTY-P könnte daher für einen direkten neuroprotektiven Effekt von Fingolimod (FTY-720) mit verantwortlich sein und im Rahmen der MS möglicherweise die Remyelinisierung fördern.

Kritisch zu beurteilen ist in diesem Zusammenhang die Beschränkung der Stimulationsdauer auf maximal 8 Stunden. Wie in weiterführenden Experimenten der Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte (siehe Kapitel 8), lässt sich bei wiederholter Gabe der S1P-Rezeptoragonisten für eine Zeitspanne von bis zu einer Woche beobachten, dass die Expression der neurotrophen/-protektiven Faktoren zwar langsam zurückgeht, allerdings persistierten grundsätzlich die Effekte von S1P und FTY-P und waren untereinander vergleichbar. Dies unterstützt die Auffassung, dass auch über einen längeren Zeitraum sowohl S1P, als auch FTY-P agonistische Effekte vermittelt [Mullershausen et al., 2009, Wu et al., 2013].

4.6 Hypothese zur Wirkung von FTY und S1P auf Neurone und Gliazellen

Diese Arbeit zeigt, dass bei Stimulation von humanen Astrozyten mit dem biologisch aktiven Metaboliten von FTY (FTY-P), als auch mit S1P die Expression von HB-EGF, IL-11, LIF und FGF2 gesteigert wird. Auf Grundlage der diskutierten Literatur im Abschnitt 4.5 kann angenommen werden, dass bei Bindung von FTY-P oder S1P an die entsprechenden Rezeptoren auf Astrozyten, Signalkaskaden in Gang gesetzt werden, die schließlich zur Expression und Freisetzung von HB-EGF, IL-11, LIF, FGF2 führen. Diese Faktoren könnten wiederum auf Neurone oder Gliazellen einwirken und im Rahmen der MS oder anderen Erkrankungen des ZNS zur Regeneration neuronalen Gewebes beitragen (**Abbildung 16**).

Die therapeutische Modulation der Astrozytenfunktion, mit der Absicht deren neuroprotektives Potential zu entfesseln, scheint ein vielversprechender Ansatz bei der Behandlung der MS. Auch vor dem Hintergrund weiterer Erkrankungen des ZNS, wie beispielsweise dem Schlaganfall, könnte sich diese Strategie als erfolgversprechend erweisen [Anderson et al., 2014, Barreto et al., 2011].

Um die Daten der vorliegenden Arbeit wissenschaftlich weiter zu untermauern, ist es notwendig die erzielten Ergebnisse nach Übertragung auf die Proteinebene am Tiermodell eingehend zu überprüfen. Dazu könnten die S1P-Rezeptoragonisten lokal oder systemisch einem geeigneten Versuchstier appliziert werden und die Produktion der entsprechenden neurotrophen Faktoren (HB-EGF, IL-11, LIF, FGF2) im Vergleich zu Placebo-behandelten Kontrolltieren evaluiert werden. Weiterführend könnte man sich vorstellen mit selektiven S1P-Rezeptor-Liganden zu arbeiten, um womöglich einen bestimmten Rezeptorsubtyp ausfindig zu machen, der für die Expression der neurotrophen Faktoren hauptsächlich verantwortlich ist. Es ist offensichtlich, dass die molekularbiologische Verbindung zwischen den S1P-Rezeptoragonisten und den neurotrophen Faktoren ein großes therapeutisches Potential birgt, worauf im folgenden Unterkapitel zum Abschluss dieser Arbeit näher eingegangen werden soll.

