

Aus dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie

Direktor: Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. Florian Holsboer

Induktion des Proteinaseinhibitors SLPI und weiterer  
funktionell verknüpfter Gene durch eine  
Kortisonstoßtherapie bei Patienten mit Multipler  
Sklerose

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Franziska K. Hahn

aus

Freising

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Frank Weber

---

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Reinhard Hohlfeld

---

Prof. Dr. Christian Sommerhoff

---

Priv. Doz. Dr. Christoph Lücking

---

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Hans Faber

---

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser,  
FACR, FRCR

---

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2015

---

*Meinen lieben Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1	Multiple Sklerose . . . . .	6
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie . . . . .	7
1.1.2	Immunpathologie . . . . .	8
1.1.3	Klinisches Bild und Verlaufsformen . . . . .	12
1.1.4	Diagnostik . . . . .	14
1.1.5	Therapiemöglichkeiten . . . . .	16
1.2	Stellenwert der Kortisonbehandlung bei der Therapie der Multiplen Sklerose . . . . .	20
1.3	Zielsetzungen der Arbeit . . . . .	23
<b>2</b>	<b>Patienten, Material und Methoden</b>	<b>24</b>
2.1	Patienten und gesunde Kontrollen . . . . .	24
2.2	Material und Methoden . . . . .	26
2.2.1	Microarray aus Patienten-Vollblut . . . . .	26
2.2.2	Pathway-Studio . . . . .	27
2.2.3	Zellkultur mit PBMC und neutrophilen Granulozyten von MS-Patienten und gesunden Kontrollen . . . . .	27
2.2.4	RNA-Isolation aus der Zellkultur . . . . .	29
2.2.5	RNA-Isolation aus menschlichem Vollblut . . . . .	31
2.2.6	Reverse Transkription von RNA in cDNA . . . . .	31
2.2.7	Quantitative PCR . . . . .	32
2.2.8	Zytotoxizitäts-Tests . . . . .	36
2.2.9	SLPI-ELISA . . . . .	38
2.2.10	OSM-ELISA . . . . .	40
2.2.11	MMP9-ELISA . . . . .	41
2.2.12	Statistische Auswertung . . . . .	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
3.1	Array-Auswertung . . . . .	44
3.2	Array-Validierung . . . . .	45
3.3	Zellkultur mit PBMC und neutrophilen Granulozyten von MS-Patienten und gesunden Kontrollen . . . . .	48

3.3.1	Dosis-Wirkungs-Beziehung . . . . .	48
3.3.2	Kinetische Untersuchungen . . . . .	52
3.3.3	Stimulationsversuche mit Methylprednisolon (MP) und/oder TNF- $\alpha$ an Zellkulturen von MS-Patienten . . . . .	54
3.3.4	Stimulationsversuche mit Methylprednisolon (MP) und/oder TNF- $\alpha$ an Zellkulturen gesunder Probanden . . . . .	56
3.4	ELISA . . . . .	57
3.4.1	OSM-ELISA . . . . .	57
3.4.2	SLPI-ELISA . . . . .	58
3.4.3	MMP9-ELISA . . . . .	61
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>64</b>
4.1	Identifizierung eines kortisonregulierten Gensignalwegs . . . . .	64
4.1.1	Charakterisierung des Gens Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) . . . . .	65
4.1.2	Geninteraktionsrecherche mit Hilfe des Pathway Studios (Ariadne Genomics) . . . . .	68
4.2	Validierung der Microarray-Ergebnisse . . . . .	69
4.3	Proteinanalysen in vivo . . . . .	69
4.3.1	OSM . . . . .	69
4.3.2	MMP9 . . . . .	70
4.3.3	SLPI . . . . .	71
4.4	In vitro-Untersuchungen von SLPI, OSM und MMP9 an neutrophilen Granulozyten und peripheren mononukleären Blutzellen von MS- Patienten . . . . .	72
4.5	In vitro-Untersuchungen von SLPI, OSM und MMP9 an neutrophilen Granulozyten und peripheren mononukleären Blutzellen von gesun- den Kontrollen . . . . .	73
4.6	Methylprednisolon als Induktor für krankheitsfördernde und krank- heitseindämmende Gene . . . . .	74
4.6.1	Charakterisierung des Gens Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9) . . . . .	75
4.6.2	Charakterisierung des Gens Oncostatin M (OSM) . . . . .	78
4.6.3	Verknüpfung von SLPI, OSM und MMP9 über die Neutrophile Elastase . . . . .	79
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>82</b>

6	Literaturverzeichnis	84
7	Danksagung	94
8	Erklärung an Eides Statt	95

# 1 Einleitung

## 1.1 Multiple Sklerose

„ . . . my eyes were so attacked that when fixed upon minute objects indistinctness of vision was the consequence: Until I attempted to read, or to cut my pen, I was not aware of my eyes being in the least attacked. Soon after I went to Ireland, and without anything having been done to my eyes, they completely recovered their strength and distinctness of vision.“

(Firth 1941, Pearce 2005)

Dieser Auszug aus dem Tagebuch von Sir Augustus Frederick d’Este (1794-1848), eines Enkels von George III., stellt den Anfang einer der ältesten Krankheitsbeschreibungen von Multipler Sklerose (MS) dar. Frederick d’Este beschreibt hier 1822 die Symptome einer Retrobulbärneuritis, den Beginn eines schubförmigen Krankheitsverlaufes über 26 Jahre.

In den darauffolgenden Jahren zeichnete er ein sehr plastisches Bild von der Vielschichtigkeit der MS-Erkrankung:

So stellte er mit der Zeit eine starke Ermüdung beim Reiten fest („I . . . am much fatigued by it“), beschrieb immer weiter nachlassende Kraft („every day i found gradually my strength leaving me. . . . When standing or walking I cannot keep my balance without a [s]tick“), unangenehme Empfindungsstörungen („sitting produces a numbness all down the back part of my [t]highs and [l]egs“) sowie schmerzhaft spastische Lähmungen („sharp spasmodic pains in my [f]eet and [l]egs“). Die Symptome weiteten sich auf die oberen Extremitäten aus und es kamen vegetative Beschwerden hinzu. Im Jahr 1848 verstarb Sir Augustus Frederick d’Este, inzwischen an den Rollstuhl gebunden. Jahre später wurde sein Manuskript in einem der London Sector Hospitals gefunden und gibt uns heute neben der detaillierten Symptomschilderung interessante Einblicke in die hilflos wirkenden Heilversuche der Ärzte dieser Zeit.

Auch heute, fast 200 Jahre nach Sir Augustus Frederick d’Estes Tagebucheintrag, ist immer noch unklar wodurch Multiple Sklerose ausgelöst wird. Wir sind weiter auf der Suche nach den genauen Pathomechanismen dieser Erkrankung und nach spezifisch wirkenden Therapeutika.

### 1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Multiple Sklerose ist die häufigste erworbene chronisch entzündlich-demyelinisierende Erkrankung des ZNS (Pugliatti et al. 2006). Die genaue Ätiologie der Erkrankung ist allerdings auch mehr als 150 Jahre nach der Beschreibung von MS-Läsionen durch den französischen Pathologen Jean Baptiste Cruveilhier (1791-1873) noch nicht bekannt.

Die Prävalenz dieser Erkrankung beträgt zwischen 60-200/100.000 in Nordeuropa und Nordamerika, 6–20/100.000 in Niedrigrisiko-Gebieten wie Asien oder Afrika (Sospedra und Martin 2005). Die Inzidenzrate beträgt in unseren Breiten 4,3/100.000 Einwohner (Pugliatti et al. 2006) und zeigt eine auffällige geographische Verteilung, die mit steigender Entfernung vom Äquator stetig zunimmt (Handel et al. 2010, Compston und Coles 2008). Mehrere Studien beschreiben vor allem eine Zunahme beim weiblichen Geschlecht. Da Frauen ohnehin von der MS häufiger betroffen sind als Männer (1,6–2,0 : 1), nimmt damit die unterschiedliche Geschlechterverteilung weiter zu. Allerdings gelten diese geschlechtsspezifischen Verteilungsunterschiede nur für den schubförmigen (RR-MS) und nicht den primär progredienten (PP-MS) Verlaufstyp (Keegan und Noseworthy 2002, Compston und Coles 2008).

Der Erkrankungsbeginn liegt meist zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, typischerweise im jungen Erwachsenenalter (Coles 2009, Sospedra und Martin 2005). Migrationsstudien zeigen, dass Personen, die eine Gegend mit hoher MS-Prävalenz vor dem 15. Lebensjahr verlassen und fortan in einer Gegend mit niedriger Prävalenz leben, das niedrigere Erkrankungsrisiko des Ziellandes aufweisen. Eine Auswanderung nach dem 15./16. Lebensjahr verändert das Erkrankungsrisiko jedoch nicht (Dean und Kurtzke 1971, Dean und Elian 1997, Hammond 2000).

Diese Untersuchungen verdeutlichen den Beitrag verschiedener Umweltfaktoren zur Entstehung der MS. Hierzu zählt auch die Sonnenlichtexposition, die u.a. für die Vitamin D-Synthese notwendig ist (Sospedra und Martin 2005). Weitere Risikofaktoren stellen neben dem Vitamin D-Mangel Zigarettenrauch, Luftverschmutzung und andere Umweltveränderungen dar, die mit der Industrialisierung/sozioökonomischen Entwicklung einhergehen.

Als weitere Trigger der Krankheitsentstehung werden Virusinfektionen wie EBV in jungem Erwachsenenalter oder Masern-, Mumps- und Rötelninfektionen in höherem Alter betrachtet (Compston und Coles 2008).

Für genetische Einflussfaktoren sprechen die Ergebnisse von Familien- und Zwillingsstudien. Diese besagen, dass die Prävalenz unter Familienmitgliedern stark erhöht



ist. So weisen Verwandte 1. Grades ein 20- bis 50-fach höheres Erkrankungsrisiko (2%–5%) gegenüber der Normalbevölkerung auf. Die Konkordanzrate eineiiger Zwillinge beträgt 25%–30%, die zweieiiger und Nicht-Zwillings-Geschwister 3%–5%. Demgegenüber steht ein Erkrankungsrisiko von 0,1%–0,4% der Normalbevölkerung (Keegan und Noseworthy 2002, Sospedra und Martin 2005). Bereits in den 70er-Jahren wurden Suszeptibilitätsgene auf Chromosom 6p21 im Bereich des MHC (major histocompatibility complex)-/HLA (histocompatibility leukocyte antigen)-Komplexes entdeckt, die 10%–60% des genetischen MS-Risikos erklären sollen. Hierzu zählen zum Beispiel der HLA-DRB1-, der HLA-DR2- und der HLA-DR15-Lokus (Keegan und Noseworthy 2002, Sospedra und Martin 2005, Sawcer et al. 2011). In genomweiten Untersuchungen wurden neuerdings non-HLA-Gene identifiziert, die -jedes Gen für sich genommen- nur wenig dazu beitragen an MS zu erkranken. Hierzu gehören IL-2- und IL-7-Rezeptorketten (Hafler et al. 2007, Sawcer et al. 2011), TCR (T-Zell-Rezeptor)-Gene, sowie das CD45-Gen, um nur eine kleine Auswahl zu nennen (Keegan und Noseworthy 2002, Sospedra und Martin 2005, Compston und Coles 2008). Die Tatsache, dass nahezu alle bisher identifizierten Gene mit dem Immunsystem assoziiert sind, stützt die Hypothese, dass die MS eine immunvermittelte Erkrankung darstellt.

### 1.1.2 Immunpathologie

Im Rahmen der Pathogenese der MS spielen Entzündungsvorgänge, Demyelinisierung und axonale Degeneration eine bedeutende Rolle (Noseworthy et al. 2000). Das von Oligodendrozyten gebildete Myelin im zentralen Nervensystem stellt zusammen mit Axonen das vorrangige Zielgewebe der Entzündungsreaktion dar. Durch autoimmunologische Vorgänge entstehen fokale Demyelinisierungen (Plaques), die sich über neuroanatomische Grenzen hinweg erstrecken. Diese Veränderungen werden mit der Zeit in gliöses Narbengewebe umgebaut. Dadurch kommt es zu einer Verhärtung (Sklerose) der betroffenen Strukturen, welche für die Multiple Sklerose namensgebend war. Bereits im frühen Krankheitsstadium findet die Degeneration von Axonen statt, die zusammen mit dem Remyelinisierungspotential für die Krankheitsprogression und den Behinderungsgrad entscheidend ist (Trapp, Ransohoff und Rudick 1999, Wujek et al. 2002).

Man geht davon aus, dass die Läsionsbildung durch autoreaktive CD4<sup>+</sup>-T-Zellen angestoßen wird (siehe Nr. 5a/5b in Abbildung 1.1). Da autoreaktive Lymphozyten auch im Blut gesunder Probanden nachgewiesen werden können, spricht dies für eine veränderte Immunregulation bei MS. Die in der Peripherie aktivierten T-Zellen

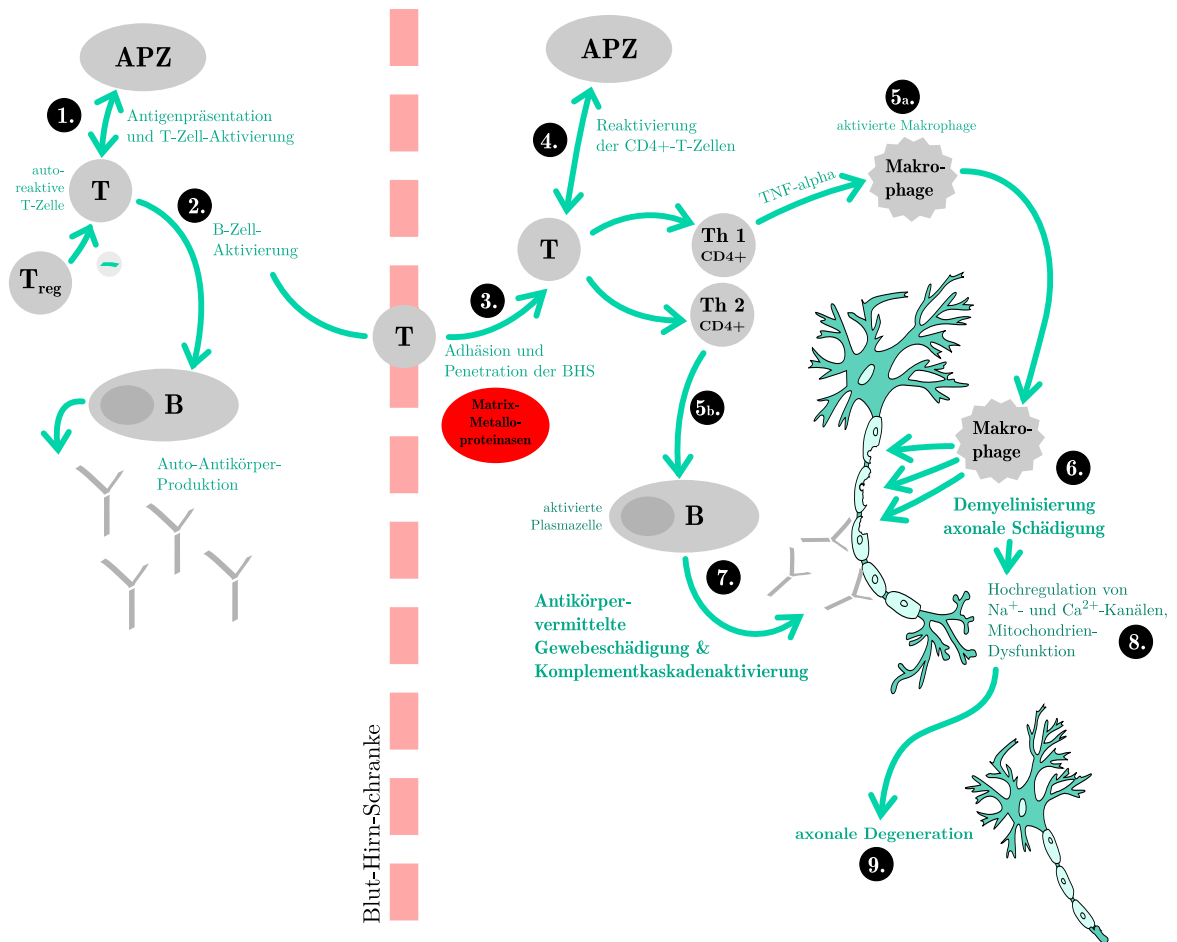
(siehe Nr. 1 in Abbildung 1.1) von MS-Patienten adhären an Endothelzellen der Blut-Hirnschranke und treten durch die Blut-Hirn-Schranke in das Hirngewebe über (siehe Nr. 3 in Abbildung 1.1).

Im Hirnparenchym erfolgt eine Aktivierung der dortigen Mikroglia und der Astrozyten durch proinflammatorische Zytokine und Chemokine wie  $\text{INF-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-8 und IL-23. Durch dieses proinflammatorische Milieu kommt es darüber hinaus zu einer Rekrutierung weiterer Immunzellen wie Monozyten,  $\text{CD8}^+$ -T- und B-Zellen aus dem Blut. Ferner wird die Läsionsbildung von verschiedenen Zyto- und Chemokinen koordiniert, so dass schließlich für die MS typische, häufig ventrikelnaher Entmarkungsherde mit perivenösen Rundzellinfiltraten und proliferierenden Astrozyten entstehen (Sospedra und Martin 2005).

Weitere Prädilektionsstellen für MS-Läsionen stellen der N. opticus, der Hirnstamm, das Kleinhirn und die weiße Substanz des Rückenmarks dar. Die Läsionsbildung ist dabei meist in der Nähe eines oder mehrerer mittelgroßer Blutgefäße zu finden. In einigen Studien wurde gezeigt, dass auch dünn myelinisierte Areale der grauen Substanz wie der Kortex, Basalganglien und Hypothalamus von der Läsionsbildung betroffen sein können.

Das Myelin-basische Protein (MBP), das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG), das Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG), das Proteolipid Protein, Phosphodiesterasen und das S-100 Protein gelten als mögliche Zielantigene des autoimmunologischen Geschehens (Noseworthy et al. 2000, Gold und Rieckmann 2007). Kürzlich konnten Antikörper gegen den Kaliumkanal KIR4.1 als möglicher serologischer Marker in 50% der MS-Patienten identifiziert werden, deren pathogenetischer und/oder diagnostischer Stellenwert gegenwärtig allerdings noch unklar ist (Srivastava et al. 2012).

Während der floriden Entzündungsphase führen viele Prozesse zum Myelinabbau sowie zur Oligodendrozyten- und Axonschädigung (siehe Nr. 5-9 in Abbildung 1.1). Hierzu tragen freie Radikale,  $\text{TNF-}\alpha$ , Leukotriene, Komplement- und Antikörpervermittelte Reaktionen bei, ebenso die Phagozytose von Myelin, die direkte Axonzerstörung durch zytotoxische  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen sowie die Proteasensekretion durch Mastzellen, Monozyten und T-Zellen (Sospedra und Martin 2005).



**Abbildung 1.1:** Mögliche Mechanismen der Gewebeschädigung und Remyelinisierung im Rahmen der Multiplen Sklerose, modifiziert nach Noseworthy et al. (2000)

Entsprechend der verschiedenen Schädigungsmechanismen kann man MS-Läsionen vier histopathologischen Subtypen zuordnen (Lucchinetti et al. 2000):

- primär immunologisch induzierte Entmarkung
  - Subtyp I: Makrophagen-/T-Zell-vermittelt
  - Subtyp II: Antikörper-/Komplement-vermittelt
- Oligodendrozyten-Stoffwechselstörung
  - Subtyp III: Oligodendrozytenapoptose, MAG (myelinassoziertes Glykoprotein)-Verlust, Hypoxie (ischämischer Mechanismus)
  - Subtyp IV: nicht-apoptotische Oligodendrozyten-Degeneration

Die jeweiligen Muster scheinen beim einzelnen Patienten gleich oder ähnlich zu sein, interindividuell aber unterschiedlich. Subtyp I und II kommen mit 80% am häufigsten vor. Der vierte Subtyp ist am wenigsten häufig und kommt v.a. bei der PP-MS-Form vor (Gold und Rieckmann 2007, Sospedra und Martin 2005). Die Kenntnis dieser verschiedenen Pathomechanismen könnte in Zukunft dabei helfen, Patienten Therapien zuzuführen, die auf ihren Krankheitstyp spezifischer abgestimmt sind als dies zur Zeit der Fall ist. So könnte Subtyp I gut mit modernen Immuntherapeutika behandelt werden, bei antikörper- oder komplementvermittelten Reaktionen wäre hingegen eine Plasmapherese wirkungsvoller (Keegan et al. 2005). Um diese Erkenntnisse therapeutisch nutzen zu können, müssten die unterschiedlichen histopathologischen Typen allerdings auch ohne Histologie am lebenden Patienten bestimmbar sein (Gold und Rieckmann 2007).

Die Remyelinisierungsfähigkeit scheint neben der Schwere der vorangegangenen Entzündungsreaktion für das Ausmaß der Gewebeschädigung und damit für den weiteren Krankheitsverlauf entscheidend zu sein. Unter MS-Erkrankten ist die Fähigkeit zur Markscheiden-Neubildung sehr unterschiedlich, beim einzelnen Patienten jedoch homogen. Ein Phänomen, das bereits bei den Läsionsmustern zu beobachten ist. Nur 20% der Patienten zeigten in Untersuchungen an Autopsiematerial eine starke Remyelinisierung mit einer sog. Markschatthenherd-Bildung. Diese ist vor allem innerhalb aktiver Plaques im Rahmen eines akuten Schubgeschehens oder im frühen Krankheitsverlauf zu finden. Bei einem chronischen Krankheitsverlauf kann nur noch eine sehr geringe Remyelinisierungsfähigkeit nachgewiesen werden (Noseworthy et al. 2000, Gold und Rieckmann 2007, Kuhlmann et al. 2008).

Nach Ablauf des akuten Entzündungsgeschehens finden sich neben demyelinisierten Axonen, apoptotischen Oligodendrozyten und Immunzellen auch Axon-Durchtrennungen mit Zwiebelknollen-artigen Auftreibungen an den jeweiligen Axonenden (Trapp et al. 1998). Daraus folgt eine Störung der Reizweiterleitung sowie des axonalen Transportes. Im Stadium der abklingenden Entzündungsreaktionen sezernieren Th2/3-Zellen antiinflammatorische Zytokine wie TGF- $\beta$  und IL-10. Von ortsständigen Zellen und T-Zellen werden darüber hinaus verschiedene Wachstumsfaktoren wie der brain-derived neurotrophic factor (BDNF) oder der fibroblast growth factor (FGF) sezerniert. In dieser Phase der abklingenden Entzündungsreaktion beginnen aktivierte Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und noch vorhandene reife Oligodendrozyten mit der Remyelinisierung entmarkter Axonabschnitte. Die dadurch entstehende neue Myelinschicht ist allerdings dünner als die ursprüngliche. Dies führt zu einer verlangsamten Reizweiterleitung in den remyelinisierten Bereichen, obwohl eine kompensatorische Umverteilung von Na<sup>+</sup>-Kanälen erfolgt. Dies könnte durch eine veränderte Zusammensetzung des Myelins bei Reparaturvorgängen im Vergleich zu reifem Myelin bedingt sein. Beide Myelinarten unterscheiden sich in der Zusammensetzung der Myelinprotein-Isoformen und in verschiedenen posttranslationalen Modifikationen (Sospedra und Martin 2005). Mit zunehmender Anzahl von De- und Remyelinisierungsvorgängen erschöpft sich die Gewebereparatur-Kapazität (Compston und Coles 2008).

Da -wie anfangs erwähnt- die Degeneration von Axonen und das Remyelinisierungspotential für die Krankheitsprogression und den Behinderungsgrad entscheidend sind, wird im Rahmen aktueller Studien nach serologischen, molekularbiologischen und bildgebenden- auch spektroskopischen- Markern gesucht, mit welchen man das Ausmaß axonaler Schädigung abschätzen könnte (Gold und Rieckmann 2007). Ferner sollen nicht-invasive Untersuchungsmethoden zur Ermittlung des vorherrschenden histopathologischen Mechanismus etabliert werden. Wenn diese beiden Vorhaben gelingen, könnte man MS-Patienten bestimmten Risikogruppen zuordnen und einer individuell abgestimmten, spezifischen Therapie zuführen.

### **1.1.3 Klinisches Bild und Verlaufsformen**

Die Multiple Sklerose ist eine schubförmig oder chronisch progredient verlaufende Demyelinisierungserkrankung von Gehirn und Rückenmark. Im Jahr 1868 beschrieb J.M. Charcot eine für MS typische Trias: Hierzu zählen Nystagmus, skandierende Sprache und Intentionstremor. Diese von Charcot beobachteten neurologischen Ausfälle weisen vor allem auf eine zerebelläre Schädigung hin.

Da die Demyelinisierungsherde jedoch disseminiert im ZNS auftreten und sich die Krankheitssymptome damit sehr unterschiedlich präsentieren können, stellt die Charcot-Trias keine besonders häufige Symptomkonstellation dar. Vielmehr können Störungen in allen neurologischen Funktionssystemen entstehen.

Bei Auftreten erstmaliger Symptome, die auf eine demyelinisierende ZNS-Erkrankung hinweisen, spricht man von einem klinisch isolierten Syndrom (KIS). Die Diagnose einer MS kann hier jedoch noch nicht gestellt werden.

85% der Patienten weisen zu Beginn der Erkrankung einen schubförmig-remittierenden Verlauf (RRMS) auf. Der Krankheitsverlauf wird von Schubereignissen geprägt, die in Form einer neuen Symptomatik oder einer Verstärkung vorbekannter Symptome auftreten, länger als 24 Stunden andauern und nicht durch Infekte oder eine Erhöhung der Körpertemperatur erklärt werden können. Die während dieses Krankheitsschubes neu aufgetretenen oder aggravierten Symptome können sich anschließend wieder völlig oder teilweise zurückbilden. Man spricht dann von einer Voll- bzw. Teilremission, die meist innerhalb von 6–8 Wochen eintritt.

In circa 50% der Fälle von schubförmig-verlaufender MS erfolgt innerhalb von 10 Jahren der Übergang in eine sekundär-progrediente Verlaufsform (SPMS). Die Zahl akuter Schubereignisse nimmt ab und es kommt zu einem kontinuierlichen langsamen Fortschreiten der Erkrankung (siehe Abbildung 1.2).

Nur etwa 15% der Erkrankten leiden an einer primär progredienten Form der MS (PPMS). Hier herrscht von Erkrankungsbeginn an eine langsam aber stetige Zunahme der Symptome vor, zu Schubereignissen kommt es nicht. Entzündungsreaktionen scheinen bei dieser Verlaufsform von geringerer Bedeutung zu sein. Gehäuft findet sich diese Form bei einem späten Erkrankungsbeginn oder einer überwiegend spinalen Symptomatik. Die progredienten Verlaufsformen weisen, verglichen mit der schubförmigen, meist eine ungünstigere Prognose bezüglich des Krankheitsverlaufes auf (Compston und Coles 2008, Keegan und Noseworthy 2002).

Im Folgenden sollen einige besonders typische Symptome erläutert werden:

In einem Drittel der Fälle tritt initial eine Retrobulbärneuritis auf, die sich typischerweise durch einen einseitigen Visusverlust äußert. Desweiteren kann es zu Ausfallerscheinungen der Okulomotorik kommen, welche sich in Form von Doppelbildern (Diplopie) aufgrund einer Augenmuskelparese, in Form eines (dissoziierten) Nystagmus oder einer internukleären Ophthalmoplegie manifestieren können. Gelegentlich sind auch andere Hirnnerven zu Beginn betroffen, wie beispielsweise der N. facialis oder der N. trigeminus mit einer oftmals beidseitigen Trigeminalneuralgie.

Zerebelläre Symptome treten in ca. 75% der Fälle auf. Besonders auffallend ist eine Gang- und Standunsicherheit, die sich über die Jahre in einem ataktischen Gangbild manifestieren kann. Desweiteren fallen dysmetrische Bewegungsabläufe und ein Intentionstremor auf.

In über 80% der Erkrankungsfälle kommt es zu einer Affektion der Pyramidenbahn, die sich in einer asymmetrischen spastischen Para-, Hemi- oder Tetraparese zeigen kann, sowie in pathologischen Pyramidenbahnzeichen wie dem positiven Babinski-Zeichen und Reflexsteigerungen.

Sensibilitätsstörungen und Missempfindungen (Parästhesien) finden sich häufig (50% der Fälle) bereits zu Krankheitsbeginn, wobei vor allem der Vibrationssinn der unteren Extremitäten beeinträchtigt wird.

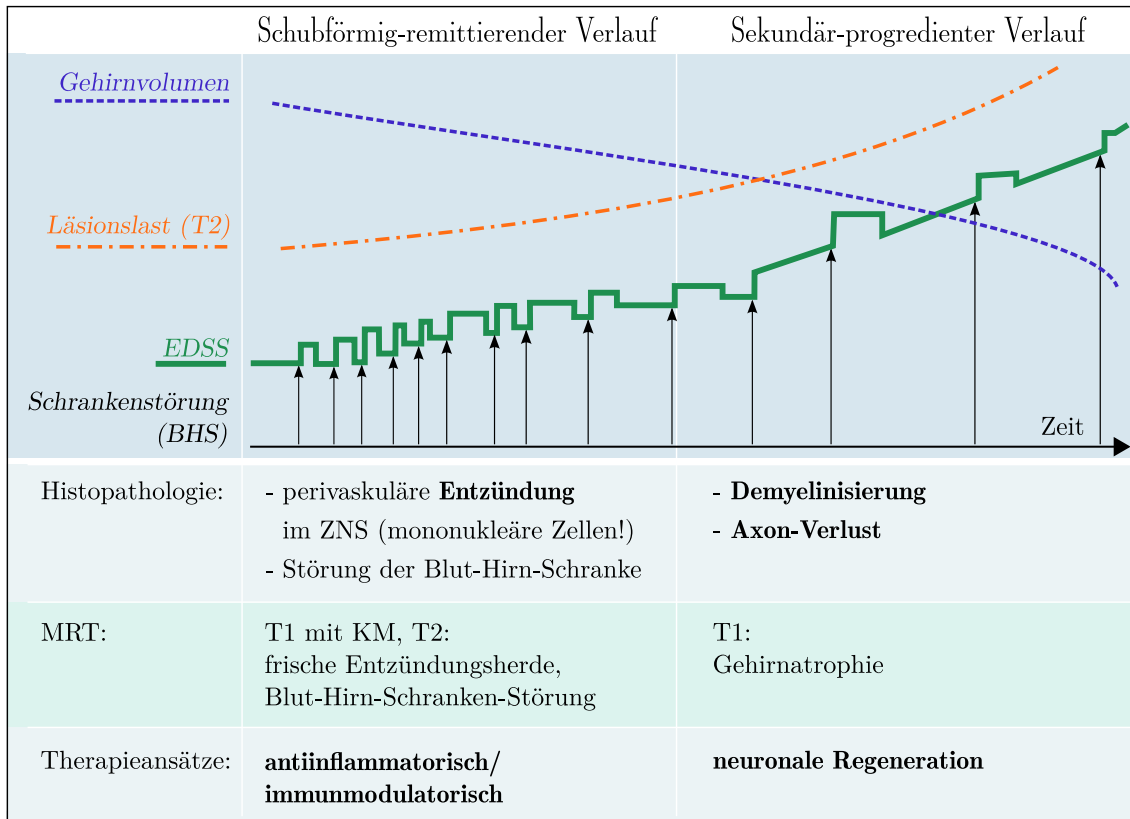
Ungefähr 20% der Patienten berichten relativ früh von Blasen- und Mastdarmentörungen. Hier stehen Miktionsstörungen mit Inkontinenz- oder Restharnproblematik im Vordergrund (Compston und Coles 2008).