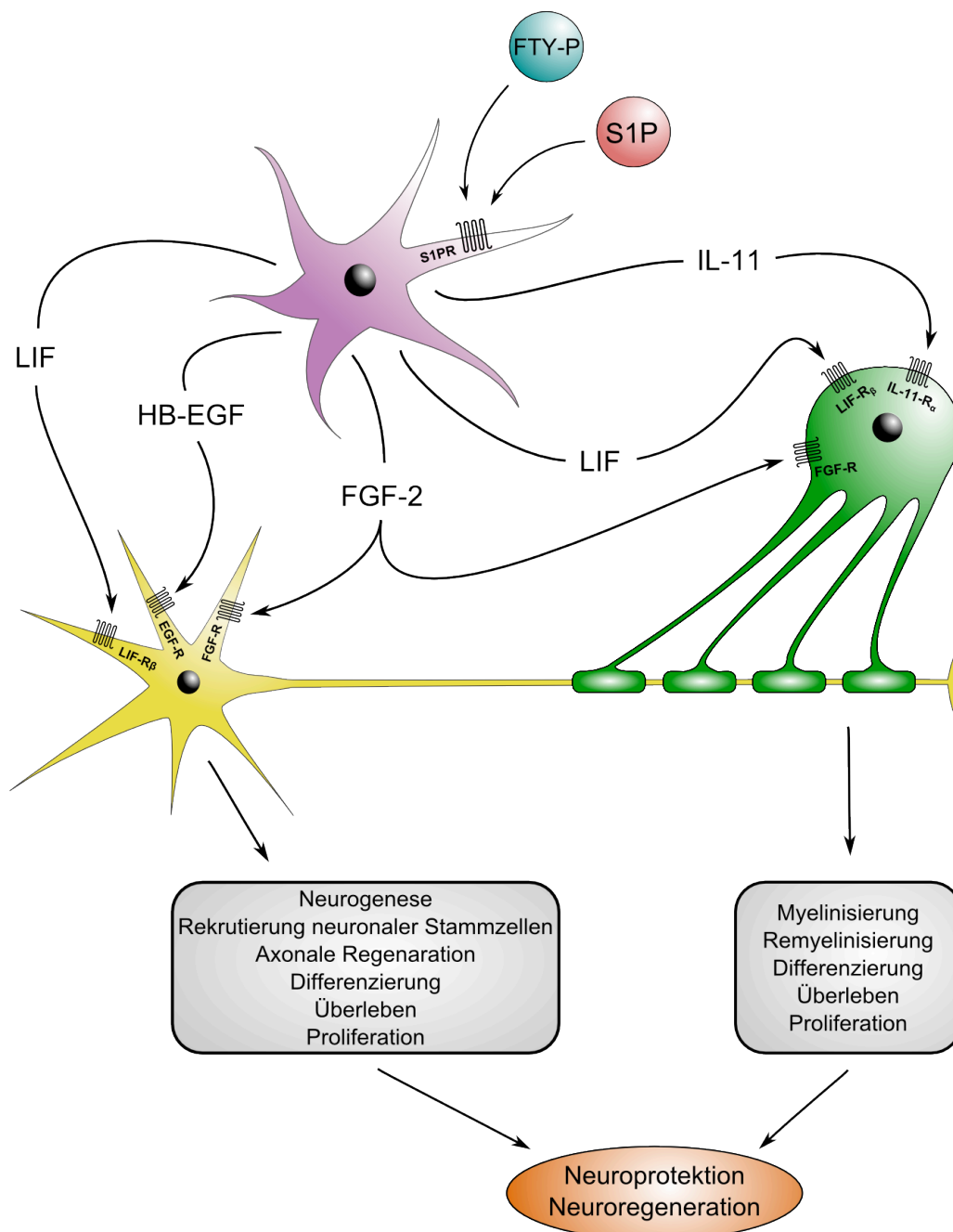


Abbildung 16: FTY-P oder S1P (Sphingosin-1-phosphat) binden an S1P-Rezeptoren (S1PR), die u. a. von Astrozyten (violett) exprimiert werden. Dadurch wird in dieser Zellpopulation die Expression neurotropher/-protektiver Faktoren (HB-EGF, LIF, IL-11, FGF2) stimuliert. Diese können dann an die entsprechenden Rezeptoren auf Neuronen (gelb) oder Oligodendrozyten (grün) binden und über verschiedene Mechanismen (Neurogenese, Remyelinisierung, axonale Regeneration, Proliferation etc.) neuroprotektive bzw. neuroregenerative Effekte vermitteln.

4.7 *Klinische Relevanz der Daten und Perspektive*

Die vorliegende Arbeit unterstreicht die Auffassung, dass in der Entwicklung therapeutisch nutzbarer Substanzen mit Angriffspunkt am S1P-System großes Potential für die Therapie neurodegenerativer bzw. demyelinisierender Erkrankungen liegt. Vor dem Hintergrund der gewonnenen Daten, wäre dabei anzustreben, über gezielte pharmakologische Modulation der S1P-Rezeptoren die Freisetzung neuroprotektiver bzw. neurotropher Faktoren aus Astrozyten zu bewirken und damit die Regeneration neuronalen Gewebes zu fördern.

Erste Hinweise auf die Realisierbarkeit dieser Idee bietet der kürzlich in der Therapie der MS zugelassene S1P-Rezeptormodulator Fingolimod (FTY 720). Wie im Abschnitt 1.3 auf Basis der verfügbaren Literatur erläutert, vermittelt Fingolimod offenbar auch direkte neuroprotektive Effekte. Jedoch ist bisher nicht geklärt, welche Faktoren daran beteiligt sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einen ersten Hinweis, welcher Art diese Faktoren sein könnten und bilden damit eine Grundlage für weiterführende Untersuchungen.

Die derzeit zur Verfügung stehenden therapeutischen Substanzen zur Behandlung der MS führen zwar zu einer Verringerung der Schubrate und beschleunigen nach einem Schub die Rückbildung der neurologischen Defizite. Sie können aber das chronische Fortschreiten der Erkrankung nicht verhindern, da sie kaum einen Einfluss auf Neuroregeneration und Remyelinisierung haben [Kieseier et al., 2005]. Eine große Herausforderung für die Zukunft ist daher, therapeutische Strategien der Neuroregeneration und Remyelinisierung ausfindig zu machen. Es ist bekannt, dass u. a. auch bei der MS regenerative Prozesse im ZNS stattfinden und man weiß, dass neurotrophe Faktoren dabei eine wichtige Rolle spielen [Franklin, 2002]. Aus diesem Grund wurden schon in der Vergangenheit Versuche unternommen, neurotrophe Faktoren therapeutisch einzusetzen. In den dazu durchgeführten klinischen Studien ergaben sich jedoch große Probleme bezüglich der Passierbarkeit der Blut-Hirn-Schranke. Zudem war die lokale oder systemische Applikation neurotropher Faktoren mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden. Darüber hinaus kam es zur Bildung von Antikörpern gegen den jeweiligen applizierten neurotrophen Faktor als Reaktion des Immunsystems auf das Fremdprotein [Bartus, 2012, Pezet et al., 2006, Ruozi et al., 2012]. Trifft die hier aufgestellte Hypothese zu, so könnte man sich gut vorstellen, diese Hürden über das S1P-System zu umgehen.

Fingolimod, als erster für die klinische Anwendung zugelassener S1P-Rezeptromodulator, kann die Blut-Hirn-Schranke leicht überwinden und reichert sich sodann ohne nennenswerte Nebenwirkungen im ZNS an [Foster et al., 2007, Kappos et al., 2010]. Dort könnte es dann vor Ort die Produktion körpereigener neurotropher Faktoren stimulieren, die nicht in der Gefahr stehen, vom Immunsystem neutralisiert zu werden. Denkbar wäre in Zukunft die Herstellung weiterer S1P-Rezeptormodulatoren, die effektiv und möglichst spezifisch die Produktion neuroprotektiver bzw. neurotropher Faktoren im ZNS fördern.

5 Zusammenfassung

Multiple Sklerose (MS, *Encephalomyelitis disseminata*) ist die häufigste neurologische Ursache für eine bereits im jungen Erwachsenenalter erworbene körperliche Behinderung. Die MS zählt zu den Autoimmunerkrankungen und ist neuropathologisch gekennzeichnet durch entzündliche Veränderungen (Plaques) im zentralen Nervensystem (ZNS), insbesondere der weißen Substanz. Die Ätiologie der MS ist unbekannt und die Pathogenese bisher nicht vollständig geklärt. Der Krankheitsverlauf kann durch verschiedene Medikamente positiv, aber nicht nachhaltig beeinflusst werden, eine kurative Therapie steht nicht zur Verfügung. Ein vielversprechender Ansatz liegt in der Förderung neuroregenerativer bzw. neuroprotektiver Prozesse.

Seit März 2011 hat Fingolimod (FTY-720) in der Europäischen Union einen festen Platz in der verlaufsmodifizierenden Therapie der hochaktiven, schubförmigen MS. Fingolimod ähnelt strukturell dem physiologisch vorkommenden Sphingosin-1-phosphat (S1P) und bindet wie dieses in phosphorylierter Form (FTY-P) an G-Protein-gekoppelte S1P-Rezeptoren. S1P-Rezeptoren werden auf vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert und beeinflussen bei Bindung eines Liganden u. a. Proliferation, Differenzierung, Migration und das Überleben.

Es existieren Hinweise darauf, dass Fingolimod neben seiner Wirkung auf Immunzellen auch Einfluss auf die Zellen des zentralen Nervensystems ausübt und dadurch direkte neuroprotektive Effekte vermittelt. Welche Faktoren im einzelnen hieran beteiligt sein könnten, ist bisher nicht geklärt. Demgegenüber ist bekannt, dass Astrozyten, welche die größte Zellpopulation im ZNS darstellen, unter pathologischen Bedingungen Substanzen mit neurotrophen bzw. neuroprotektiven Eigenschaften sezernieren.