Psychische Symptome können bereits initial auftreten, im weiteren Verlauf zeigt ungefähr die Hälfte aller Betroffenen psychische Veränderungen sowie kognitive Beeinträchtigungen (Winkelmann et al. 2007, Feinstein 2011).

Der Krankheitsverlauf und damit die Prognose ist wie das klinische Bild interindividuell sehr variabel. Daher ist es schwierig den Krankheitsverlauf jedes einzelnen Patienten genau vorherzusagen. Jedoch gibt es einige Kriterien, die eher für einen günstigen bzw. ungünstigeren Verlauf sprechen. Eher positiv für das weitere Krankheitsgeschehen ist ein junges Erkrankungsalter, weibliches Geschlecht, ein monosymptomatischer Krankheitsbeginn mit einer Optikusneuritis oder sensiblen Ausfällen, sowie kurz anhaltende Schübe mit guter Symptomremission, lange Intervalle zwischen den Krankheitsschüben und keine intrathekale Antikörper-Produktion. Für einen eher ungünstigen Verlauf sprechen vorherrschende zerebelläre und motorische Ausfälle, bereits initial eine hohe Läsionslast in der kraniellen/spinalen Bildgebung mittels MRT, eine Häufung mehrerer Symptome zu Krankheitsbeginn, lang anhaltende Schübe mit schlechter Symptomrückbildung sowie ein progredienter Verlaufstyp (Degenhardt et al. 2009).

#### **1.1.4 Diagnostik**

Da es keinen spezifischen, die Multiple Sklerose beweisenden, Einzelbefund gibt, ist die Diagnose allein aufgrund der klinischen Symptomatik oft schwierig und bedarf



**Abbildung 1.2:** Bild verschiedener MS-Verlaufsformen: Die Heterogenität verschiedener MS-Verlaufsformen aufgezeigt anhand klinischer, histopathologischer sowie morphologischer Veränderungen, modifiziert nach Sospedra und Martin (2005)

meist einer Untermauerung durch weitere Untersuchungen wie MRT, Liquoruntersuchung und/oder evozierte Potenziale sowie den gründlichen Ausschluss anderer Krankheitsursachen. Der wichtigste Grundsatz bei der Diagnosestellung der MS ist der Nachweis einer örtlichen und zeitlichen Dissemination der Erkrankung. Das heißt, dass der Nachweis multifokaler Läsionen und deren zeitlich getrennte Entstehung erbracht werden muss.

International angewandte Leitlinien für die Diagnosestellung stellen heutzutage die McDonald-Kriterien dar. Im Jahr 2001 erschien die erste Fassung dieser Diagnosekriterien, die klinische, magnetresonanztomographische, liquordiagnostische, elektrophysiologische und laborchemische Befunde einschließen (McDonald et al. 2001). 2005 und 2010 erfolgten weitere Überarbeitungen der Kriterien, die den MRT-Befunden mehr Gewicht verliehen und insgesamt eine frühere und präzisere Diagnosestellung ermöglichen. Mit der neuesten Überarbeitung von Polman et al. 2011 kann nun eine MRT-Aufnahme für den Nachweis der räumlichen und zeitlichen Dissemination ausreichen. Das Kriterium der örtlichen Dissemination ist erfüllt, wenn



mindestens eine T2-Läsion in mindestens 2 von 4 typischen ZNS- Bereichen (periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell oder spinal) zu diagnostizieren ist. Die zeitliche Dissemination ist gegeben, wenn sich gleichzeitig Kontrastmittel-/Gadolinium-anreichernde Bereiche und nicht-anreichernde Läsionen in einem MRT-Bild zeigen (Polman et al. 2011, Klotz et al. 2011). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Gadolinium-anreichernde Läsion, welche die aktuelle Symptomatik verursacht, nicht gezählt werden darf. Im Rahmen eines klinisch isolierten Syndroms (KIS), dem Anfangsstadium der klinischen Erkrankung, werden die Kriterien der zeitlichen Dissemination nicht erfüllt. Neben der MRT-Untersuchung kann die MS-Diagnostik mit elektrophysiologischen Untersuchungen sowie einer Liquorpunktion komplettiert werden. So können weitere klinisch stumme Herde beispielsweise durch evozierte Potentiale ermittelt werden. Besondere Bedeutung kommt dabei dem visuell evozierten Potential (VEP) zu. Eine Lumbalpunktion zur Liquorgewinnung kann für die Bestätigung einer entzündlichen Genese der Krankheitssymptome und vor allem zur differentialdiagnostischen Abklärung hilfreich sein (Polman et al. 2011, Klotz et al. 2011). Ein MS-typischer Befund zeigt keine oder eine leichte lymphomonozytäre Pleozytose ( $<50$  Zellen/ $\mu\text{l}$ ) und in etwa 95% den Nachweis oligoklonaler (IgG-)Banden als Ausdruck einer intrathekalen IgG-Synthese (McLean, Luxton und Thompson 1990).

Um einen Krankheitsschub zu diagnostizieren, müssen Symptome, die das zentrale Nervensystem betreffen, neu auftreten oder sich bereits bestehende verschlimmern. Dieser Zustand muss mindestens 24 Stunden anhalten und es dürfen zur gleichen Zeit keine erhöhte Temperatur oder ein Infekt vorliegen. Alle weiteren Beschwerden, die im Zeitraum von 30 Tagen hinzukommen, zählen noch zu diesem Schubereignis (Polman et al. 2011).

### **1.1.5 Therapiemöglichkeiten**

Die Therapie der Multiplen Sklerose fußt auf drei Säulen: der akuten Schubbehandlung mit intravenöser Kortisongabe sowie ggf. mit einer Plasmapherese, einer verlaufsmodifizierenden Therapie z.B. mit Interferonpräparaten, Glatirameracetat, Natalizumab oder Fingolimod sowie einer begleitenden symptomatischen Therapie, beispielsweise von Spastik, Blasenstörungen oder Fatigue, wobei hier Medikamente und Physiotherapie zum Einsatz kommen.

Die Indikation zu einer Kortison-Stoßtherapie mit 0,5–1 g Methylprednisolon pro Tag i.v. über 3–5 Tage ist gegeben, wenn die im vorherigen Kapitel beschriebenen Kriterien für einen Krankheitsschub und keine Kontraindikationen vorliegen. Da

auf die Rolle der Kortisontherapie im Rahmen der Multiplen Sklerose im nächsten Kapitel ausführlicher eingegangen wird, sollen im Weiteren die Therapiemaßnahmen zur verlaufsmodifizierenden Therapie näher ausgeführt werden.

Nach den neuesten Therapieempfehlungen der DGN-Leitlinien ist eine immunmodulatorische Therapie bereits dann angezeigt, wenn ein Patient ein klinisch isoliertes Syndrom (KIS) aufweist und ein hohes Risiko für die Entwicklung einer klinisch gesicherten MS besteht (Jacobs, Beck und Simon 2000, Kappos et al. 2007). Eine immunmodulierende Therapie sollte möglichst früh im Krankheitsverlauf eingesetzt werden, da die Präparate besonders gut in der entzündlichen Phase der Erkrankung wirken (Kuhlmann et al. 2002, Kappos et al. 2007).

In Deutschland sind zur Zeit für eine immunmodulierende Therapie der schubförmig verlaufenden MS folgende Präparate zugelassen:  $\beta$ -Interferone, Glatirameracetat, Natalizumab, Fingolimod, Teriflunomid, Alemtuzumab, Dimethylfumarat, Mitoxantron und Azathioprin. Diese Substanzen wirken immunmodulatorisch und verbessern die Prognose.

Die aktuellen Therapiempfehlungen der DGN-Leitlinie von 2012 sprechen sich für die Behandlung schubförmiger MS-Formen mit Interferon-Präparaten oder Glatirameracetat als Basistherapie aus. Mit IFN- $\beta$  kann neben der RRMS auch das klinisch isolierte Syndrom (KIS) und die SPMS mit aufgelagerten Schüben behandelt werden. Zur Zeit sind mit Betaferon<sup>®</sup>/Extavia<sup>®</sup> (IFN- $\beta_{1b}$ ), Avonex<sup>®</sup> (IFN- $\beta_{1a}$ ) und Rebif<sup>®</sup> (IFN- $\beta_{1a}$ ) 3 rekombinante IFN- $\beta$ -Präparate auf dem Markt. IFN- $\beta_{1a}$  und IFN- $\beta_{1b}$  unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz und der Glykosylierung, während sich die IFN- $\beta_{1a}$ - Interferone Avonex<sup>®</sup> und Rebif<sup>®</sup> vor allem in der Applikationsform und -frequenz unterscheiden. Rekombinantes IFN- $\beta$  weist antivirale Eigenschaften auf, wirkt auf die Antigenpräsentation, die T-Zell-Proliferation sowie auf Zytokin-Expressionsmuster (Buck und Hemmer 2011). Die genannten Präparate bewirken eine Reduktion der Schubrate, eine geringere Zunahme der Läsionslast und eine Verlangsamung der Behinderungsprogression. Da die Nebenwirkungen wie Irritationen der Injektionsstellen, eine Leukopenie und eine Erhöhung der Leberenzyme überschaubar sind, eignen sich diese Medikamente gut für eine Langzeittherapie. Problematisch kann allerdings die Bildung neutralisierender Antikörper gegen IFN- $\beta$  sein, zu welcher es aufgrund der immunogenen Wirkung von Interferon kommen kann. Kommt es zur Bildung dieser Antikörper, geht damit ein Wirkungsverlust der Interferon-Therapie einher. In Abhängigkeit vom klinischen Verlauf sollte ein Absetzen des jeweiligen Präparates sowie eine Therapieumstellung diskutiert werden.

Eine weitere Option zur Frühtherapie schubförmiger Verlaufsformen stellt der Wirkstoff Glatirameracetat (Copaxone®) dar. Dabei handelt es sich um ein Polymer der Aminosäuren Tyrosin, Glutamat, Alanin und Lysin. Glatirameracetat werden Effekte auf die T-Zell-Differenzierung zugeschrieben, eine immunmodulatorische Wirkung auf Antigen-präsentierende Zellen sowie der Ausgleich eines Mangels an regulatorischen T-Zellen (Buck und Hemmer 2011). Darüberhinaus wird die Induktion neurotropher Faktoren durch Glatirameracetat diskutiert (Rieckmann 2006). Das Polypeptidgemisch weist eine mit Interferonen vergleichbare Wirksamkeit auf, wie im Rahmen der REGARD- und BEYOND-Studie nachgewiesen wurde (Mikol et al. 2008, O'Connor et al. 2009). Ferner zeichnet sich Glatirameracetat durch eine gute Verträglichkeit aus. Außer lokalen Reaktionen an den Einstichstellen und seltenen, gutartig verlaufenden systemischen Reaktionen nach der Injektion sind keine weiteren Nebenwirkungen bekannt.

Als Primärtherapie bei schweren MS-Verlaufsformen (zwei Schübe pro Jahr sowie Gadolinium-anreichernde Herde) bzw. als Eskalationstherapie bei Versagen der Basistherapie können der monoklonale Antikörper Natalizumab (Tysabri®) oder das Sphingosin-1-Phosphat-Analogon Fingolimod (Gilenya®) eingesetzt werden. Natalizumab ist gegen das very late antigen-4 (VLA-4) gerichtet, das als Adhäsionsmolekül auf T-Lymphozyten und Monozyten exprimiert ist. Das Adhäsionsmolekül dient diesen Zellen zum Anheften an den Liganden VCAM auf Endothelzellen. Der Antikörper verhindert diesen Adhäsionsvorgang und damit auch einen Übertritt der genannten Immunzellen über die Blut-Hirn-Schranke. Damit kann das Eindringen dieser Zellen ins ZNS vermindert werden. Natalizumab wird bei schwer verlaufenden und hoch aktiven schubförmigen MS-Formen im Abstand von 4 Wochen i.v. verabreicht. Unter der Therapie mit dem monoklonalen Antikörper besteht die Gefahr an opportunistischen Infektionen wie der progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML) zu erkranken (Buck und Hemmer 2011, Rieckmann 2006). Der Nachweis von Antikörpern gegen das JC-Virus, den Erreger der PML, erlaubt es das Erkrankungsrisiko von MS-Patienten abzuschätzen. Antikörper-negative Patienten haben ein sehr geringes Risiko an einer PML zu erkranken. Weiterhin ist die Anzahl der Infusionen und die Vorbehandlung mit immunsuppressiven Medikamenten als Risikofaktor zu berücksichtigen. Weitere Nebenwirkungen von Natalizumab wie allergene Reaktionen oder die Erhöhung von Leberenzymen sind selten schwerwiegend.

Fingolimod ist ein oral zu verabreichendes Medikament zur Schubreduktion und zur Verzögerung des Fortschreitens der Erkrankung sowie des Behinderungsgrades. Über die Wirkung auf Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren hemmt Fingolimod das Auswandern herangereifter Lymphozyten aus sekundären lymphatischen Organen in die

Peripherie. Dies führt zu einer Abnahme von CD4<sup>+</sup>-Zellen und von B-Lymphozyten im peripheren Blut und damit auch im ZNS. Hierdurch kommt es zu einer Verminderung der autoreaktiven Entzündungsvorgänge im ZNS, allerdings auch zu einer vermehrten Infektneigung. Daher treten als unerwünschte Nebenwirkungen z.B. Infektionen mit Herpesviren auf, es kommt häufiger zu Infekten der Atemwege, Harnwege, etc. Ferner ist auf eine Erhöhung der Leberenzyme, eine Lymphozytopenie und EKG-Veränderungen (Bradykardie, AV-Block) zu achten (Buck und Hemmer 2011).

Mitoxantron dient ebenfalls der Behandlung von MS-Patienten mit schweren schubförmigen Verläufen. Darüber hinaus ist es für die Therapie der sekundär chronisch progredienten MS zugelassen. Mitoxantron wird alle drei Monate als Infusion verabreicht, eine kumulative Gesamt-Lebensdosis von 140 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche soll allerdings aufgrund kardiotoxischer Nebenwirkungen nicht überschritten werden. Bereits ab einer Verabreichung über 100 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche sollte eine einzelfallbasierte Nutzen-Risiko-Abwägung erfolgen. Haupteinschränkungen stellen die Gefahr sekundärer Malignome sowie einer Kardiomyopathie dar (Diener, Weimar und Neurologie 2012).

2013 erfolgte die Zulassung für den Dihydroorotat-Dehydrogenase-Hemmstoff Teriflunomid (Aubagio<sup>®</sup>) als Basistherapeutikum sowie für das gegen CD52 gerichtete Alemtuzumab (Lemtrada<sup>®</sup>) zur Eskalationstherapie.

Teriflunomid ist ein aktiver Metabolit von Leflunomid, welches als Antirheumatikum eingesetzt wird. Teriflunomid wirkt entzündungshemmend und immunsuppressiv, da es die De novo-Pyrimidin-Synthese und damit die Zellteilung aktivierter Lymphozyten hemmt. Es wird einmal täglich oral appliziert und ist zur Therapie schubförmiger MS-Verlaufsformen zugelassen. In den Zulassungsstudien wurden vor allem gastrointestinale Nebenwirkungen, Leberenzym erhöhungen, Neutro-/Lymphopenie sowie Alopezie beobachtet. Teriflunomid soll die Schubrate, das Fortschreiten des Behinderungsgrades sowie die Läsionslast im ZNS im Vergleich zu Placebo deutlich reduzieren. In der Phase III-Studie TENERE wies Teriflunomid eine vergleichbare Wirksamkeit zu IFN- $\beta_{1a}$  auf (Vermersch et al. 2014, Salmen, Gold und Chan 2013, Buck und Hemmer 2011).

Alemtuzumab ist ein monoklonaler Antikörper, welcher gegen das Oberflächenprotein CD52 auf CD4- und CD8-T-Lymphozyten sowie auf B-Lymphozyten gerichtet ist und zur Lyse dieser Zellen führt. Bislang wurde dieses Präparat im Rahmen der Leukämie-Therapie eingesetzt, nun ist es zur Behandlung schubförmiger MS-Verlaufsformen als Eskalationstherapeutikum zugelassen. Die Applikation erfolgt

intravenös, wobei es zu Infusionsreaktionen kommen kann. Ferner werden Leukopenie, schwere Infektionen sowie in einem Drittel der Fälle autoimmune Nebenwirkungen wie Thyreoiditis, Nephritis und teilweise ein erhöhtes Carcinomrisiko beschrieben (Ontaneda und Cohen 2013, Salmen, Gold und Chan 2013, Buck und Hemmer 2011).

2014 erfolgte die europäische Zulassung von Dimethylfumarat (Tecfidera®) als orales Basistherapeutikum bei schubförmiger MS. Dieses Präparat wurde ursprünglich zur Therapie der Psoriasis eingesetzt. Im Rahmen der CONFIRM- und der DEFINE-Studie, zweier Phase III-Studien, zeigte sich bei Patienten mit RR-MS eine signifikant reduzierte Schubrate, ein vermindertes Fortschreiten des Behinderungsgrades sowie eine Reduktion der Läsionslast im ZNS im Vergleich zu Placebo und eine zu Glatirameracetat zumindest gleichwertige Wirksamkeit. Ferner kann es oral eingenommen werden und zeichnet sich durch eine gute Verträglichkeit aus. Neben gastrointestinalen Nebenwirkungen wurden vor allem Flush-Symptomatik und Leberwerterhöhungen beschrieben (Gold et al. 2012, Fox et al. 2012)

Darüberhinaus befinden sich einige neue immunmodulierende Substanzen in Phase II/III-Studien. Dazu zählen oral verabreichbare Therapeutika wie der VLA4-Antagonist Fingertegrast und das Chinolinderivat Laquinimod.

Einige neue monoklonale Antikörper sind derzeit ebenfalls in der Studienphase II/III. Mit dem gegen CD25 gerichteten monoklonalen Antikörper Daclizumab sowie den drei gegen CD20 gerichteten Antikörpern Rituximab, Ocrelizumab und Ofatumumab stehen eine Reihe neuer Biologicals in der Erprobung (Wynn et al. 2010, Naismith et al. 2010, Kappos et al. 2011, Sorensen et al. 2014).

Mit diesen neuen Medikamenten verbindet sich die Hoffnung auf eine spezifischere und individueller abstimmbare Therapie, auf eine bessere Schubreduktion und auf eine verminderte Krankheitsprogression.

## **1.2 Stellenwert der Kortisonbehandlung bei der Therapie der Multiplen Sklerose**

Nach den Leitlinien der DGN und der American Academy of Neurology stellt die intravenöse Glukokortikoid-Pulstherapie derzeit die Standardbehandlung eines akuten MS-Schubereignisses dar (Goodin et al. 2002, Diener, Weimar und Neurologie 2012). Als Mittel der Wahl hat sich Methylprednisolon (MP) etabliert. Die Anfänge der Kortisontherapie bei Multipler Sklerose liegen bereits über 40 Jah-

re zurück. Das zu Beginn eingesetzte Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) sowie orales Prednisolon wurden mittlerweile von hochdosiertem intravenös appliziertem MP abgelöst. Die Infusionstherapie umfasst üblicherweise eine drei- bis fünftägige Verabreichung von 1000 mg MP. Ziel der Steroidpulstherapie ist eine raschere Symptomrückbildung während des Schubereignisses. Diese Wirkung wurde in einer Reihe von Studien nachgewiesen, eine positive Langzeitwirkung konnte bislang allerdings nicht sicher belegt werden (Brusaferri und Candelise 2000). Darüberhinaus gibt es Hinweise, dass Kortison möglicherweise den Axonverlust reduziert und Remyelinisierungsprozesse anstößt (Gold, Buttgerit und Toyka 2001). Kortikosteroide unterdrücken durch eine Vielzahl von Mechanismen Entzündungsvorgänge und wirken der pathologischen Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke im MS-Schub entgegen (Burnham et al. 1991, Miller et al. 1992). Ersteres erfolgt durch Herabregulierung der Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) sowie durch eine verminderte Immunglobulin-Sekretion. Darüberhinaus inhibieren Kortisonpräparate die T-Zell-Aktivierung über CD86 und vermitteln eine herabgesetzte T-Zell-Antwort gegenüber Antigenen. Dies wird beispielsweise durch eine verminderte MHC II-Exprimierung auf Makrophagen und Zellen der Mikroglia gefördert (Loughlin, Woodroffe und Cuzner 1993). Steroide induzieren weiterhin Apoptose, insbesondere von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Dies geschieht über einen Fas (CD95)-unabhängigen, aber Caspase-abhängigen Reaktionsweg (Zipp et al. 2000). Zytotoxisch wirkendes Stickstoffmonoxid (NO) soll im Rahmen lokaler Entzündungsreaktionen am Oligodendrozyten-Untergang durch Zellen der Mikroglia beteiligt sein. Das Enzym, welches NO synthetisiert, die NO-Synthetase, wird durch TNF- $\alpha$  induziert (Brenner et al. 1997). Unter MP-Therapie kommt es zu einer Reduktion von TNF- $\alpha$  in PBMC als auch zu einer reduzierten NO-Synthese bzw. einem erhöhten NO-Abbau (Xu et al. 1998, Leussink et al. 2001). Darüberhinaus bewirken Glukokortikosteroide eine Reduktion von Lymphozyten und Monozyten sowie eine Erhöhung der neutrophilen Granulozyten (Grauer et al. 2001).

Der Blut-Hirn-Schrankenstörung wirken Glukokortikoide durch eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen an ZNS-Endothelien (Cronstein et al. 1992) und T-Zellen (Pitzalis et al. 1997) entgegen. Damit kommt es zu einer Migrationshemmung von autoreaktiven T-Zellen und peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) an der Blut-Hirn-Schranke (Gelati et al. 2002).

Die immunsupprimierenden Kortisoneffekte werden derzeit drei bekannten Wirkmechanismen zugeschrieben: Es gibt direkte und indirekte genomische Effekte sowie nicht-genomische Effekte.

Die genomischen Effekte werden über zytosolische Glukokortikoidrezeptoren vermittelt. Glukokortikoidrezeptoren sind Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren und können somit die Gentranskription direkt und indirekt beeinflussen. Im Rahmen der direkten Transkriptionsbeeinflussung bindet der Kortisol-Glukokortikoidrezeptor-Komplex an eine DNA-Sequenz im Promotorbereich, die sich „glucocorticoid-responsive element“ (GRE) nennt und wirkt so auf die Transkription. Interagiert der Kortisol-Glukokortikoidrezeptor-Komplex hingegen mit anderen Transkriptionsfaktoren als dem GRE, z.B. mit NF- $\kappa$ B, so spricht man von einer indirekten Wirkung auf die Transkription (Rhen und Cidlowski 2005).

Im Rahmen nicht-genomischer Effekte werden unspezifische von spezifischen Wirkungen unterschieden. Unspezifische nicht-genomische Effekte beruhen auf einer direkten physikalisch-chemischen Interaktion von Glukokortikoiden mit Zellmembranen. Spezifische Wirkungen werden über eine direkte Interaktion der Glukokortikoide mit membranständigen Rezeptoren und second messenger-Systemen vermittelt (Cato, Nestl und Mink 2002, Gold, Buttgerit und Toyka 2001).

Während die Mechanismen der genomischen Wirkungsweise schon mehrere Jahrzehnte bekannt sind, wurde eine der ersten Arbeiten über nicht-genomische Effekte 1999 von Buttgerit et al. publiziert (Buttgerit, Brand und Burmester 1999).

Genomische Effekte setzen verzögert und bereits bei niedrigen Kortikosteroid-Konzentrationen (bis 1 mg/kg/Tag) ein. Nicht-genomische hingegen wirken zwar sofort nach Applikation, benötigen aber mit über 10mg/kg/Tag höhere Wirkdosen (Gold, Buttgerit und Toyka 2001, Grauer et al. 2001). Da diese Steroiddosis im Rahmen der Kortisonpuls-Therapie erreicht wird, scheinen die nicht-genomischen Effekte hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen. Nicht-genomische Mechanismen beeinflussen den Ionentransport über die Zellmembran sowie die ATP-Produktion. Dies soll die Aktivierung von Immunzellen inhibieren und neben genomischen Effekten auch die Apoptose von CD4+-Zellen induzieren (Schmidt et al. 2000).

Die Kenntnis dieser unterschiedlichen Wirkungsweisen von Kortikosteroiden legt eine spezifische Auswahl der Kortisondosis je nach gewünschtem Effekt nahe. Darüberhinaus wären weitere Patientenstudien zur Überprüfung und eventuellen Anpassung der derzeit verwendeten Steroiddosen im Rahmen der hochdosierten MS-Schubtherapie wünschenswert.

### 1.3 Zielsetzungen der Arbeit

Kortikosteroide und ACTH werden bereits seit den frühen siebziger Jahren zur Akuttherapie von Krankheitsschüben der MS eingesetzt (Rose et al. 1970), da diese eine schnellere Rückbildung der Schubsymptomatik fördern (Brusaferri und Candelise 2000). Im Mai 2011 erhielt Urbason® als eines der seit langer Zeit erfolgreich eingesetzten Methylprednisolon-Präparate offiziell die Zulassung zur Therapie des akuten MS-Schubes. Trotz der klinisch erfolgreichen Anwendung über einen so langen Zeitraum wissen wir über die Mechanismen der therapeutischen Effekte noch sehr wenig.

Einige Teilaspekte der Kortikosteroid-Wirkung konnten zwischenzeitlich aufgedeckt werden, wie die abdichtende Funktion an der Blut-Hirn-Schranke (Burnham et al. 1991, Miller et al. 1992) sowie eine Apoptose-Induktion von T-Lymphozyten (v.a. CD4<sup>+</sup>), welche im EAE-Modell und in vivo durch eine hochdosierte Glukokortikoid-Pulstherapie ausgelöst werden können (Leussink et al. 2001, Zipp et al. 2000).

Da diese Erkenntnisse die Kortisonwirkung noch nicht ausreichend erklären, führten Herr Dr. H. Faber und Herr Dr. P. Weber mit Hilfe eines Microarrays eine genomweite Expressionsanalyse an MS-Patienten vor, unter und nach Kortisonstoßtherapie durch. Die statistische Auswertung der Rohdaten erfolgte durch Herrn Dr. B. Pütz. Im Weiteren analysierte ich die zur Verfügung gestellten Genexpressionsdaten mit dem Ziel kortisonregulierte Gene zu identifizieren, die an der Wirkung der Kortikosteroid-Schubtherapie beteiligt und für die MS-Pathogenese relevant sein könnten. Diese Gene sollen einen Gensignalweg bilden und darüber in Interaktion stehen. Die Genexpressionsveränderungen sollen auf mRNA-Ebene in vivo und in vitro sowie auf Proteinebene nachgewiesen werden. Durch die Aufdeckung weiterer Wirkmechanismen von Kortikosteroiden möchten wir einen Anstoß zur Entwicklung neuer Medikamente mit geringeren Nebenwirkungen und einer höheren Wirksamkeit geben.



## 2 Patienten, Material und Methoden

### 2.1 Patienten und gesunde Kontrollen

In unsere Untersuchungen wurden nach schriftlich dokumentierter Aufklärung und Einwilligung insgesamt 72 Patienten der MS-Ambulanz und der neurologischen Station des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie München einbezogen. Diese waren an Multipler Sklerose entsprechend der Kriterien von McDonald (Polman et al. 2011) erkrankt und wurden mit 1000 mg Methylprednisolon i.v. behandelt.

6 Patienten wurden in die Microarray-Analyse eingeschlossen, 6 weitere in die Validierung der Arrayergebnisse mittels qRT-PCR, 23 in den SLPI-ELISA, 21 in den MMP9-ELISA, 13 in den OSM-ELISA und 3 in die Zellkulturexperimente. Genauere Angaben zu Alter, Geschlechtsverteilung und dem jeweiligen Expanded Disability Status Scale (EDSS)-Score können Tabelle 2.1 entnommen werden. Nicht aufgeführt sind hierin die Daten der Patienten, die zur Microarray-Validierung herangezogen wurden. Hierbei handelte es sich um 6 Patienten, welche an einer RR-MS litten, im Mittel 44 Jahre (SD = 16,52) alt waren und einen EDSS-Median von 2,75 sowie eine EDSS-Spannweite von 2–3,5 aufwiesen. Die Patienten waren nicht mit einer verlaufsmodifizierenden Therapie behandelt. Die Probandendaten sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

22 Patienten des SLPI-ELISA litten an einer RR-MS, einer an einer SP-MS im Schub. 20 Patienten waren zum Zeitpunkt der Untersuchung unbehandelt, zwei erhielten Glatirameracetat und einer IFN- $\beta_{1a}$ . Von 23 Patienten existierten Serumproben zum Zeitpunkt ihres Krankheitsschubes (vor der MP-Behandlung) und während der Therapie, von 9 Patienten gab es eine dritte Serumprobe 4 Wochen nach der Behandlung. Die MS-Patienten waren im Mittel 40 Jahre alt, die Gesunden 35 Jahre. Die Geschlechtsverteilung spiegelte das für MS-typische 1(m):2(w)-Verhältnis wider. So wurden 8 männliche Patienten und 15 weibliche, sowie 3 gesunde Männer und 5 gesunde Frauen in die Untersuchung einbezogen.

Mit dem MMP9-ELISA wurden Seren von 21 (m:w = 9:12) Patienten und von 9 (m:w = 4:5) gesunden Probanden untersucht. 20 Patienten wiesen eine RR-Verlaufsform auf, ein Patient eine sekundär progrediente MS im Schub. Vier Patienten waren mit Glatirameracetat, einer mit IFN- $\beta_{1a}$  behandelt. Während vor und unter der Behandlung Proben aller Patienten vorlagen, konnten für den Zeitpunkt vier Wochen nach der Behandlung nur 9 Patienten rekrutiert werden.

Die Patienten des OSM-ELISA sowie der Zellkultur-Untersuchungen wiesen alle eine RR-MS sowie keine verlaufsmodifizierende Therapie auf.

Für den OSM-ELISA wurden 5 (m:w = 2:3) gesunde Probanden und für die Zellkultur 3 (m:w = 1:2) Gesunde als Kontrollgruppe herangezogen.

Für die Untersuchung mit PCR und ELISA-Technik wurden jeweils 2 PAXgene-Röhrchen mit 2,5 ml Vollblut und ein Serumröhrchen mit 7,5 ml abgenommen, für die Zellkultur-Experimente wurden je Patient/Proband mindestens 4 Röhrchen EDTA-Blut (je 7,5 ml) benötigt.