Die vorliegende Arbeit hat sich daher zum Ziel gesetzt, die Effekte des MS-Therapeutikums Fingolimod und S1P auf primäre, humane Astrozyten genauer zu untersuchen, um schließlich mit Hilfe der Microarray-Technologie die Frage beantworten zu können, ob bei Stimulation von Astrozyten mit den beiden genannten S1P-Rezeptorliganden Faktoren exprimiert werden, die potentiell regenerative Prozesse im ZNS fördern können. Etabliert wurden die entsprechenden Versuchsbedingungen anhand von Modellzelllinien, einer Astrozytomzelllinie (U373 MG, Glioblastom WHO Grad IV) und Vorhautfibroblasten (HFF, *human foreskin fibroblasts*), die humanen Astrozyten in gewissen Merkmalen ähnlich sind.

Die genomweite Expressionsanalyse der mit S1P oder FTY-P stimulierten humanen Astrozyten ergab vor dem Hintergrund der Neuroprotektion und -regeneration vier Kandidatengene, die anhand der *Real-Time* PCR validiert wurden. Es handelt sich hierbei um die neurotrophen Faktoren HB-EGF, IL-11, LIF und FGF2. Als Wachstumsfaktoren (HB-EGF, FGF2) bzw. Zytokine (IL-11, LIF) sind sie an der Neubildung von Nervenzellen aus neuronalen Stammzellen (Neurogenese) beteiligt und fördern sowohl die axonale Regeneration nach Verletzung des ZNS, als auch das Überleben von Neuronen nach hypoxischen Zuständen. Besonders bedeutend im Rahmen der MS ist die Tatsache, dass sie maßgeblich am Prozess der Remyelinisierung beteiligt sind.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen die Hypothese zu, dass Astrozyten nach Kontakt mit S1P oder dem biologisch aktiven Metaboliten des MS-Therapeutikums Fingolimod (FTY-P) beginnen, neurotrophe Faktoren zu bilden, die das umliegende neuronale Gewebe vor dem Zelluntergang schützt (Neuroprotektion), die Neubildung von Neuronen fördert (Neurogenese) und im Bereich von MS-Plaques womöglich eine wichtige Rolle bei der Remyelinisierung spielen. Hervorgehoben wird dabei die Rolle der S1P-Rezeptoren als potenziell therapeutisch nutzbarer Angriffspunkt im Rahmen der MS oder auch anderen Erkrankungen, die mit einer Schädigung des ZNS einhergehen.

6 Literaturverzeichnis

Albrecht, P.J., Murtie, J.C., Ness, J.K., Redwine, J.M., Enterline, J.R., Armstrong, R.C., Levison, S.W.

Astrocytes produce CNTF during the remyelination phase of viral-induced spinal cord demyelination to stimulate FGF-2 production.

Neurobiol. Dis. 13 (2003) 89-101

Aloisi, F., Borsellino, G., Samoggia, P., Testa, U., Chelucci, C., Russo, G., Peschle, C., Levi, G.

Astrocyte cultures from human embryonic brain: characterization and modulation of surface molecules by inflammatory cytokines.

J. Neurosci. Res. 32 (1992) 494-506

Alvarez, S.E., Harikumar, K.B., Hait, N.C., Allegood, J., Strub, G.M., Kim, E.Y., Maceyka, M., Jiang, H., Luo, C., Kordula, T., Milstien, S., Spiegel, S.

Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2.

Nature. 465 (2010) 1084-1088

Anderson, G., Maes, M.

Reconceptualizing adult neurogenesis: role for sphingosine-1-phosphate and fibroblast growth factor-1 in co-ordinating astrocyte-neuronal precursor interactions.

CNS Neurol. Disord. Drug Targets. 13 (2014) 126-136

Anelli, V., Bassi, R., Tettamanti, G., Viani, P., Riboni, L.

Extracellular release of newly synthesized sphingosine-1-phosphate by cerebellar granule cells and astrocytes.

J. Neurochem. 92 (2005) 1204-1215

Ascherio, A., Munger, K.L.

Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection.

Ann. Neurol. 61 (2007a) 288-299

Ascherio, A., Munger, K.L.

Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors.

Ann. Neurol. 61 (2007b) 504-513

Banner, L.R., Moayeri, N.N., Patterson, P.H.

Leukemia inhibitory factor is expressed in astrocytes following cortical brain injury.

Exp. Neurol. 147 (1997) 1-9

Baranzini, S.E., Elfstrom, C., Chang, S.Y., Butunoi, C., Murray, R., Higuchi, R., Oksenberg, J.R.

Transcriptional analysis of multiple sclerosis brain lesions reveals a complex pattern of cytokine expression.

J. Immunol. 165 (2000) 6576-6582

- Barkhof, F., Calabresi, P.A., Miller, D.H., Reingold, S.C.
Imaging outcomes for neuroprotection and repair in multiple sclerosis trials.
Nat. Rev. Neurol. 5 (2009) 256-266
- Barnett, S.C., Linington, C.
Myelination: Do Astrocytes Play a Role?
Neuroscientist. (2012)
- Barreto, G., White, R.E., Ouyang, Y., Xu, L., Giffard, R.G.
Astrocytes: targets for neuroprotection in stroke.
Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem. 11 (2011) 164-173
- Bartus, R.T.
Translating the therapeutic potential of neurotrophic factors to clinical 'proof of concept': a personal saga achieving a career-long quest.
Neurobiol. Dis. 48 (2012) 153-178
- Berger, A., Bittman, R., Schmidt, R.R., Spiegel, S.
Structural requirements of sphingosylphosphocholine and sphingosine-1-phosphate for stimulation of activator protein-1 activity.
Mol. Pharmacol. 50 (1996) 451-457
- Billich, A., Bornancin, F., Devay, P., Mechtcheriakova, D., Urtz, N., Baumruker, T.
Phosphorylation of the immunomodulatory drug FTY720 by sphingosine kinases.
J. Biol. Chem. 278 (2003) 47408-47415
- Blesch, A., Uy, H.S., Grill, R.J., Cheng, J.G., Patterson, P.H., Tuszynski, M.H.
Leukemia inhibitory factor augments neurotrophin expression and corticospinal axon growth after adult CNS injury.
J. Neurosci. 19 (1999) 3556-3566
- Bomprezzi, R.
Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: an overview.
Ther. Adv. Neurol. Disord. 8 (2015) 20-30
- Brinkmann, V.
Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology.
Pharmacol. Ther. 115 (2007) 84-105
- Brinkmann, V.
FTY720 (fingolimod) in Multiple Sclerosis: therapeutic effects in the immune and the central nervous system.
Br. J. Pharmacol. 158 (2009) 1173-1182
- Brinkmann, V., Billich, A., Baumruker, T., Heining, P., Schmouder, R., Francis, G., Aradhye, S., Burtin, P.
Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis.
Nature reviews. Drug discovery. 9 (2010) 883-897

- Bryan, L., Kordula, T., Spiegel, S., Milstien, S.
Regulation and functions of sphingosine kinases in the brain.
Biochim. Biophys. Acta. 1781 (2008) 459-466
- Butzkueven, H., Zhang, J.G., Soilu-Hanninen, M., Hochrein, H., Chionh, F., Shipham, K.A., Emery, B., Turnley, A.M., Petratos, S., Ernst, M., Bartlett, P.F., Kilpatrick, T.J.
LIF receptor signaling limits immune-mediated demyelination by enhancing oligodendrocyte survival.
Nat. Med. 8 (2002) 613-619
- Cannella, B., Raine, C.S.
The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions.
Ann. Neurol. 37 (1995) 424-435
- Casetta, I., Iuliano, G., Filippini, G.
Azathioprine for multiple sclerosis.
The Cochrane database of systematic reviews. (2007) CD003982
- Cecom, J., Loukh, N., Lauwers-Cances, V., Touriol, C., Nicaise, Y., Gentil, C., Uro-Coste, E., Pitson, S., Maurage, C.A., Duyckaerts, C., Cuvillier, O., Delisle, M.B.
Reduced sphingosine kinase-1 and enhanced sphingosine 1-phosphate lyase expression demonstrate deregulated sphingosine 1-phosphate signaling in Alzheimer's disease.
Acta neuropathologica communications. 2 (2014) 12
- Choi, J.W., Gardell, S.E., Herr, D.R., Rivera, R., Lee, C.W., Noguchi, K., Teo, S.T., Yung, Y.C., Lu, M., Kennedy, G., Chun, J.
FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108 (2011) 751-756
- Coelho, R.P., Payne, S.G., Bittman, R., Spiegel, S., Sato-Bigbee, C.
The immunomodulator FTY720 has a direct cytoprotective effect in oligodendrocyte progenitors.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 323 (2007) 626-635
- Cohen, B.A., Rieckmann, P.
Emerging oral therapies for multiple sclerosis.
Int. J. Clin. Pract. 61 (2007) 1922-1930
- Cohen, J.A., Barkhof, F., Comi, G., Hartung, H.P., Khatri, B.O., Montalban, X., Pelletier, J., Capra, R., Gallo, P., Izquierdo, G., Tiel-Wilck, K., de Vera, A., Jin, J., Stites, T., Wu, S., Aradhye, S., Kappos, L.
Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis.
N. Engl. J. Med. 362 (2010) 402-415
- Cohen, J.A., Chun, J.
Mechanisms of fingolimod's efficacy and adverse effects in multiple sclerosis.
Ann. Neurol. 69 (2011) 759-777

- Comi, G., Filippi, M., Barkhof, F., Durelli, L., Edan, G., Fernandez, O., Hartung, H., Seeldrayers, P., Sorensen, P.S., Rovaris, M., Martinelli, V., Hommes, O.R.
Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study.
Lancet. 357 (2001) 1576-1582
- Compston, A., Coles, A.
Multiple sclerosis.
Lancet. 359 (2002) 1221-1231
- Couttas, T.A., Kain, N., Daniels, B., Lim, X.Y., Shepherd, C., Kril, J., Pickford, R., Li, H., Garner, B., Don, A.S.
Loss of the neuroprotective factor Sphingosine 1-phosphate early in Alzheimer's disease pathogenesis.
Acta neuropathologica communications. 2 (2014) 9
- Covey, M.V., Levison, S.W.
Leukemia inhibitory factor participates in the expansion of neural stem/progenitors after perinatal hypoxia/ischemia.
Neuroscience. 148 (2007) 501-509
- Dehghan, S., Javan, M., Pourabdolhossein, F., Mirnajafi-Zadeh, J., Baharvand, H.
Basic fibroblast growth factor potentiates myelin repair following induction of experimental demyelination in adult mouse optic chiasm and nerves.
J. Mol. Neurosci. 48 (2012) 77-85
- Derfuss, T., Parikh, K., Velhin, S., Braun, M., Mathey, E., Krumbholz, M., Kumpfel, T., Moldenhauer, A., Rader, C., Sonderegger, P., Pollmann, W., Tiefenthaller, C., Bauer, J., Lassmann, H., Wekerle, H., Karagogeos, D., Hohlfeld, R., Linington, C., Meinl, E.
Contactin-2/TAG-1-directed autoimmunity is identified in multiple sclerosis patients and mediates gray matter pathology in animals.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106 (2009) 8302-8307
- Dev, K.K., Mullershausen, F., Mattes, H., Kuhn, R.R., Bilbe, G., Hoyer, D., Mir, A.
Brain sphingosine-1-phosphate receptors: implication for FTY720 in the treatment of multiple sclerosis.
Pharmacol. Ther. 117 (2008) 77-93
- Farina, C., Aloisi, F., Meinl, E.
Astrocytes are active players in cerebral innate immunity.
Trends Immunol. 28 (2007) 138-145
- Fischer, I., Alliod, C., Martinier, N., Newcombe, J., Brana, C., Pouly, S.
Sphingosine kinase 1 and sphingosine 1-phosphate receptor 3 are functionally upregulated on astrocytes under pro-inflammatory conditions.
PLoS One. 6 (2011) e23905

- Foster, C.A., Howard, L.M., Schweitzer, A., Persohn, E., Hiestand, P.C., Balatoni, B., Reuschel, R., Beerli, C., Schwartz, M., Billich, A.
Brain penetration of the oral immunomodulatory drug FTY720 and its phosphorylation in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis: consequences for mode of action in multiple sclerosis.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 323 (2007) 469-475
- Franklin, R.J.
Why does remyelination fail in multiple sclerosis?
Nat. Rev. Neurosci. 3 (2002) 705-714
- Fugger, L., Friese, M.A., Bell, J.I.
From genes to function: the next challenge to understanding multiple sclerosis.
Nat. Rev. Immunol. 9 (2009) 408-417
- Grin'kina, N.M., Karnabi, E.E., Damania, D., Wadgaonkar, S., Muslimov, I.A., Wadgaonkar, R.
Sphingosine kinase 1 deficiency exacerbates LPS-induced neuroinflammation.
PLoS One. 7 (2012) e36475
- Groves, A., Kihara, Y., Chun, J.
Fingolimod: direct CNS effects of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor modulation and implications in multiple sclerosis therapy.
J. Neurol. Sci. 328 (2013) 9-18
- Gurfein, B.T., Zhang, Y., Lopez, C.B., Argaw, A.T., Zameer, A., Moran, T.M., John, G.R.
IL-11 regulates autoimmune demyelination.
J. Immunol. 183 (2009) 4229-4240
- Hait, N.C., Oskeritzian, C.A., Paugh, S.W., Milstien, S., Spiegel, S.
Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases.
Biochim. Biophys. Acta. 1758 (2006) 2016-2026
- Hannun, Y.A., Obeid, L.M.
Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids.
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9 (2008) 139-150
- Hartung, H.P., Aktas, O., Boyko, A.N.
Alemtuzumab: A new therapy for active relapsing-remitting multiple sclerosis.
Mult. Scler. (2014)
- Herr, D.R., Chun, J.
Effects of LPA and S1P on the nervous system and implications for their involvement in disease.
Curr. Drug Targets. 8 (2007) 155-167
- Holmoy, T., Hestvik, A.L.
Multiple sclerosis: immunopathogenesis and controversies in defining the cause.
Curr. Opin. Infect. Dis. 21 (2008) 271-278