**Tabelle 2.1:** Patientendaten

	<b>Micro-array</b>	<b>SLPI-ELISA</b>	<b>MMP9-ELISA</b>	<b>OSM-ELISA</b>	<b>Zellkultur (MS-Patienten)</b>
Anzahl (n)	6	23	21	13	3
Alter (Jahre, Mittelwert $\pm$ SD <sup>1</sup> )	36,30 $\pm$ 7,15	40,17 $\pm$ 11,21	41,43 $\pm$ 10,93	39,5 $\pm$ 4,24	58,0 $\pm$ 17,78
Geschlechterverhältnis (männlich : weiblich)	3:3	8:15	9:12	4:9	1:2
EDSS <sup>2</sup> (Median, Spannweite)	2,50 (2-3)	2,96 (1,5-6,5)	2,90 (1,5-6,5)	2,0 (2-5)	3,70 (1,5-6)

**Tabelle 2.2:** Probandendaten

	<b>SLPI-ELISA</b>	<b>MMP9-ELISA</b>	<b>OSM-ELISA</b>	<b>Zellkultur (Probanden)</b>
Anzahl (n)	8	9	5	3
Alter (Jahre, Mittelwert $\pm$ SD <sup>1</sup> )	35 $\pm$ 9,28	35,29 $\pm$ 10,59	35,2 $\pm$ 9,93	30,67 $\pm$ 4,19
Geschlechterverhältnis (männlich : weiblich)	3:5	4:5	2:3	1:2

<sup>1</sup>SD: Standard Deviation (Standardabweichung)

<sup>2</sup>EDSS: Expanded Disability Status Scale

## 2.2 Material und Methoden

### 2.2.1 Microarray aus Patienten-Vollblut

#### *Material*

- PAXgene Blood RNA tubes, PreAnalytix<sup>®</sup> GmbH (BD/Qiagen GmbH), Hombrechtikon (CH)
- Illumina<sup>®</sup> TotalPrep RNA Amplification Kit, Illumina<sup>®</sup> Inc., San Diego, California (USA)
- 3 “Sentrix Human-6v2 Six-sample Bead Chips” von Illumina<sup>®</sup>
- Illumina<sup>®</sup> BeadArray Reader

Als Vorarbeit wurde von Herrn Dr. Hans Faber und Herrn Dr. Peter Weber ein Gesamt-Genom-Expressions-Microarray durchgeführt.

Dazu wurde Vollblut von 6 MS-Patienten in PAXgene-Röhrchen vor der i.v.-Methylprednisolontherapie, während der Kortisonstoßtherapie jeweils vor der dritten 1000 mg-Gabe sowie 4 Wochen nach Ende der Behandlung, entnommen.

Der Microarray wurde nach dem Prinzip der Direkt-Hybridisierung unter Nutzung der Illumina<sup>®</sup> BeadArray-Technologie durchgeführt. Die cRNA wurde mit Hilfe des Illumina<sup>®</sup> TotalPrep RNA Amplifikations-Kit und des dazugehörigen Protokolls gewonnen. Drei „Sentrix Human\_6\_v2 Six-sample Bead Chips” mit je 48.687 Gensonden wurden nach dem Illumina<sup>®</sup> Protokoll „Whole-Genome Gene Expression Direct Hybridization Assay Guide“ hybridisiert. Untersucht wurden 18 Patientenproben: 6 Patienten mit jeweils 3 Proben (vor, unter und nach Methylprednisolontherapie).

Die Fluoreszenz-Intensität, die mit der Menge der Transkripte in den einzelnen Proben korreliert, wurde mit dem BeadArray Reader ermittelt. Dabei handelt es sich um einen Laser, der Signale detektiert und ein Bild sowie Daten von jedem BeadChip erstellt. Im Rahmen der Auswertung durch Herrn Dr. Benno Pütz wurde eine Normalisierung der Rohdaten, sowie ein Clustering der Patientenproben zur Visualisierung von Ähnlichkeiten unter den verschiedenen Expressionsprofilen durchgeführt. Ferner wurde eine differentielle Expressions-Analyse erstellt. Darüberhinaus erfolgte eine Klassifizierung der signifikant regulierten Gene mit der empirischen BAYES-Methode. Diese bezieht Informationen aus allen Proben ein, um die Proben-Varianz für jedes einzelne Gen abschätzen zu können. Mit dieser Annäherung soll eine Stabilisierung der statistischen Analyse erzielt werden, insbesondere bei Array-Analysen mit einer kleineren Probenanzahl.

9.154 Gene zeigten kein Expressionssignal. Diese Gene wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Die übrigen wurden bezüglich Expressionsunterschieden in allen drei (Kortisontherapie-Schub, Remission-Schub und Remission-Kortisontherapie) oder nur in einzelnen der untersuchten Konditionen gruppiert. Die dadurch generierte Genexpressions-Datenmenge analysierten wir mit Hilfe des Programmes Pathway-Studio®.

### 2.2.2 Pathway-Studio

#### *Material*

- Pathway Studio® Version 7.1 (Ariadne Genomics, Inc, Rockville MD, USA)

Um einen Überblick über die umfangreiche Datenmenge der Microarray-Untersuchung zu bekommen, wurden 1.908 signifikant regulierte ( $p < 0,05$ ) Gene in das Programm Pathway Studio Version 7.1 eingelesen.

Mit Hilfe dieser Software können Zusammenhänge zwischen einzelnen Genen auf verschiedenen Ebenen dargestellt werden. Neben der Einbindung von Genen in bestimmte Stoffwechsel- und Signalwege können Genregulations- und Geninteraktionsnetzwerke untersucht werden. Diese Informationen über Genzusammenhänge werden durch die integrierte MedScanTechnology zum Beispiel direkt aus Pubmed-Publikationen gewonnen. Die MedScan-Anwendung kann Bedeutungsstrukturen in einem Text automatisch erkennen und somit die jeweiligen Informationen den entsprechenden Genen im Pathway zuordnen. Die durch MedScan genutzte Informationsquelle ist für den Nutzer durch eine direkte Verlinkung zu Pubmed oder anderen Datenbanken einsehbar. Ziel der Anwendung dieses Programmes war es, zu untersuchen, inwieweit die Kandidatengene aus dem Microarray funktionell in Beziehung stehen.

### 2.2.3 Zellkultur mit PBMC und neutrophilen Granulozyten von MS-Patienten und gesunden Kontrollen

#### *Material*

- S-MONOVETTE® 7,5 ml-Blutabnahmeröhrchen mit 1,6 mg EDTA/ml Blut, SARSTEDT Aktiengesellschaft&Co, Nümbrecht
- Kulturmedium RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin versetzt mit 10% fetalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin, jeweils Biochrom AG, Berlin

- Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) ohne CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub>, GIBCO® , Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- Biocoll Separating Solution, Dichte 1,077 g/ml, Biochrom AG, Berlin
- TPP Zellkultur-Testplatten, 12 well, zellkulturbehandelt, gammasterilisiert, pyrogenfrei, RNA(se)-/DNA(se)-frei, TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
- Urbason® soluble forte 250 mg, Wirkstoff: Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat, Sanofi Aventis, Frankfurt am Main
- Recombinantes Human TNF- $\alpha$ /TNFSF1A/TNF- $\alpha$ , Katalog Nummer: 210-TA, R&D Systems®, Minneapolis
- 14,3 M  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME), RLT-Puffer (Guanidin-Thiocyanat-Puffer), Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- QIAshredderTM, Qiagen GmbH, Hilden
- Zentrifuge Biofuge fresco, Firma Heraeus, Buckinghamshire, England
- Zentrifuge 420R, Firma Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
- Inkubator BB 6220 CU CO<sub>2</sub>-Inkubator von Heraeus/Thermo Fisher Scientific, Bonn
- Sterilsicherheitswerkbank HERA safe HS 15 von Heraeus/Thermo Fisher Scientific, Bonn

Aus frisch abgenommenem EDTA-Blut wurden zunächst periphere mononukleäre Zellen (PBMC) durch Dichtezentrifugation gewonnen. Dazu wurden jeweils 10 ml EDTA-Blut in ein steriles 50 ml-Röhrchen gegeben, mit 25 ml PBS verdünnt und schließlich auf 15 ml Biocoll geschichtet. Nach vierzigminütiger Zentrifugation bei 400 g und 20 °C konnten die PBMC aus der Schicht zwischen Überstand und Biocoll abgenommen werden. Im zuvor abpipettierten Überstand befinden sich Thrombozyten, im Sediment verbleiben Erythro- und Granulozyten. Die gewonnenen PBMC wurden mit PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt.

Die neutrophilen Granulozyten bilden über dem Erythrozytenpellet eine trüb-graue Schicht, die nach Absaugen des Plasma-, Thrombozyten- und Biocoll-Überstandes abpipettiert werden konnte. Um die neutrophilen Granulozyten von verunreinigenden Erythrozyten zu trennen, erfolgte eine viermalige Lyse der Erythrozyten durch eine hypotone Salzlösung. Hierzu wurde eine hypotone 0,2%-ige und eine hypertone 1,6%-ige NaCl-Lösung hergestellt. Zunächst wurden 20 ml der hypotonen Lösung zugegeben und nach 30 Sekunden Einwirkzeit 20 ml der hypertonen Lösung, um die

Isotonizität wiederherzustellen. Zwischen jedem Lysezyklus erfolgte eine fünfzehnminütige Zentrifugation bei 509 g (1200 rpm) und 4 °C.

Die PBMC und neutrophilen Granulozyten wurden mehrmals in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zählung lebender Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Abgestorbene Zellen konnten durch eine Färbung mit Trypanblau ermittelt werden.

Im Folgenden wurden die Zellen so auf die 12 well-Platten verteilt, dass sich in jeder Zellkulturplatten-Vertiefung circa 4 Millionen Zellen befanden.

Nach Inkubation über zwölf Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank wurden die Zellen mit zwei verschiedenen Methylprednisolon- und TNF- $\alpha$ -Konzentrationen stimuliert. Von der 0,1 mg/ml- bis zu der 0,00001 mg/ml-Methylprednisolon-Lösung wurden pro well 20  $\mu$ l zugegeben, von der 0,1 ng/ $\mu$ l- und der 5 ng/ $\mu$ l-TNF- $\alpha$ -Verdünnung jeweils 2  $\mu$ l. Die Stimulationsdauer betrug 4, 12 und 24 Stunden.

Im Anschluss wurden die Zellen mit dem Medium abpipettiert, vom Medium abzentrifugiert und mit PBS gewaschen.

## 2.2.4 RNA-Isolation aus der Zellkultur

### *Material*

- RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden
- QIAshredder<sup>TM</sup>, Qiagen GmbH, Hilden
- QIAamp<sup>®</sup> RNA Blood Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden
- RNase-Free DNase Set, Qiagen GmbH, Hilden
- 14,3 M  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME), Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Mikrozentrifuge Biofuge fresco, Firma Heraeus, Buckinghamshire, England
- Nano-Photometer 1166 von IMPLEN GmbH, München
- PBS (für photometrische RNA-Messung), GIBCO<sup>®</sup>, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- Ethanol (100% Reinst.), Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Mit Hilfe des RNeasy Mini Kits von Qiagen wurde die Gesamt-RNA aus PBMC und neutrophilen Granulozyten isoliert.

Die RNeasy-Technologie vereint die selektiven RNA-Bindungseigenschaften von Silicagel-Membranen mit der Mikrozentrifugationstechnik. Durch ein spezielles Puffersystem können bis zu 100  $\mu\text{g}$  RNA, welche länger als 200 Basenpaare ist, an der Gelmembran gebunden werden. Somit erfolgt eine selektive mRNA-Aufreinigung, da rRNA oder tRNA größtenteils aus einer geringeren Basenpaaranzahl bestehen.

Im ersten Schritt erfolgte die Lyse der Blutzellen mit 350  $\mu\text{l}$  einer 14,3 M  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME)-haltigen Lösung. Diese wurde zuvor durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol in 1 ml RLT-Puffer hergestellt und bewirkt eine Denaturierung der Zellwände.

Hierauf wird das Gemisch auf eine QIAshredder-Säule gegeben und durch diese zentrifugiert. Die Shredder-Säule wird verworfen, die durchzentrifugierte Flüssigkeit wird zur RNA-Isolierung weiterverwendet.

Die folgende Homogenisierung dient dazu, die durch die Zellyse entstandene Viskosität zu vermindern, damit eine effiziente Bindung der RNA an die Silicagel-Membran erfolgen kann. Dies erfolgte durch die Zentrifugation des Lysats in QIAshredder-Spinsäulen und die Zugabe von 70%-igem Ethanol. Anschließend wurden die Proben in RNeasy Mini-Spinsäulen pipettiert. Die Gesamt-RNA bindet an die Silicagel-Membran, während Verunreinigungen mit verschiedenen Puffern ausgewaschen werden.

Da die gewonnene RNA für Untersuchungen mit der quantitativen RT-PCR-Technik benötigt wurde, integrierten wir einen zusätzlichen DNase-Verdau-Schritt mit dem RNase-Free DNase Set von Qiagen. Der DNase-Verdau erfolgte hierbei auf der RNeasy-Säule mit mehreren aufeinanderfolgenden Waschschritten.

Im Anschluss wurde die RNA mit RNase freiem Wasser eluiert. Als Grundlage für die Versuchsdurchführung diente das Protokoll für tierische Zellen im RNeasy Mini Handbuch der Firma Qiagen.

Um die Konzentration und Reinheit der extrahierten RNA zu bestimmen, erfolgte eine photometrische Messung mit 8  $\mu\text{l}$  RNA, die 1:10 in RNA-freiem Wasser verdünnt wurde. Mit dem Absorptionswertquotienten  $\frac{A_{260}}{A_{280}}$  kann die RNA-Reinheit bestimmt werden. A 260 steht für den Wert der photometrischen Absorptionsmessung bei der Wellenlänge 260 nm, die vor allem zur DNA-/RNA-Konzentrationsbestimmung genutzt wird. Da A 280 die Absorption bei 280 nm angibt, welche speziell zur Proteinkonzentrationsbestimmung herangezogen wird, weist ein Wert  $< 1,8$  des  $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ -Quotienten auf eine Proteinverunreinigung hin. Der  $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ -Quotient sollte im Bereich von 1,8–2,0 liegen. In diesem Fall kann man von einer hohen DNA-/RNA-Reinheit ausgehen.

### 2.2.5 RNA-Isolation aus menschlichem Vollblut

#### *Material*

- PAXgene<sup>TM</sup> Blood RNA-Röhrchen, PreAnalytix<sup>®</sup> GmbH (BD/Qiagen GmbH), Hombrechtikon (CH)
- PAXgene Blood RNA Kit, PreAnalytix<sup>®</sup> GmbH (BD/Qiagen GmbH), Hombrechtikon (CH)
- 100%-iger Ethanol, Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Für die Gewinnung von RNA aus menschlichem Vollblut nutzten wir das PAXgene Blood RNA Kit, bestehend aus speziellen Blutabnahmeröhrchen (PAXgene Blood RNA Tubes) und einem Nukleinsäure-Reinigungs-Set (PAXgene Blood RNA Kit).

Die Abnahmeröhrchen enthalten spezielle Reagenzien zur Stabilisierung von RNA, die eine RNA-Degradation sowie Genexpressions-Veränderungen nach der Blutabnahme verhindern soll. Damit kann das abgenommene Blut bis zu drei Tage bei Raumtemperatur und bis zu 50 Monate bei  $-20\text{ °C}$  bzw.  $-70\text{ °C}/-80\text{ °C}$  gelagert werden.

Die im Abnahmeröhrchen enthaltenen 2,5 ml Vollblut wurden im Folgenden zentrifugiert, um ein Nukleinsäurepellet zu bekommen. Es folgten Wasch-, Resuspensionschritte und Proteinverdau durch die Proteinase K. Darauf schloss sich die Zelllyse in PAXgene Shredder-Säulen an. Nach Zugabe von 100%-igem Ethanol konnte die Gesamt-RNA in PAXgene RNA-Spinsäulen, die im PAXgene Blood RNA Kit enthalten sind, gebunden werden. Die RNA wurde in mehreren Wasch- und DNA-Verdauschritten gereinigt und schließlich von dem Silicagel eluiert.

### 2.2.6 Reverse Transkription von RNA in cDNA

#### *Material*

- SuperScript<sup>TM</sup>III First-Strand Synthesis SuperMix für qRT-PCR, invitrogen GmbH, Darmstadt

Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte mit dem SuperScript<sup>TM</sup>III First-Strand Synthesis SuperMix für qRT-PCR von invitrogen gemäß Herstellerprotokoll. Anfangs wurde die eluierte RNA für dreißig Minuten bei  $50\text{ °C}$  inkubiert. Währenddessen konnte ein MasterMix aus dem 2X RT Reaction Mix, welcher oligo(dT)<sub>20</sub>-,



Random-Hexamer-Primer, MgCl<sub>2</sub> und dNTPs enthält, sowie dem RT Enzyme Mix, der aus einer hitzestabilen Reversen Transkriptase und einem RNase-Inhibitor-Protein besteht, hergestellt werden. Nach Zugabe dieses Ansatzes zu den einzelnen RNA-Proben musste zunächst eine Inkubation für zehn Minuten bei 25 °C erfolgen, für eine weitere halbe Stunde bei 50 °C und schließlich für fünf Minuten bei 85 °C, um die Enzyme zu denaturieren und damit die Reaktion zu beenden. Zur Entfernung der RNA von den cDNA-RNA-Hybrid-Molekülen wurde E.coli RNase H zugegeben. Dadurch wird die Sensitivität der qRT-PCR erhöht. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei 37 °C wurde die gewonnene cDNA gegebenenfalls verdünnt, um im Weiteren für die qRT-PCR eingesetzt werden zu können.

### 2.2.7 Quantitative PCR

#### *Material*

- LightCycler® 2.0 (Software Version 4.0.5.415), sowie LightCycler® 480, jeweils Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
- LightCycler® 2.0 Proben-Karussell (32 Proben) mit LightCycler® Kapillaren (20 µl) bzw. LightCycler 480 Multiwell Plate 384, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
- LightCycler® 2.0 Karussell-Zentrifuge und Kapillaren-Löser, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
- Fluoreszenzfarbstoff QuantiFast™SYBR® Green, Qiagen GmbH, Hilden
- GAPDH-, DUSP1-, SLPI-, OSM- und MMP9-Primer, mit Hilfe der Primer 3-Software, der NCBI Nucleotide- und der NCBI Ensemble-Datenbank sowie der NCBI BLAST-Anwendung designt, Synthese durch Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
- Nuclease-Free Water, 50 ml, Qiagen GmbH, Hilden

#### *Primer*

- GAPDH:
  - Vorwärts- Primer (Exon 4/5):  
5' -CCA TCA CCA TCT TCC AGG AGC GAG- 3'
  - Rückwärts- Primer (Exon 7/8):  
5' -GAT GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG -3'

- DUSP1:
  - Vorwärts- Primer (Exon 2):  
5' -AGT ACC CCA CTC TAC GAT CAG- 3'
  - Rückwärts- Primer (Exon 4):  
5' -CCT CCT CCA GCA TTC TTG- 3'
  
- SLPI:
  - Vorwärts- Primer (Exon 2):  
5' -CCA GGG AAG AAG AGA TGT TG- 3'
  - Rückwärts- Primer (Exon 4):  
5' -ACA CAG AGC AGG ACT CCA G- 3'
  
- OSM:
  - Vorwärts- Primer (Exon 2):  
5'-GCA GAC TCC TGG ACC CCT AT- 3'
  - Rückwärts- Primer (Exon 3):  
5' -CTG CTC TAA GTC GGC CAG TC- 3'
  
- MMP9:
  - Vorwärts- Primer (Exon 11):  
5' -GGG AAG ATG CTG CTG TTC A- 3'
  - Rückwärts- Primer (Exon 13):  
5' -TCA ACT CAC TCC GGG AAC TC- 3'

Die Array-Ergebnisse wurden mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR) validiert. Hierzu nutzten wir den LightCycler 2.0 sowie den LightCycler 480 von Roche (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim). Zur Quantifizierung diente der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff QuantiFast™SYBR® Green von Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden).

Die Fluoreszenzlösung SYBR Green I, die in dem Master Mix des QuantiFast™SYBR® Green PCR Kit enthalten ist, bindet unspezifisch an alle doppelsträngigen DNA-Moleküle und emittiert dann ein Fluoreszenzsignal bei 520 nm. Das Reaktionsvolumen von 10  $\mu$ l ergab sich jeweils aus 2  $\mu$ l cDNA und 8  $\mu$ l Master Mix. Dieser enthielt 5  $\mu$ l des Qiagen Master Mix, der sich aus einer hitzestabilen DNA-Polymerase, einem PCR-Puffer, SYBR Green I- Fluoreszenzlösung und einer Fluoreszenz-Referenzlösung zusammensetzt sowie 1  $\mu$ l Wasser und jeweils 1  $\mu$ l des forward- und reverse-Primers pro untersuchter Probe.

Zur Aktivierung der hitzestabilen DNA-Polymerase ist ein anfänglicher Inkubationsschritt von fünf Minuten bei 95 °C nötig. Hierauf folgt der Amplifikations-schritt, der aus einem Denaturierungsabschnitt von 10 Sekunden bei 95 °C und einer Anlagerungs- und Verlängerungsphase von 30 Sekunden bei 60 °C besteht. Im vor-letzten Schritt werden die Schmelzkurven mit einer jeweils zehneckündigen 95 °C-, 50 °C- und nochmaligen 95 °C-Phase ermittelt. Zuletzt folgt ein Kühschritt bei 42 °C für 30 Sekunden.

Da die SYBR Green-Moleküle unspezifisch an doppelsträngige DNA-Moleküle bin-den ist eine Schmelzkurvenananalyse unabdingbar, um unspezifisch amplifizierte PCR-Produkte und Primerdimere zu entdecken. Bei niedrigen Temperaturen sollte die Fluoreszenz hoch sein, da die DNA hier doppelsträngig vorliegt, mit steigender Temperatur sollte die Fluoreszenz abnehmen, da die DNA-Produkte sich bei ih-rem jeweiligen Schmelzpunkt in Einzelstränge auftrennen. Da PCR-Produkte von verschiedener Länge beziehungsweise Sequenz unterschiedliche Schmelzpunkte auf-weisen, ergeben sich mehrere peaks im Schmelzpunkte-Profil, falls nicht nur das gesuchte Genprodukt amplifiziert wurde.

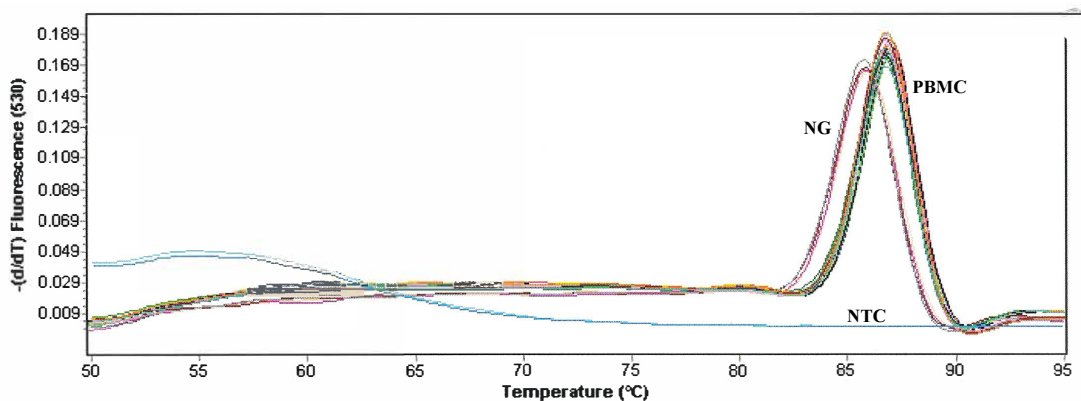
Zur Quantifizierung der Genexpressions-Levels wurde das Prinzip der relativen Quan-tifizierung genutzt. Dazu werden Expressionsdaten eines Zielgenes mit denen eines Referenzgenes ins Verhältnis gesetzt. Ein Referenzgen, auch Housekeeping-Gen ge-nannt, soll in möglichst jedem Zustand einer Zelle sowie verschiedenen experimen-tellen Bedingungen gleich stark exprimiert werden. Annähernd gilt dies für das Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase). Unter der Voraussetzung, dass die Amplifikations-Effektivität für das Zielgen und das Housekeeping-Gen ver-gleichbar und möglichst 100% ist, was bedeutet, dass sich die Genprodukte in jedem Zyklus der exponentiellen Phase verdoppeln, kann die  $2^{-\Delta C_p}$ -Methode angewendet werden:

$$\frac{\text{Zielgen}}{\text{Housekeeping-Gen}} = 2^{-\Delta C_p}$$

Das Kürzel  $C_p$  steht für Threshold Cycle oder crossing point. Der  $C_p$ -Wert gibt den PCR-Zyklus an, bei welchem das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellen-wert (threshold) übersteigt und damit als signifikant angesehen werden kann. Der Schwellenwert wird von stark exprimierten Genen mit einer relativ großen Ausgangs-cDNA-Menge schnell erreicht, der  $C_p$  -Wert ist daher niedrig. Aus der Differenz der  $C_p$ -Werte von Ziel- und Referenzgen ergibt sich mit oben genannter Formel die Ex-pression des Zielgens in Prozent bezogen auf das Referenzgen.

Das Primer-Design erfolgte mit der Primer 3-Software, der NCBI Nucleotide- und der NCBI Ensemble-Datenbank sowie der NCBI BLAST-Anwendung. Nucleotide und Ensemble dienten der Auswahl der Primer-Lage. Das Primerpaar sollte durch ein Intron von mindestens 1000 Basenpaaren getrennt sein, um eine möglichst gute mRNA-spezifische Amplifikation zu erreichen, die Primergröße sollte 18 bis 20 Basenpaare mit einem GC-Gehalt von circa 40–60% umfassen und die Produktgröße sollte 200 Basenpaare nicht überschreiten.

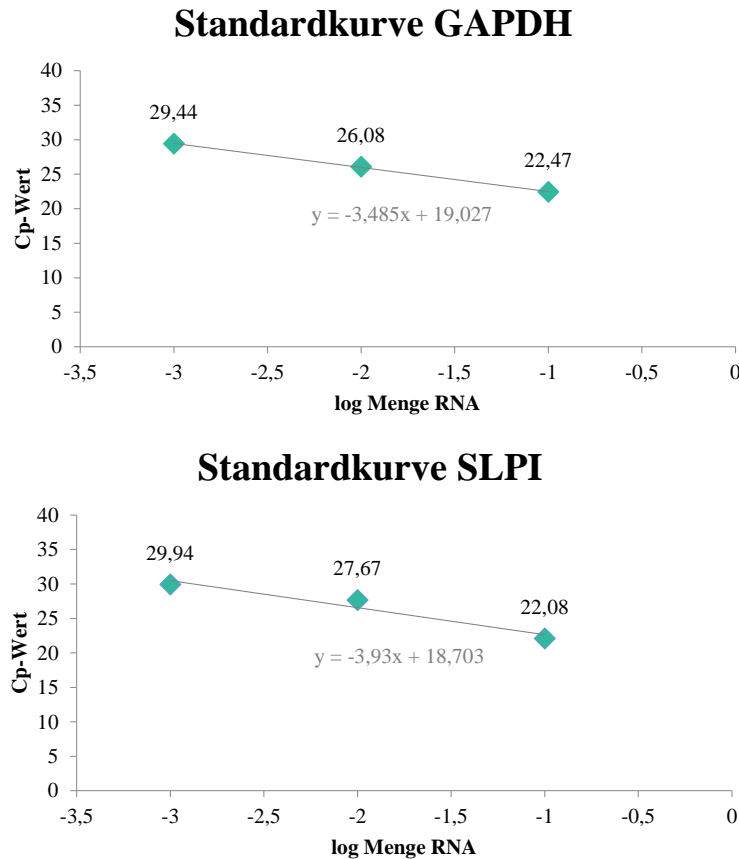
Um die Spezifität des konzipierten Primers zu überprüfen, wurde mit Nucleotide BLAST geprüft, dass kein anderes als das gewünschte Gen erkannt wird. Darüber hinaus wurde die Spezifität der PCR-Assays durch Schmelzkurvenanalysen, welche keinen Hinweis auf eine Primer-Dimer-Bildung oder die Bildung unspezifischer Produkte ergaben, bestätigt. Hierzu Abbildung 2.1 mit einer exemplarischen GAPDH-Schmelzkurve aus einer PCR mit Neutrophilen und PBMC unter verschiedenen Stimulationen.



**Abbildung 2.1:** GAPDH-Schmelzkurve aus einer PCR mit Neutrophilen Granulozyten (NG) und PBMC unter verschiedenen Stimulationen (NTC: No Template Control)

Um zu zeigen, dass die verwendeten PCR-Assays sensitiv sind, erstellten wir mittels Cp-Werten aus ex vivo-Verdünnungen von Neutrophilen Granulozyten Standardkurven für GAPDH und SLPI. In Abbildung 2.2 wird auf der x-Achse die logarithmische Menge der eingesetzten RNA-Menge zu den Cp-Werten auf der y-Achse aufgetragen. Mit zunehmender Verdünnung steigt der Cp-Wert (GAPDH:1:1000-Verdünnung (Cp-Wert 29,44), 1:10-Verdünnung (Cp-Wert 22,47)). Aus der Steigung der Geraden wurde die Effizienz der GAPDH- und SLPI-PCR-Assays berechnet. Die Effizienz von GAPDH beträgt 93,6%, die von SLPI 80%. In einem Cp-Wertbereich von 22–29 laufen die GAPDH- und SLPI-PCR effizient. Am Verlauf der Standardkurven zeigt sich darüber hinaus ein linearer Zusammenhang der Cp-Werte zu den

Verdünnungsstufen. Ferner sprechen vergleichbare Ergebnisse des Microarrays und der Validierung mittels qPCR für eine ähnliche Sensitivität und Spezifität der beiden Methoden.



**Abbildung 2.2:** Standardkurve für GAPDH und SLPI anhand ex vivo-Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000) mit Neutrophilen Granulozyten. Aus der Steigung der Geraden kann die Effizienz des jeweiligen PCR-Assays berechnet werden.

## 2.2.8 Zytotoxizitäts-Tests

### LDH-Test

#### *Material*

- Cytotoxicity LDH Detection Kit, Clontech, Mountain View, USA
- 96 well Zellkultur- Testplatten, flach, Biochrom AG, Berlin
- Kulturmedium RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin versetzt mit 10% fetalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin, jeweils Biochrom AG, Berlin

- Triton X-100 (für Elektrophorese) Detergens-Lösung, Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
- HCl-Lösung, Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
- 96 well-Rotor für Zentrifuge 420R, Firma Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
- Inkubator BB 6220 CU CO<sub>2</sub>- Inkubator von Heraeus/Thermo Fisher Scientific, Bonn
- Platerreader BertholdTech TriStar, Driver Version 1.03 (490 nm), Berthold Technologies GmbH&Co. KG, Bad Wildbad

Der Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Test dient der Quantifizierung der Zytotoxizität. Da LDH ein stabiles zytoplasmatisches Enzym darstellt, das in allen Zellen exprimiert wird, kommt es bei einem Zellmembranschaden im Rahmen des Zelltodes zu einem schnellen Anstieg der LDH-Konzentration im Zellkulturüberstand.