- Hopson, K.P., Truelove, J., Chun, J., Wang, Y., Waeber, C.
S1P activates store-operated calcium entry via receptor- and non-receptor-mediated pathways in vascular smooth muscle cells.
Am. J. Physiol. Cell Physiol. 300 (2011) C919-926
- Hurwitz, B.J.
Analysis of current multiple sclerosis registries.
Neurology. 76 (2011) S7-13
- Ishibashi, T., Dakin, K.A., Stevens, B., Lee, P.R., Kozlov, S.V., Stewart, C.L., Fields, R.D.
Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses.
Neuron. 49 (2006) 823-832
- Jaillard, C., Harrison, S., Stankoff, B., Aigrot, M.S., Calver, A.R., Duddy, G., Walsh, F.S., Pangalos, M.N., Arimura, N., Kaibuchi, K., Zalc, B., Lubetzki, C.
Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival.
J. Neurosci. 25 (2005) 1459-1469
- Jin, K., LaFevre-Bernt, M., Sun, Y., Chen, S., Gafni, J., Crippen, D., Logvinova, A., Ross, C.A., Greenberg, D.A., Ellerby, L.M.
FGF-2 promotes neurogenesis and neuroprotection and prolongs survival in a transgenic mouse model of Huntington's disease.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102 (2005) 18189-18194
- Jin, K., Mao, X.O., Sun, Y., Xie, L., Jin, L., Nishi, E., Klagsbrun, M., Greenberg, D.A.
Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor: hypoxia-inducible expression in vitro and stimulation of neurogenesis in vitro and in vivo.
J. Neurosci. 22 (2002) 5365-5373
- Johnson, K.P., Brooks, B.R., Cohen, J.A., Ford, C.C., Goldstein, J., Lisak, R.P., Myers, L.W., Panitch, H.S., Rose, J.W., Schiffer, R.B., Vollmer, T., Weiner, L.P., Wolinsky, J.S.
Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group.
Neurology. 50 (1998) 701-708
- Kappos, L., Radue, E.W., O'Connor, P., Polman, C., Hohlfeld, R., Calabresi, P., Selmaj, K., Agoropoulou, C., Leyk, M., Zhang-Auberson, L., Burtin, P.
A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis.
N. Engl. J. Med. 362 (2010) 387-401
- Kieseier, B.C., Hemmer, B., Hartung, H.P.
Multiple sclerosis--novel insights and new therapeutic strategies.
Curr. Opin. Neurol. 18 (2005) 211-220
- Kimura, A., Ohmori, T., Ohkawa, R., Madoiwa, S., Mimuro, J., Murakami, T., Kobayashi, E., Hoshino, Y., Yatomi, Y., Sakata, Y.
Essential roles of sphingosine 1-phosphate/S1P1 receptor axis in the migration of neural stem cells toward a site of spinal cord injury.
Stem Cells. 25 (2007) 115-124

Knapska, E., Kaczmarek, L.

A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK?

Prog. Neurobiol. 74 (2004) 183-211

Krumbholz, M., Derfuss, T., Hohlfeld, R., Meinl, E.

B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy.

Nat. Rev. Neurol. 8 (2012) 613-623

Leadbeater, W.E., Gonzalez, A.M., Logaras, N., Berry, M., Turnbull, J.E., Logan, A.

Intracellular trafficking in neurones and glia of fibroblast growth factor-2, fibroblast growth factor receptor 1 and heparan sulphate proteoglycans in the injured adult rat cerebral cortex.

J. Neurochem. 96 (2006) 1189-1200

Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., Lassmann, H.

Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination.

Ann. Neurol. 47 (2000) 707-717

Malchinkhuu, E., Sato, K., Muraki, T., Ishikawa, K., Kuwabara, A., Okajima, F.

Assessment of the role of sphingosine 1-phosphate and its receptors in high-density lipoprotein-induced stimulation of astroglial cell function.

Biochem. J. 370 (2003) 817-827

Matloubian, M., Lo, C.G., Cinamon, G., Lesneski, M.J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M.L., Proia, R.L., Cyster, J.G.

Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1.

Nature. 427 (2004) 355-360

Mayer, M.C., Meinl, E.

Glycoproteins as targets of autoantibodies in CNS inflammation: MOG and more.

Ther. Adv. Neurol. Disord. 5 (2012) 147-159

McDonald, W.I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H.P., Lublin, F.D., McFarland, H.F., Paty, D.W., Polman, C.H., Reingold, S.C., Sandberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., van den Noort, S., Weinshenker, B.Y., Wolinsky, J.S.

Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis.

Ann. Neurol. 50 (2001) 121-127

McKinnon, R.D., Matsui, T., Dubois-Dalcq, M., Aaronson, S.A.

FGF modulates the PDGF-driven pathway of oligodendrocyte development.

Neuron. 5 (1990) 603-614

Mehling, M., Brinkmann, V., Antel, J., Bar-Or, A., Goebels, N., Vedrine, C., Kristofic, C., Kuhle, J., Lindberg, R.L., Kappos, L.

FTY720 therapy exerts differential effects on T cell subsets in multiple sclerosis.

Neurology. 71 (2008) 1261-1267

- Mehling, M., Johnson, T.A., Antel, J., Kappos, L., Bar-Or, A.
Clinical immunology of the sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis.
Neurology. 76 (2011) S20-27
- Mendelson, K., Evans, T., Hla, T.
Sphingosine 1-phosphate signalling.
Development. 141 (2014) 5-9
- Messersmith, D.J., Murtie, J.C., Le, T.Q., Frost, E.E., Armstrong, R.C.
Fibroblast growth factor 2 (FGF2) and FGF receptor expression in an experimental demyelinating disease with extensive remyelination.
J. Neurosci. Res. 62 (2000) 241-256
- Meyer zu Heringdorf, D., Liliom, K., Schaefer, M., Danneberg, K., Jaggar, J.H., Tigyi, G., Jakobs, K.H.
Photolysis of intracellular caged sphingosine-1-phosphate causes Ca²⁺ mobilization independently of G-protein-coupled receptors.
FEBS Lett. 554 (2003) 443-449
- Miller, D.H., Soon, D., Fernando, K.T., MacManus, D.G., Barker, G.J., Yousry, T.A., Fisher, E., O'Connor, P.W., Phillips, J.T., Polman, C.H., Kappos, L., Hutchinson, M., Havrdova, E., Lublin, F.D., Giovannoni, G., Wajgt, A., Rudick, R., Lynn, F., Panzara, M.A., Sandrock, A.W.
MRI outcomes in a placebo-controlled trial of natalizumab in relapsing MS.
Neurology. 68 (2007) 1390-1401
- Milo, R., Kahana, E.
Multiple sclerosis: geoeidemiology, genetics and the environment.
Autoimmunity reviews. 9 (2010) A387-394
- Miron, V.E., Schubart, A., Antel, J.P.
Central nervous system-directed effects of FTY720 (fingolimod).
J. Neurol. Sci. 274 (2008) 13-17
- Mizugishi, K., Yamashita, T., Olivera, A., Miller, G.F., Spiegel, S., Proia, R.L.
Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development.
Mol. Cell. Biol. 25 (2005) 11113-11121
- Mudo, G., Bonomo, A., Di Liberto, V., Frinchi, M., Fuxe, K., Belluardo, N.
The FGF-2/FGFRs neurotrophic system promotes neurogenesis in the adult brain.
J. Neural Transm. 116 (2009) 995-1005
- Mullershausen, F., Craveiro, L.M., Shin, Y., Cortes-Cros, M., Bassilana, F., Osinde, M., Wishart, W.L., Guerini, D., Thallmair, M., Schwab, M.E., Sivasankaran, R., Seuwen, K., Dev, K.K.
Phosphorylated FTY720 promotes astrocyte migration through sphingosine-1-phosphate receptors.
J. Neurochem. 102 (2007) 1151-1161

- Mullershausen, F., Zecri, F., Cetin, C., Billich, A., Guerini, D., Seuwen, K.
Persistent signaling induced by FTY720-phosphate is mediated by internalized S1P1 receptors.
Nat. Chem. Biol. 5 (2009) 428-434
- Nakagawa, T., Sasahara, M., Hayase, Y., Haneda, M., Yasuda, H., Kikkawa, R., Higashiyama, S., Hazama, F.
Neuronal and glial expression of heparin-binding EGF-like growth factor in central nervous system of prenatal and early-postnatal rat.
Brain Res. Dev. Brain Res. 108 (1998) 263-272
- Nishimura, H., Akiyama, T., Irei, I., Hamazaki, S., Sadahira, Y.
Cellular localization of sphingosine-1-phosphate receptor 1 expression in the human central nervous system.
J. Histochem. Cytochem. 58 (2010) 847-856
- Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Weinshenker, B.G.
Multiple sclerosis.
N. Engl. J. Med. 343 (2000) 938-952
- O'Connor, P., Wolinsky, J.S., Confavreux, C., Comi, G., Kappos, L., Olsson, T.P., Benzerdjeb, H., Truffinet, P., Wang, L., Miller, A., Freedman, M.S., Group, T.T.
Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis.
N. Engl. J. Med. 365 (2011) 1293-1303
- Obinata, H., Hla, T.
Sphingosine 1-phosphate in coagulation and inflammation.
Semin. Immunopathol. 34 (2012) 73-91
- Olivera, A., Allende, M.L., Proia, R.L.
Shaping the landscape: metabolic regulation of S1P gradients.
Biochim. Biophys. Acta. 1831 (2013) 193-202
- Olivera, A., Spiegel, S.
Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens.
Nature. 365 (1993) 557-560
- Opanashuk, L.A., Mark, R.J., Porter, J., Damm, D., Mattson, M.P., Seroogy, K.B.
Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in hippocampus: modulation of expression by seizures and anti-excitotoxic action.
J. Neurosci. 19 (1999) 133-146
- Osinde, M., Mullershausen, F., Dev, K.K.
Phosphorylated FTY720 stimulates ERK phosphorylation in astrocytes via S1P receptors.
Neuropharmacology. 52 (2007) 1210-1218

- Papadopoulos, D., Rundle, J., Patel, R., Marshall, I., Stretton, J., Eaton, R., Richardson, J.C., Gonzalez, M.I., Philpott, K.L., Reynolds, R.
FTY720 ameliorates MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing both cellular and humoral immune responses.
J. Neurosci. Res. 88 (2010) 346-359
- Patrikios, P., Stadelmann, C., Kutzelnigg, A., Rauschka, H., Schmidbauer, M., Laursen, H., Sorensen, P.S., Bruck, W., Lucchinetti, C., Lassmann, H.
Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients.
Brain. 129 (2006) 3165-3172
- Paugh, S.W., Payne, S.G., Barbour, S.E., Milstien, S., Spiegel, S.
The immunosuppressant FTY720 is phosphorylated by sphingosine kinase type 2.
FEBS Lett. 554 (2003) 189-193
- Peabay, A., Toutant, M., Premont, J., Calvo, C.F., Venance, L., Cordier, J., Glowinski, J., Tence, M.
Sphingosine-1-phosphate induces proliferation of astrocytes: regulation by intracellular signalling cascades.
Eur. J. Neurosci. 13 (2001) 2067-2076
- Pezet, S., McMahon, S.B.
Neurotrophins: mediators and modulators of pain.
Annu. Rev. Neurosci. 29 (2006) 507-538
- Pineau, I., Lacroix, S.
Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved.
J. Comp. Neurol. 500 (2007) 267-285
- Polman, C.H., O'Connor, P.W., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Miller, D.H., Phillips, J.T., Lublin, F.D., Giovannoni, G., Wajgt, A., Toal, M., Lynn, F., Panzara, M.A., Sandrock, A.W., Investigators, A.
A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis.
N. Engl. J. Med. 354 (2006) 899-910
- Polman, C.H., Reingold, S.C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J.A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Lublin, F.D., Montalban, X., O'Connor, P., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A.J., Waubant, E., Weinschenker, B., Wolinsky, J.S.
Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria.
Ann. Neurol. 69 (2011) 292-302
- Radue, E.W., O'Connor, P., Polman, C.H., Hohlfeld, R., Calabresi, P., Selmaj, K., Mueller-Lenke, N., Agoropoulou, C., Holdbrook, F., de Vera, A., Zhang-Auberson, L., Francis, G., Burtin, P., Kappos, L., Group, F.T.Y.R.E.E.o.D.O.T.i.M.S.S.
Impact of fingolimod therapy on magnetic resonance imaging outcomes in patients with multiple sclerosis.
Arch. Neurol. 69 (2012) 1259-1269