Mit Hilfe des Assays kann die LDH-Aktivität anhand einer Farbreaktion festgestellt werden. Dieser Farbumschlag von gelb auf rot ergibt sich durch eine NAD<sup>+</sup>- und NADH/H<sup>+</sup>-abhängige Reaktion: LDH katalysiert die NAD<sup>+</sup>-reduzierende Reaktion von Laktat zu Pyruvat. Somit entsteht NADH/H<sup>+</sup>, das für die Redox-Reaktion von wasserlöslichem, gelbem Tetrazolium-Salz zu reduziertem, rot erscheinendem Formazan benötigt wird. Damit führt ein Anstieg des Zellmembranschadens- bzw. Zelltodes zu einer LDH-Erhöhung, die in direkter Korrelation mit dem Formazan-Konzentrationsanstieg in einer definierten Zeitspanne steht. Es besteht eine direkte Proportionalität zwischen dem Zelltod und dem Formazan-Konzentrationsanstieg. Das wasserlösliche Formazan weist ein breites Absorptionsmaximum bei 500 nm auf, Tetrazolium hingegen nicht.

Den Test führten wir entsprechend dem Protokoll des Herstellers durch. Hierbei wurden die Zellkulturplatten nach stattgehabter Stimulation zentrifugiert, um einen möglichst zellfreien Überstand zu gewinnen, der auf eine neue 96-well Zellkulturplatte übertragen wurde. Nach Zugabe von 100  $\mu$ l Reaktions-Mixtur folgte eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei Dunkelheit und Raumtemperatur. Anschließend wurde mit 50  $\mu$ l einmolarer HCl-Lösung die Reaktion beendet und die Absorption photometrisch bei 490 nm ermittelt.

## MTT-Test

### *Material*

- Dimethylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium-bromid (MTT), Sigma M5655-1g: 5 mg/ml in PBS, Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
- Solubilisationslösung: 40% Dimethylformamid, 10% SDS, konzentrierte Essigsäure (pH<4), Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- 96 well Zellkultur-Testplatten, flach, BIOCHROM AG, Berlin
- Platerreader DYNATECH MR 7000, 550 nm, DYNEX Technologies, Chantilly, USA

Mit Hilfe des MTT-Assays soll die Zellviabilität der mit Kortison- und TNF- $\alpha$ -stimulierten Blutzellen ermittelt werden.

Der Test beruht auf dem Prinzip, dass der gelbe, wasserlösliche Farbstoff MTT in Mitochondrien lebender Zellen durch zwei Elektronentransport-Schritte in blauviolett erscheinendes, wasserunlösliches Formazan umgewandelt wird. Diese Reaktion ist NADH/NADPH-abhängig. Da die Menge des umgesetzten Farbstoffes der Glykolyserate der Zelle entspricht, können somit Rückschlüsse auf die Toxizität der zugegebenen Stimuli gezogen werden.

Zur Durchführung des Tests gibt man 10  $\mu$ l MTT in jedes well mit Zellkulturlösung, inkubiert die Testplatte bei 37 °C für vier Stunden im Brutschrank und fügt daraufhin 100  $\mu$ l Solubilisationslösung hinzu. Die blauen Präzipitate, die sich während der Inkubationszeit gebildet hatten, zerfallen durch die Hinzugabe der Solubilisationslösung. Anschließend wird die Platte in Alufolie gewickelt, bei Raumtemperatur gelagert und am nächsten Tag im Platerreader bei 550 nm gelesen.

### 2.2.9 SLPI-ELISA

#### *Material*

- Quantikine<sup>®</sup> Human SLPI Immunoassay DP100, R&D Systems<sup>®</sup>, Minneapolis
- Nuclease-Free Water, 50 ml, Qiagen GmbH, Hilden
- Wallac Victor 2 1420 Multilabel Reader, Perkin Elmer, Massachusetts, USA

Zur Ermittlung der SLPI-Konzentration im Serum von MS-Patienten und von gesunden Kontrollpersonen nutzten wir den Quantikine® Human SLPI Immunoassay DP100 von R&D Systems.

Hierbei handelt es sich um einen Festphase-ELISA mit aus E.coli-Stämmen gewonnenem rekombinantem humanem SLPI und dagegen gerichteten Antikörpern.

Die Patientenserumproben wurden während und nach einem Krankheitsschub standardisiert abgenommen: während des Schubereignisses sowohl vor der Behandlung mit Methylprednisolon sowie am dritten Tag vor der 3. MP-Infusion. Die dritte Blutabnahme erfolgte in einem Mindestabstand von vier Wochen nach dem Schubereignis/der abgeschlossenen MP-Behandlung. Die letztgenannte Probe lag nicht von allen Patienten vor.

Bei der Auswahl der gesunden Kontrollpersonen wurde auf eine Geschlechts- und Altersverteilung wie bei den Patientenproben geachtet.

Im SLPI-Sandwich-ELISA ist ein für SLPI spezifischer monoklonaler Antikörper auf den Bodenoberflächen der 96-well-Mikrotiterplatte gebunden. Dieser erste Antikörper wird *coating*-Antikörper genannt. Er bindet das in den Patienten- oder Kontrollserum vorhandene SLPI-Protein als Antigen.

Zur Quantifizierung der in den Proben gebundenen SLPI-Menge muss eine SLPI-Standard-Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen mitgemessen werden. Diese Verdünnungsreihe muss vor der Versuchsdurchführung aus einer SLPI-Stammlösung (stock solution) hergestellt werden, so dass ein SLPI-Konzentrationsbereich von 62,5–4000 pg/ml abgedeckt wird. Desweiteren wurden die Plasma-Proben 20-fach verdünnt.

Nach Zugabe der Serumproben bzw. der Verdünnungsansätze in die einzelnen wells musste eine Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur eingehalten werden. In dieser Zeit erfolgte die SLPI-Bindung aus den hinzupipettierten Proben an die im well vorgelegten Antikörper. Nach mehrmaligen Waschschritten und abschließend möglichst vollständiger Entfernung des Waschpuffers aus der 96-Well-Platte wurde ein SLPI-Konjugat zugegeben. Dabei handelte es sich um einen polyklonalen Antikörper, der ebenfalls an das SLPI-Protein bindet, jedoch auch an andere Epitope als der *coating*-Antikörper und an den ein Enzym gebunden ist. In unserem Fall das Enzym Meerrettich-Peroxidase. Dieser zweite Antikörper wird als *detection*-Antikörper bezeichnet, da sein gebundenes Enzym nach Hinzupipettieren einer Substratlösung einen Farbumschlag erzeugt, der sich proportional zur SLPI-Konzentration der Probe verhält und photometrisch ermittelt werden kann. Aufgrund der Bindung des Antigens durch zwei Antikörper spricht man vom Sandwich-



Prinzip. Nach Zugabe des zweiten Antikörpers hatte nochmals eine Inkubationszeit von zwei Stunden zu erfolgen, damit die Detektions-Antikörper vollständig an die aus Coating-Antikörpern und SLPI bestehenden Antigen-Antikörper-Komplexe binden konnten. Im darauffolgenden Waschschrift wurden, wie bereits im ersten, ungebundene Partikel entfernt. Die im folgenden hinzugegebene Substrat-Lösung musste unter Lichtschutz für zwanzig Minuten einwirken. Hierauf wurde die Enzym-Substrat-Reaktion, welche einen Farbumschlag ergab, mit einer schwefelsäurehaltigen Stopplösung beendet. Innerhalb einer halben Stunde musste die photometrische Messung zur Bestimmung der Absorption des jeweiligen wells bei 450 nm Wellenlänge durchgeführt werden.

### 2.2.10 OSM-ELISA

#### *Material*

- Oncostatin M Human ELISA Kit ab100619, Abcam plc, Cambridge, United Kingdom
- Nuclease-Free Water, 50 ml, Qiagen GmbH, Hilden
- Wallac Victor 2 1420 Multilabel Reader, Perkin Elmer, Massachusetts, USA

Zur Quantifizierung der OSM-Konzentration im Serum von MS-Patienten vor, unter und nach Kortisontherapie sowie von gesunden Kontrollpersonen nutzten wir das Oncostatin M Human ELISA Kit von abcam<sup>®</sup>. Wie bei dem zuvor beschriebenen SLPI-ELISA handelte es sich hierbei ebenfalls um einen Festphase-ELISA, der nach dem Sandwich-Prinzip funktioniert. Ein für OSM spezifischer monoklonaler Antikörper war bereits an die Bodenoberflächen der Mikrotiterplatte gebunden. Dieser *coating*-Antikörper bindet das OSM der Proben bzw. der Standards. Anschließend wird ein polyvalenter biotynilierter Antikörper, der gegen humanes OSM gerichtet ist, hinzupipettiert.

Die Proben der MS-Patienten und gesunden Kontrollen stammten aus demselben Probenpool wie bei der Durchführung des SLPI-ELISA. Die 13 Patientenseren und 5 Kontrollseren wurden unverdünnt eingesetzt und in Duplikaten gemessen.

Vor der Versuchsdurchführung musste eine Standard-Verdünnungsreihe aus einer OSM-Stammlösung hergestellt werden. Diese dient der Quantifizierung der in den jeweiligen Proben vorhandenen OSM-Menge. Durch verschieden starke Verdünnung wird ein OSM-Konzentrationsbereich von 0–1000 pg/ml abgedeckt.

Im ersten Schritt des OSM-ELISA wurden die Standardverdünnungen und die zu untersuchenden Seren in die jeweiligen wells pipettiert und über Nacht bei 4 °C auf einem leicht rotierenden Schüttler inkubiert. Während dieser Inkubationsphase erfolgte die Bindung des in den Proben enthaltenen OSM an den Antikörper, welcher sich bereits auf der Plattenoberfläche befand. Am nächsten Tag wurden im Anschluss an den Waschschrift zu jedem well 100  $\mu$ l des polyvalenten biotynilierten Antikörpers hinzugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Dieser zweite Antikörper bindet an andere Epitope des OSM-Proteins als der vorgelegte Antikörper. Nach erfolgtem Waschschrift bindet an Merrettichperoxidase gebundenes Streptavidin an die bestehenden Antigen-Antikörper-Komplexe aus OSM-Protein, vorgelegtem Antikörper und Detektionsantikörper. Nach einer 45-minütigen Inkubation und einem weiteren Waschschrift werden in jedes well 100  $\mu$ l einer Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung hinzugefügt, welche innerhalb der nächsten 30 Minuten von dem zuvor zugegebenem Enzym unter Lichtausschluss umgesetzt wird. Die mit dieser Reaktion einhergehende blaue Farbentwicklung verhält sich proportional zum Betrag von gebundenem OSM. Durch Zugabe von 50  $\mu$ l einer schwefelsäurehaltigen Stopplösung wurde die Enzymreaktion beendet und es erfolgte ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Farbintensität, die sich hierbei einstellte, wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm ermittelt.

### 2.2.11 MMP9-ELISA

#### *Material*

- Duo Set ELISA Development Kit human MMP9 (DY911), R&D Systems<sup>®</sup>, Minneapolis
- Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS), GIBCO<sup>®</sup>, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- Wasch-Puffer (0,05% Tween<sup>®</sup> 20 in PBS, pH 7,2-7,4, WA126), R&D Systems<sup>®</sup>, Minneapolis
- Reagenslösung (1% BSA in PBS, DY995), R&D Systems<sup>®</sup>, Minneapolis
- Substratlösung (1:1-Mischung von Farbreagenz A (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und B (Tetramethylbenzidin), R&D Systems<sup>®</sup>, Minneapolis
- Stopp-Lösung ( 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, DY994), R&D Systems<sup>®</sup>, Minneapolis
- Normal Goat Serum (DY005), R&D Systems<sup>®</sup>, Minneapolis
- Wallac Victor 2 1420 Multilabel Reader, Perkin Elmer, Massachusetts, USA

Im DuoSet ELISA Development Kit von R&D Systems® sind der *Coating*-Antikörper, der Detektionsantikörper, eine MMP9-Stammlösung für die Verdünnungsreihe und an Streptavidin gebundene Meerrettichperoxidase enthalten.

Mit diesem ELISA soll — wie in den vorangegangenen ELISA — die Quantifizierung der MMP9-Konzentration im Serum von MS-Patienten vor, unter und nach Kortisontherapie sowie von gesunden Kontrollpersonen durchgeführt werden. Deshalb wurden in diese Untersuchung 21 MS-Patienten und 9 gesunde Probanden aus dem Probenpool des SLPI-ELISA eingeschlossen.

Die Antikörperpaare des Sets sind für die Analyse von Zellkulturüberständen entwickelt worden. Da in unseren Untersuchungen jedoch Seren gemessen werden sollten, musste zunächst validiert werden in welcher Verdünnung diese eingesetzt werden können, damit die Messwerte innerhalb des Konzentrationbereiches liegen, den die Standardkurve abdeckt. Dies erforderte einige Testmessungen mit verschiedenen Serenverdünnungen. Nach Auswertung dieser Testmessungen haben wir uns für den Einsatz einer 1:1000-Verdünnung entschieden.

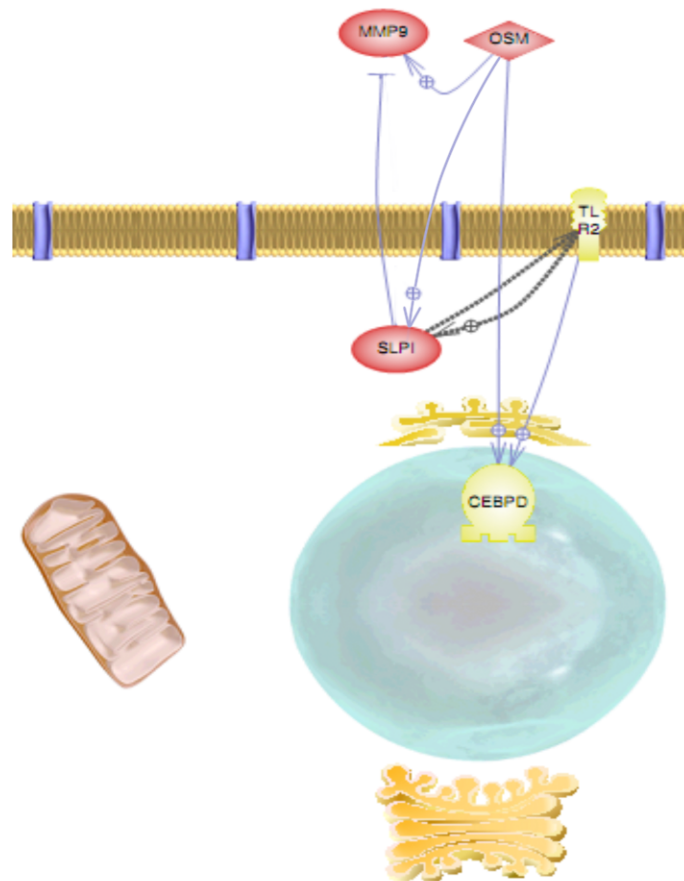
Der erste Schritt der ELISA-Durchführung beinhaltete das Beschichten der Mikrotiterplatte mit den in PBS verdünnten *coating*-Antikörpern (= *Coaten* der Platte). Dazu wurden 100  $\mu$ l der verdünnten Antikörper-Lösung in jedes *well* gegeben und die Platte über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Platte wurde eine Reagens-Lösung hinzugefügt und es erfolgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach nochmaligem Waschen wurden die Proben und die Standardreihe auf die Platte gegeben. Nach 2-stündiger Inkubation (bei Raumtemperatur) und erneutem Waschschrift wurden die Detektionsantikörper hinzugegeben. Diese wurden in mit Ziegenserum (*normal goat serum*) versetzter Reagenslösung verdünnt. Nach wiederum 2-stündiger Inkubationszeit und anschließendem Waschen der Platte wurde an Streptavidin gebundene Meerrettichperoxidase zu jedem *well* gegeben und für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. In dieser Zeit ging Streptavidin eine Bindung mit dem biotynilierten Detektionsantikörper ein. Das an Streptavidin gebundene Enzym Meerrettichperoxidase setzte die nach einem weiteren Waschschrift hinzugegebene Substratlösung während einer 20-minütigen Inkubation unter Lichtausschluss um. Nach Hinzugabe der Stopplösung wurde diese enzymatische Reaktion beendet und die Absorption konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm ermittelt werden.

### **2.2.12 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte für den SLPI- und den MMP9-ELISA mit dem Programm SigmaStat® 3.5 und mit Hilfe von Herrn Dr. Yassouridis (Biostatistiker des MPI für Psychiatrie, München). Wir prüften einerseits den Effekt der Kortisonbehandlung auf den SLPI/MMP9-Gehalt der Patientenseren und andererseits die SLPI/MMP9-Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollseren zu den einzelnen Behandlungs-Phasen. Für den ersten Vergleich wurde eine Varianzanalyse mit wiederholten Messungen angewandt, während für den Vergleich zwischen Patienten und Kontrollen innerhalb der einzelnen Zeitphasen [Phase I: Zeit vor der Behandlung, Phase II: Zeit während der Behandlung, Phase III: Zeit nach der Behandlung] jeweils eine Kovarianzanalyse mit der SLPI-/MMP9-Konzentration als abhängige Variable, mit der Gruppe (Patienten vs. Kontrollen) als Einflussfaktor sowie mit dem Geschlecht und Alter als Kovariaten appliziert wurde.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Array-Auswertung



**Abbildung 3.1:** Direkte Interaktion der Methylprednisolon-regulierten Gene SLPI, OSM und MMP9 (CEBPD: CCAAT enhancer binding protein, TLR2: toll-like receptor 2),

Symbol für Induktion:  $\text{---}\oplus\text{--}\rightarrow$ , Symbol für Inhibition:  $\text{---}\perp\text{--}\rightarrow$

Auf dem Microarray untersuchten Herr Dr. H. Faber und Herr Dr. P. Weber als Vorarbeit jeweils drei Proben von 6 MS-Patienten: 1. Eine Probe unmittelbar vor Beginn der Methylprednisolon-Stoßtherapie, 2. Eine Probe vor der dritten Methylprednisolon-Infusion, 3. Eine Probe mindestens vier Wochen nach der letzten Methylprednisolon-Infusion. Herr Dr. B. Pütz wertete die Rohdaten des Microarray aus. Diese wurden mir zur Verfügung gestellt und im Weiteren durch mich analysiert. Im Vergleich der Proben vor Steroidtherapie zu unter Steroidtherapie sowie im Vergleich der Proben unter Therapie zu nach Therapie fanden sich 1908 Gene, die einer Regulierung

durch Kortikosteroide unterliegen ( $p < 0,05$ ). Zwischen den beiden Stadien vor Kortisontherapie und ca. vier Wochen nach Kortisontherapie zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die hundert höchstregulierten Gene wurden bezüglich ihrer möglichen Relevanz für die MS-Pathologie manuell durchgesehen. Dabei fiel eine deutliche und signifikante Erhöhung der SLPI-Transkripte unter der MP-Therapie auf. Als Proteinaseinhibitor könnte SLPI möglicherweise für die Pathologie der MS relevant sein. Hierauf wurden 173 Gene, die neben einem p-Wert kleiner als 0,05 eine Genexpressions-Veränderung (*fold change*) von  $|FC| > 2,0$  zwischen dem Zeitpunkt der Kortisonbehandlung und dem Zeitpunkt des Schubereignisses aufwiesen, im Programm Pathway Studio<sup>®</sup> bezüglich funktioneller Interaktionen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass das Gen SLPI, das eines der am stärksten regulierten Gene ( $FC = 8,97$ ) in unserem Array darstellt, mit den Genen Oncostatin M (OSM,  $FC = 2,82$ ) und MMP9 ( $FC = 2,52$ ) eine funktionelle Verknüpfung aufweist, wie in Abbildung 3.1 graphisch dargestellt ist.

Die Ergebnisse des Microarrays bezüglich der von uns untersuchten Gene sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Hier wurden die Expressionsniveaus zu den verschiedenen Zeitpunkten betrachtet und jeweils ins Verhältnis zueinander gesetzt.

**Tabelle 3.1:** Microarrayanalyse: *Fold change* der Gene SLPI, MMP9, OSM und DUSP1

Rang	Gen	Kortison/Schub	Remission/Schub	Kortison/Remission
4	SLPI	8,97	1,38	6,52
330	MMP9	2,52	1,02	2,46
652	OSM	2,82	-1,03	2,91
1275	DUSP1	1,91	1,09	1,76

## 3.2 Array-Validierung

Zur Plausibilitätskontrolle der Arraydaten untersuchten wir zunächst Gene, die gemäß Literaturstudium sicher durch Kortison reguliert werden, wie z.B. die Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1). Im nächsten Schritt bestimmten wir die Expression von Kandidatengenen, die uns basierend auf der Arrayauswertung bezüglich möglicher Wirkmechanismen einer Kortisonstoßtherapie interessant erschienen: Mit SLPI, OSM und MMP9 haben wir Gene gefunden, die einer starken Kortisonregu-

lation unterliegen, für die Pathologie der MS relevant erscheinen und laut Literatur funktionell verknüpft sind.

Zur Validierung der Array-Ergebnisse erfolgte die Quantifizierung der Expression der oben genannten Kandidatengene von denjenigen Patienten, die in den Array eingeschlossen waren mittels quantitativer RT-PCR. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 3.2 und Tabelle 3.3. In Tabelle 3.2 sind die Mittelwerte der Genexpression in % GAPDH mit Standardabweichung angegeben, in Tabelle 3.3 sind zur besseren Vergleichbarkeit mit den Microarray-Ergebnissen die Expressionsverhältnisse aufgeführt.

**Tabelle 3.2:** Validierung der Mikroarray-Ergebnisse anhand der Gene SLPI, MMP9, OSM und DUSP1 mittels quantitativer PCR (MW±SD) an den im Array eingeschlossenen Patienten

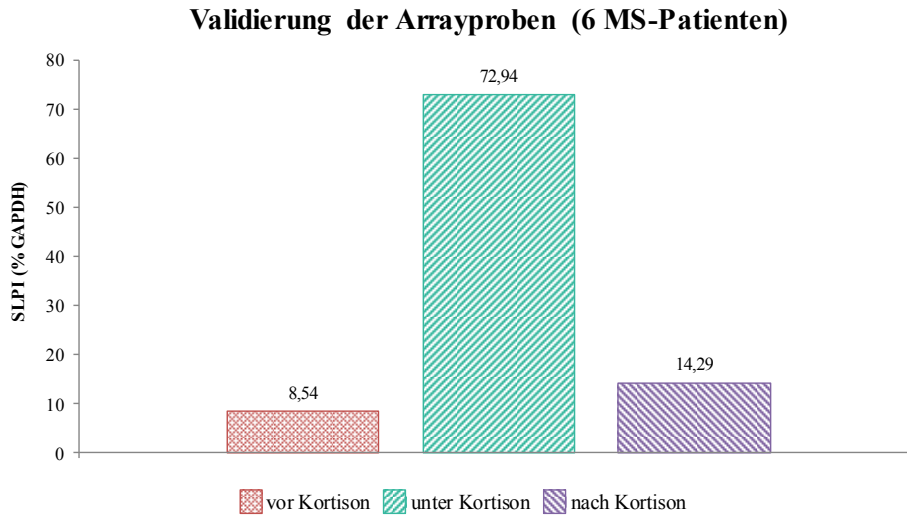
Genbezeichnung	Schub	unter Kortison	Remission
SLPI	8,54±5,77	72,94±29,62	14,29±8,12
MMP9	21,75±5,24	48,94±7,08	20,45±4,82
OSM	0,83±0,31	1,99±0,3	4,23±0,52
DUSP1	129,29±31,33	246,24±106,92	159,9±25,49

**Tabelle 3.3:** Validierung der Array-Ergebnisse mittels quantitativer PCR: Expressionsverhältnisse der Gene SLPI, MMP9, OSM und GAPDH der im Array eingeschlossenen Patienten

Genbezeichnung	Kortison/Schub	Remission/Schub	Kortison/Remission
SLPI	8,54	1,67	5,1
MMP9	2,25	0,94	0,42
OSM	2,4	1,14	0,47
DUSP1	1,90	1,24	1,54

Der Vergleich der Expressionsverhältnisse aus der Microarray-Untersuchung mit denen der PCR-Messungen ergibt nahezu identische Verhältnisgrößen. Das Gen SLPI zeigt bei Gegenüberstellung des Schubereignisses zur Kortisonstoßtherapie mit 8,97 bzw. 8,54 in beiden Messverfahren die größte Expressionsänderung. Die Kortisonbehandlung verhält sich gegenüber der Remissionsphase mit einer 6,52- bzw. 5,1-fachen Expressionssteigerung ähnlich. Die geringen Expressionsunterschiede zwischen Schub und Remission zeigen sich in den Werten 1,38 bzw. 1,67, die einem 1:1-Verhältnis sehr nahe kommen.

Die SLPI-Transkripte sind relativ zum Housekeeping-Gen GAPDH zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten vor, unter und nach Kortison in Abbildung 3.2 exemplarisch dargestellt.



**Abbildung 3.2:** Validierung der Mikroarray-Ergebnisse für SLPI mittels quantitativer PCR an den im Array eingeschlossenen Patienten

Ferner erfolgten im Sinne einer weiteren Validierung Messungen mittels quantitativer RT-PCR an unabhängigen Proben von sechs MS-Patienten. Hierbei wurde die Expression der Gene SLPI, OSM und MMP9 im Schub, in Remission sowie unter Methylprednisolon-Behandlung ermittelt.

**Tabelle 3.4:** Validierung der Mikroarray-Ergebnisse anhand der Gene SLPI, MMP9, OSM und DUSP1 mittels quantitativer PCR (MW±SD) an unabhängigen Patienten

Genbezeichnung	Schub	unter Kortison	Remission
SLPI	4,32±2,09	34,43±14,98	6,69±0,1
MMP9	15,88±6,58	49,54±15,26	21,95±3,13
OSM	0,54±0,28	1,23±0,81	0,75±0,48

Die Expression für SLPI und MMP9 verhält sich untereinander ähnlich wie in der Array-Untersuchung und in der Validierung der Arraydaten mittels qPCR, wie aus Tabelle 3.4 und Tabelle 3.5 hervorgeht. Die beiden Gegenüberstellungen Kortisontherapie zu Schubereignis und Kortisonbehandlung zu Remissionsphase zeigen die jeweils stärksten Expressionsunterschiede in einer vergleichbaren Größenordnung. Remissionsphase und Schub weisen hingegen keine relevanten Expressionsunterschiede auf. Die Transkripte für das Gen OSM weisen durchgängig relativ geringe Unter-



**Tabelle 3.5:** Expressionsverhältnisse der Gene SLPI, MMP9 und OSM in unabhängigen Patientenproben

Genbezeichnung	Kortison/Schub	Remission/Schub	Kortison/Remission
SLPI	7,97	1,55	5,15
MMP9	3,12	1,38	2,26
OSM	2,27	1,39	1,64

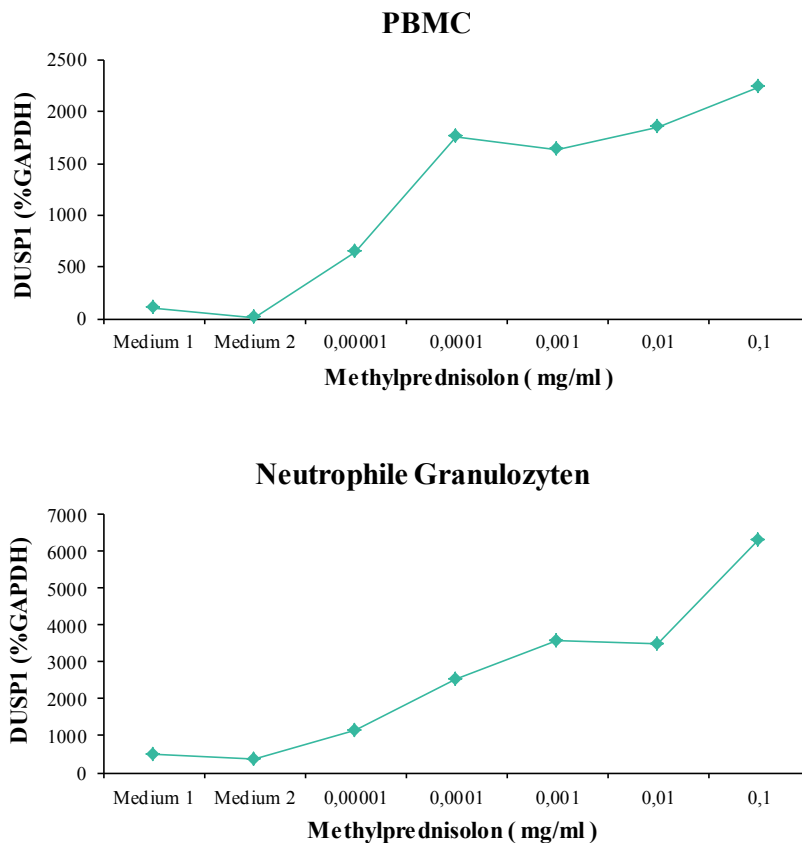
schiede auf und erreichen in der Gegenüberstellung Kortison zu Schub die höchsten Differenzen.

### 3.3 Zellkultur mit PBMC und neutrophilen Granulozyten von MS-Patienten und gesunden Kontrollen

Um zu überprüfen, ob die zuvor beschriebenen Erhöhungen der Transkripte von SLPI, OSM und MMP9 während eines Kortisonstoßes Ausdruck einer direkten Regulation durch MP auf Zellebene sind, quantifizierten wir die Gentranskripte von SLPI, OSM und MMP9 in neutrophilen Granulozyten und mononukleären Blutzellen (PBMC) nach in vitro-Stimulation mit Methylprednisolon und/oder TNF- $\alpha$ . Hierbei führten wir zwei verschiedene Versuchsansätze durch.

#### 3.3.1 Dosis-Wirkungs-Beziehung

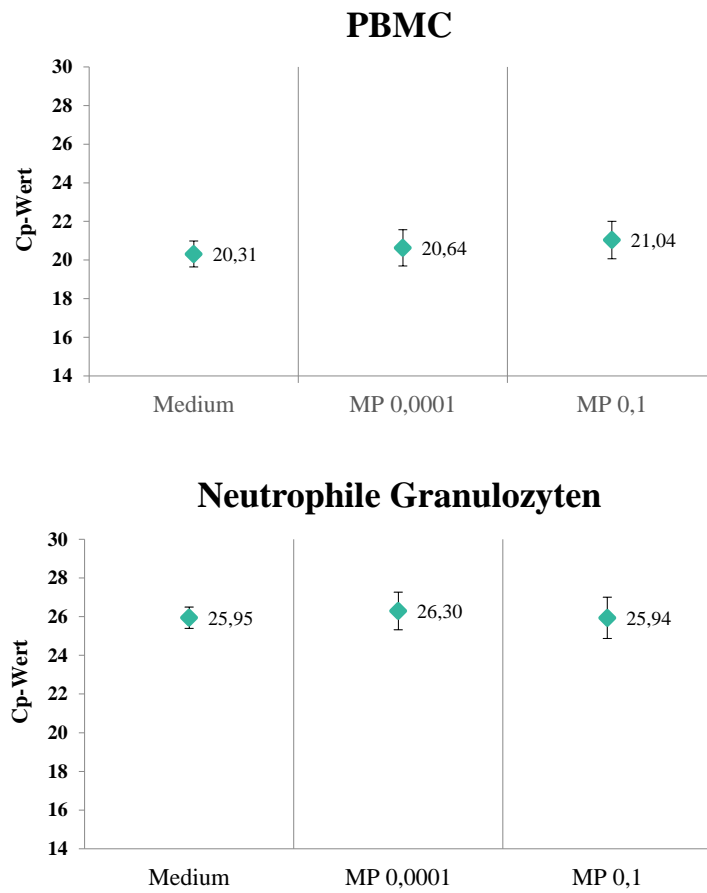
Zum einen verwendeten wir Verdünnungsreihen, um die Dosis-Wirkungs-Beziehung einer Stimulation mit TNF- $\alpha$  und Methylprednisolon zu ermitteln. Hierbei erfolgte eine Stimulation der Zellen mit verschiedenen Methylprednisolon-Konzentrationen (0,00001 mg/ml–0,1 mg/ml), an welche sich eine zwölfstündige Inkubation anschloss. Abbildung 3.3 zeigt den Genexpressionsverlauf von DUSP1 bei Neutrophilen und PBMC. Die DUSP1-Expression der PBMC nimmt unter der Methylprednisolon-Konzentrationssteigerung um das 22-fache des Ausgangswertes von 102% GAPDH zu und erreicht damit ein Maximum von 2232% GAPDH bei einer Stimulation mit 0,1 mg/ml. Der stärkste Expressionsanstieg findet sich zwischen den Konzentrationen 0,00001 mg/ml und 0,0001 mg/ml. Bei den Neutrophilen steigt die DUSP1-Expression ausgehend von 503% GAPDH gleichmäßig bis zur Konzentration von 0,01 mg/ml an. Mit der Erhöhung auf 0,1 mg/ml geht eine deutliche Zunahme der Genexpression auf 6333% GAPDH, das 13-fache des Ausgangswertes, einher.



**Abbildung 3.3:** DUSP1 (in % GAPDH, housekeeping gene) in Zellkultur von PBMC und neutrophilen Granulozyten eines gesunden Probanden unter verschiedenen Methylprednisolon-Verdünnungen (0,0001-0,1 mg/ml), Inkubationszeit 12 h

Abbildung 3.4 zeigt anhand der mittels qRT-PCR ermittelten Cp-Werte (Crossing point, gibt den PCR-Zyklus an, bei welchem das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert übersteigt und damit als signifikant angesehen werden kann) von GAPDH in Medium und verschiedenen Methylprednisolon-Konzentrationen, dass Kortisonstimulation die Expression von GAPDH in keinem relevanten Maß beeinflusst. In der Abbildung sind die Cp-Mittelwerte ( $\pm$  SD) von 3 Patienten in Zellkultur von Neutrophilen und PBMC nach 12-stündiger Inkubationszeit dargestellt.

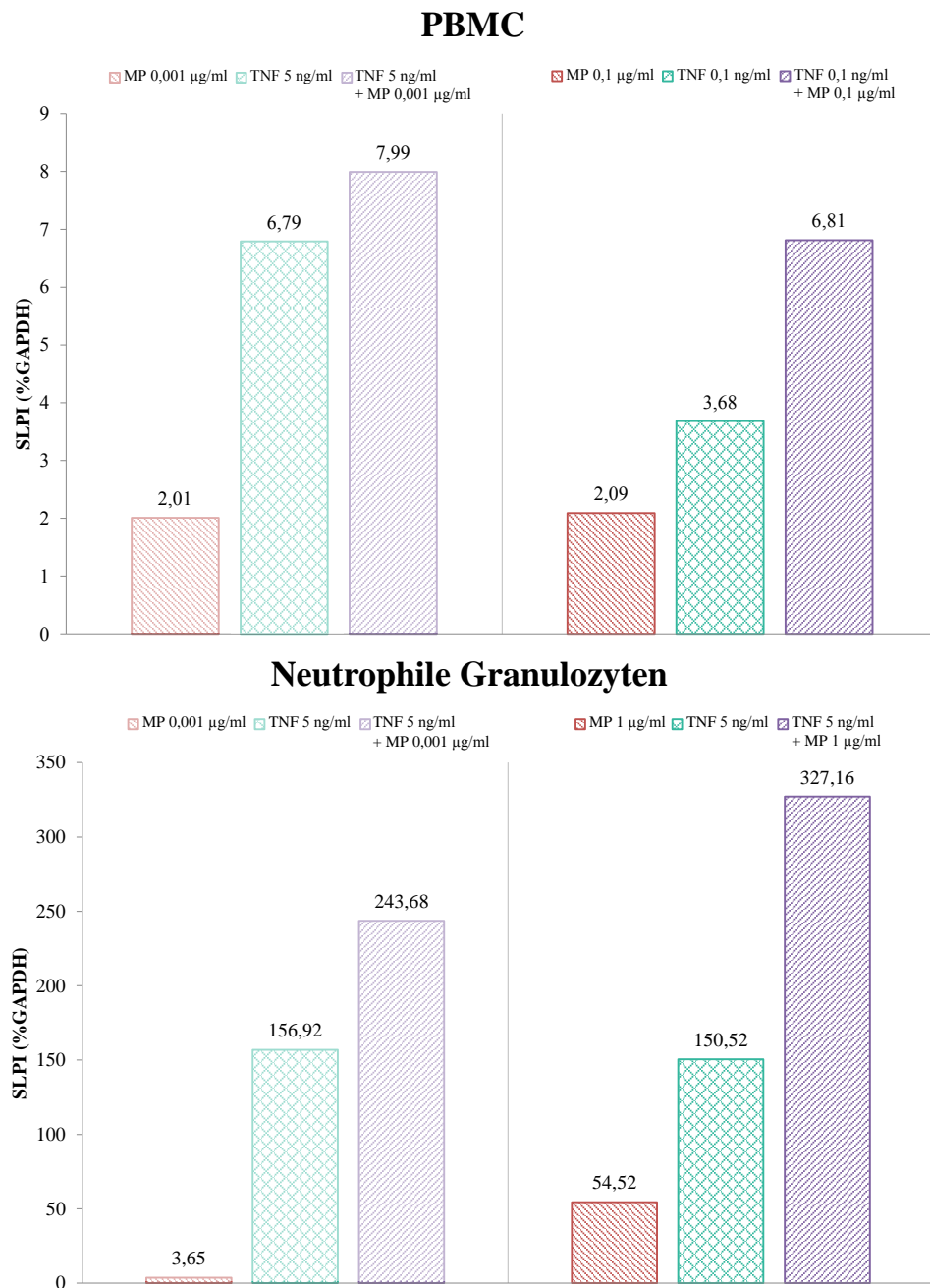
Ferner haben wir Dosis-Wirkungs-Beziehungen mit verschiedenen Methylprednisolon- und TNF- $\alpha$ -Konzentrationen an PBMC und Neutrophilen untersucht. Es erfolgten Stimulationen mit Methylprednisolon, mit TNF- $\alpha$  und Stimulationen mit beiden Substanzen, jeweils in verschiedenen Konzentrationen (0,00001 mg/ml–0,1 mg/ml Methylprednisolon, 0,1 bzw. 5 ng/ml TNF- $\alpha$ ). Dies stellten Voruntersuchungen zu den in Abschnitt 3.3.3 beschriebenen Stimulationsversuchen dar.



**Abbildung 3.4:** Cp (Crossing point)-Mittelwerte ( $\pm$  SD) des Gens GAPDH von 3 Patienten ( $n=3$ ) bei Neutrophilen Granulozyten und PBMC im Medium und unter verschiedenen Methylprednisolon-Konzentrationen (mg/ml) nach 12-stündiger Inkubation

In Abbildung 3.5 werden exemplarisch einige Versuchsansätze gezeigt. In der Abbildung zu Neutrophilen besteht bei Stimulation mit der niedrigeren Methylprednisolon-Konzentration von  $0,001 \mu\text{g/ml}$  im Vergleich zu  $1 \mu\text{g/ml}$  eine mit 3,65% GAPDH verminderte SLPI-Expression im Vergleich zu 54,52% GAPDH. Die TNF- $\alpha$ -Stimulation ist bei beiden Ansätzen gleich und ergibt eine ähnliche Expression von SLPI in beiden Versuchen. Bei kombinierter Stimulation mit Methylprednisolon und TNF- $\alpha$  kommt es jeweils zu den höchsten SLPI-Expressionen, wobei sich die niedrigere Methylprednisolon-Konzentration im ersten Ansatz in einer niedrigeren SLPI-Expression von 243,68 im Vergleich zu 327,16 widerspiegelt. Bei Stimulation von PBMC mit Methylprednisolon  $0,001 \mu\text{g/ml}$  bzw. Methylprednisolon  $0,1 \mu\text{g/ml}$  ergibt sich kein wesentlicher Expressionsunterschied von SLPI. Die Stimulation mit einer höheren TNF- $\alpha$ -Konzentration von  $5 \text{ ng/ml}$  im Vergleich zu  $0,1 \text{ ng/ml}$  resultiert in einer mit 6,79 zu 3,68 deutlich höheren Expression. Auch bei kombinierter Stimula-

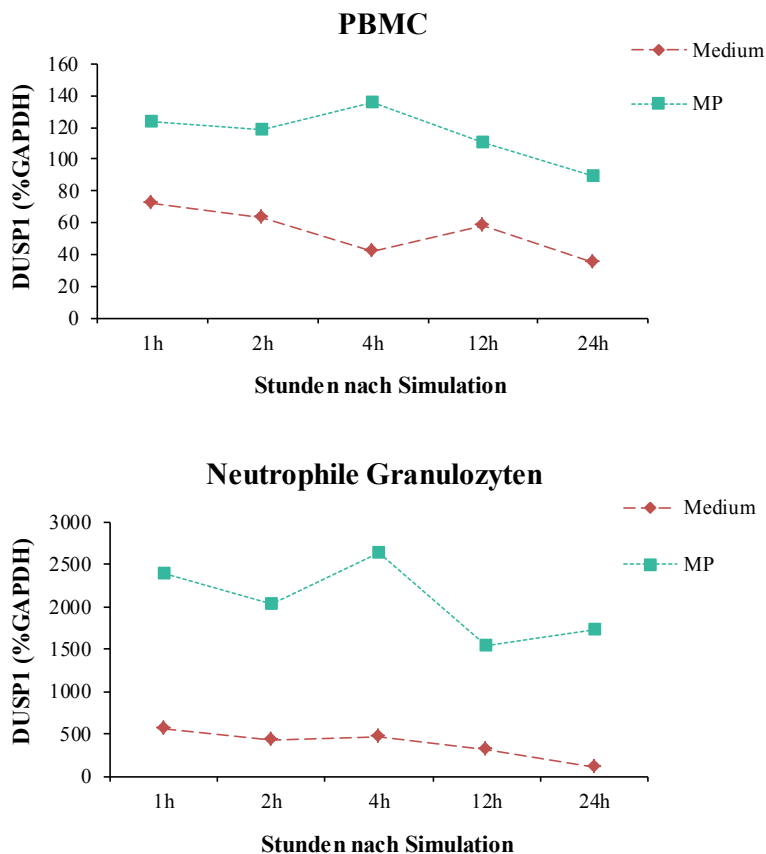
tion bewirkt der Ansatz mit einer höheren TNF- $\alpha$ -Konzentration eine leicht höhere SLPI-Expression.



**Abbildung 3.5:** SLPI (% GAPDH, housekeeping gene) in Zellkultur von PBMC und Neutrophilen eines MS-Patienten unter verschiedenen MP- und/oder TNF- $\alpha$ -Stimulationen

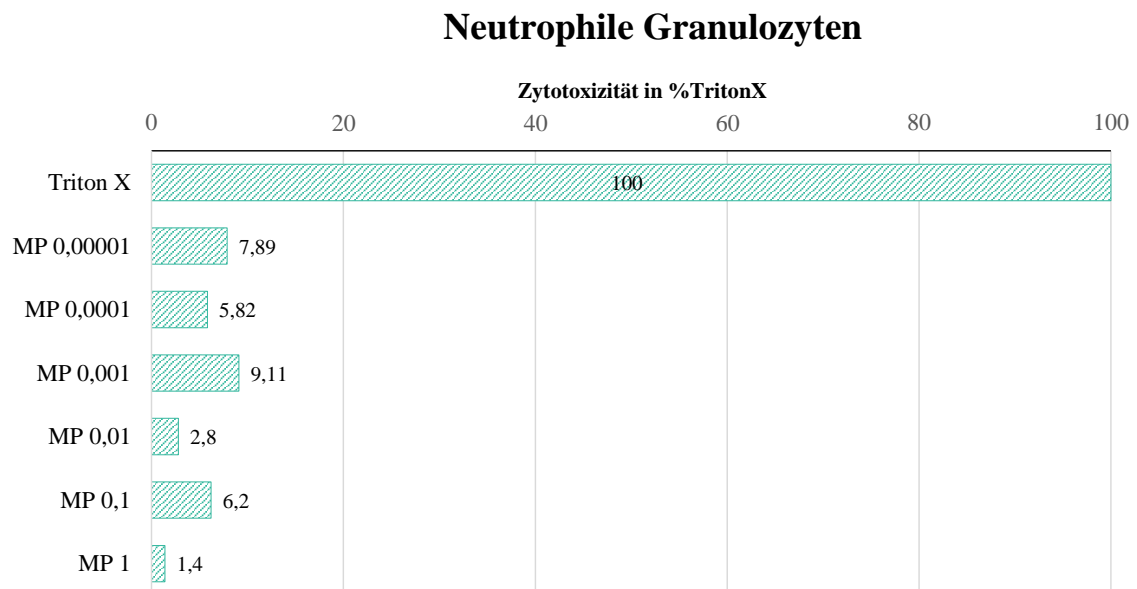
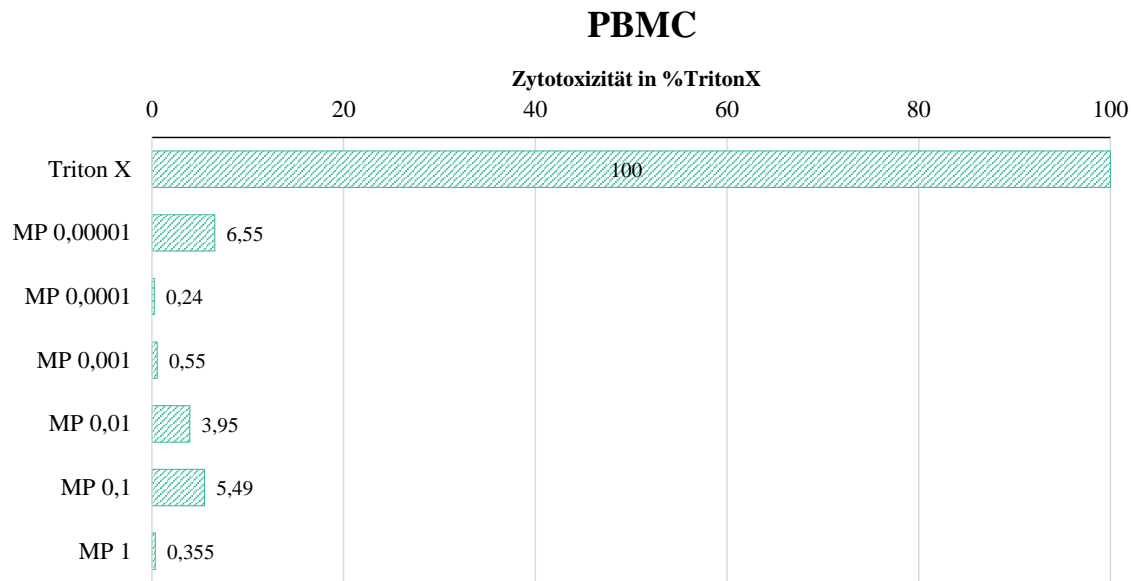
### 3.3.2 Kinetische Untersuchungen

Zum anderen nahmen wir kinetische Untersuchungen vor, um die optimale Stimulationsdauer von Neutrophilen und PBMC mit einer MP-Konzentration von 0,1 mg/ml zu ermitteln. Hierzu stimulierten wir die Zellen über verschieden lange Zeiträume (1 Stunde–24 Stunden). Dies ist exemplarisch für das kortisonregulierte Gen DUSP1 in Abbildung 3.6 zu sehen. Die mit 0,1 mg/ml Methylprednison stimulierten Zellen zeigen gegenüber der Mediumkontrolle eine deutliche Transkriptionssteigerung des Gens DUSP1. Das Maximum wird 4 Stunden nach Stimulation erreicht, wobei die PBMC circa eine Verdreifachung der Transkription gegenüber der Mediumkontrolle zeigen, die neutrophilen Granulozyten sogar eine Verfünffachung.



**Abbildung 3.6:** DUSP1 (in % GAPDH, housekeeping gene) in Zellkultur von PBMC und Neutrophilen eines gesunden Probanden über verschiedene Zeitpunkte nach MP-Stimulation (0,1 mg/ml)

Diese in vitro-Versuchsansätze mit alleiniger MP-Stimulation zeigten allerdings keine mit den Arrayergebnissen vergleichbaren Gentranskriptionssteigerungen unserer drei Kandidatengene SLPI, OSM und MMP9.



**Abbildung 3.7:** Zytotoxizität (% Triton X) in Zellkultur von PBMC eines Gesunden unter Triton X und verschiedenen MP-Konzentrationen (0,00001 mg/ml–1 mg/ml)

Mittels MTT- und LDH-Test untersuchten wir die von uns verwendeten Stimulationssubstanzen und -konzentrationen auf ihre Zytotoxizität. Hierbei zeigte sich keine relevante zytotoxische Wirkung der verwendeten Methylprednisolon- und TNF- $\alpha$ -Konzentrationen. In der Abbildung 3.7 wird die Zytotoxizität in % Triton X der verwendeten MP-Konzentrationen nach 4-stündiger Inkubation an PBMC und Neutrophilen gezeigt. Bei längerer Inkubationsdauer kommt es zu höherem Zelltod, ferner erscheinen Neutrophile empfindlicher als PBMC. Bei PBMC bewegen sich die

Zytotoxizitäts-Werte zwischen 0,36% und 6,55%, bei Neutrophilen erstrecken sich die Werte von 1,4% bis maximal 9,11%.

Aufgrund der Ergebnisse der Zytotoxizitätstests führten wir die fehlenden Gentranskriptionssteigerungen im Rahmen der *in vitro*-Versuche mit alleiniger MP-Stimulation auf das Fehlen inflammatorischer Zytokine zurück, welche während eines Schubereignisses die Entzündungsreaktion unterhalten und vermutlich als Trigger der Transkriptionsänderung nötig sind.

### **3.3.3 Stimulationsversuche mit Methylprednisolon (MP) und/oder TNF- $\alpha$ an Zellkulturen von MS-Patienten**

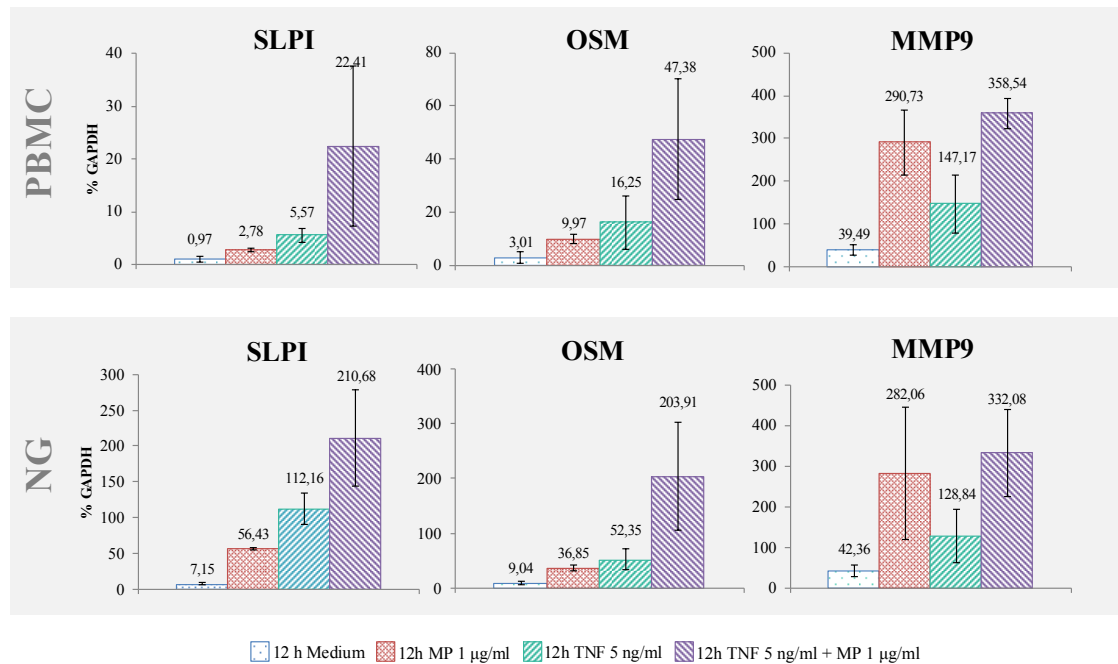
Daher untersuchten wir im Folgenden den Effekt einer gleichzeitigen Stimulation von MP und TNF- $\alpha$ , da TNF- $\alpha$  bei MS-Patienten im Rahmen von Schubereignissen (Beck et al. 1988, Sharief und Hentges 1991, Maimone et al. 1991, Rieckmann et al. 1995, Hautecoeur et al. 1997) sowie in MS-Läsionen (Cannella und Raine 1995) stark exprimiert wird. Somit soll der *in vitro*-Versuchsansatz den *in vivo*-Bedingungen von MS-Patienten, wie wir sie mittels des Arrays ermittelt hatten, näher kommen.

In Abbildung 3.8 sind die Genexpressionsverläufe der Gene SLPI, OSM und MMP9 unter verschiedenen Stimulationsbedingungen in PBMC und neutrophilen Granulozyten von drei MS-Patienten dargestellt.

In beiden Zelltypen zeigt sich für alle drei untersuchten Gene ein Expressionsanstieg unter MP-Stimulation sowie eine weitere Steigerung unter kombinierter MP-/TNF- $\alpha$ -Stimulation. Interessant erscheint, dass SLPI und OSM in neutrophilen Granulozyten stärker exprimiert werden als in PBMC, während die MMP9-Level in beiden Zelltypen ähnlich hoch sind.

Das Gen SLPI zeigt in den PBMC unter MP-Stimulation eine circa dreifache Expressionssteigerung gegenüber der Mediumkontrolle, unter TNF- $\alpha$ -Stimulation eine circa 6-fache Steigerung und den höchsten Anstieg auf das 20-fache (22,41% GAPDH) unter kombinierter MP-TNF- $\alpha$ -Stimulation.

Die neutrophilen Granulozyten weisen den gleichen Verlauf auf, wobei sie SLPI in höherem Maße produzieren und sezernieren, wie der Expressionsanstieg auf 56% GAPDH unter MP beziehungsweise auf 112% GAPDH unter TNF- $\alpha$  von 7% GAPDH der Mediumkontrolle zeigt. Unter der Kombinationsstimulation steigt die SLPI-Expression schließlich auf den Höchstwert von 210% GAPDH.



**Abbildung 3.8:** Relative Expression (GAPDH, housekeeping Gen) von SLPI, OSM und MMP9 in PBMC und neutrophilen Granulozyten von drei MS-Patienten, Stimulation mit verschiedenen TNF- $\alpha$ - und/oder MP-Konzentrationen, Mittelwert  $\pm$  Standardfehler

Das Gen OSM verhält sich bezüglich der Expressionsveränderung ähnlich wie SLPI, das heißt auch hier ist eine leichte Erhöhung der Genexpression unter MP, eine stärkere Steigerung unter TNF- $\alpha$  und das höchste Expressionsniveau unter der Kombination von MP und TNF- $\alpha$  festzustellen. Allerdings liegt das OSM- Expressionsniveau der PBMC im Vergleich zum SLPI etwas höher. Es steigt von 3% GAPDH auf circa 50% GAPDH.

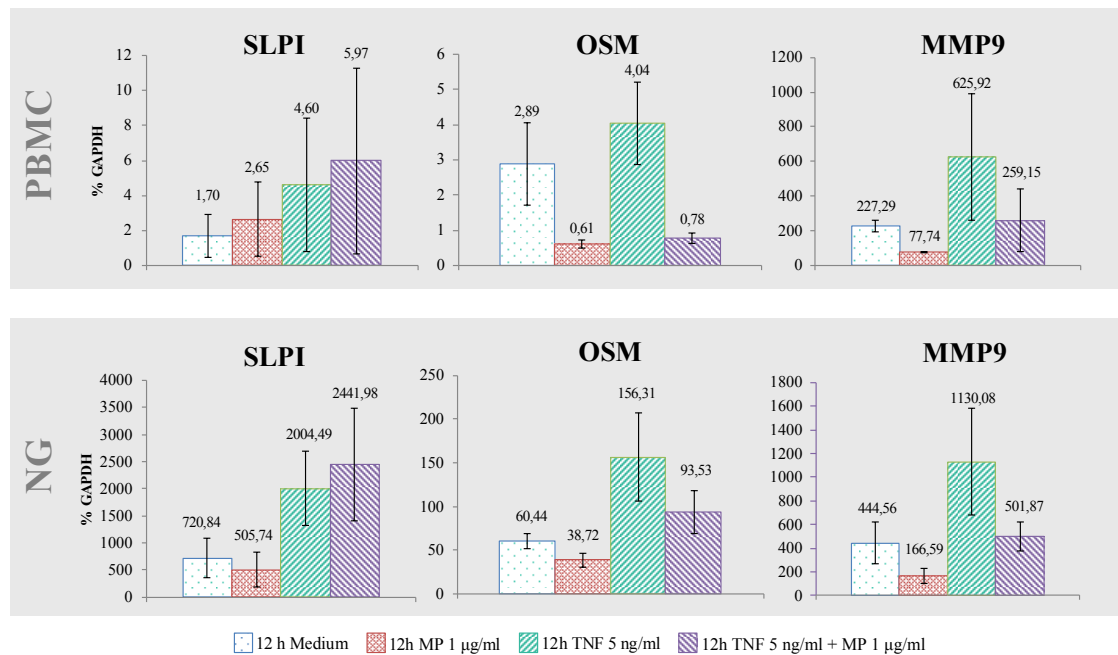
Bei den Neutrophilen ist die OSM-Expression ein wenig geringer als bei SLPI. Unter MP erfolgt eine ungefähr 4-fache Expressionserhöhung, unter TNF- $\alpha$  eine 5-fache und unter gleichzeitiger Stimulation eine 20-fache.

Für das Gen MMP9 kehrt sich das Verhältnis zwischen MP und TNF- $\alpha$  um. Während bei den anderen Genen TNF- $\alpha$  eine höhere Expressionsinduktion als MP erzielen konnte, bewirkt die alleinige MP-Stimulation bei MMP9 einen größeren Effekt als eine reine TNF- $\alpha$ -Stimulation. Die Stimulation mit beiden Substanzen erbringt allerdings wie auch bei den beiden anderen Genen die höchste Expressionssteigerung. PBMC und neutrophile Granulozyten exprimieren MMP9 ungefähr gleich stark. MP bewirkt bei beiden Zelllinien eine circa 7-fache Expressionserhöhung, unter TNF- $\alpha$  steigt die Expression nur um das 3-4-fache und unter Kostimulation kann eine 8-9-fache Expressionserhöhung im Vergleich zum Medium erreicht werden.



### 3.3.4 Stimmulationsversuche mit Methylprednisolon (MP) und/oder TNF- $\alpha$ an Zellkulturen gesunder Probanden

In einer weiteren Versuchsreihe fhrten wir dieselben Stimmulationen mit MP und TNF- $\alpha$  an PBMC und neutrophilen Granulozyten dreier gesunder Probanden durch. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 3.9 dargestellt.



**Abbildung 3.9:** Relative Expression (GAPDH, housekeeping Gen) von SLPI, OSM und MMP9 in PBMC und neutrophilen Granulozyten von drei gesunden Probanden, Stimulation mit verschiedenen TNF- $\alpha$ - und/oder MP-Konzentrationen, Mittelwert  $\pm$  Standardfehler

SLPI zeigt auch bei Gesunden hhere Expressionswerte in Neutrophilen als in PBMC. Die SLPI-Expression in PBMC erreicht bei Gesunden vergleichbar hohe Werte wie bei MS-Patienten. Lediglich unter kombinierter Stimulation weisen MS-Erkrankte eine ca. 4-fach hhere Expression auf. Die SLPI-Expression in Neutrophilen ist bei MS-Patienten jedoch um ein Vielfaches niedriger als bei der gesunden Vergleichsgruppe, die ca. 10-fach, zum Teil 100-fach hhere Werte erreichen.

OSM und MMP9 zeigen bei Gesunden in beiden Zelltypen ein anderes Expressionsmuster als bei MS-Kranken. Whrend OSM bei MS-Patienten eine Expressionssteigerung unter MP-Stimulation zeigt, kommt es bei Gesunden hierunter zu einer Expressionsabnahme um ca. das 4-fache gegenber dem Mediumwert bei PBMC und ca. um das 1,5-fache bei Neutrophilen. Unter TNF- $\alpha$ -Stimulation kann bei gesunden Probanden eine Steigerung der OSM-Expression im Vergleich zum Mediumwert verzeichnet werden. Bei PBMC erreicht diese allerdings nur 1/4 der Expressionshhe

von Patienten, bei Neutrophilen erfolgt jedoch eine Verdreifachung der Expression im Vergleich zu Patienten. Die kombinierte Stimulation liegt bei PBMC ungefähr auf dem Niveau der alleinigen MP-Stimulation und bei Neutrophilen ca. auf dem doppelten Expressionsniveau, während bei MS-Patienten unter dieser Stimulation die höchsten OSM-Level in beiden Zelltypen beobachtet wurden.

MMP9 wies bei MS-Patienten eine starke Expressionssteigerung unter MP-Stimulation sowohl in PBMC als auch in Neutrophilen auf. Unter TNF- $\alpha$ -Stimulation kam es nur zu einem geringeren Anstieg. Bei Gesunden zeigt sich das umgekehrte Bild: Unter alleiniger MP-Stimulation kommt es in Neutrophilen und PBMC zu einer ca. 3-fachen Verminderung der Expression im Vergleich zur Mediumkontrolle und zu einer ca. 3-fachen Erhöhung der Expressionslevel unter TNF-Stimulation beider Zelltypen.

Anzumerken ist jedoch, dass insbesondere bei den gesunden Probanden ein hoher Standardfehler auffällt, so dass die Ergebnisse nur als Trend anzusehen sind und durch weitere Experimente bestätigt werden müssen.

## **3.4 ELISA**

Im nächsten Schritt sollten die bislang auf Transkriptebene gewonnenen Erkenntnisse auf Proteinebene verifiziert werden. Dazu führten wir Sandwich-ELISA für die Proteine SLPI, OSM und MMP9 mit Patientenseren und Seren von gesunden Kontrollen durch.

### **3.4.1 OSM-ELISA**

Der OSM-ELISA lieferte keine verwertbaren Resultate, da von 13 gemessenen Patientenseren nur bei 5 eine messbare OSM-Konzentration vorlag. Diese 5 positiven Messungen variierten darüber hinaus sehr stark. So reichten die Konzentrationen der Proben vor der Kortisonbehandlung von 1,1 bis 143,2 pg/ml und von 2,8 bis 170,3 pg/ml unter der Kortisontherapie. Unter den 5 gesunden Kontrollen konnte nur bei einer Probandin eine messbare OSM-Konzentration von 52,2 pg/ml ermittelt werden. Nach Angaben des Herstellers betrage die geringste nachzuweisende OSM-Konzentration weniger als 1 pg/ml.