- Rao, T.S., Lariosa-Willingham, K.D., Lin, F.F., Palfreyman, E.L., Yu, N., Chun, J., Webb, M.
Pharmacological characterization of lysophospholipid receptor signal transduction pathways in rat cerebrocortical astrocytes.
Brain Res. 990 (2003) 182-194
- Rao, T.S., Lariosa-Willingham, K.D., Lin, F.F., Yu, N., Tham, C.S., Chun, J., Webb, M.
Growth factor pre-treatment differentially regulates phosphoinositide turnover downstream of lysophospholipid receptor and metabotropic glutamate receptors in cultured rat cerebrocortical astrocytes.
Int. J. Dev. Neurosci. 22 (2004) 131-135
- Rodriguez, M.
A function of myelin is to protect axons from subsequent injury: implications for deficits in multiple sclerosis.
Brain. 126 (2003) 751-752
- Rohowsky-Kochan, C., Molinaro, D., Cook, S.D.
Cytokine secretion profile of myelin basic protein-specific T cells in multiple sclerosis.
Mult. Scler. 6 (2000) 69-77
- Rosen, H., Gonzalez-Cabrera, P.J., Sanna, M.G., Brown, S.
Sphingosine 1-phosphate receptor signaling.
Annu. Rev. Biochem. 78 (2009) 743-768
- Ruozi, B., Belletti, D., Bondioli, L., De Vita, A., Forni, F., Vandelli, M.A., Tosi, G.
Neurotrophic factors and neurodegenerative diseases: a delivery issue.
Int. Rev. Neurobiol. 102 (2012) 207-247
- Sartori, A., Carle, D., Freedman, M.S.
Teriflunomide: a novel oral treatment for relapsing multiple sclerosis.
Expert Opin. Pharmacother. 15 (2014) 1019-1027
- Sato, K., Ishikawa, K., Ui, M., Okajima, F.
Sphingosine 1-phosphate induces expression of early growth response-1 and fibroblast growth factor-2 through mechanism involving extracellular signal-regulated kinase in astroglial cells.
Brain Res. Mol. Brain Res. 74 (1999) 182-189
- Sawcer, S., Franklin, R.J., Ban, M.
Multiple sclerosis genetics.
Lancet Neurol. 13 (2014) 700-709
- Silverman, E.S., Collins, T.
Pathways of Egr-1-mediated gene transcription in vascular biology.
Am. J. Pathol. 154 (1999) 665-670
- Slaets, H., Hendriks, J.J., Stinissen, P., Kilpatrick, T.J., Hellings, N.
Therapeutic potential of LIF in multiple sclerosis.
Trends Mol. Med. 16 (2010) 493-500

- Sorensen, S.D., Nicole, O., Peavy, R.D., Montoya, L.M., Lee, C.J., Murphy, T.J., Traynelis, S.F., Hepler, J.R.
Common signaling pathways link activation of murine PAR-1, LPA, and SIP receptors to proliferation of astrocytes.
Mol. Pharmacol. 64 (2003) 1199-1209
- Spiegel, S., Milstien, S.
Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid.
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4 (2003) 397-407
- Spiegel, S., Milstien, S.
The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity.
Nat. Rev. Immunol. 11 (2011) 403-415
- Spohr, T.C., Dezone, R.S., Nones, J., Dos Santos Souza, C., Einicker-Lamas, M., Gomes, F.C., Rehen, S.K.
Sphingosine 1-phosphate-primed astrocytes enhance differentiation of neuronal progenitor cells.
J. Neurosci. Res. 90 (2012) 1892-1902
- Stangel, M., Fredrikson, S., Meinl, E., Petzold, A., Stuve, O., Tumani, H.
The utility of cerebrospinal fluid analysis in patients with multiple sclerosis.
Nat. Rev. Neurol. 9 (2013) 267-276
- Steinman, L.
Immunology of relapse and remission in multiple sclerosis.
Annu. Rev. Immunol. 32 (2014) 257-281
- Strochlic, L., Dwivedy, A., van Horck, F.P., Falk, J., Holt, C.E.
A role for SIP signalling in axon guidance in the *Xenopus* visual system.
Development. 135 (2008) 333-342
- Sugiura, S., Kitagawa, K., Tanaka, S., Todo, K., Omura-Matsuoka, E., Sasaki, T., Mabuchi, T., Matsushita, K., Yagita, Y., Hori, M.
Adenovirus-mediated gene transfer of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor enhances neurogenesis and angiogenesis after focal cerebral ischemia in rats.
Stroke. 36 (2005) 859-864
- Suzuki, S., Yamashita, T., Tanaka, K., Hattori, H., Sawamoto, K., Okano, H., Suzuki, N.
Activation of cytokine signaling through leukemia inhibitory factor receptor (LIFR)/gp130 attenuates ischemic brain injury in rats.
J. Cereb. Blood Flow Metab. 25 (2005) 685-693
- Takabe, K., Paugh, S.W., Milstien, S., Spiegel, S.
"Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets.
Pharmacol. Rev. 60 (2008) 181-195
- Tzartos, J.S., Friese, M.A., Craner, M.J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M.M., Fugger, L.
Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis.
Am. J. Pathol. 172 (2008) 146-155

- Van Brocklyn, J.R., Lee, M.J., Menzeleev, R., Olivera, A., Edsall, L., Cuvillier, O., Thomas, D.M., Coopman, P.J., Thangada, S., Liu, C.H., Hla, T., Spiegel, S.
Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival.
J. Cell Biol. 142 (1998) 229-240
- Van Doorn, R., Van Horssen, J., Verzijl, D., Witte, M., Ronken, E., Van Het Hof, B., Lakeman, K., Dijkstra, C.D., Van Der Valk, P., Reijerkerk, A., Alewijnse, A.E., Peters, S.L., De Vries, H.E.
Sphingosine 1-phosphate receptor 1 and 3 are upregulated in multiple sclerosis lesions.
Glia. 58 (2010) 1465-1476
- Wang, C., Jie, C., Dai, X.
Possible roles of astrocytes in estrogen neuroprotection during cerebral ischemia.
Rev. Neurosci. (2014)
- Williams, A., Piaton, G., Lubetzki, C.
Astrocytes--friends or foes in multiple sclerosis?
Glia. 55 (2007) 1300-1312
- Willis, M.A., Cohen, J.A.
Fingolimod therapy for multiple sclerosis.
Semin. Neurol. 33 (2013) 37-44
- Wu, C., Leong, S.Y., Moore, C.S., Cui, Q.L., Gris, P., Bernier, L.P., Johnson, T.A., Seguela, P., Kennedy, T.E., Bar-Or, A., Antel, J.P.
Dual effects of daily FTY720 on human astrocytes in vitro: relevance for neuroinflammation.
J. Neuroinflammation. 10 (2013) 41
- Zhang, Y., Taveggia, C., Melendez-Vasquez, C., Einheber, S., Raine, C.S., Salzer, J.L., Brosnan, C.F., John, G.R.
Interleukin-11 potentiates oligodendrocyte survival and maturation, and myelin formation.
J. Neurosci. 26 (2006) 12174-12185
- Zivadinov, R., Reder, A.T., Filippi, M., Minagar, A., Stuve, O., Lassmann, H., Racke, M.K., Dwyer, M.G., Frohman, E.M., Khan, O.
Mechanisms of action of disease-modifying agents and brain volume changes in multiple sclerosis.
Neurology. 71 (2008) 136-144