### 3.4.2 SLPI-ELISA

Mit dem SLPI-ELISA wurden die Seren von 23 MS-Patienten und 8 gesunden Probanden gemessen. Von 23 Patienten existierten Serumproben zum Zeitpunkt ihres Krankheitsschubes (vor der MP-Behandlung) und während der Therapie, von 9 Patienten gab es eine dritte Serumprobe 4 Wochen nach der Behandlung. Die MS-Patienten waren im Mittel 40 Jahre alt, die Gesunden 35 Jahre. Die Geschlechterverteilung spiegelt das für MS-typische 1(m):2(w)-Verhältnis wider (Tabelle 3.6).

**Tabelle 3.6:** Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardfehler (SEM) der SLPI-Konzentration (ng/ml) in den Seren von MS-Patienten und gesunden Kontrollen

	<i>MS-Patienten</i>			<i>Gesunde Kontrollen</i>		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
<b>SLPI-Konzentration</b>				27,88	1,61	8
<u>vor</u> MP-Behandlung:	35,68	1,73	23			
<u>unter</u> MP-Behandlung:	43,61	2,54	23			
<u>nach</u> MP-Behandlung:	37,46	2,61	9			
<b>Alter</b>	40,17	2,43		34,75	3,51	
<b>Geschlecht (m/w)</b>	(8/15)			(3/5)		

Die Ergebnisse des SLPI-ELISAs sind in Abbildung 3.10 veranschaulicht. Aus der Darstellung geht hervor, dass die Proben unter der MP-Therapie sowohl gegenüber den Serumproben während des Schubes/vor der Behandlung als auch gegenüber den Proben nach der Behandlung signifikante Unterschiede zeigen. Unter der MP-Therapie wird eine mittlere SLPI-Konzentration von 43,61 ng/ml erreicht, während im Schub vor der Behandlung und in der Remission nach der Therapie die mittleren Konzentrationen bei 35,68 ng/ml und 37,46 ng/ml liegen. Die mittlere SLPI-Konzentration ist mit 27,88 ng/ml bei gesunden Probanden hingegen in allen drei Behandlungsphasen signifikant niedriger als die der erkrankten Personen.

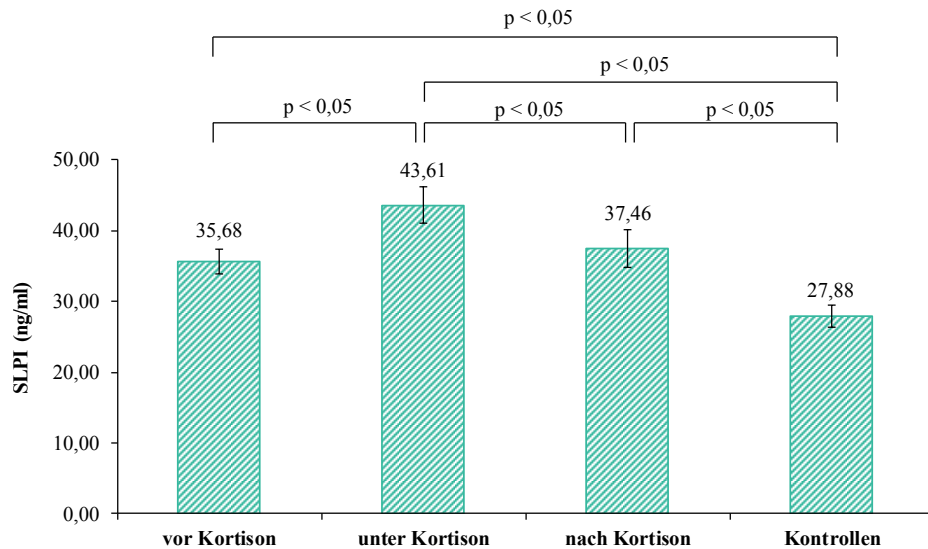
Im Rahmen weiterer statistischer Untersuchungen prüften wir einerseits den Effekt der Kortisonbehandlung auf den SLPI-Gehalt der Patienten (Vergleich I in Tabelle 3.7) und andererseits die SLPI-Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen zu den einzelnen Behandlungs-Phasen (Vergleich II in Tabelle 3.7).

**Tabelle 3.7:** Ergebnisse der statistischen Analyse des SLPI-Gehalts im Serum nach multivariater Varianzanalyse

<b>Vergleich I (Varianzanalyse mit wiederholten Messungen)</b>	<b>Mittelwert- differenz (abs.)</b>	<b>F-Werte der ANOVA [DF<sup>1</sup>;Wert]</b>	<b>p-Wert</b>
Phase I (vor Behandlung) vs. Phase II (während Behandlung)	7,93	(1,8); F=10,13	0,013
Phase III (nach Behandlung) vs. Phase II (während Behandlung)	9,92	(1,8); F= 0,90	0,009
Phase I (vor Behandlung) vs. Phase III (nach Behandlung)	1,99	(1,8); F=11,90	0,368

<b>Vergleich II (Varianzanalysen mit Geschlecht und Alter als Kovariaten)</b>	<b>Mittelwert- differenz (abs.)</b>	<b>F-Werte der ANOVA [DF<sup>1</sup>;Wert]</b>	<b>p-Wert</b>
gesunde Kontrollen vs. Patienten (Phase I, vor Behandlung)	13,29	(1,25); F=6,03	0,021
gesunde Kontrollen vs. Patienten (Phase II, während Behandlung)	21,23	(1,25); F=9,98	0,004
gesunde Kontrollen vs. Patienten (Phase III, nach Behandlung)	12,16	(1,12); F=6,13	0,029

<sup>1</sup>DF: Degrees of Freedom (Freiheitsgrade)



**Abbildung 3.10:** SLPI-Konzentration im Serum von MS-Patienten vor, während und nach der MP-Behandlung sowie von gesunden Kontrollen (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, MANOVA-Test)

Zum ersten Vergleich lässt sich sagen, dass sich die Konzentration von SLPI im Serum signifikant zwischen den drei Behandlungsphasen [Wilks multivariate test of significance:  $F(2,7) = 5,55$ , sig of  $F = 0,036$ ] unterscheidet. Anschließende Kontrasttests in ANOVA zeigen, dass die Unterschiede zwischen den Phasen „vor“ und „unter“ der Behandlung sowie zwischen „nach“ und „unter“ der Therapie signifikant sind. Dies gilt allerdings nicht für die Unterschiede zwischen den Phasen „vor“ und „nach“ der Kortisonbehandlung. Dies spiegelt sich in den Mittelwertdifferenzen aus Tabelle 3.7 wider, die bei der Gegenüberstellung von der Kortisontherapie und den Zeitpunkten vor bzw. nach der Behandlung 7,93 bzw. 9,92 betragen, im Vergleich von vor und nach der Behandlung jedoch nur einen Unterschied von 1,99 ausmachen.

Zum zweiten Vergleich ist festzustellen, dass sich die Konzentration von SLPI im Serum zwischen MS-Patienten und Kontrollen zu jeder Behandlungsphase signifikant unterscheidet [F-Tests in ANOVA: vor der Behandlung:  $F(1,25) = 6,032$ ,  $p = 0,021$ ; während der Behandlung:  $F(1,25) = 9,98$ ,  $p = 0,004$ ; nach der Behandlung:  $F(1,12) = 6,136$ ,  $p = 0,029$ ]. Dies zeigt sich in einer hohen Differenz der Mittelwerte unter Vergleich II in Tabelle 3.7. Gesunde Kontrollen verglichen mit MS-Patienten unter Kortisonbehandlung zeigen mit einer Mittelwertdifferenz von 21,23 die größten Unterschiede in der SLPI-Produktion. Gesunde gegen MS-Patienten vor und nach der Therapie weisen etwas geringere Mittelwert-Unterschiede von 13,29 und 12,16 auf. Die Kovariaten ‚Alter‘ und ‚Geschlecht‘ haben in keiner der drei Behandlungsphasen Einfluss auf die festgestellten Effekte.

### 3.4.3 MMP9-ELISA

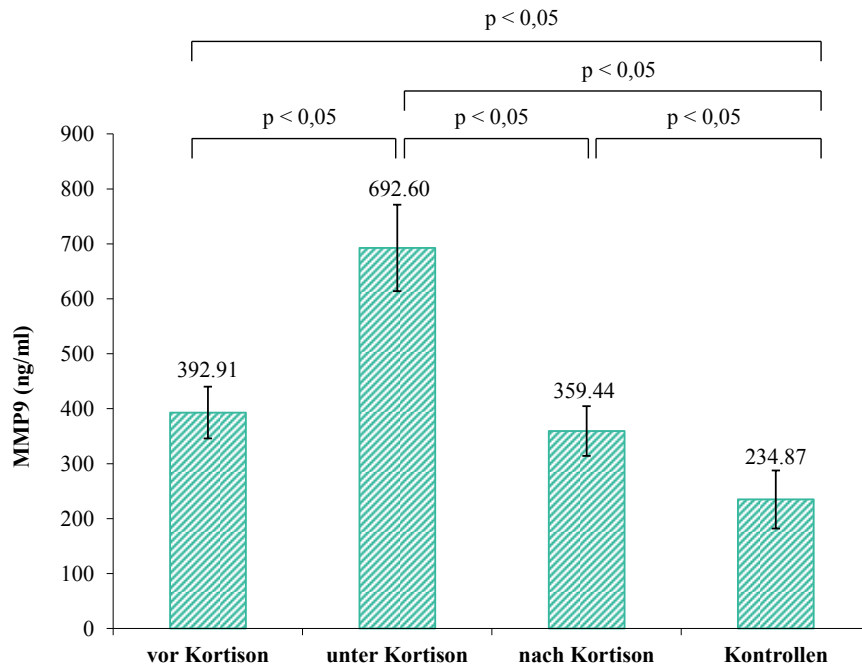
Mit dem MMP9-ELISA wurden Seren von 21 Patienten und von 9 gesunden Probanden untersucht. Während vor und unter der Behandlung Proben aller Patienten vorlagen, konnten für den Zeitpunkt vier Wochen nach der Behandlung nur 9 Patienten rekrutiert werden. Weitere Patienten- bzw. Probandendaten sind in Tabelle 3.8 aufgeführt.

**Tabelle 3.8:** Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardfehler (SEM) der MMP9-Konzentration (ng/ml) im Serum von MS-Patienten und gesunden Kontrollen

	<i>MS-Patienten</i>			<i>Gesunde Kontrollen</i>		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
<b>MMP9-Konzentration</b>				234,87	52,75	9
<u>vor</u> MP-Behandlung:	392,91	47,11	21			
<u>unter</u> MP-Behandlung:	692,60	78,69	21			
<u>nach</u> MP-Behandlung:	359,44	45,26	9			
<b>Alter</b>	41,43	6,31		35,29	6,17	
<b>Geschlecht (m/w)</b>	(9/12)			(4/5)		

Wie der Abbildung 3.11 entnommen werden kann, betragen die Serum-Werte von MMP9 (234,87 ng/ml bis 692,6 ng/ml) circa das Zehnfache der SLPI-Serumkonzentrationen (27,88 ng/ml–43,61 ng/ml). Darüberhinaus konnten wir unter der Behandlung mit MP eine Hochregulierung der MMP9-Serumlevel auf durchschnittlich 692,60 ng/ml verglichen mit den Zeitpunkten vor und nach der Therapie (Mittelwert: 392,91 ng/ml bzw. 359,44 ng/ml) sowie im Vergleich mit gesunden Kontrollen (Mittelwert: 234,87 ng/ml) nachweisen. Patienten vor und nach Kortisonbehandlung zeigen keine Unterschiede in den MMP9-Serumwerten. Patienten im Schub/vor Therapie zeigen jedoch unterschiedliche Serumwerte im Vergleich zu Patienten unter Kortisonstoßtherapie und Patienten vier Wochen nach Behandlung. Patienten während der Behandlung zeigen ebenfalls einen signifikanten Unterschied gegenüber Patienten im Schub und Patienten nach erfolgter Therapie.

Auch bei diesem ELISA prüften wir neben dem Effekt der Kortisonbehandlung auf die MMP9-Serumlevel der Patienten (Vergleich I in Tabelle 3.9) die MMP9-Serumunterschiede zwischen Patienten in den einzelnen Behandlungs-Phasen und



**Abbildung 3.11:** MMP9-Konzentration im Serum von MS-Patienten vor, während und nach der Methylprednisolon-Behandlung und von gesunden Kontrollen (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, MANOVA-Test)

gesunden Kontrollen (Vergleich II in Tabelle 3.9). Der Behandlungseffekt auf die MMP9-Serumkonzentrationen der Patienten erwies sich in der Varianzanalyse mit wiederholten Messungen als statistisch signifikant [Wilks multivariate test of significance:  $F(2,7) = 18.53$ , sig of  $F = 0,002$ ]. Die nachfolgenden Kontrasttests zeigten, dass sich die Serumwerte der Patienten während der Behandlung signifikant von denen vor [ $F(1,8) = 31,39$ ,  $p = 0,001$ ] und denen nach der Behandlung [ $F(1,8) = 40,17$ ,  $p < 0,0001$ ] unterscheiden. Es gibt keine signifikanten Unterschiede in den Serumwerten zwischen Prä- und Postbehandlung. Die Patienten unterscheiden sich auf das nominale Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  signifikant von den Kontrollen in den Serumwerten vor, während der Kortisonbehandlung und nach der Behandlung [F-tests in ANOVA; vor der Behandlung:  $F(1,16) = 7,02$ ,  $p = 0,017$ ; während der Behandlung:  $F(1,16) = 27,48$ ,  $p < 0,001$ ; nach der Behandlung:  $F(1,16) = 5,36$ ,  $p = 0,034$ ]. Auch hier haben die Kovariaten ‚Alter‘ und ‚Geschlecht‘ in keiner der drei Behandlungsphasen Einfluss auf die festgestellten Effekte.

**Tabelle 3.9:** Ergebnisse der statistischen Analyse der MMP9-Konzentration im Serum nach multivariater Varianzanalyse

<b>Vergleich I (Varianzanalyse mit wiederholten Messungen)</b>	<b>Mittelwert- differenz (abs.)</b>	<b>F-Werte der ANOVA [DF<sup>1</sup>;Wert]</b>	<b>p-Wert</b>
Phase I (vor Behandlung) vs. Phase II (während Behandlung)	299,69	(1,8); F=31,39	0,001
Phase III (nach Behandlung) vs. Phase II (während Behandlung)	333,06	(1,8); F=40,17	<0,0001
Phase I (vor Behandlung) vs. Phase III (nach Behandlung)	33,37	(1,8); F=3,37	0,104

<b>Vergleich II (Varianzanalysen mit Geschlecht und Alter als Kovariaten)</b>	<b>Mittelwert- differenz (abs.)</b>	<b>F-Werte der ANOVA [DF<sup>1</sup>;Wert]</b>	<b>p-Wert</b>
gesunde Kontrollen vs. Patienten (Phase II, während Behandlung)	457,73	(1,16); F=7,02	0,017
gesunde Kontrollen vs. Patienten (Phase I, vor Behandlung)	158,04	(1,16); F=27,48	<0,0001
gesunde Kontrollen vs. Patienten (Phase III, nach Behandlung)	124,67	(1,16); F=5,36	0,034

<sup>1</sup>DF: Degrees of Freedom (Freiheitsgrade)



## 4 Diskussion

Den Anstoß für unsere Untersuchungen gab, dass Glukokortikosteroide bereits seit den frühen siebziger Jahren zur Akutbehandlung von MS-Schüben eingesetzt werden und auch heute noch die etablierte Standardtherapie bei Schubereignissen darstellen. Die Wirkmechanismen sind allerdings immer noch nicht vollständig erforscht. Mit dem Ziel, die Kortikosteroideffekte bei der Behandlung der Multiplen Sklerose genauer zu verstehen, waren wir auf der Suche nach einem Gensignalweg, der aus interagierenden und kortisonregulierten Genen bestehen sollte. Anhand einer Microarray-Untersuchung identifizierten wir die Gesamtzahl kortisonregulierter Gene und analysierten diese mit Hilfe des Pathway Studios auf Interaktionen. Auf diese Weise fanden wir drei funktionell zusammenhängende Gene, die unter Therapie mit hochdosiertem Methylprednisolon signifikante Veränderungen in der Genexpression zeigten. Diese Genexpressionsveränderungen validierten wir auf mRNA-Ebene *in vivo* und *in vitro* sowie für zwei der drei Gene auch auf Proteinebene. Vor dem Hintergrund der Induktion krankheitseindämmender wie auch krankheitsfördernder Gene durch Glukokortikoide, sollen unsere Untersuchungen Anstoß zur Entwicklung neuer, spezifischer wirksamer und gegebenenfalls potenterer Therapeutika geben.

### 4.1 Identifizierung eines kortisonregulierten Gensignalwegs

Als Vorarbeit lag ein mit sechs Blutproben von MS-Patienten durchgeführter Microarray vor. Aus den 1908 Genen, die eine statistisch signifikante Genexpressionsveränderung zwischen Schub bzw. Remission und hochdosierter Kortisongabe zeigten, stach SLPI mit einer Expressionsänderung um den Faktor 8,97 (Kortisontherapie zu Schub) hervor. SLPI stand an dritter Stelle der höchstregulierten Gene unter Kortisonstoßtherapie. Hierauf wurden 173 Gene, die neben einem p-Wert kleiner als 0,05 eine Genexpressions-Veränderung (*fold change*) von  $|FC| > 2,0$  zwischen dem Zeitpunkt der Kortisonbehandlung und dem Zeitpunkt des Schubereignisses aufwiesen, im Programm Pathway Studio<sup>®</sup> bezüglich funktioneller Interaktionen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass das Gen SLPI mit den Genen Oncostatin M (OSM, FC = 2,82) und MMP9 (FC = 2,52) eine funktionelle Verknüpfung aufweist.

Neben der starken Expressionsinduktion durch Kortison und der bereits aus dem Namen hervorgehenden Anti-Protease-Aktivität, die durch den Schutz von Geweboberflächen die Immunantwort unterstützt, gibt es zahlreiche weitere Eigenschaften,

die dieses Gen bzw. Protein für die MS-Pathologie interessant erscheinen lassen: SLPI wird eine anti-inflammatorische, eine antibakterielle, antivirale und antifungale Wirkung sowie eine immunmodulierende Funktion zugeschrieben.

#### 4.1.1 Charakterisierung des Gens Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI)

Das SLPI-Gen liegt auf Chromosom 20 (20q12-13.2) und umfasst vier Exons und drei Introns (Moreau et al. 2008). Das Protein besteht aus einer Einzelkette von 107 Aminosäuren, ist basisch und nicht glykosiliert. SLPI gehört zur Familie der „whey acidic proteins“ (WAP), die alle an der homöostatischen Regulierung der Immunantwort beteiligt sind.

Die SLPI-Sekretion kann durch krankheitsassoziierte Toll-Like-Rezeptor-Liganden sowie durch mehrere andere pro-inflammatorische Moleküle wie LPS und TNF- $\alpha$  getriggert werden (Vroling et al. 2010). Hierzu passend konnten wir eine deutliche Genexpressionsteigerung von SLPI unter in vitro-Stimulation mit TNF- $\alpha$  sowohl in NG als auch in PBMC zeigen. Zunächst war die SLPI-Sekretion durch Schleimhautepithelien wie beispielsweise des oberen Respirationstraktes, des Gastrointestinaltraktes, der Samenblase oder der Zervix bekannt, inzwischen hat man ebenso eine Produktion und Sekretion durch Neutrophile Granulozyten, Mikroglia, reaktivierte Astrozyten, dendritische Zellen sowie periphere mononukleäre Zellen etc. festgestellt. Hinsichtlich aktivierter Makrophagen ist die Literatur widersprüchlich. In einer Publikation des Journals Brain über Makrophagen in Rückenmarksverletzungen konnte kein SLPI nachgewiesen werden, in anderen Publikationen war dies jedoch beschrieben (Ghasemlou et al. 2010, Vroling et al. 2010). Während die SLPI-Konzentration im Speichel und im Lungensekret im  $\mu\text{g/ml}$ -Bereich ( $4 \mu\text{g/ml}$ – $24 \mu\text{g/ml}$  bzw.  $10 \mu\text{g/ml}$ ) liegt, finden sich im Serum Werte im  $\text{ng/ml}$ -Bereich (bis über  $100 \text{ng/ml}$ ) (Taggart et al. 2005).

Als Serin-Proteasen-Inhibitor hemmt SLPI Enzyme wie die Neutrophile Elastase, Cathepsin G, Trypsin, Chymotrypsin, Chymase und Tryptase (Weldon und Taggart 2007, Moreau et al. 2008). Diese Eigenschaft wird dem C-terminalen Ende, welches die Aminosäure Leucin an Position 72 enthält, zugeschrieben.

Das N-terminale Ende mit seiner kationischen Ladung scheint hingegen für die antimikrobielle Wirkung verantwortlich zu sein. Aufgrund der kationischen Eigenschaft kommt es zu einer direkten Interaktion mit anionischen Bakterienmembranen, die zur Zellwandzerstörung führen kann (Weldon und Taggart 2007, Vroling et al. 2010).

Darüberhinaus unterdrückt das SLPI-Protein die LPS-induzierte NO-, TNF- $\alpha$ - und IL8- Bildung, sowie die NF- $\kappa$ B (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells)-Aktivierung in Monozyten und Makrophagen. Der Mechanismus besteht in einer Störung der LPS-CD14-Interaktion wie auch in einer direkten Bindung an NF- $\kappa$ B-Bindungsstellen proinflammatorischer Gene im Zellinneren. Durch diese Verminderung der LPS-Wirkung könnte SLPI am Aufbau einer immunologischen Toleranz beteiligt sein. In Untersuchungen von peripheren mononukleären Blutzellen wurde gezeigt, dass das SLPI-Protein durch eine Interaktion mit membranassoziierten Proteinen wie zum Beispiel Scramblases 1 und 4 (Py et al. 2009) in die genannten Zellen eindringen, sich im Zytoplasma anreichern und bis in den Nucleus vordringen kann. Für die Überwindung von Zellmembranen werden sowohl arginin-haltige Protein-Domänen als auch die Bindung von SLPI an das Zelloberflächenprotein Annexin II diskutiert. Aufgrund seiner relativ kleinen Molekülgröße scheint SLPI passiv in den Nucleus diffundieren zu können und seine positive Ladung ermöglicht die direkte Bindung an negativ geladene DNA-Abschnitte wie z.B. an eine spezifische NF- $\kappa$ B-Bindungsstelle (Taggart et al. 2005, Vroling et al. 2010). Eine Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivität kann jedoch ebenso durch eine kompetitive Hemmung der p65-Bindung an NF- $\kappa$ B-Bindungsstellen erfolgen. Die verminderte NF- $\kappa$ B-Aktivierung wird durch die Verhinderung des I $\kappa$ B $\alpha$ - bzw. I $\kappa$ B $\beta$ - (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha/beta) und IRAK (interleukin 1 receptor associated kinase)-Abbaus erreicht, was zu erhöhten Spiegeln dieser Regulatorproteine führt. Durch den Zerfall von I $\kappa$ B-Proteinen dissoziieren diese vom NF- $\kappa$ B-Komplex. Somit kann dieser in den Nucleus wandern und als Transkriptionsfaktor fungieren. NF- $\kappa$ B fördert u.a. die Transkription proinflammatorischer Proteine, welche an der Immunantwort beteiligt sind. Somit scheint SLPI durch die Aktivitätsminderung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B Entzündungsreaktionen zu reduzieren. Darauf deutet auch die in einigen Publikationen beschriebene Verminderung der MMP1- und MMP9-Produktion durch SLPI hin (Weldon und Taggart 2007).

SLPI wirkt durch die NF- $\kappa$ B-Aktivitätsminderung auch proapoptotisch, da aktives NF- $\kappa$ B durch Caspasen-Inaktivierung Zellen vor Apoptose schützen kann (Weldon und Taggart 2007).

Darüberhinaus konnten im Tiermodell mit transgenen Mäusen, die SLPI überexprimieren, nach einer Kontusionsverletzung des Rückenmarks frühe neuroprotektive Effekte festgestellt werden: Wildtyp-Mäuse, die über eine Woche nach der Verletzung mit rekombinantem SLPI behandelt wurden, zeigen eine Verbesserung der Lokomotionskontrolle sowie einen verminderten sekundären Gewebeschaden. Eine erhöhte

SLPI-Sekretion fand sich vor allem in Astrozyten in direkter Läsionsnähe wie auch in Neutrophilen innerhalb des verletzten Rückenmarkparenchyms. Während die positiven Effekte der besseren Lokomotionskontrolle in der Gruppe der transgenen Mäuse in den ersten zehn Tagen am stärksten waren und danach sukzessive abnahmen, hielten diese Effekte bei Verabreichung von rekombinantem SLPI über die gesamte Versuchslänge (28 Tage) hin an. Ein wichtiger Vermittler der Lokomotionskontrolle sind serotonerge Fasern, die vom Hirnstamm ins Vorderhorn ziehen. Deren Innervation nahm bei Zuführung von rekombinantem SLPI um 60% zu. Gewebeschnitte, die über eine Woche mit rekombinantem SLPI behandelt wurden, zeigten in der *glial fibrillary acidic protein* (GFAP)-Immunreaktivitätsuntersuchung eine signifikante Verkleinerung der Läsionsgröße gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe. Ferner konnte mit Hilfe der Luxolblau-Histochemie ein verminderter Myelinverlust im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Ghasemlou et al. 2010).

In weiteren Untersuchungen konnte im EAE-Tiermodell eine mehr als hundertfache Steigerung der SLPI-Expression in Rückenmark von DA-Ratten während eines akuten Krankheitsschubes und eine zehnfache Steigerung während der Schubrückbildung nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse ergaben sich anhand von Mikroarray-Untersuchungen. Um festzustellen, ob SLPI hierbei eine protektive oder negative Wirkung auf den Krankheitsverlauf hat, inkubierte man adulte neuronale Stammzellen *in vitro* mit SLPI. Dabei kam es zur Zellproliferation und Förderung der Zelldifferenzierung hin zu Oligodendrozyten. Somit scheint SLPI, neben der bekannten Gewebeprotektion aufgrund seiner Proteinasen-Hemmung, durch die Differenzierungsförderung von neuronalen Zellen hin zu Oligodendrozyten direkt zur Gewebereparatur beizutragen (Mueller et al. 2008).

2012 unternahm Mueller et al. weitere Untersuchungen, die eine rein protektive Wirkung von SLPI im Rahmen der MS in Frage stellen. Hierbei induzierten sie zunächst gegen SLPI gerichtete Antikörper in EAE-Mäusen und -Ratten. Diese Antikörperbildung sollte durch eine intraperitoneale Beimpfung der Tiere mit rekombinantem SLPI erfolgen. Die neutralisierende Wirkung der induzierten Antikörper auf die SLPI-Aktivität wurde über die Zunahme der IL-8-Produktion einer humanen Monozyten-Zelllinie nachgewiesen, da SLPI die IL-8-Sekretion inhibiert. Infolge dieser Behandlung beschreiben Mueller et al. die Entwicklung eines weniger schweren EAE-Krankheitsverlaufs verglichen mit Tieren, die als Kontrolle lediglich mit Ovalbumin (OVA) immunisiert wurden. In der Gruppe mit gegen SLPI-beimpften EAE-Mäusen sei es zusätzlich zu einem verzögerten Krankheitsauftreten gekommen (Müller et al. 2012). Hierzu ist allerdings kritisch anzumerken, dass in den Untersuchungen mit den EAE-Ratten, deren Krankheitsmodell der MS näher kommt als

das Modell von EAE-Mäusen (Storch et al. 2006), nur punktuell signifikante Unterschiede zur OVA-Gruppe aufgetreten sind und auch das Krankheitsauftreten nicht verzögert gewesen ist. Ferner wird in der Publikation diskutiert, dass die Vorbehandlung zur Induktion der Anti-SLPI-Antikörper die Immunregulation verändert haben könnte.

In einem weiteren Schritt injizierten Mueller et al. EAE-Mäusen rekombinantes SLPI intraperitoneal. Diese Behandlung erfolgte drei mal täglich über 16 Tage nach Krankheits-Induktion. Ihrer Beschreibung nach habe dies zum früheren Auftreten von Krankheitszeichen und einem schwereren Krankheitsverlauf als in der mit 0,9% NaCl behandelten Gruppe geführt.

Weiterhin beschreiben die Kollegen um Mueller eine Inhibierung des antiinflammatorisch wirkenden TGF- $\beta$  sowie eine Hemmung der Differenzierung regulatorischer T-Zellen durch SLPI. Ersteres wiesen sie durch Inkubation von U937-Zellen (human leukemic monocyte lymphoma cell line) mit rekombinatem SLPI bzw. durch Quantifizierung der TGF- $\beta$ -Serumkonzentration von Mäusen nach, die gegen SLPI immunisiert waren. Letzteres wurde durch Inkubation humaner CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit rekombinatem SLPI untersucht (Müller et al. 2012).

Untersuchungen an SLPI-Knockout Mäusen oder SLPI-überexprimierenden transgenen Tieren sind unseres Wissens bisher nicht durchgeführt worden.

Trotz dieser zuletzt veröffentlichten Arbeit, deutet -wie oben ausgeführt- die Mehrzahl der zur Zeit bekannten Ergebnisse auf interessante therapeutische Einsatzmöglichkeiten für SLPI hin. Dies gilt sowohl für einen Einsatz im Gebiet der akuten Rückenmarksverletzung als auch im Rahmen autoimmuner ZNS-Schädigungen wie der Multiplen Sklerose.

#### **4.1.2 Geninteraktionsrecherche mit Hilfe des Pathway Studios (Ariadne Genomics)**

Mit Hilfe des Programmes Pathway Studio konnte eine funktionelle Verknüpfung der Gene SLPI, Onkostatin M und Matrix-Metalloproteinase 9 gezeigt werden.

OSM verstärkt die Expression von SLPI (Boutten et al. 1998) und MMP9 (Korzus et al. 1997, Chen, Gillespie und Benveniste 2006). MMP9 betreffend, wird dies in den herangezogenen Publikationen für Astrozyten im Rahmen von Astrogliomen und Fibroblasten beschrieben. Boutten et al. haben die Induktion von SLPI durch OSM an Lungenepithelien untersucht. Bezüglich der Regulation von MMP9 durch

SLPI gibt es Hinweise für eine Expressionshemmung (Zhang et al. 1997, Taggart et al. 2002).

Da MMP9 und OSM überdies mit einer 2,52-fachen bzw. 2,82-fachen Expressionsänderung im Array eine starke Kortisonregulation aufwiesen, rückten diese beiden Gene neben SLPI in den Fokus weiterer Untersuchungen.

## **4.2 Validierung der Microarray-Ergebnisse**

Wir validierten die Microarray-Ergebnisse von SLPI, OSM und MMP9 anhand einer weiteren Methode, der quantitativen RT-PCR. Um die Methode aufzubauen und zu validieren überprüften wir die Genexpression von in der Literatur als sicher ausgewiesenen kortisonregulierten Genen wie der Dual specificity protein phosphatase 1 (DUSP1) (Joanny et al. 2012). Diese Messungen nahmen wir am Probenmaterial der in den Array eingeschlossenen Patienten sowie an sechs weiteren unabhängigen Patientenproben vor. Damit wurden insgesamt zwölf MS-Patienten als Probanden in die Untersuchungen zur Microarray-Validierung eingeschlossen. Anhand dieser Patientenproben konnten die Ergebnisse der Arrayuntersuchung valide reproduziert werden.

## **4.3 Proteinanalysen in vivo**

Im nächsten Schritt wurden die SLPI-, OSM- und MMP9-Serumwerte von MS-Patienten vor, unter und nach einer Kortisonstoßtherapie sowie von gesunden Kontrollen quantifiziert. Wir nutzten hierzu kommerziell-erhältliche ELISA-Kits bzw. Antikörpersets.

### **4.3.1 OSM**

Mit dem für OSM verfügbaren ELISA-Kit von abcam<sup>®</sup> erhielten wir keine verwertbaren Ergebnisse, da dieser Assay nur bei weniger als der Hälfte der Probanden messbare OSM-Konzentrationen im Serum erbrachte. Das Probenmaterial entsprach demselben wie bei den übrigen ELISA-Untersuchungen und wurde überdies unverdünnt eingesetzt, so dass dies als Fehlerquelle unwahrscheinlich erscheint. Eine über

Nacht erforderliche Probeninkubation auf einem Schüttler bei 4 °C weist auf eine schwache OSM-Bindungsfähigkeit des *coating*-Antikörpers hin. Dies erklärt jedoch nicht, weshalb in einigen Proben von MS-Patienten und Gesunden messbare Konzentrationen vorlagen und in anderen nicht. Erklärend hierfür könnte sein, dass OSM nach Angaben des ELISA-Kit-Herstellers temperaturempfindlich sei. Somit könnte die fehlende Nachweisbarkeit von OSM in einem Teil der Proben durch einen Lagerungsschaden begründet sein.

### 4.3.2 MMP9

Auch auf Proteinebene konnten wir unter Methylprednisolon-Therapie von MS-Patienten im Schub eine Erhöhung der MMP9-Serumwerte messen. Wie bereits in anderen publizierten MMP9-ELISA-Untersuchungen, stellten wir unter intravenöser Kortisonstoßtherapie eine signifikante MMP9-Erhöpfung gegenüber dem Zeitpunkt vor Kortisongabe/im akuten Schub sowie nach Kortisongabe/in der Remissionsphase fest. Darüberhinaus sind die MMP9-Werte unter der Behandlung von Werten gesunder Probanden signifikant verschieden. Desweiteren konnten wir zeigen, dass MS-Patienten im Schub signifikant höhere Werte aufweisen als Gesunde (siehe Abbildung 3.11). Eine der vorangegangenen Publikationen zu dieser Thematik von Mirowska D. et al. konnte ebenfalls zeigen, dass MS-Patienten bereits vor Therapie mit Methylprednisolon erhöhte MMP9-Serumwerte im Vergleich zu Gesunden aufweisen, wobei die Daten- im Gegensatz zu unseren Ergebnissen- keine Signifikanz zeigten. Darüberhinaus stellte Mirowska fest, dass die MMP9-Serumkonzentration unter i.v.-MP-Therapie mit 1000 mg/Tag signifikant ansteigt (Mirowska et al. 2004). Dies wird durch unsere Ergebnisse bestätigt. Gelati et al. hat 2002 ebenso eine Steigerung der MMP9-Serumwerte von MS-Patienten innerhalb von 24 Stunden nach Gabe von 1 mg MP festgestellt (Gelati et al. 2002). Kandagaddala et al. untersuchten MMP9-Plasmaspiegel nach EAE-Induktion bei Mäusen. Hierbei fiel 10, 21 sowie 30 Tage nach EAE-Induktion ein signifikanter Anstieg der MMP9-Plasmaspiegel auf. Dies unterstützt unsere Beobachtung erhöhter MMP9-Serumspiegel bei MS-Patienten im Vergleich zu Gesunden auf Tiermodellebene. Allerdings wählte diese Arbeitsgruppe mit Zymographie und Western-Blot andere Nachweismethoden (Kandagaddala et al. 2012).

Die meisten Publikationen, welche die Relevanz von MMP9 für die MS thematisieren, haben ihren Fokus auf die Untersuchung von Gewebeschnitten oder von MMP9-Konzentrationen im Liquor gerichtet. Hier differieren die Ergebnisse. Wäh-

rend Rosenberg et al. 1996 unter MP-Therapie mit 1 g pro Tag über drei Tage einen Abfall der MMP9-Liquorwerte von MS-Patienten beobachten konnte (Rosenberg et al. 1996), beschreibt Sellebjerg et al. keine MMP9-Aktivitätsunterschiede in Liquoruntersuchungen. Sellebjergs Ergebnissen ging allerdings keine i.v.-Therapie, sondern eine orale Hochdosistherapie mit 500 mg MP über 15 Tage voraus (Sellebjerg et al. 2000). Dies könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Resultate sein. Zumal auch Kieseier et al. erhöhte mRNA- sowie Proteinlevel von MMP9 im Liquor von MS-Patienten und supprimierte MMP9-Liquorwerte unter MP-Hochdosistherapie nachweisen konnte (Kieseier et al. 1999).

Darüberhinaus könnten fallende MMP9-Konzentrationen im Liquor und steigende Serumkonzentrationen durch die Abdichtung der Blut-Hirn-Schranke im Rahmen der Kortikosteroidtherapie begründet sein.

### 4.3.3 SLPI

In unserer Arbeit konnten wir erstmalig zeigen, dass SLPI bei überwiegend unbehandelten MS-Patienten erhöhte Serumwerte aufweist. Unter MP-Therapie steigen die SLPI-Level weiter an (siehe Abbildung 3.10). Dies könnte darauf hinweisen, dass SLPI einige der positiven Kortisoneffekte vermittelt. Denn einige Gen- bzw. Proteinfunktionen, die für SLPI beschrieben sind, überschneiden sich mit Effekten, die der Glukokortikosteroid-Therapie zugeschrieben werden.

Die Serumwerte von SLPI sind circa 10-fach niedriger als die MMP9-Level. Wir sehen unter MP-Behandlung einen signifikanten Anstieg der Proteinkonzentration verglichen zu Werten vor und nach Behandlung sowie zu gesunden Kontrollen. Interessant ist, dass die Serumkonzentration von MS-Patienten im Schub und in Remission ebenfalls signifikant verschieden zu Werten gesunder Kontrollen ist. Da SLPI eine bessere Trennschärfe als MMP9 zwischen Erkrankten und Gesunden aufweist, könnte es für den Einsatz als diagnostischer Marker geeignet sein.

Ferner wird SLPI in zahlreichen Publikationen als antiinflammatorisch wirkend beschrieben (Moreau et al. 2008, Taggart et al. 2002, Zhang et al. 1997). In EAE-Ratten zeigt SLPI eine erhöhte Expression unter Krankheitsaktivität (Mueller et al. 2008). Zur genaueren Einordnung der SLPI-Wirkung inkubierten Mueller et al. adulte neuronale Stammzellen mit rekombinantem SLPI, wobei sie eine Erhöhung der Zellproliferation sowie eine Zunahme der Differenzierung zu Oligodendrozyten feststellten. Dies ließ sie auf eine Beteiligung von SLPI an Remyelinisierungsprozessen schließen (Mueller et al. 2008). Ghasemlou et al. fanden in SLPI-überexprimierenden Mäusen



nach spinalem Trauma früh einsetzende protektive Effekte, die sich zum Beispiel in einer Verbesserung der Lokomotion zeigten. Außerdem wiesen auch Wildtyp-Mäuse mit Rückenmarksverletzung, welche rekombinantes SLPI intraperitoneal verabreicht bekamen, eine verbesserte Bewegungsfunktion und einen geringeren sekundären Gewebeschaden auf. Überdies soll SLPI an Mäusen mit Rückenmarksverletzungen die Proliferation und Differenzierung neuronaler Stammzellen induzieren (Ghasemlou et al. 2010). Diese Daten weisen auf eine neuroregenerative Wirkung des SLPI hin.

Um zu klären, ob SLPI eher krankheitseindämmend oder auch krankheitsfördernd auf die Multiple Sklerose wirkt, müssen weitere Untersuchungen folgen. Hierbei sollte allerdings auf die Anwendung geeigneter und sicherer Methoden geachtet werden. In den zuletzt von Mueller durchgeführten Untersuchungen erscheint die Methode durch Vakzinierung induzierter SLPI-Antikörper doch sehr fehleranfällig. Zum einen merkten die Autoren selbst an, dass sich das immunogene Potenzial von SLPI und von OVA unterscheiden könne und es damit zu einer unspezifischen Immunsystem-Modulation der Mäuse bzw. Ratten kommen könnte. Zum anderen könnte auch der Vorgang der Antikörper-Induktion unspezifische Immunmodulationen im Tiermodell hervorrufen, die sekundär den EAE-Verlauf beeinflussen könnten.

Daher würden wir die Injektion gereinigter SLPI-Antikörper einer Vakzinierung vorziehen und weitere Untersuchungen mit transgenen Tieren anstreben. Das hieße bei SLPI-überexprimierenden- oder SLPI-knockout- Tieren EAE zu induzieren und an diesen Modellen die Krankheitsentwicklung und den Krankheitsverlauf zu beobachten.

#### **4.4 In vitro-Untersuchungen von SLPI, OSM und MMP9 an neutrophilen Granulozyten und peripheren mononukleären Blutzellen von MS-Patienten**

Der Nachweis einer erhöhten Genexpression aller drei untersuchten Gene unter Kortisontherapie sowie erhöhter Serumwerte von SLPI und MMP9 in MS-Patienten, warf die Frage auf, welche Zellen diese Effekte maßgeblich unterhalten. Für OSM wird eine Sekretion durch NG (Morikawa 2005) sowie PBMC (Ensoli et al. 2002) in der Literatur beschrieben, für SLPI eine Sekretion durch Neutrophile (Böhm et al. 1992) sowie Interaktionen mit PBMC (Shugars, Sauls und Weinberg 1997, Taggart et al. 2005) und für MMP9 eine Sekretion durch NG (Wize et al. 1998). Daher untersuchten wir im Folgenden die Genexpression der drei Gene in NG und PBMC.

Damit sollte zum einen geklärt werden, welche Zelltypen für die jeweilige Genexpression besonders bedeutsam sind und zum anderen wollten wir damit die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen *in vitro* reproduzieren.

Zunächst mussten Zeitverläufe sowie Verdünnungsreihen durchgeführt werden, um die korrekte Stimulationsdauer sowie geeignete Konzentrationen von Methylprednisolon zu ermitteln.

Nach ersten Versuchsreihen mit alleiniger Kortisonstimulation, erweiterten wir unsere Untersuchungen um Stimulationen mit TNF- $\alpha$  sowie eine Kostimulation mit TNF- $\alpha$  und MP. Dies kommt den physiologischen Bedingungen im MS-Patienten näher als eine alleinige Kortisonstimulation. Denn eine erhöhte TNF- $\alpha$ -Expression ist bei MS-Patienten im Rahmen von Schubereignissen im Serum sowie im Liquor beschrieben und konnte darüberhinaus in chronisch aktiven MS-Läsionen gezeigt werden (Beck et al. 1988, Sharief und Hentges 1991, Maimone et al. 1991, Rieckmann et al. 1995, Hautecoeur et al. 1997).

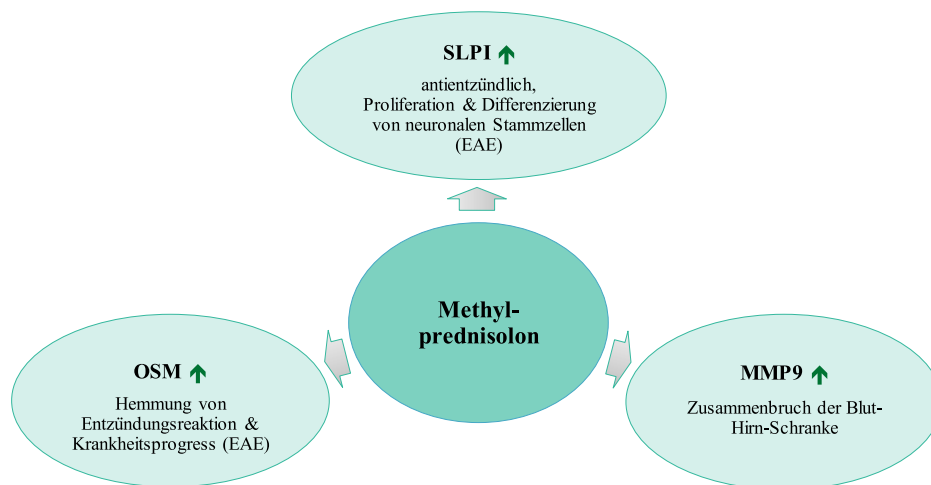
Unsere *in vitro*-Untersuchungen zeigten, dass von MS-Patienten gewonnene NG und PBMC nach Stimulation mit 1 $\mu$ g/ml Methylprednisolon über 12 Stunden eine Steigerung der Expression von SLPI, OSM und MMP9 aufweisen. Interessant ist hier anzumerken, dass SLPI und OSM in NG stärker exprimiert werden als in PBMC, während MMP9 von beiden Zelltypen in vergleichbarer Höhe exprimiert wird. Für den Krankheitsprozess und das Schubgeschehen typische Mediatoren, wie TNF- $\alpha$ , können darüberhinaus die Genexpression unter Kortisontherapie noch weiter steigern (siehe Abbildung 3.8).

#### **4.5 In vitro-Untersuchungen von SLPI, OSM und MMP9 an neutrophilen Granulozyten und peripheren mononukleären Blutzellen von gesunden Kontrollen**

In Zellkultur-Untersuchungen von drei gesunden Probanden wurde ein gegensätzliches Expressionsverhalten unter den verschiedenen Stimulationen beobachtet: Unter MP-Stimulation ist für OSM und MMP9 bei beiden Zelltypen sowie für SLPI in neutrophilen Granulozyten eine verminderte Genexpression festzustellen, während die Kortisonstimulation bei MS-Patienten zu einer Erhöhung der Genexpression führt. Unter TNF- $\alpha$ -Stimulation werden SLPI, OSM und MMP9 bei Gesunden jedoch im Vergleich zur Mediumkontrolle gesteigert exprimiert (siehe Abbildung 3.9).

Da bei Gesunden kein entzündliches Milieu vorliegt, erscheint eine Herabregulierung von antiinflammatorisch wirkenden Genen durchaus sinnvoll. Unter TNF- $\alpha$ -Zugabe, zur Simulation von Entzündungsvorgängen, wird folglich die Genexpression zur Inflammationshemmung angehoben. Desweiteren erscheint interessant, dass die Medianwerte der Genexpression von den gesunden Kontrollen für alle Gene in beiden Zelltypen höher liegen als bei MS-Patienten. Besonders stark ausgeprägt findet sich dies in den neutrophilen Granulozyten, die bei Gesunden eine 10-fach höhere MMP9-Expression zeigen sowie eine 100-fach gesteigerte SLPI-Expression. Dies könnte auf eine Genregulationsstörung antiinflammatorisch wirkender Gene und damit auf eine Immunregulationsstörung bei MS-Erkrankten hindeuten. Einschränkend ist jedoch darauf hinzuweisen, dass die Ergebnisse aufgrund der hohen Streuung nicht signifikant waren, so dass weitere Untersuchungen zur Untermauerung der oben genannten Schlussfolgerungen notwendig erscheinen.

#### 4.6 Methylprednisolon als Induktor für krankheitsfördernde und krankheitseindämmende Gene



**Abbildung 4.1:** Induktion krankheitsfördernder und krankheitseindämmender Gene durch Kortikosteroide, erstellt nach Mueller et al. (2008), Wahl und Wallace (2001) und Hartung und Kieseier (2000)

MMP9 begünstigt den Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke (Hartung und Kieseier 2000), OSM und SLPI wirken im Tiermodell der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis (EAE) jedoch protektiv sowie regenerativ (Wahl und Wallace 2001, Mueller et al. 2008). Somit weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass Kor-

tikosteroide sowohl Gene mit protektiven als auch Gene mit krankheitsfördernden Eigenschaften induzieren, wie Abbildung 4.1 veranschaulicht.

Deshalb soll im Folgenden noch näher auf die Eigenschaften der Gene MMP9 und OSM eingegangen werden.

#### **4.6.1 Charakterisierung des Gens Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9)**

MMP9 gehört zu einer großen Untergruppe Zink-bindender Endopeptidasen, die von einer Vielzahl von Zellen sezerniert werden. Dazu gehören differenzierte Gliazellen, Monozyten, Makrophagen, T-Zellen, Neutrophile, Astrozyten und endotheliale Zellen, wobei vor allem die zerebralen endothelialen Zellen bedeutsam zu sein scheinen (Mirowska et al. 2004, Harkness et al. 2000).

MMP9 wird als Proenzym in den Extrazellulärraum sezerniert. Dort muss es proteolytisch gespalten werden, um seine Proteasefähigkeit zu erlangen. In aktivierter Form werden MMPs von TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteases) inhibiert, die ubiquitär exprimiert werden und mit Endoproteinasen eine Komplexbildung im Verhältnis 1:1 eingehen. Darüber hinaus könnten auch noch weitere Proteasen-Inhibitoren eine regulatorische Wirkung haben. So zeigte beispielsweise das Pathway Studio Hinweise für eine Inhibierung der MMP9-Expression durch SLPI (Zhang et al. 1997).

Auf Transkriptionsebene wird die MMP9-Expression ferner durch die Wirkung von Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und Interleukine oder Kortikosteroide beeinflusst. Ob es zur Expressionsinhibierung oder -induktion kommt, hängt bei den jeweiligen Zytokinen stark vom Zelltyp ab (Hartung und Kieseier 2000). Kortikosteroide unterdrücken die MMP9-Transkription bei Gesunden (Murphy et al. 1994). Dies konnten wir mit unseren Zellkultur-Untersuchungen ebenfalls zeigen. Welcher Wirkmechanismus dem zu Grunde liegt, ist nicht erwiesen. Zum einen wird angenommen, dass Kortison die MMP9-Transkription direkt beeinflusst, zum anderen bewirken Glukokortikoide in endothelialen Zellen des ZNS einen Anstieg der TIMP-1-Produktion (Förster et al. 2007). Hier stellt sich nun die Frage, ob SLPI eventuell auch zur MMP9-Suppression unter Steroidtherapie beiträgt .

Die Familie der Matrix-Metalloproteinasen hat die Fähigkeit alle Proteinkomponenten der extrazellulären Matrix abzubauen. Damit spielen sie physiologisch eine wichtige Rolle bei der Wundheilung, der Angiogenese sowie bei Entwicklungsvorgängen. In verschiedenen Arbeiten gibt es Hinweise, dass Matrix-Metalloproteinasen an

der Entstehung entzündlicher Demyelinisierung, am Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke und der damit verbundenen Zellinvasion ins ZNS, sowie an der Aktivierung oder dem Abbau krankheitsmodifizierender Zytokine beteiligt sind. Darüber hinaus können sie Zellen des ZNS auch direkt schädigen (Kandagaddala et al. 2012, Hartung und Kieseier 2000). Da MMPs immunhistochemisch in akut demyelinisierenden wie auch chronischen MS-Läsionen, in infiltrierenden mononukleären Zellen und Astrozyten von MS-Patienten nachgewiesen werden konnten, kam es zu diesen Annahmen.

Im Rahmen von in vitro-Studien spielen MMPs bei der Basalmembran-Überwindung durch T-Lymphozyten eine wichtige Rolle, wie auch bei Demyelinisierungsprozessen. Letzteres ergibt sich aus ihrer Eigenschaft das Myelin Basische Protein (MBP), einen wichtigen Baustein der Myelinscheide, proteolytisch zu spalten.

Im EAE-Tiermodell zeigte sich nach intrathekalen MMP9-Injektionen ebenfalls eine MMP9-Beteiligung an der Entstehung entzündlicher Demyelinisierung und dem Blut-Hirnschranken-Zusammenbruch bei Ratten. Während Demyelinisierungsprozessen wiesen die MMP9-Messergebnisse auf mRNA-Ebene sowie im Liquor stark erhöhte Werte auf, die in Korrelation mit dem Erkrankungsverlauf bzw. der Schwere der Erkrankung standen. Durch eine MMP9-Inhibition wurde die Krankheitsentwicklung inhibiert und die klinischen Symptome aufgehoben, beides erfolgte dosisabhängig. Ferner wird die EAE-Induktion in MMP9-Knockout-Mäusen unterdrückt (Hartung und Kieseier 2000). In mit Gelelektrophorese und Western Blot untersuchten Gewebeschnitten von EAE-Mäusen fand sich im Gehirn, im Rückenmark und in der Milz eine signifikant erhöhte MMP9-Expression. Parallel hierzu konnte eine signifikante Abnahme des Organengewichts von Gehirn und Milz nachgewiesen werden. Dies impliziert eine Beteiligung der Metalloproteinasen an dem Vorgang der Gewebeschädigung (Kandagaddala et al. 2012).

Hierfür gibt es auch im Rahmen mehrerer Studien mit MS-Patienten Hinweise. Es zeigte sich eine Assoziation von erhöhten MMP9-mRNA-Werten in PBMC sowie von erhöhten Serum- und Liquorwerten mit der klinisch apparenten Symptomatik sowie der im MRT-nachgewiesenen Krankheitsaktivität. Unsere Untersuchungen können diese Ergebnisse weiter untermauern, da auch wir eine Hochregulierung der MMP9-Expression auf mRNA-Ebene sowie auf Proteinebene von MS-Patienten zeigen konnten.

Selbst in gesund erscheinender weißer Substanz von MS-Patienten wurden erhöhte MMP9-Werte gemessen. Nach Krankheitsverlaufstypen unterteilt, zeigten sich bei RR-MS- und SP-MS-Formen im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöhte MMP9-

Serum-Level und ein erhöhtes MMP9/TIMP-1-Verhältnis (Benesová et al. 2009). Die im Serum von MS-Patienten während eines Schubereignisses nachgewiesene MMP9-Konzentration war 10- bis 1000-fach höher als die im Liquor. Wie durch Gadolinium-unterstützte-MRT-Aufnahmen belegt werden konnte, gingen mit den erhöhten Liquorwerten Schädigungen der Blut-Hirn-Schranke einher. Hierfür könnte auch das Verhältnis von TIMP-1- zu MMP9-Protein interessant sein. Eine hochdosierte Methylprednisolon-Behandlung (5x 1000 mg) bewirkt in Immunzellen zunächst (in der ersten Woche nach Verabreichung, Maximum am 7.Tag) einen MMP9-Anstieg, im weiteren Verlauf (Tag 7-14, bis mehrere Monate danach) kann es jedoch zu einer Verminderung der MMP9-Transkription wie auch zu einem erniedrigten Liquorspiegel und einer verminderten Gadolinium-Anreicherung im ZNS kommen (Mirowska et al. 2004, Hartung und Kieseier 2000, Yushchenko et al. 2000). Der vorübergehende MMP9-Anstieg in Immunzellen könnte auch durch die Zellverschiebung bedingt sein, welche mit der Kortisonverabreichung einhergeht. Denn unter Kortisontherapie nimmt der Anteil von Granulozyten und Monozyten zu, die als stärkste MMP9-Produzenten gelten (Mirowska et al. 2004). Im Liquor wurde dieses Phänomen ebenfalls beobachtet. Sobald die Liquor-Zellzahl mehr als 4 Zellen/ $\mu$ l betrug, stieg die MMP9-Konzentration an, wobei das Verhältnis von Albumin im Liquor/Albumin im Serum gleich blieb, das heißt keine Blut-Hirn-Schranken-Störung bestand. Im Liquor gesunder Probanden kann kein MMP9 nachgewiesen werden (Yushchenko et al. 2000).

Im Rahmen von in vitro-Versuchen an mikrovaskulären Endothelzellen des ZNS konnte eine konstitutive Expression von MMP9 gezeigt werden, die durch Zugabe von proinflammatorischen Zytokinen gesteigert werden konnte. Endothelien des ZNS sind zwar mengenmäßig nicht die größten MMP-Produzenten, allerdings könnten sie aufgrund ihrer Nähe zur Blut-Hirn-Schranke gerade für die Anfangsphase der Blut-Hirnschranken-Schädigung bedeutsam sein (Harkness et al. 2000).

Aufgrund der zuvor beschriebenen Erkenntnisse und der Beobachtung, dass erhöhte MMP-Level zu einer Zerstörung perineuronaler Netzwerke in MS-Plaques führen, kann trotz einiger kritischer Einwände davon ausgegangen werden, dass Matrix-Metalloproteinasen zur neuronalen Dysfunktion und Degeneration bei MS-Patienten beitragen (Gray et al. 2008).

#### 4.6.2 Charakterisierung des Gens Oncostatin M (OSM)

Oncostatin M (OSM) ist ein Zytokin, das zur IL6-Familie gehört und über den gp130-Rezeptor oder gp130-Rezeptor ähnliche Untereinheiten eine Vielzahl von Zellen beeinflussen kann (Ensoli et al. 2002). Dazu gehören endotheliale, hämatopoetische, lymphopoetische und neuronale Zellen. Das Protein wird von aktivierten T-Zellen, Makrophagen, humanen dendritischen Zellen sowie von neutrophilen Granulozyten und peripheren mononukleären Blutzellen sezerniert (Ruprecht et al. 2001, Wallace et al. 1999).

Nach Bindung des OSM-Proteins an den gp 130/OSM-Rezeptor  $\beta$  (OSMR  $\beta$ )- oder LIFR/gp130- Komplex erfolgt eine Heterodimerisierung dieses Komplexes. Im Folgenden ist sowohl eine Aktivierung des (JAK)-STAT- als auch des MAPK (mitogen-activated protein kinase)- Signalwegs möglich (Morikawa 2005, Ruprecht et al. 2001).

Histologisch konnte OSM mittels Luxol-Blau- und Perjodsäure-Schiff-Färbung in entzündlichen MS-Läsionen dargestellt werden. Im Gehirn von MS-Patienten zeigte sich eine OSM-Anreicherung insbesondere in der Mikroglia, in reaktiven Astrozyten und in infiltrierenden Leukozyten, während bei Gesunden und Erkrankten nicht-entzündlicher neurologischer Erkrankungen kein OSM im Parenchym nachgewiesen werden konnte. Dies spricht für eine Beteiligung von OSM an der Pathophysiologie entzündlicher Prozesse des zentralen Nervensystems. Allerdings werden diesem Protein neben antiinflammatorischen auch proinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben (Ruprecht et al. 2001).

Protektive Eigenschaften von OSM zeigen sich in den Tiermodellen chronisch entzündlicher Erkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis und der MS. OSM ist hier stark entzündungshemmend und gewebeprotektiv. So sind bei EAE-Mäusen, die über mehrere Tage mit jeweils 10  $\mu$ g OSM i.p. behandelt wurden, 18 Tage nach der krankheits-induzierenden Immunisation keine Krankheitszeichen und keine histologischen EAE-Korrelate sichtbar. Im Gegensatz hierzu weisen unbehandelte EAE-Mäuse EAE-typische Läsionen auf. In den OSM-behandelten Tieren konnte kein Entzündungsinfiltrat im Gehirn oder Rückenmark nachgewiesen werden. Interessanterweise werden die T-Zell-Funktion sowie die Antikörper-Produktion durch diese anti-inflammatorische und anti-degenerative OSM-Wirkung nicht tangiert. Somit wies OSM eine anti-entzündliche Wirkung ohne begleitende Immunsuppression auf, was das OSM-Protein für einen etwaigen therapeutischen Einsatz interessant machen könnte. Darüber hinaus inhibiert OSM dosisabhängig die LPS (Lipopolysaccharid, bakteriell)- induzierte TNF- $\alpha$ -Produktion und wird erst relativ spät, 24–48 Stunden nach Auftreten eines proinflammatorischen Stimulus, sezerniert. Zu dieser

späten Phase herrschen eher Proteine vor, die nicht für die Entzündungs-Initiierung verantwortlich sind. Der für die OSM-abhängige TNF- $\alpha$ -Inhibition relevante molekulare Mechanismus ist noch nicht bekannt. Es wäre allerdings möglich, dass OSM durch seine Induktion der IL-6-Sekretion in Endothelzellen die TNF- $\alpha$ -Produktion in vivo unterdrücken kann (Wahl und Wallace 2001, Wallace et al. 1999).

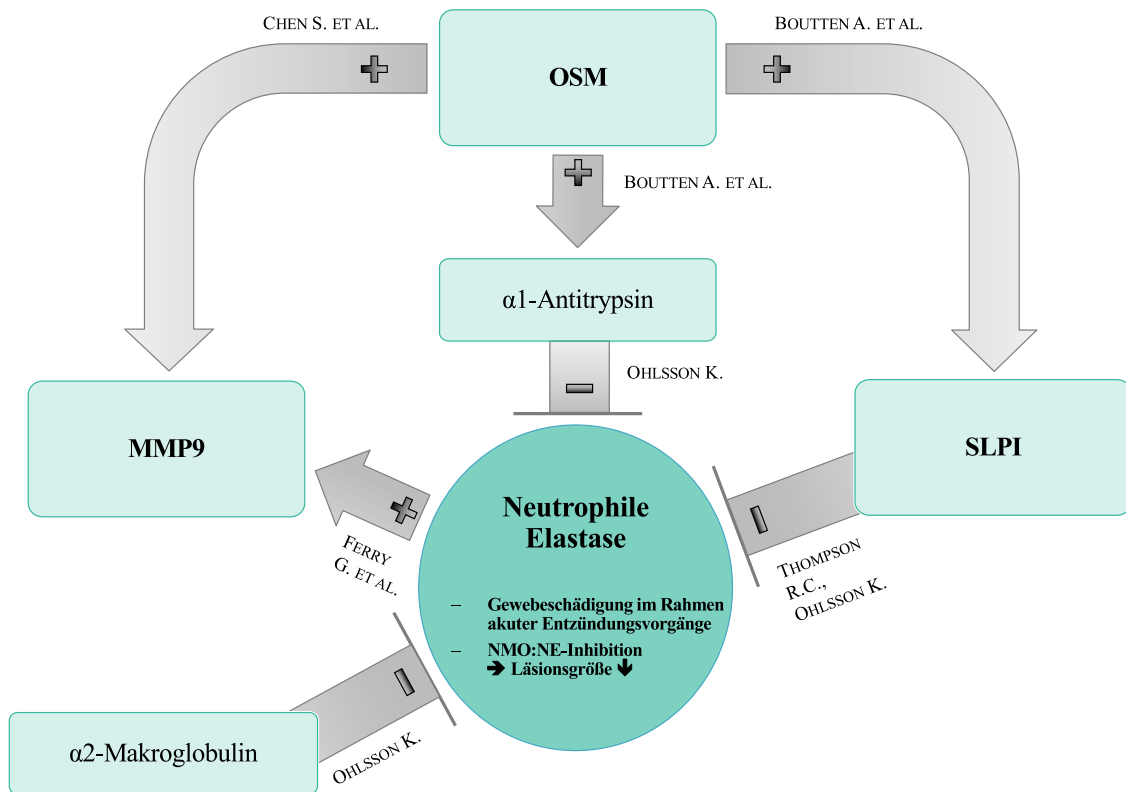
Eher förderlich für das Entstehen und Fortschreiten einer entzündlichen Erkrankung erscheinen die Expressionsinduktion von Matrix-Metalloproteinasen in Astrozyten, die negative Beeinflussung der Oligodendrozyten-Differenzierung sowie die Inhibierung des Wachstums und die Apoptose-Förderung differenzierter neuronaler Zellen. Da OSM ferner die ICAM-1-Expression fördert, unterstützt es die endotheliale Leukozyten-Transmigration, was eine Beeinträchtigung der Blut-Hirnschranken-Funktion sowie eine Anreicherung von Entzündungszellen in entzündlichen Gehirnarealen verursachen könnte (Ruprecht et al. 2001, Ensoli et al. 2002). Aufgrund dieser zahlreichen protektiven wie auch negativen Eigenschaften des Oncostatins bleibt eine Einordnung seiner Bedeutung innerhalb der MS-Pathologie schwierig. Die Art der OSM-Wirkung scheint von dem jeweiligen Mikromilieu, der Krankheitsphase bzw. -art, der Interaktion mit anderen Zytokinen und anderen Parametern abhängig zu sein.