7 Verzeichnis der Abkürzungen

ABC	<i>ATP binding cassette</i>
Akt	Synonym für Proteinkinase B
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
β-ME	β-Mercaptoethanol
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
DMDs	<i>disease modifying drugs</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSG	Deutschen Multiple Sklerose Gesellschaft
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAE	<i>experimental autoimmune encephalomyelitis</i>
ED	Encephalomyelitis disseminata
EDSS	<i>expanded disability status scale</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGR1	<i>early growth response protein 1</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FGF2	<i>fibroblast growth factor 2</i>
FLAIR	<i>fluid attenuated inversion recovery</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
HB-EGF	<i>heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor</i>
HFF	<i>human foreskin fibroblasts</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
IL-11	Interleukin 11
INF	Interferon
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LOWESS	<i>locally weighted scatterplot smoothing</i>
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MBP	<i>myelin basic protein</i>

MOG	<i>myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NGF	<i>nerve growth factor</i>
OKB	oligoklonale Banden
OPCs	<i>oligodendrocyte precursor cells</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (dt. Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
Pi3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLP	Proteolipidprotein
PPIA	Peptidylprolyl-Isomerase A (Cyclophilin A)
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S	Sphingosin
S1P	Sphingosin-1-phosphat
S1PR	Sphingosin-1-phosphat Rezeptor
SGPP	Sphingosin-Phosphatase
SphK	Sphingosin-Kinase
SpL	Sphingosin-Lyase
SRF	<i>serum response factor</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor-beta</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-alpha</i>
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VLA	<i>very late antigen</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 Publikationen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf folgenden Kongressen in Form eines Vortrags oder Posters vorgestellt und als Abstract veröffentlicht:

Hoffmann F, **Hofereiter J**, Rübsamen H, Faber H, Weber P, Pütz B, Weber F, Hohlfeld R, Meinl E, Krumbholz M

Fingolimod stimulates neuroprotective capacity of human astrocytes

Vortrag auf dem 87. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie – DGN, 15.-19. September 2014, München

Hoffmann F, **Hofereiter J**, Rübsamen H, Faber H, Weber P, Pütz B, Weber F, Hohlfeld R, Meinl E, Krumbholz M

Effects of fingolimod treatment on astrocyte functions

Poster auf dem “29th Congress of the European Committee for Research and Treatment in Multiple Sclerosis (ECTRIMS)“, 2.-5. Oktober 2013 in Kopenhagen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen im Rahmen einer Originalarbeit zur Publikation eingereicht:

Hoffmann F, **Hofereiter J**, Rübsamen H, Faber H, Weber P, Pütz B, Weber F, Hohlfeld R, Meinl E, Krumbholz M

Fingolimod stimulates neuroprotective capacity of human astrocytes

(submitted)

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen meinen Dank aussprechen, die maßgeblich an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren und mich während dieser Zeit persönlich unterstützt haben.

Ganz herzlich danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Edgar Meinl, für die großzügige Aufnahme in seine Arbeitsgruppe am Max-Planck-Institut für Neurobiologie und die Überlassung dieser spannenden Thematik. Überaus geschätzt habe ich während der Zeit am Institut seine stetige persönliche Präsenz und Gesprächsbereitschaft sowie die Toleranz gegenüber eigenen Ideen.

Herrn Prof. Dr. med. Reinhard Hohlfeld, Direktor des Instituts für klinische Neuroimmunologie der Universität München (LMU), sowie Herrn Prof. Dr. med. Hartmut Wekerle, emeritierter Direktor der Abteilung Neuroimmunologie des Max-Planck-Instituts für Neurobiologie, danke ich in gleichem Maße für die Möglichkeit an ihren Instituten in einem herausragenden wissenschaftlichen Umfeld arbeiten und lernen zu dürfen.

Bedanken möchte ich mich sehr bei meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Markus Krumbholz, der für eine von Grund auf solide Einführung in die experimentellen Arbeitstechniken sorgte, mich auf die Fallstricke der angewandten Methoden aufmerksam machte und während aller Phasen der Doktorarbeit den erforderlichen Raum für Beratung und Diskussion bot.

Danken möchte ich auch allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, als auch den Institutsmitgliedern für den ausgesprochen kollegialen Umgang miteinander und für die beständige Hilfsbereitschaft. Hierbei sei vor allem Frau Dr. med. Verena Loleit für die kompetente Einarbeitung und Herrn Dr. med. Andreas Junker gedankt, der mich nicht nur mit seiner ungebremsten Begeisterung am wissenschaftlichen Arbeiten ansteckte, sondern auch häufig die schnelle Lösung bei Softwareproblemen parat hatte.

Für die Durchführung sowie statistische Auswertung des Microarray bedanke ich mich sehr bei Herrn Dr. med. Hans Faber, Herrn Dr. rer. nat. Peter Weber, Herrn Dr. rer. nat. Benno Pütz und Herrn Prof. Dr. med. Frank Weber vom Max-Planck-Institut für Psychiatrie.

Der Abteilung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Axel Ullrich (Max-Planck-Institut für Biochemie), Herrn Dr. med. Klaus Korn (Virologisches Institut Erlangen) sowie Frau Dr. Francesca Aloisi danke ich für die bereitwillig zur Verfügung gestellten Zellkulturen.

Bedanken möchte ich mich auch sehr bei Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann und allen Organisatoren des Förderprogramms für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät der LMU München für die ideelle und finanzielle Unterstützung im Rahmen des Promotionsstudiengangs „Molekulare und systembiologische Medizin“.

Vor allem danke ich meinen wunderbaren Eltern, die mich in allen Lebensphasen tatkräftig unterstützt und mir stets den nötigen Rückhalt gegeben haben.

Eidesstattliche Versicherung

Hofereiter, Johann

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Effekte des immunmodulatorischen MS-Therapeutikums Fingolimod und des Lipidmediators Sphingosin-1-phosphat auf humane Astrozyten“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 12.11.2015