#### **4.6.3 Verknüpfung von SLPI, OSM und MMP9 über die Neutrophile Elastase**

Im Rahmen unserer Untersuchungen hat sich eine Verbindung von SLPI, OSM und MMP9 über die Neutrophile Elastase gezeigt, wie in Abbildung 4.2 dargestellt. OSM hemmt die Neutrophile Elastase zweifach. Einerseits durch die Induktion von  $\alpha_1$ -Antitrypsin, welches die Neutrophile Elastase inhibiert. Andererseits fördert OSM die Expression von SLPI (Boutten et al. 1998) und SLPI wirkt wiederum hemmend auf die Neutrophile Elastase. Die Neutrophile Elastase ihrerseits aktiviert MMP9 (Ferry et al. 1997). Interessant erscheint die Neutrophile Elastase im Kontext der Multiplen Sklerose deshalb, weil sie mit der Gewebeschädigung im Rahmen akuter Entzündungsvorgänge in Verbindung gebracht wird. Darüberhinaus konnte für das Krankheitsbild der Neuromyelitis optica (NMO) eine Verringerung der Läsionsgröße durch eine Inhibition der Neutrophilen Elastase im Mausmodell nachgewiesen werden (Saadoun et al. 2012). In diesem Kontext erfolgt eine durch die Neutrophile Elastase vermittelte Inhibition von MMP9 sowohl durch SLPI als auch durch OSM. Da für Kortikosteroide ebenfalls eine hemmende Wirkung auf Enzyme wie die Neutrophile Elastase beschrieben wird (Stockley et al. 1986), könnte dieser Zusam-



menhang unsere Annahme unterstützen, dass SLPI und OSM an der Vermittlung positiver Kortisoneffekte beteiligt sind.



**Abbildung 4.2:** Verknüpfung von SLPI, OSM und MMP9 über die Neutrophile Elastase, (Ohlsson 1975, Thompson und Ohlsson 1986, Ferry et al. 1997, Boutten et al. 1998),

Symbol für Induktion: ➔, Symbol für Inhibition: —

Für SLPI sind darüberhinaus noch einige weitere Effekte bekannt, die sich mit der Wirkung von Glukokortikosteroiden decken. Hierzu zählen beispielsweise die verminderte NO- und TNF- $\alpha$ -Expression sowie proapoptotische Effekte. Dies könnte ein weiterer Hinweis dafür sein, dass SLPI erwünschte Kortisoneffekte vermittelt und damit den Krankheitsverlauf der MS günstig beeinflusst. Daher wäre es erwägenswert, spezifische Induktoren von SLPI zu entwickeln. Denn damit könnte die erwünschte Wirkung von SLPI gezielt gefördert und die Induktion unerwünschter Gene durch Kortikosteroide gleichzeitig vermieden werden.

Dies könnte einen verfolgenswerten Ansatz für eine spezifischere MS-Schubbehandlung darstellen. Um die Rolle von SLPI in der Pathogenese der MS weiter zu beleuchten, wollen wir in weiteren Untersuchungen Gefrierschnitte des menschlichen Gehirns immunhistochemisch auf die Nachweisbarkeit von SLPI prüfen. Darüberhinaus planen wir die Krankheitsentwicklung und den Krankheitsverlauf von SLPI-knockout-

und/oder SLPI-überexprimierenden Mäusen/Ratten, die an EAE erkrankt sind, zu untersuchen.

## 5 Zusammenfassung

Glukokortikosteroide wurden bereits seit den frühen siebziger Jahren zur Behandlung der Multiplen Sklerose (MS), einer chronisch entzündlichen ZNS-Erkrankung, eingesetzt. Im Rahmen der Behandlung akuter Schubereignisse bewirkt eine hochdosierte Kortisontherapie eine raschere Rückbildung der klinischen Schubsymptomatik. Nach heutigem Wissen könnte hierzu die verminderte Expression proinflammatorischer Zytokine oder die Abdichtung der Blut-Hirnschranke durch Glukokortikoide beitragen. Die für den therapeutischen Effekt von Kortikosteroiden verantwortlichen Wirkmechanismen konnten jedoch bislang noch nicht vollständig aufgeklärt werden.

Deshalb war es unser Ziel, einen kortisonregulierten Gensignalweg ausfindig zu machen, der aus mehreren interagierenden Genen besteht und für die MS-Pathogenese interessant sein könnte, um neue Ansätze für spezifischer wirksame Therapeutika in der MS-Schubbehandlung zu entwickeln.

Als Vorarbeit wurde von Herrn Dr. H. Faber, Dr. P. Weber und Dr. B. Pütz eine genomweite Genexpressionsanalyse von 6 MS-Patienten im Schub, unter Methylprednisolon-Therapie und in Remission durchgeführt. Im Rahmen meiner Analyse der zur Verfügung gestellten Genexpressionsdaten fanden sich 1908 signifikant kortisonregulierte Gene. Aufgrund ihrer Steroidinduktion und Interaktion wurden im Weiteren drei Gene ausgewählt: Onkostatine M (OSM) mit einer 2,82-fachen Expressionsänderung während der Kortisonbehandlung gegenüber vor der Behandlung, Sekretorischer Leukozyten Peptidase Inhibitor (SLPI) mit einer 8,97-fachen Expressionsänderung und Matrix Metalloproteinase-9 (MMP9) mit einer 2,52-fachen Expressionsänderung. Die Genexpressionsveränderungen dieser drei Gene sollten auf mRNA-Ebene *in vitro* und *in vivo* sowie auf Proteinebene nachgewiesen werden.

Die Microarrayergebnisse konnte ich mittels quantitativer PCR an den Arrayproben sowie an sechs zusätzlichen Patienten bestätigen.

Im Folgenden wurden die Serumkonzentrationen von SLPI und MMP9 bei MS-Patienten vor, unter und nach MP-Therapie sowie bei Gesunden mittels ELISA quantifiziert. Die Serumwerte von SLPI und MMP9 waren während der MP-Behandlung im Vergleich zu Blutproben vor/nach der Therapie und gesunder Kontrollen erhöht. Des Weiteren zeigten MS-Patienten im Schub höhere Serumkonzentrationen als gesunde Kontrollen.

Unsere Untersuchungen an PBMC und NG von MS-Patienten, die *in vitro* 12 Stunden mit Methylprednisolon (MP) und/oder TNF- $\alpha$  stimuliert wurden, weisen darauf hin, dass MP die Expression von SLPI, OSM und MMP9 in PBMC und in NG ver-

stärkt. Eine gleichzeitige Stimulation mit TNF- $\alpha$  erhöht die Genexpression darüberhinaus weiter deutlich. Bei Gesunden ist der gegensätzliche Effekt zu beobachten. Unter MP-Stimulation scheint bei Gesunden eine Supprimierung der Expression von MMP9 und OSM in beiden Zelltypen sowie von SLPI in NG zu erfolgen. TNF- $\alpha$  hingegen bewirkt eine Expressions-Induktion für alle Gene in beiden Zelltypen.

Da die MP-Behandlung die Genexpression von SLPI, OSM und MMP9 steigert und die Serumkonzentration von SLPI und MMP9 bei MS-Patienten erhöht, weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass Kortikosteroide sowohl Gene mit protektiven als auch Gene mit krankheitsfördernden Eigenschaften induzieren. So begünstigt MMP9 den Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke, während OSM und SLPI im Tiermodell der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis (EAE) eher protektiv sowie regenerativ wirken.

Mit unseren Untersuchungen konnten wir erstmals zeigen, dass die SLPI-Serumkonzentration in überwiegend unbehandelten MS-Patienten im Schub und in der Remission erhöht ist und unter Kortisontherapie weiter ansteigt. Dies könnte darauf hinweisen, dass SLPI einige der erwünschten Kortisoneffekte vermittelt. Die erhöhte Expression und Serumkonzentration von SLPI bei MS-Patienten könnte die Anwendung von SLPI als diagnostischen Marker ermöglichen.

Darüberhinaus wird SLPI als antiinflammatorisch wirkendes Protein beschrieben, das in EAE-Mäusen mit Rückenmarksverletzung die Proliferation und Differenzierung von neuronalen Stammzellen fördert. Dies weist auf ein neuroregeneratives Potenzial von SLPI hin.

Durch die Identifizierung spezifischer SLPI-Induktoren könnten somit ungünstige Geninduktionen, die durch Kortikosteroide hervorgerufen werden, umgangen werden und günstige Effekte des SLPI gezielt gefördert werden. Dies wäre ein verfolgenswerter Ansatz für eine spezifischere MS-Schubbehandlung. Um die protektive Wirkung von SLPI zu untermauern, sollte im Weiteren der Krankheitsverlauf von SLPI-knockout- und/oder SLPI-überexprimierenden Mäusen, die an EAE erkrankt sind, untersucht werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Beck J et al.** (1988). „Increased production of interferon gamma and tumor necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: do cytokines trigger off exacerbations?“ *Acta Neurologica Scandinavica* 78.4, S. 318–23.
- Benesová Y et al.** (2009). „Matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2 as biomarkers of various courses in multiple sclerosis.“ *Multiple Sclerosis* 15.3, S. 316–22.
- Böhm B et al.** (1992). „The serine-protease inhibitor of cartilage matrix is not a chondrocytic gene product.“ *European Journal of Biochemistry* 207.2, S. 773–9.
- Boutten A et al.** (1998). „Oncostatin M is a potent stimulator of alpha1-antitrypsin secretion in lung epithelial cells: modulation by transforming growth factor-beta and interferon-gamma.“ *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 18.4, S. 511–20.
- Brenner T et al.** (1997). „Inhibition of nitric oxide synthase for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis.“ *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 158.6, S. 2940–6.
- Brusaferri F. und Candelise L.** (2000). „Steroids for multiple sclerosis and optic neuritis: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials.“ *Journal of Neurology* 247.6, S. 435–42.
- Buck D. und Hemmer B.** (2011). „Treatment of multiple sclerosis: current concepts and future perspectives.“ *Journal of Neurology* 258.10, S. 1747–62.
- Burnham J. A. et al.** (1991). „The effect of high-dose steroids on MRI gadolinium enhancement in acute demyelinating lesions.“ *Neurology* 41.9, S. 1349–54.
- Buttgereit F., Brand M. D. und Burmester G.-R.** (1999). „Equivalent doses and relative drug potencies for non-genomic glucocorticoid effects: a novel glucocorticoid hierarchy.“ *Biochemical Pharmacology* 58.2, S. 363–368.
- Cannella B und Raine C. S.** (1995). „The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions.“ *Annals of Neurology* 37.4, S. 424–35.
- Cato A. C. B., Nestl A. und Mink S.** (2002). „Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways.“ *Science Signaling* 2002.138, re9.

- Chen S.-H., Gillespie G. Y. und Benveniste E. N.** (2006). „Divergent effects of oncostatin M on astrogloma cells: influence on cell proliferation, invasion, and expression of matrix metalloproteinases.“ *Glia* 53.2, S. 191–200.
- Coles A.** (2009). „Multiple sclerosis.“ *Practical Neurology* 9.2, S. 118–26.
- Compston A. und Coles A.** (2008). „Multiple sclerosis.“ *The Lancet* 372.9648, S. 1502–17.
- Cronstein B. N. et al.** (1992). „A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89.21, S. 9991–9995.
- Dean G und Elian M** (1997). „Age at immigration to England of Asian and Caribbean immigrants and the risk of developing multiple sclerosis.“ *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 63.5, S. 565–8.
- Dean G und Kurtzke J. F.** (1971). „On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa.“ *BMJ* 3.5777, S. 725–9.
- Degenhardt A. et al.** (2009). „Clinical prognostic factors in multiple sclerosis: a natural history review.“ *Nature Reviews Neurology* 5.12, S. 672–82.
- Diener H., Weimar C. und Neurologie K. L. der Deutschen Gesellschaft für** (2012). *DGN / KKNMS Leitlinie zur Diagnose und Therapie der MS (06/2012)*. 5. Auflage.
- Ensoli F et al.** (2002). „Lymphomononuclear cells from multiple sclerosis patients spontaneously produce high levels of oncostatin M, tumor necrosis factors  $\alpha$  and  $\beta$ , and interferon  $\gamma$ .“ *Multiple Sclerosis* 8.4, S. 284–288.
- Feinstein A.** (2011). „Multiple sclerosis and depression.“ *Multiple Sclerosis Journal* 17.11, S. 1276–81.
- Ferry G et al.** (1997). „Activation of MMP-9 by neutrophil elastase in an in vivo model of acute lung injury.“ *FEBS Letters* 402.2-3, S. 111–5.
- Firth D** (1941). „The Case of Augustus d’Este (1794-1848): The First Account of Disseminated Sclerosis: (Section of the History of Medicine).“ *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 34.7, S. 381–4.

- Fox R. J. et al.** (2012). „Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis.“ *New England Journal of Medicine* 367.12, S. 1087–97.
- Förster C. et al.** (2007). „Dexamethasone induces the expression of metalloproteinase inhibitor TIMP-1 in the murine cerebral vascular endothelial cell line cEND“. *The Journal of Physiology* 3, S. 937–949.
- Gelati M. et al.** (2002). „Methylprednisolone acts on peripheral blood mononuclear cells and endothelium in inhibiting migration phenomena in patients with multiple sclerosis.“ *Archives of Neurology* 59.5, S. 774–80.
- Ghasemlou N. et al.** (2010). „Beneficial effects of secretory leukocyte protease inhibitor after spinal cord injury.“ *Brain* 133.Pt 1, S. 126–38.
- Gold R, Buttgereit F und Toyka K. V.** (2001). „Mechanism of action of glucocorticosteroid hormones: possible implications for therapy of neuroimmunological disorders.“ *Journal of Neuroimmunology* 117.1-2, S. 1–8.
- Gold R und Rieckmann P** (2007). „Fortschritte im Verständnis von Pathogenese und Immuntherapie der Multiplen Sklerose“. *Der Nervenarzt* 78.S1, S. 15–26.
- Gold R. et al.** (2012). „Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis.“ *New England Journal of Medicine* 367.12, S. 1098–107.
- Goodin D. S. et al.** (2002). „Disease modifying therapies in multiple sclerosis: Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines“. *Neurology* 58.2, S. 169–178.
- Grauer O et al.** (2001). „Glukokortikosteroid-Therapie bei Optikusneuritis und Multipler Sklerose“. *Der Nervenarzt* 72.8, S. 577–589.
- Gray E. et al.** (2008). „Elevated matrix metalloproteinase-9 and degradation of perineuronal nets in cerebrocortical multiple sclerosis plaques.“ *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 67.9, S. 888–99.
- Hafler D. A. et al.** (2007). „Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study.“ *New England Journal of Medicine* 357.9, S. 851–62.
- Hammond S. R.** (2000). „The age-range of risk of developing multiple sclerosis: Evidence from a migrant population in Australia“. *Brain* 123.5, S. 968–974.

- Handel a. E. et al.** (2010). „Genetic and environmental factors and the distribution of multiple sclerosis in Europe.“ *European Journal of Neurology* 17.9, S. 1210–4.
- Harkness K. A. et al.** (2000). „Dexamethasone regulation of matrix metalloproteinase expression in CNS vascular endothelium.“ *Brain* 123 ( Pt 4, S. 698–709.
- Hartung H. P. und Kieseier B. C.** (2000). „The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system.“ *Journal of Neuroimmunology* 107.2, S. 140–7.
- Hautecoeur P et al.** (1997). „Variations of IL2, IL6, TNF alpha plasmatic levels in relapsing remitting multiple sclerosis.“ *Acta Neurologica Belgica* 97.4, S. 240–3.
- Jacobs L. D., Beck R. W. und Simon J. H.** (2000). „INTRAMUSCULAR INTERFERON BETA-1a THERAPY INITIATED DURING A FIRST DEMYELINATING EVENT IN MULTIPLE SCLEROSIS“. *N Engl J Med* 343, S. 898–904.
- Joanny E. et al.** (2012). „Anti-inflammatory effects of selective glucocorticoid receptor modulators are partially dependent on up-regulation of dual specificity phosphatase 1.“ *British Journal of Pharmacology* 165.4b, S. 1124–36.
- Kandagaddala L. D. et al.** (2012). „Expression and activation of matrix metalloproteinase-9 and NADPH oxidase in tissues and plasma of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice.“ *Experimental and Toxicologic Pathology* 64.1-2, S. 109–114.
- Kappos L. et al.** (2007). „Effect of early versus delayed interferon beta-1b treatment on disability after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: a 3-year follow-up analysis of the BENEFIT study.“ *The Lancet* 370.9585, S. 389–97.
- Kappos L. et al.** (2011). „Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial.“ *The Lancet* 378.9805, S. 1779–87.
- Keegan B. M. und Noseworthy J. H.** (2002). „Multiple sclerosis.“ *Annual Review of Medicine* 53, S. 285–302.
- Keegan M. et al.** (2005). „Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange.“ *The Lancet* 366.9485, S. 579–82.



- Kieseier B. C. et al.** (1999). „Effector pathways in immune mediated central nervous system demyelination.“ *Current Opinion in Neurology* 12.3, S. 323–36.
- Klotz L et al.** (2011). „Diagnostik der Multiplen Sklerose 2010 Revision der McDonald-Kriterien“. *Der Nervenarzt* 82.10, S. 1302–9.
- Korzus E. et al.** (1997). „The mitogen-activated protein kinase and JAK-STAT signaling pathways are required for an oncostatin M-responsive element-mediated activation of matrix metalloproteinase 1 gene expression“. *Journal of Biological Chemistry* 272.2, S. 1188–1196.
- Kuhlmann T et al.** (2008). „Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis.“ *Brain* 131.Pt 7, S. 1749–58.
- Kuhlmann T. et al.** (2002). „Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time.“ *Brain* 125.Pt 10, S. 2202–12.
- Leussink V. I. et al.** (2001). „High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis induces apoptosis in peripheral blood leukocytes.“ *Archives of Neurology* 58.1, S. 91–7.
- Loughlin a. J., Woodroffe M. N. und Cuzner M. L.** (1993). „Modulation of interferon-gamma-induced major histocompatibility complex class II and Fc receptor expression on isolated microglia by transforming growth factor-beta 1, interleukin-4, noradrenaline and glucocorticoids.“ *Immunology* 79.1, S. 125–30.
- Lucchinetti C et al.** (2000). „Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination.“ *Annals of Neurology* 47.6, S. 707–17.
- Maimone D. et al.** (1991). „Cytokine levels in the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis“. *Journal of Neuroimmunology* Volume 32, S. 67–74.
- McDonald W. I. et al.** (2001). „Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis.“ *Annals of Neurology* 50.1, S. 121–7.
- McLean B. N., Luxton R. W. und Thompson E. J.** (1990). „A study of immunoglobulin G in the cerebrospinal fluid of 1007 patients with suspected neu-

rological disease using isoelectric focusing and the Log IgG-Index. A comparison and diagnostic applications.“ *Brain* 113 ( Pt 5, S. 1269–89.

**Mikol D. D. et al.** (2008). „Comparison of subcutaneous interferon beta-1a with glatiramer acetate in patients with relapsing multiple sclerosis (the REbif vs Glatiramer Acetate in Relapsing MS Disease [REGARD] study): a multicentre, randomised, parallel, open-label trial.“ *The Lancet Neurology* 7.10, S. 903–14.

**Miller D. H. et al.** (1992). „High dose steroids in acute relapses of multiple sclerosis: MRI evidence for a possible mechanism of therapeutic effect.“ *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 55.6, S. 450–3.

**Mirowska D et al.** (2004). „Increase of matrix metalloproteinase-9 in peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with high doses of methylprednisolone“. *Journal of Neuroimmunology* 146, S. 171–175.

**Müller A. M. et al.** (2012). „Inhibition of SLPI ameliorates disease activity in experimental autoimmune encephalomyelitis.“ *BMC Neuroscience* 13.1, S. 30.

**Moreau T. et al.** (2008). „Multifaceted roles of human elafin and secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI), two serine protease inhibitors of the chelonianin family.“ *Biochimie* 90.2, S. 284–95.

**Morikawa Y.** (2005). „Oncostatin M in the development of the nervous system.“ *Anatomical Science International* 80.1, S. 53–9.

**Mueller A. M. et al.** (2008). „Novel role for SLPI in MOG-induced EAE revealed by spinal cord expression analysis.“ *Journal of Neuroinflammation* 5, S. 20.

**Murphy G. et al.** (1994). „Regulation of matrix metalloproteinase activity.“ *Annals of the New York Academy of Sciences* 732, S. 31–41.

**Naismith R. T. et al.** (2010). „Rituximab add-on therapy for breakthrough relapsing multiple sclerosis: a 52-week phase II trial.“ *Neurology* 74.23, S. 1860–7.

**Noseworthy J. H. et al.** (2000). „Multiple sclerosis.“ *New England Journal of Medicine* 343.13, S. 938–52.

**O’Connor P. et al.** (2009). „250 microg or 500 microg interferon beta-1b versus 20 mg glatiramer acetate in relapsing-remitting multiple sclerosis: a prospective, randomised, multicentre study.“ *The Lancet Neurology* 8.10, S. 889–97.

- Ohlsson K** (1975). „Alpha1-antitrypsin and alpha2-macroglobulin. Interactions with human neutrophil collagenase and elastase.“ *Journal of Neuroradiology* 256, S. 409–19.
- Ontaneda D. und Cohen J. a.** (2013). „The benefits and risks of alemtuzumab in multiple sclerosis.“ *Expert Review of Clinical Immunology* 9.3, S. 189–91.
- Pearce J. M. S.** (2005). „Historical descriptions of multiple sclerosis.“ *European Neurology* 54.1, S. 49–53.
- Pitzalis C et al.** (1997). „Comparison of the effects of oral versus intravenous methylprednisolone regimens on peripheral blood T lymphocyte adhesion molecule expression, T cell subsets distribution and TNF alpha concentrations in multiple sclerosis.“ *Journal of Neuroimmunology* 74.1-2, S. 62–8.
- Polman C. H. et al.** (2011). „Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria.“ *Annals of Neurology* 69.2, S. 292–302.
- Pugliatti M et al.** (2006). „The epidemiology of multiple sclerosis in Europe.“ *European Journal of Neurology* 13.7, S. 700–22.
- Py B. et al.** (2009). „The phospholipid scramblases 1 and 4 are cellular receptors for the secretory leukocyte protease inhibitor and interact with CD4 at the plasma membrane.“ *PLoS ONE* 4.3, e5006.
- Rhen T. und Cidlowski J. a.** (2005). „Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs.“ *New England Journal of Medicine* 353.16, S. 1711–23.
- Rieckmann P et al.** (1995). „Tumor necrosis factor-alpha messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity.“ *Annals of Neurology* 37.1, S. 82–8.
- Rieckmann P.** (2006). „Immunmodulatorische Stufentherapie der Multiplen Sklerose. Aktuelle Therapieempfehlungen (September 2006).“ *Der Nervenarzt* 77.12, S. 1506–18.
- Rose A. S. et al.** (1970). „Cooperative study in the evaluation of therapy in multiple sclerosis. ACTH vs. placebo-final report.“ *Neurology* 20.5, S. 1–59.

- Rosenberg G. A. et al.** (1996). „Effect of steroids on CSF matrix metalloproteinases in multiple sclerosis: relation to blood-brain barrier injury.“ *Neurology* 46.6, S. 1626–32.
- Ruprecht K et al.** (2001). „Effects of oncostatin M on human cerebral endothelial cells and expression in inflammatory brain lesions.“ *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 60.11, S. 1087–98.
- Saadoun S. et al.** (2012). „Neutrophil protease inhibition reduces neuromyelitis optica-immunoglobulin G-induced damage in mouse brain.“ *Annals of Neurology* 71.3, S. 323–33.
- Salmen A., Gold R. und Chan A.** (2013). „Management of disease modifying treatments in neurological autoimmune diseases of the central nervous system.“ *Clinical & Experimental Immunology*, S. 1–40.
- Sawcer S. et al.** (2011). „Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis.“ *Nature* 476.7359, S. 214–9.
- Schmidt J et al.** (2000). „T-cell apoptosis in situ in experimental autoimmune encephalomyelitis following methylprednisolone pulse therapy.“ *Brain* 123, S. 1431–41.
- Sellebjerg F et al.** (2000). „Immunological effects of oral high-dose methylprednisolone in acute optic neuritis and multiple sclerosis.“ *European Journal of Neurology* 7.3, S. 281–9.
- Sharief M. K. und Hentges R** (1991). „Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis.“ *New England Journal of Medicine* 325.7, S. 467–72.
- Shugars D. C., Sauls D. L. und Weinberg J. B.** (1997). „Secretory leukocyte protease inhibitor blocks infectivity of primary monocytes and mononuclear cells with both monocytoprotropic and lymphocytotropic strains of human immunodeficiency virus type I.“ *Oral Diseases* 3 Suppl 1, S70–2.
- Sorensen P. S. et al.** (2014). „Safety and efficacy of ofatumumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: A phase 2 study.“ *Neurology* 82, S. 573–581.
- Sospedra M. und Martin R.** (2005). „Immunology of Multiple Sclerosis“. *Annual Review of Immunology* 23, S. 683–747.

- Srivastava R. et al.** (2012). „Potassium channel KIR4.1 as an immune target in multiple sclerosis.“ *New England Journal of Medicine* 367.2, S. 115–23.
- Stockley R. a. et al.** (1986). „Elastase inhibitors of sputum sol phase: variability, relationship to neutrophil elastase inhibition, and effect of corticosteroid treatment.“ *Thorax* 41.6, S. 442–7.
- Storch M. K. et al.** (2006). „Autoimmunity to Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein in Rats Mimics the Spectrum of Multiple Sclerosis Pathology“. *Brain Pathology* 8.4, S. 681–694.
- Taggart C. C. et al.** (2002). „Secretory leucoprotease inhibitor prevents lipopolysaccharide-induced IkappaBalpha degradation without affecting phosphorylation or ubiquitination.“ *Journal of Biological Chemistry* 277.37, S. 33648–53.
- Taggart C. C. et al.** (2005). „Secretory leucoprotease inhibitor binds to NF-kappaB binding sites in monocytes and inhibits p65 binding.“ *Journal of Experimental Medicine* 202.12, S. 1659–68.
- Thompson R. C. und Ohlsson K** (1986). „Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83.18, S. 6692–6.
- Trapp B. D., Ransohoff R und Rudick R** (1999). „Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability.“ *Current Opinion in Neurology* 12.3, S. 295–302.
- Trapp B. D. et al.** (1998). „Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis.“ *New England Journal of Medicine* 338.5, S. 278–85.
- Vermersch P. et al.** (2014). „Teriflunomide versus subcutaneous interferon beta-1a in patients with relapsing multiple sclerosis: a randomised, controlled phase 3 trial.“ *Multiple Sclerosis Journal* 20.6, S. 705–16.
- Vroling A. B. et al.** (2010). „The production of secretory leukocyte protease inhibitor by dendritic cells.“ *Molecular Immunology* 48.4, S. 630–636.
- Wahl A. F. und Wallace P. M.** (2001). „Oncostatin M in the anti-inflammatory response.“ *Annals of the Rheumatic Diseases* 60 Suppl 3, S. iii75–80.

- Wallace P. M. et al.** (1999). „Regulation of inflammatory responses by oncostatin M.“ *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 162.9, S. 5547–55.
- Weldon S. und Taggart C. C.** (2007). „Innate host defense functions of secretory leucoprotease inhibitor.“ en. *Experimental Lung Research* 33.10, S. 485–91.
- Winkelmann A. et al.** (2007). „Cognitive impairment in multiple sclerosis.“ *Journal of Neurology* 254 Suppl.2007, S. II35–42.
- Wize J et al.** (1998). „Ligation of selectin L and integrin CD11b/CD18 (Mac-1) induces release of gelatinase B (MMP-9) from human neutrophils.“ *Inflammation Research* 47.8, S. 325–7.
- Wujek J. R. et al.** (2002). „Axon loss in the spinal cord determines permanent neurological disability in an animal model of multiple sclerosis.“ *Journal of Neuro pathology and Experimental Neurology* 61.1, S. 23–32.
- Wynn D. et al.** (2010). „Daclizumab in active relapsing multiple sclerosis (CHOICE study): a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, add-on trial with interferon beta.“ *The Lancet Neurology* 9.4, S. 381–90.
- Xu J et al.** (1998). „Methylprednisolone inhibition of TNF-alpha expression and NF-kB activation after spinal cord injury in rats.“ *Molecular Brain Research* 59.2, S. 135–42.
- Yushchenko M. et al.** (2000). „Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human cerebrospinal fluid (CSF): elevated levels are primarily related to CSF cell count.“ *Journal of Neuroimmunology* 110.1-2, S. 244–51.
- Zhang Y et al.** (1997). „Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the production of monocyte prostaglandin H synthase-2, prostaglandin E2, and matrix metalloproteinases.“ *Journal of Clinical Investigation* 99.5, S. 894–900.
- Zipp F et al.** (2000). „Dual effect of glucocorticoids on apoptosis of human autoreactive and foreign antigen-specific T cells.“ *Journal of Neuroimmunology* 110.1-2, S. 214–22.

## 7 Danksagung

Ich möchte mich hiermit besonders herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. F. Weber für die engagierte Betreuung, Förderung und stets tatkräftige Unterstützung bedanken.

Ebenfalls großen Dank möchte ich meinem Betreuer Dr. Hans Faber aussprechen für seine sorgfältige Einführung in die Laborarbeit und die Heranführung an wissenschaftliches Arbeiten.

Desweiteren bedanke ich mich bei Herrn Joachim Hornung und Frau Barbara Nehls für die Unterstützung und nette Arbeitsatmosphäre im Labor.

Herrn Dr. Alexander Yassouridis möchte ich für die statistische Überprüfung unserer Daten danken, Herrn Dr. P. Weber für die Durchführung und Herrn Dr. Benno Pütz für die statistische Auswertung des Microarrays.

Abschließend möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. F. Holsboer für die gute Infrastruktur und die angenehme Arbeitsatmosphäre am Max-Planck-Institut für Psychiatrie bedanken.

## 8 Erklärung an Eides Statt

Hahn, Franziska K.

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

*Induktion des Proteinaseinhibitors SLPI und weiterer funktionell verknüpfter Gene durch eine Kortisonstoßtherapie bei Patienten mit Multipler Sklerose*

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.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand