

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Neurodegenerative Prozesse als therapeutisches Target  
bei Multipler Sklerose

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Antonia Janssen  
aus Hadamar

Datum der Promotion: 25. Juni 2017

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>3</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>4</b>
Abstrakt (deutsch) .....	4
Abstrakt (englisch) .....	5
1. Einleitung .....	6
2. Zielstellung .....	9
3. Methodik .....	10
4. Ergebnisse .....	13
5. Diskussion .....	17
Literaturverzeichnis .....	21
<b>Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>24</b>
<b>Anteilerklärung</b> .....	<b>25</b>
<b>Ausgewählte Publikationen</b> .....	<b>26</b>
1. Characterization of natural killer cells in paired CSF and blood samples during neuroinflammation.....	26
2. The antioxidant idebenone fails to prevent or attenuate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse .....	31
3. Treatment of Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis with Epigallocatechin-3-Gallate and Glatiramer Acetate Alters Expression of Heme-Oxygenase-1 .....	37
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>54</b>
<b>Komplette Publikationsliste</b> .....	<b>55</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>56</b>

## Abkürzungsverzeichnis

BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CFA	Complete Freund's Adjuvant, komplettes Freund-Adjuvans
CFSE	Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
CIS	Klinisch isoliertes Syndrom
CSF	Cerebrospinal Fluid, Liquor cerebrospinalis
C <sub>T</sub>	Cycle Threshold, Schwellenwert-Zyklus
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EGCG	Epigallocatechingallat
FCS	Fetal Calf Serum, Fetales Kälberserum
GA	Glatirameracetat
H&E	Hämatoxylin-Eosin Färbung
HO-1	Hämoxygenase-1
IND	Inflammatory neurological diseases
INF- $\beta$	Interferon- $\beta$
LFB	Luxol-Fast-Blue-Färbung
LHON	Lebersche hereditäre Optikusneuropathie
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
NGF	Nerve growth factor
NIND	Non-inflammatory neurological diseases
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NT-3	Neurotrophin-3
NT-4	Neurotrophin-4
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PLP	Proteolipid-Protein
PPMS	„primary progressive“ MS
PRMS	„progressive-relapsing“ MS
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RRMS	„relapsing-remitting“ MS
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SPMS	„secondary progressive“ MS
ZBF	Zink-basierte Fixationslösung
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Abstrakt

Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch inflammatorische ZNS-Erkrankung, bei der neben Demyelinisierung, axonale und neuronale Schädigung für das Ausmaß der Erkrankung maßgebend sind. Oxidativer Stress, mitochondriale Dysfunktion und Dysregulation des Eisenstoffwechsels scheinen als Bindeglied zwischen entzündlichen und neurodegenerativen Prozessen zu fungieren. Antiinflammatorische oder immunmodulatorischen Therapieansätze zeigen kaum einen klinischen Nutzen bei chronisch progredienten Erkrankungsverläufen.

Zur Entwicklung neuer Therapieoptionen ist ein besseres Verständnis der Ätiopathogenese und der pathogenetischen Rolle verschiedener Immunzellpopulationen unabdingbar. In meiner Arbeit habe ich zur Charakterisierung von Natürlichen Killer-(NK)-Zellen im Liquor von MS-Patienten und Patienten mit anderen inflammatorischen und nicht-inflammatorischen neurologischen Erkrankungen beigetragen. Wir konnten zeigen, dass NK-Zellen im Liquor von Patienten mit neuroinflammatorischen Erkrankungen einen unreifen Phänotyp aufweisen, der im Kontrast zu den ausdifferenzierten NK-Zellen des Blutes steht, was auf eine selektive Rekrutierung unreifer NK-Zellen in den Liquor hindeutet.

Das Hauptaugenmerk meiner Arbeit lag auf der Entwicklung neuer Therapiestrategien für die Behandlung progredienter MS-Verlaufsformen in Hinblick auf oxidativen Stress als begünstigenden Mechanismus der Neurodegeneration. Die antioxidative Substanz Idebenon, welche sich bei Erkrankungen, die primär durch eine mitochondriale Dysfunktion gekennzeichnet sind, als wirksam erwiesen hat, verfehlte im Mausmodell der progredienten MS, der chronisch experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) jeglichen therapeutischen Effekt.

Vielversprechender war die Untersuchung der Kombinationstherapie von Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) und der immunmodulatorischen Substanz Glatirameracetat (GA) bei chronischer EAE. Grundlage waren vorausgegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, welche synergistische neuroprotektive Wirkungen von EGCG und GA bei schubförmig verlaufender EAE nachgewiesen haben. In einem therapeutischen Behandlungsansatz wurde EGCG täglich mittels oraler Gavage verabreicht. Die Injektion einer suboptimalen GA-Dosierung erfolgte einmalig subkutan. Überraschenderweise verfehlte die Kombinationstherapie jeglichen therapeutischen Effekt. GA und EGCG in Monotherapie verringerten jedoch signifikant die Anzahl entzündlicher ZNS-Infiltrate. Allein EGCG konnte vor Demyelinisierung und axonaler Schädigung schützen. Die zusätzliche Verabreichung von GA hingegen neutralisierte diese Effekte. Als mögliche Inter-

aktionsebene untersuchten wir die Proliferation enzephalitogener T-Zellen, die Beeinflussung anti- und proinflammatorischer Parameter, die durch EGCG-vermittelte Eisenkomplexierung sowie die Expression neurotropher Faktoren. Interessanterweise führte GA in Kombination mit EGCG zu einer gesteigerten Expression des durch oxidativen Stress und inflammatorische Stimuli induzierbaren Enzyms Hämoxxygenase-1 (HO-1), wohingegen EGCG diese reduzierte. Die neuroprotektive Wirkung von EGCG scheint vornehmlich auf einer Beeinflussung oxidativer Prozesse zu beruhen. Es bleibt unklar, ob die Hochregulation der HO-1 einen entscheidenden Beitrag zur Krankheitsentwicklung leistet. Ein besseres Verständnis des Redox-Gleichgewichts ist zwingend erforderlich für die Entwicklung neuer Therapieoptionen bei progredienter MS.

### **Abstract (Englisch)**

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS), in which axonal and neuronal damage appear to be responsible for increasing clinical disability. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and dysregulation in iron metabolism seem to link inflammatory and neurodegenerative processes. Anti-inflammatory or immunomodulatory therapeutic agents show minimal benefit in preventing disease progression. A better understanding of disease etiopathogenesis and immunology is indispensable to develop new therapeutic options. I have contributed to the characterization of natural killer (NK) cells in the CSF of patients with MS and other neuroinflammatory or non-inflammatory neurological diseases. In contrast to blood, NK cells in the CSF display an immature phenotype during neuroinflammation, suggesting a selective recruitment of immature NK cells from the periphery into the CSF.

The main focus of this work was to examine the therapeutic potential of novel oxidative stress-targeting drugs on neurodegenerative processes in the mouse model of progressive MS. The antioxidant agent idebenone, which shows beneficial effects in disorders caused by mitochondrial alterations, failed to show therapeutic efficacy in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). A more promising strategy was the combination of another antioxidant agent, epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and the immunomodulatory agent glatiramer acetate (GA) in chronic EAE. Basis for this approach was previous investigations from our group, which showed synergistic neuroprotective effects of the combination in relapsing-remitting EAE. Using a therapeutic treatment strategy, EGCG was administered daily by oral gavage. A suboptimal GA dose was injected once. Unexpectedly, the combined therapy of GA+EGCG did

not improve EAE. However, GA and EGCG single treatments led to significant reductions of spinal cord inflammation. While treatment with EGCG alone preserved axons and myelin from damage, the neuroprotective effects of EGCG were abolished when GA was applied in combination. To investigate mechanisms of druginterference, we examined the encephalitogenic T cell re-sponse, anti- and proinflammatory parameters, the iron chelator activity of EGCG and the expression of neurotrophic factors. Interestingly, EGCG induced a downregulation of the gene expression of the stress-inducible enzyme heme oxygenase-1 (HO-1), while the combination of GA +EGCG led to increased HO-1 expression. Altogether, our data indicate that neuroprotection by EGCG in chronic EAE involve regulation of oxidative processes. It remains unclear, whether upregulation of HO-1 may contribute to disease progression. Further investigations of the redox balance are warranted to design novel treatment strategies for progressive MS.

## **1. Einleitung**

Multiple Sklerose (MS) ist eine immunvermittelte chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die als eine der häufigsten neurologischen Krankheiten im jungen Erwachsenenalter nicht selten zu bleibender Behinderung und frühzeitiger Berentung führt [1]. Die Ätiopathogenese der MS ist bis heute nicht vollständig verstanden, jedoch scheint die Reaktion ZNS-spezifischer autoreaktiver T-Zellen für einen Zustand chronischer Inflammation verantwortlich zu sein, der nicht nur eine Schädigung von Myelin und Oligodendrozyten verursacht, sondern auch frühzeitig axonale und neuronale Schäden bedingt, die vor allem mit der Schwere der Erkrankung korrelieren [2]. Als erste Krankheitsmanifestation tritt häufig das sog. klinisch isolierte Syndrom (CIS) auf, welches typische Frühsymptome einer demyelinierenden Erkrankung zeigt, jedoch noch nicht die Diagnosekriterien der zeitlichen Dissemination nach McDonald erfüllt [3]. Kommt es im Verlauf zu weiteren Schüben mit zwischenzeitlich vollständiger oder unvollständiger Rückbildung der Symptome (Remission), spricht man von schubförmig remittierender MS („relapsing-remitting“ MS, RRMS). Diese stellt mit bis zu 85% die häufigste klinische Erscheinungsform der MS dar. Bei einem Großteil der Erkrankten kommt es innerhalb von 10 - 25 Jahren zu einer sekundären Progredienz („secondary progressive“ MS, SPMS), d.h. zu einer schleichenden Zunahme klinischer Symptome und neurologischer Beeinträchtigungen. Eine von Beginn an fortschreitende Krankheitsverschlechterung tritt in ca. 15 % der Fälle auf, kann mit oder ohne Schübe verlaufen und umfasst die primär progrediente („pri-

mary progressive“ MS, PPMS) sowie die schubförmig progrediente („progressive-relapsing“ MS, PRMS) Verlaufsform [1].

Es wird immer wieder diskutiert, ob MS eine in sich geschlossene Krankheitsentität darstellt oder ob sich hinter der uneinheitlichen Klinik, der höchstwahrscheinlich verschiedene Pathomechanismen zu Grunde liegen, verschiedene Erkrankungen verbergen [4]. Diese Heterogenität und Komplexität der MS erfordert die Entwicklung von Modellen, die spezifische Aspekte der histopathologischen und neurobiologischen Besonderheiten darstellen und durch ein verbessertes Verständnis pathogenetischer Mechanismen neue Therapiestrategien ermöglichen [4]. Somit kommt auch der Frage nach der pathogenetischen Rolle verschiedener Immunzellpopulationen eine immer größere Bedeutung zu. In den letzten Jahren rückten Natürliche Killer-(NK)-Zellen und deren Funktion in der Regulation immunologischer Prozesse zunehmend in den Fokus der Aufmerksamkeit. NK-Zellen sind ein Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Wie der Name impliziert, reagieren NK-Zellen ohne vorherigen Antigenkontakt zytotoxisch auf transformierte oder viral infizierte Zellen. Sie sind jedoch nicht nur reine „Killer“, sondern besitzen auch regulatorische Funktionen, die sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem beeinflussen [5]. Genmutationen, die einen Defekt der NK-Zellen verursachen, haben neben Immundefizienz und Infektanfälligkeit eine Empfänglichkeit für Autoimmunerkrankungen zur Folge [6]. Bei Patienten mit MS ist neben der Anzahl zirkulierender NK-Zellen auch die funktionale Aktivität zu Beginn klinischer Schübe reduziert, wohingegen es in der Remissionsphase zu einer Normalisierung kommt - Erkenntnisse, die auf eine protektive Funktion der NK-Zellen hinweisen [7]. Gegensätzlich zu diesen Ergebnissen gibt es Untersuchungen, die von einer Beteiligung der NK-Zellen an neurotoxischen Prozessen berichten [8]. Auch wurden schädliche Einflüsse von NK-Zellen bei MS beschrieben [9]. Es ist zu untersuchen, ob diese widersprüchlichen Beobachtungen von ein und demselben Zelltyp verursacht werden, oder ob unterschiedliche Subtypen existieren, die in der Erklärung dieser Unstimmigkeit von Bedeutung sind [10]. Vorausgehende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die Expression des Chemokinrezeptors CX3CR1 den Zellreifungsgrad der NK-Zellen widerspiegelt und dass unreife CX3CR1<sup>-</sup> Zellen sich bezüglich ihres zytotoxischen Potenzials und Zytokinprofils von reifen CX3CR1<sup>+</sup> NK-Zellen unterscheiden [11]. Des Weiteren korrelierte die Krankheitsaktivität bei RRMS-Patienten mit der Frequenz von CX3CR1<sup>+</sup> NK-Zellen im Blut [12]. Der therapeutische Erfolg immunmodulatorischer Substanzen wie Daclizumab oder

INF- $\beta$  wird mit einer gesteigerten Frequenz unreifer NK-Zellen assoziiert [13]. Arbeiten unserer Gruppe hingegen zeigten, dass ein Therapieansprechen auf Mitoxantron, welches zur Behandlung der SPMS zugelassen ist, auf einer Reifung von NK-Zellen beruht [14]. Diese Zusammenhänge und die Rolle der NK-Zellen und ihrer Subtypen bei neuroinflammatorischen Erkrankungen bleiben zum aktuellen Zeitpunkt unklar. Weitere Untersuchungen sind somit zwingend erforderlich.

Im Gegensatz zur schubförmig verlaufenden MS werden bei der progredienten Form der Erkrankung nicht entzündliche, sondern vor allem neurodegenerative Prozesse für die stetige Zunahme der körperlichen Beeinträchtigung verantwortlich gemacht [15]. Oxidativer Stress, mitochondriale Dysfunktion und Dysregulation des Eisenstoffwechsels scheinen dabei als Bindeglied zwischen Entzündung und axonaler Neurodegeneration zu fungieren [16]. Gegenwärtige Therapieansätze und Neuentwicklungen in der MS-Therapie beruhen jedoch hauptsächlich auf antiinflammatorischen oder immunmodulatorischen Effekten. Sie zeigen kaum einen klinischen Nutzen, das Fortschreiten neurologischer Defizite bei chronisch progredienten Erkrankungsverläufen aufzuhalten. Wirksame therapeutische Optionen für SPMS oder PPMS existieren bis dato nicht. Somit ist ein vielversprechender Ansatzpunkt in der Entwicklung neuer therapeutischer Möglichkeiten die Untersuchung von Substanzen wie Idebenon oder Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG), die über das Potenzial verfügen, oxidativem Stress und Neurodegeneration entgegenzuwirken.

Idebenon ist ein synthetisches Analogon des Coenzym Q10, welches an der mitochondrialen Innenmembran lokalisiert als Bestandteil der Atmungskette am Elektronentransfer dieser beteiligt ist [17]. Idebenon besitzt die Fähigkeit, den Elektronenfluss in geschädigten Mitochondrien und somit die zelluläre Energieversorgung wiederherzustellen [17, 18]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die protektive Anwendung von Idebenon retinale Zellen effektiv vor oxidativem Stress schützt [19]. In Anbetracht dessen wurde die Hypothese erstellt, dass die Behandlung mit einem Antioxidans wie Idebenon einen positiven Effekt im Tiermodell der chronischen Neuroinflammation zeigen würde [20].

EGCG, ein Polyphenol gewonnen aus grünem Tee, weist als Eisenchelatbildner neben antiapoptischen Eigenschaften die Fähigkeit auf, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu unterbinden und somit vor neuronaler Schädigung zu schützen [21]. Im Tiermodell der RRMS, der schubförmig verlaufenden experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) konnte

EGCG die Schwere der klinischen Symptomatik abmildern, in dem es nicht nur die Entzündungsaktivität im Gehirn, sondern auch neuronale Schäden reduzierte [22]. Jüngere Untersuchungen von Wang et al. erbrachten den Nachweis, dass EGCG bei chronischer EAE das Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen T-Zell-Phänotypen zugunsten eines neuroprotektiven Effektes veränderte [23].

Hier wurde EGCG als „Add-on“-Therapie zu Glatirameracetat (GA), einem anerkannten, immunmodulatorischen MS-Basistherapeutikum eingesetzt. Die Therapie mit diesem Polypeptid induziert spezifische GA-reaktive TH2-Zellen, die die Fähigkeit besitzen, im ZNS zu akkumulieren und neben antiinflammatorische Zytokinen auch neurotrophe Faktoren zu sezernieren. Die Kombination zweier Substanzen, die sich möglicherweise durch unterschiedliche therapeutische Angriffspunkte ergänzen und somit einen zusätzlichen Nutzen bringen, kann sich im Vergleich zu Monotherapien als vorteilhaft erweisen [24]. Grundlage meiner Arbeit waren vorausgegangene Untersuchungen unserer Gruppe, die im Mausmodell der RRMS synergistische therapeutische Effekte der Kombinationstherapie von EGCG und GA nachgewiesen haben [24]. Die Kombination beider Substanzen reduzierte dabei nicht nur signifikant die Schwere der Erkrankung und verzögerte den Ausbruch der Krankheitssymptome, sondern zeigte auch in vitro und ex vivo Untersuchungen eine sich verstärkende neuroprotektive und neuroregenerative Wirkung. In Zusammenschau dieser vielversprechenden Erkenntnisse wurde postuliert, dass aufgrund der Eigenschaften von EGCG und GA die Kombinationstherapie beider Komponenten bei etablierter chronischer EAE ebenfalls einen synergistischen Effekt bezüglich des neuroprotektiven und neuroregenerativen Potenzials zeigen würde.

## **2. Zielstellung**

Im Rahmen dieser Arbeit habe ich mich mit der Ätiopathogenese und Therapie der MS beschäftigt. Schwerpunkt meiner Untersuchungen waren dabei neurodegenerative Prozesse, welche vor allem bei progredienten Verlaufsformen der Erkrankung eine Rolle spielen. In Anbetracht oben genannter Erkenntnisse waren die Ziele meiner Arbeit:

- die Charakterisierung von NK-Zellen im Liquor von MS-Patienten und Patienten mit anderen inflammatorischen und nicht-inflammatorischen neurologischen Erkrankungen sowie
- die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien in Hinblick auf oxidativen Stress als begünstigenden Mechanismus der Neurodegeneration.

### **3. Methodik**

#### **3.1. Patienten**

Patienten mit klinisch definierter MS (MS, n=22), entzündlichen (IND, n=11) oder nicht entzündlichen neurologischen Erkrankungen (NIND, n=29) wurden an der Cleveland Clinic (Cleveland, Ohio, USA) und der Charité (Universitätsmedizin Berlin) rekrutiert. Die Zuordnung zu den einzelnen Gruppen erfolgte entsprechend der McDonald-Diagnosekriterien von 2005 [3] durch approbierte Humanmediziner. Die Patientengruppen waren vergleichbar in Alter und Geschlecht. Detaillierte Informationen zu demographischen und klinischen Merkmalen der Patienten sind Tabelle 1 - 3 der ausgewählten Publikation auf Seite 27 der Promotionsschrift zu entnehmen [25].

Jedem Patienten wurde zur gleichen Zeit Liquor und Blut entnommen. Diese invasive Diagnostik erfolgte im Rahmen ohnehin notwendiger Untersuchungen, sodass für die Studie keine zusätzliche Punktionen notwendig wurden. Alle Patienten gaben nach angemessener Aufklärung schriftlich Ihre Zustimmung zur Studienteilnahme. Die Studie wurde durch das `Institutional Review Board` der Cleveland Clinic und die Ethikkommission der Charité bewilligt.

#### **3.2. EAE**

Alle Versuche wurden gemäß der Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere durchgeführt und von der Tierversuchskommission des Landesamts für Gesundheit und Soziales Berlin (LAGeSo) genehmigt (Genehmigungsnummer: G 0198/11, Datum der behördlichen Genehmigung: 05.12.2011). Zur Induktion der EAE wurde 250 µg MOG<sub>35-55</sub>-Peptid (Pepceuticals, Leicester, UK) mit komplettem Freund-Adjuvans (Difco, Franklin Lakes, NJ), welches 800 µg Mycobacterium tuberculosis H37Ra enthält, emulgiert und den 8-10 Wochen alten, weiblichen C57BL/6 Mäusen subkutan injiziert. An Tag 0 und 2 nach Immunisierung wurde zusätzlich 200 ng Bordetella Pertussis Toxin (List Biological Laboratories, Campell, CA) intraperitoneal verabreicht. Die Tiere wurden täglich gewogen, auf Krankheitssymptome hin untersucht und anhand folgender Skala beurteilt: 0 = gesund; 1 = Paralyse des Schwanzes; 2 = Parese der Hinterpfoten; 3 = Paralyse der Hinterpfoten; 4 = Paraplegie und Schwäche der Vorderpfoten; 5 = moribund oder tot. Die einzelnen Therapieschemen mit GA, EGCG bzw. Idebenon sind den ausgewählten Publikationen zu entnehmen [20, 26].

### 3.3. Histologie

Die Mäuse wurden anästhesiert und folgend transkardial mit PBS und zinkbasierter Fixationslösung (ZBF) perfundiert. Nachdem Gehirn und Rückenmark entnommen wurden, erfolgte über Nacht eine Kryoprotektion in 15 % und 30 % Sucrose. Das Rückenmark wurde in 8 Querschnittssegmente geteilt in Tissue Tek (Sakura) eingebettet und in mit Hilfe von Trockeneis vorgekühltem Methylbutan schockgefroren. Danach wurden am Kryostat 12 µm dicke Schnitte angefertigt. Zur Darstellung von entzündlichen Infiltraten, Demyelinisierung und axonalen Schäden wurden die Schnitte entsprechend der Standardprotokolle mit Hämatoxylin-Eosin (H&E), Luxol Fast Blue (LFB) und Silberimprägnation nach Bielschowsky angefärbt. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ mit Hilfe eines Lichtmikroskops, indem jedes der acht Segmente in Quadranten unterteilt wurde und der Grad der entzündlichen Aktivität (H&E; 0 = keine Entzündungszeichen; 1 = milde Entzündungsaktivität; 2 = ausgeprägte Entzündungsaktivität), der Demyelinisierung (LFB; 0 = keine Demyelinisierung; 1 = milde Demyelinisierung, 2 = ausgeprägte Demyelinisierung) und des axonalen Schadens (Bielschowsky; 0 = kein axonaler Schaden; 1 = milder axonaler Schaden; 2 = ausgeprägter axonaler Schaden) von 2 unabhängigen Untersuchern verblindet beurteilt wurde. Die Ergebnisse sind dargestellt als prozentualer Anteil pathologisch veränderter Quadranten bezogen auf die Gesamtzahl aller beurteilten Quadranten.

### 3.4. Durchflusszytometrie

#### 3.4.1. Proliferationsanalyse muriner MOG-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Die Proliferation MOG-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde mittels einer Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester-(CFSE)-Verdünnungsanalyse untersucht. An Tag 16, 26 bzw. 62 nach Immunisierung wurden die drainierenden axillären und inguinalen Lymphknoten der Mäuse entnommen und homogenisiert. Nachdem die Lymphknotenzellen ( $1 \times 10^6$ /ml) gewaschen wurden, erfolgte die Resuspension in vorgewärmtem RPMI+1 % Heparin (RH) und Inkubation mit 2.5 µM CFSE (Molecular Probes, Karlsruhe) bei 37 °C für 10 min. Der Färbeprozess wurde durch die Zugabe von FCS-haltigem Kulturmedium gestoppt. Die Zellen wurden in einer 96-well Mikrotiterplatte ( $2 \times 10^5$  Zellen / well) für 72 h in Anwesenheit von 50 µg/ml MOG<sub>35-55</sub> kultiviert. Als Positivkontrolle wurden CFSE-markierte Zellen mit anti-CD3 (3 µg/ml) und anti-CD28 (2.5 µg/ml) (Becton–Dickinson, Heidelberg) stimuliert. Die Auswertung der Zellteilung erfolgte mit dem Durchflusszytometer (FACS Canto) basierend auf einer Färbung mit anti-CD4 Alexa Fluor 647 (Invitrogen, Darmstadt).

### 3.4.2. Intrazelluläre Färbung von Zytokinen und FoxP3 muriner CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Um den Einfluss der verschiedenen Behandlungsansätze auf den Phänotyp infiltrierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen und deren Funktion näher zu untersuchen, wurden an Tag 26 nach 12 Tagen der Behandlung mononukleäre Zellen der Milz ( $2 \times 10^6$  / ml) und des ZNS kultiviert und mit 3 µg/ml anti-CD3 und 2.5 µg/ml anti-CD28 (Becton–Dickinson, Heidelberg) für 4 h bei 37 °C stimuliert. Brefeldin A (1 µ/ml) wurde 2 h vor Inkubationsende hinzugegeben, um die Sekretion der produzierten Zytokine zu verhindern und damit eine Akkumulation dieser in der Zelle zu erreichen. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gegen den FcγIII/II Rezeptor (anti-mouse CD16/CD32; Becton–Dickinson, Heidelberg) geblockt, um unspezifische Bindungsstellen für nachfolgend eingesetzte Antikörper zu blockieren. Die Färbung der Milzzellen erfolgte mit PerCP-markiertem anti-CD4 (Becton–Dickinson, Heidelberg), die der ZNS-Zellen mit Antikörpern gegen CD4 und CD45 (PE Cy7; Becton–Dickinson, Heidelberg) entsprechend der Standardprotokolle. Nach der 24-stündigen Fixation mit Fix/Perm Puffer (eBioscience, Frankfurt) wurden die Zellen zusätzlich mit anti-IL17 PE (Becton–Dickinson, Heidelberg), anti-IFN $\gamma$  eFluor 450 (eBioscience, Frankfurt) und anti-FoxP3 APC (eBioscience, Frankfurt) gefärbt, um den T-Zell-Phänotyp und das Ausmaß der Zytokinproduktion zu bestimmen. Die Analyse erfolgte mit einem FACS Canto Durchflusszytometer.

### 3.4.3. Phänotypbestimmung humaner NK-Zellen und Probandenpopulation

Für die Charakterisierung von NK-Zellen bei Patienten mit MS, entzündlichen oder nicht entzündlichen neurologischen Erkrankungen (s. Methodenteil 3.1) wurde mittels spinaler Lumbalpunktion Liquor gewonnen. Einbezogen in die Untersuchung wurde nur mikroskopisch klarer, blutfreier Liquor. Gleichzeitig zur Liquor- erfolgte auch eine periphere Blutentnahme. Insgesamt wurden 22 Patienten mit Multipler Sklerose, 11 Patienten mit anderen entzündlichen neurologischen Erkrankungen (IND) und 29 Patienten mit nicht entzündlichen neurologischen Erkrankungen (NIND) eingeschlossen. Die Blut-Liquor-Probenpaare einer ersten Kohorte (16 MS Patienten, 8 IND Patienten und 29 NIND Patienten) wurden mit PE-markierten anti-CD56 und anti-CD16 sowie FITC-markierten anti-CD3 Antikörpern (Becton–Dickinson, Heidelberg) gefärbt, die einer zweiten Kohorte (6 MS Patienten und 3 IND Patienten) mit anti-CD3 PerCP, anti-CD16 Pacific Blue (Becton–Dickinson, Heidelberg), anti-CD56 FITC und biotinyliertem anti-CD27 (eBioscience, San Diego, CA), anti-CX3CR1 PE (Nagoya, Japan) und APC-Streptavidin (Becton–Dickinson, Heidelberg).

### **3.5. Quantitative Echtzeit-RT-PCR**

Zur relativen Quantifizierung der Genexpression mittels Echtzeit-PCR wurde die RNA aus zinkbasiert fixiertem Gewebe mit Hilfe von peqGOLD-TriFast Reagenz (Peqlab, Erlangen), welche Guanidiniumthiocyanat enthält, entsprechend der Herstellerhinweise isoliert. Es erfolgte die reverse Transkription und die Durchführung der quantitativen PCR mit Hilfe des ABI Prism 7000 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, Darmstadt). Die Primer und Sonden wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Also endogene Referenz diente 18s rRNA. Die Menge des Ziel- und Referenzgens wurde über cDNA-Verdünnungsreihen ermittelt. Die Werte des Schwellenwert-Zyklus (CT) wurden mittels Standardkurve in frei wählbare Einheiten (arbitrary units, AU) umgewandelt. Die Ergebnisse sind als Verhältnis der Expression des Zielgens zum Referenzgen dimensionslos dargestellt.

### **3.6. Statistik**

Die EAE Krankheitsverläufe, Ergebnisse der Histologieauswertungen und die kumulative Krankheitsaktivität wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem Dunns-post-hoc-Test oder dem Mann-Whitney-U-Test ausgewertet. Weitere Daten wurden mittels T-Test oder ANOVA analysiert. P-Werte  $< 0.05$  wurden als signifikant betrachtet. Die Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism Version 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Charakterisierung von NK-Zellen im Liquor von MS-Patienten und Patienten mit anderen inflammatorischen und nicht-inflammatorischen neurologischen Erkrankungen**

#### **4.1.1. Die Anzahl der NK-Zellen ist im Liquor von MS-Patienten erniedrigt**

Die Rolle von NK-Zellen bei chronischer Neuroinflammation ist bis dato nicht eindeutig geklärt. Um diese näher zu charakterisieren, wurde die Zellfrequenz und der Phänotyp der NK-Zellen von Patienten mit MS, entzündlichen oder nicht entzündlichen neurologischen Erkrankungen in Liquor und Blut analysiert. Die Anzahl der NK-Zellen (CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>) zeigte sich dabei im Liquor von MS-Patienten im Vergleich zu Patienten mit nicht entzündlichen neurologischen Erkrankungen signifikant reduziert. Entsprechend war der Liquor-/Blutquotient der NK-Zellen bei MS-Patienten (1 : 8,5) gegenüber den berechneten Quotienten in den Patientengruppen der entzündlichen (1 : 6) oder nicht entzündlichen (1 : 4) neurologischen Erkrankungen deutlich verringert. Im Blut hingegen konnten keine Unterschiede innerhalb der verschiede-

nen Krankheits-kategorien festgestellt werden. Interessanterweise war unabhängig von der Patientengruppe insgesamt die Frequenz der NK-Zellen im Liquor niedriger als im Blut.

#### 4.1.2. Der Phänotyp der NK-Zellen von Patienten mit neuroinflammatorischen Erkrankungen unterscheidet sich in Liquor und Blut

Um den Phänotyp der in den Liquor einwandernden NK-Zellen näher zu charakterisieren, erfolgte eine Analyse der Subgruppen der NK-Zellen anhand der Expression der Oberflächenmarker CD56 und CD16. Der Status der Zellreifung wurde mittels Expression von CD27 und CX3CR1 bestimmt [11]. Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil unreifer NK-Zellen (45 % CD56<sup>bright</sup> CD27<sup>+</sup> bzw. 65 % CD56<sup>bright</sup> CX3CR1<sup>-</sup>) im Liquor deutlich erhöht war, wohingegen im Blut der Anteil nur sehr gering ausfiel (3,5 % CD56<sup>bright</sup> CD27<sup>+</sup> bzw. 4% CD56<sup>bright</sup> CX3CR1<sup>-</sup>). Demnach scheinen bei Patienten mit entzündlichen neurologischen Erkrankungen die NK-Zellen des Liquors im Gegensatz zu den reifen NK-Zellen des Blutes einem eher unreifen Phänotyp zu entsprechen.

## 4.2. Entwicklung neuer therapeutischer Strategien in Hinblick auf oxidativen Stress als begünstigenden Mechanismus der Neurodegeneration

### 4.2.1. Bei chronischer EAE verfehlt die antioxidative Substanz Idebenon neuroprotektive Effekte

Es wurde die Wirksamkeit der antioxidativen Substanz Idebenon im chronischen EAE-Modell untersucht. Idebenon konnte dabei in einem präventiven Therapieansatz jedoch weder die Inzidenz beeinflussen noch den Ausbruch der Erkrankung verzögern. Auch eine therapeutische Behandlungsstrategie zeigte keinerlei Erfolg. Eine Abschwächung klinischer Symptome konnte nicht nachgewiesen werden [20]. Um subklinische Effekte zu evaluieren, wurden analog zu den histopathologischen Untersuchungen in dem GA und EGCG-Projekt Analysen des Rückenmarks der mit Idebenon behandelten Mäuse durchgeführt [26]. Idebenon konnte keine Verbesserung der Entzündungsaktivität, des Demyelinisierungsgrads oder der axonalen Schädigung im Vergleich zur Kontrollgruppe bewirken. Um auszuschließen, dass die mangelnden Effekte auf einer unzureichenden Dosierung oder Verteilung im Organismus beruhten, wurde der Wirkstoffspiegels in Blut und Liquor der mit Idebenon behandelten Mäuse bestimmt. Idebenon konnte in einer ausreichenden Konzentration in Blut und Liquor nachgewiesen und somit eine mangelnde Wirkstoffdistribution oder -absorption als Grund für das Fehlen der neuroprotektiven Wirkung bei chronischer EAE von Idebenon ausgeschlossen werden.

#### 4.2.2. EGCG und GA als Monotherapie erweisen sich bei chronischer EAE als wirksam, wohingegen die Kombinationstherapie versagt

Hauptziel dieser Arbeit war es, die Kombinationstherapie von EGCG und GA hinblickend auf mögliche synergistische, neuroprotektive Effekte bei etablierter chronischer EAE zu prüfen. Eine Wirksamkeit von GA bei chronischer EAE wurde mehrfach beschrieben [27, 28]. Um einen möglichen synergistischen Effekt der Kombinationstherapie durch den therapeutischen Effekt von GA nicht zu verschleiern, wurde GA in einer suboptimalen Dosierung verwendet. C57BL/6 Mäuse der mit Vehikel therapierten Kontrollgruppe entwickelten wie zu erwarten einen chronischen Krankheitsverlauf, der sich ca. 20 Tage nach der Immunisierung mit MOG auf einem konstanten Niveau stabilisierte. Sowohl GA als auch EGCG in Monotherapie hatten auf diesen einen positiven Effekt, indem sie die Krankheitssymptome abmilderten. Da GA in einer suboptimalen Dosis lediglich einmalig angewendet wurde, waren diese Auswirkungen jedoch nur vorübergehend, und die Mäuse erreichten etwa 10 Tagen nach der GA-Injektion einen vergleichbar schlechten klinischen Score zur Kontrollgruppe. Die ausschließlich mit EGCG behandelten Mäuse konnten hingegen eine anhaltende Verbesserung der klinischen Symptomatik aufweisen. Gegensätzlich zu unseren Erwartungen ließ nun gerade die Kombinationstherapie von GA und EGCG keinerlei synergistische Therapieeffekte erkennen.

Um die möglichen Mechanismen der Interaktion von GA mit EGCG näher zu untersuchen, wurde der Einfluss der verschiedenen Therapiestrategien auf die MOG-abhängige enzephalitogene T-Zellantwort *ex vivo* untersucht. Dazu wurden an Tag 10, 26 bzw. 60 nach Immunisierung Zellen aus den Lymphknoten der verschiedenen Versuchsgruppen isoliert und eine CFSE-basierte Proliferationsanalyse mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Lediglich an Tag 26 nach Induktion der EAE zeigten periphere CD4<sup>+</sup> T-Zellen der mit GA und EGCG behandelten Mäuse eine geringfügig gesteigerte Proliferation nach Stimulation mit MOG. Der Unterschied war jedoch im Vergleich zu der Antwort in der nur mit EGCG behandelten Gruppe nicht signifikant. Daraus konnte gefolgert werden, dass die Minderung des Therapieeffektes von EGCG durch GA nicht auf Ebene der Proliferation enzephalitogener T-Zellen erklärt werden kann.

#### 4.2.3. Die zusätzliche Verabreichung von GA neutralisiert die neuroprotektiven Effekte von EGCG bei chronischer EAE

Um die Wechselwirkungen beider Substanzen bei chronischer EAE weiter zu eruieren, wurden histopathologische Analysen des Rückenmarks der behandelten Mäuse bezüglich des Entzündungsgrades (Hämatoxylin-Eosin Färbung; H&E), der Demyelinisierung (Luxol Fast Blue Färbung; LFB) und der axonalen Schädigung (Silberimprägnation nach Bielschowsky) durchgeführt. Sowohl GA als auch EGCG in Monotherapie konnten die Entzündungsaktivität im ZNS signifikant reduzieren, wohingegen die mit der Kombination beider Substanzen therapierte Gruppe keinerlei Verbesserung hinsichtlich des Entzündungsausmaßes gegenüber der Kontrollgruppe aufweisen konnte. Neuroprotektive Effekte zeigte allerdings nur EGCG im chronischen EAE-Modell. So konnte EGCG signifikant vor Demyelinisierung und axonaler Schädigung schützen, während GA in suboptimaler Dosierung diese nicht beeinflusste. Erstaunlicherweise wurde durch die zusätzliche Verabreichung von GA die durch EGCG-vermittelte neuroprotektive Wirkung aufgehoben.

#### 4.2.4. GA beeinflusst weder die antiinflammatorischen Effekte von EGCG in vivo noch dessen Funktion als Eisenchelatbildner

Da berichtet wurde, dass EGCG Auswirkungen auf die Differenzierung von T-Zellen in MOG-induzierter EAE habe [23], wurde folglich der Phänotyp infiltrierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den verschiedenen Behandlungsgruppen untersucht. Der Anteil regulatorischer Foxp3<sup>+</sup>-T-Zellen sowie IFN $\gamma$ - oder IL17-produzierender T-Zellen im ZNS differierte jedoch nicht in den mit EGCG oder EGCG und GA behandelten Mäusen. Auch auf der Ebene der Genexpression der proinflammatorischen Zytokine IFN $\gamma$  und IL17 und deren entsprechenden Transkriptionsfaktoren T-bet und ROR $\gamma$ T konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Somit scheint eine Interferenz von GA und EGCG auf der Ebene (anti)-inflammatorischer Parameter nicht ursächlich für die beobachteten Effekte.

Es gibt zunehmend mehr Hinweise, dass oxidativer Stress und ein dysregulierter Eisenstoffwechsel zu neuronalen Schäden führen. EGCG ist in der Lage, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zu unterbinden, indem es als Eisenchelatbildner die frei verfügbare Menge von Eisenionen reduziert [29]. GA könnte mithin auf die Komplexbildung von Eisen durch EGCG Einfluss nehmen. Folgend wurde die lösliche Eisenkonzentration im Blutserum der verschiedenen Versuchsgruppen mittels eines Ferrozin-basierten Analyseverfahrens quantifiziert. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede in den mit EGCG oder EGCG und GA behandelten Gruppen.

#### 4.2.5. Die Expression neurotropher Faktoren bleibt unbeeinflusst

Ein möglicher neuroprotektiver Mechanismus, der durch EGCG vermittelt wird, ist die Verstärkung der Expression von Nervenwachstumsfaktoren wie BDNF oder NGF [30]. Folglich wurde überprüft ob GA diese Eigenschaft von EGCG beeinträchtigt, indem die Genexpression von BDNF, NGF, NT-3 und NT-4 im ZNS der mit EGCG oder EGCG und GA behandelten Mäusen mittels quantitativer PCR analysiert wurde. Im chronischen EAE-Modell konnten jedoch keine Unterschiede in der Expression neurotropher Faktoren zwischen den verschiedenen Therapiegruppen festgestellt werden.

4.2.6. Die gemeinsame Anwendung von EGCG und GA verursacht eine gesteigerte Expression der Hämoxygenase-1 (HO-1), wohingegen EGCG in Monotherapie zu einer Reduktion dieser führt

Die Hämoxygenase-1 (HO-1) ist ein Hitzeschockprotein, das durch oxidativen Stress induziert wird, Häm zu dem antioxidativ wirksamen Biliverdin, Kohlenstoffmonoxid und Eisen verstoffwechselt und somit möglicherweise Teil eines Mechanismus ist, der vor freien Radikalen schützt. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der HO-1 bei EAE und MS gesteigert ist [31, 32] sowie durch EGCG *in vitro* beeinflusst wird [33]. Die Auswirkungen der verschiedenen Therapiestrategien auf die Genexpression der HO-1 wäre eine mögliche Ebene, auf welcher GA mit den neuroprotektiven Effekten von EGCG interagiert. Untersucht wurde dies mittels quantitativer PCR im ZNS der mit EGCG oder EGCG und GA behandelten Mäuse. Gegensätzlich zu den erwarteten Ergebnissen führte die Verabreichung von GA in Kombination mit EGCG im Vergleich zur Monotherapie mit EGCG zu einer gesteigerten HO-1-Expression in der posterioren Hirnregion einschließlich Kleinhirn und Hirnstamm sowie im Rückenmark der Mäuse. Im Vergleich zu der mit Vehikel behandelten Kontrollgruppe reduzierte EGCG hingegen die Expression der HO-1. Diese Ergebnisse waren insofern überraschend, da angenommen wird, dass EGCG seine antioxidativen Eigenschaften über eine Steigerung der HO-1-Expression vermittelt [33].

## **5. Diskussion**

Ein Aspekt meiner Arbeit befasste sich mit NK-Zellen und deren Rolle bei neuroinflammatorischen Prozessen. Bis dato ist nicht geklärt, ob ins ZNS einwandernde NK-Zellen Übereinstimmungen mit den NK-Zellen im Blut erkennen lassen. Wenige Erkenntnisse existieren auch zur Migration der NK-Zellen ins ZNS. Um sich einer Antwort auf diese Fragestellungen zu nähern, erfolgte eine Charakterisierung der NK-Zellen von Patienten mit MS, entzündlichen oder nicht entzündlichen neurologischen Erkrankungen. Untersucht wurde dazu vergleichend in

Liquor und Blut das Vorkommen und der Phänotyp der NK-Zellen mittels Durchflusszytometrie [25]. Unabhängig von der Patientengruppe konnte gezeigt werden, dass die Frequenz der NK-Zellen im Liquor signifikant vermindert war [25]. Der Verhältnisquotient zwischen Liquor und Blut war dabei vor allem in der MS-Gruppe reduziert, welches im Einklang mit der beschriebenen Defizienz der NK-Zellen bei MS-Patienten steht [12]. Zudem fielen die NK-Zellen im Liquor von Patienten mit neuroinflammatorischen Erkrankungen durch einen eher unreifen Phänotyp auf, der im Kontrast zu den ausdifferenzierten NK-Zellen des Blutes steht [25]. Es findet anscheinend vorzugsweise eine Rekrutierung unreifer CX3CR1<sup>-</sup> NK-Zellen in den Liquor cerebrospinalis dieser Patienten statt. Unreife CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimieren die Homing-Rezeptoren CD62L und CCR7 [34], die auch bei der Migration zentraler T-Gedächtniszellen in den Liquor von MS-Patienten beteiligt sind [35]. CCR7<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen scheinen im Subarachnoidalraum mit Antigen-präsentierenden Zellen zu interagieren, zu CCR7<sup>-</sup> Effektor-T-Gedächtniszellen weiterzudifferenzieren und damit die Fähigkeit zu erlangen, in das ZNS-Parenchym einzuwandern [36]. Induziert man die EAE bei CX3CR1-defizienten Mäusen, so ist der Krankheitsverlauf schwerer und die Infiltration der NK-Zellen ins ZNS reduziert [37]. Man könnte demnach spekulieren, dass NK-Zellen zur Reifung ebenfalls im Subarachnoidalraum mit Antigen-präsentierenden Zellen in Kontakt treten und als CCR7<sup>-</sup> CX3CR1<sup>+</sup> Zellen folgend in das ZNS-Gewebe einwandern können [25]. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass der Liquor möglicherweise eine Zwischenstation in der Migration der NK-Zellen bildet und CX3CR1 einen entscheidenden Faktor für die Einwanderung der NK-Zellen ins Parenchym des ZNS darstellt. Auch würde diese Hypothese erklären, warum NK-Zellen CX3CR1-defizienter Mäuse nicht die Fähigkeit besitzen, ins ZNS Gewebe einzuwandern [37].

Multiple Sklerose ist eine Erkrankung des ZNS, bei der ein Zustand chronischer Neuroinflammation neben Demyelinisierung und Schädigung der Oligodendrozyten zu axonaler und neuronaler Schädigung führt, die maßgeblich mit dem Grad neurologischer Funktionsstörungen korreliert [15]. Dabei scheint die mitochondriale Schädigung, mutmaßlich getriggert durch die Produktion reaktiver Sauer- und Stickstoffspezies in eingewanderten Makrophagen und aktivierter Mikroglia, ein zentrales Element der Neurodegeneration darzustellen und frühzeitig, noch vor den ersten Veränderungen der Axonmorphologie, aufzutreten [38]. Therapieansätze, die der Bildung schädlicher reaktiver Verbindungen entgegensteuern, stellen somit eine aussichtsreiche

Option in der Behandlung von Erkrankungen mit mitochondrialer Beteiligung, wie auch bei der MS, dar. Basierend auf diesen Überlegungen wurde die Wirksamkeit der antioxidativen Substanz Idebenon bei chronischer EAE untersucht [20]. In klinischen Studien zur Friedreich-Ataxie sowie zur Leberschen hereditären Optikusneuropathie (LHON) - Erkrankungen, die primär durch eine mitochondriale Dysfunktion gekennzeichnet sind - hat sich Idebenon als wirksam erwiesen [39, 40]. Eine hochdosierte Behandlung von Friedreich-Ataxie-Patienten mit Idebenon resultierte in einer Verbesserung der neurologischen Funktionen sowie der gesundheitsbezogenen Lebensqualität [39]. Im Mausmodell der LHON konnte als zugrunde liegender Wirkmechanismus eine Wiederherstellung des gestörten Elektronentransportes in der Atmungskette durch Idebenon nachgewiesen werden [18]. Zusätzlich werden Idebenon antiinflammatorische Eigenschaften zugesprochen [41]. Diese Erkenntnisse und Eigenschaften von Idebenon führten zu der Hypothese, dass dieses Antioxidans sich bei den progredienten Krankheitsverläufen der MS als wirksam erweist. Im chronischen EAE-Modell zeigte Idebenon allerdings keinerlei therapeutischen Nutzen. Auch konnten in histopathologischen Untersuchungen keine subklinischen Effekte nachgewiesen werden. Idebenon konnte weder die Entzündungsaktivität noch den Grad der Demyelinisierung oder axonalen Schädigung beeinflussen. Eine unzureichende Dosierung sowie eine mangelhafte Resorption oder Distribution in das ZNS wurden als Ursache der fehlenden Wirksamkeit ausgeschlossen. Idebenon wurde mittels oraler Gavage verabreicht. Dabei konnten vergleichbare Plasma- und Liquorkonzentrationsspiegel erzielt werden, die sich im Mausmodell der LHON als wirksam erwiesen haben [18]. Obwohl der mitochondrialen Dysfunktion in der Pathogenese der chronischen EAE eine entscheidende Rolle zugesprochen wird und Idebenon die Fähigkeit besitzt, den Elektronenfluss in geschädigten Mitochondrien wiederherzustellen, konnte in unseren Händen Idebenon bei chronischer EAE keinen klinischen Nutzen erbringen.

Ein weiterer vielversprechender Kandidat zur Behandlung der chronischen Neuroinflammation ist EGCG, eine antiinflammatorische und antioxidative Substanz mit der Fähigkeit Eisen zu komplexieren. Basierend auf früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurden in diesem Zusammenhang synergistische therapeutische Effekte der Kombinationstherapie von EGCG und GA, einer Substanz, der ebenfalls neuroprotektive Eigenschaften zugeschrieben werden, bei der Behandlung der chronischen EAE überprüft [24, 26]. Überraschenderweise verfehlte die Kombination beider Substanzen jedoch jeglichen therapeutischen Effekt und zeigte keinerlei Verbesserung der klinischen Symptomatik im Vergleich zur der mit Vehikel behandelten Kon-

trollgruppe. Die alleinige Therapie mit EGCG hingegen milderte deutlich die Schwere des Krankheitsverlaufs, indem EGCG Demyelinisierung und axonale Schäden reduzierte. Auch verringerte EGCG signifikant die Anzahl entzündlicher ZNS-Infiltrate. Die zusätzliche Verabreichung von GA in der Kombination mit EGCG bei chronischer EAE scheint folglich den therapeutischen Effekt von EGCG zu neutralisieren. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, die einen synergistischen therapeutischen Effekt von GA und EGCG bei schubförmig-verlaufender EAE aufzeigten [24].

Die Kombinationstherapie mit EGCG und GA führte interessanterweise zu einer gesteigerten Expression des durch oxidativen Stress und inflammatorische Stimuli induzierbaren Enzyms HO-1 in der posterioren Hirnregion sowie im Rückenmark der erkrankten Mäuse. EGCG in Monotherapie hingegen verminderte die HO-1-Expression im Vergleich zu der mit Vehikel behandelten Kontrollgruppe. Die HO-1 wird vornehmlich in Zellen entzündlicher Läsionen im ZNS exprimiert. Man könnte demnach spekulieren, dass die Konzentration der HO-1 unabhängig von Therapieeinflüssen lediglich den Grad der Entzündung reflektiere. Allerdings beeinflusste GA in Kombination mit EGCG nicht die Infiltration entzündlicher Zellen im ZNS, weshalb es unwahrscheinlich erscheint, dass die Veränderungen der HO-1 durch die verschiedenen Therapiestrategien lediglich eine Widerspiegelung des Entzündungsmaßes darstellen. Unsere Ergebnisse sind mithin überraschend, da berichtet wurde, dass EGCG die HO-1 in vitro und in vivo induziert [33]. Während bei Lewis-Ratten die Hemmung der HO-1 vor EAE-Beginn den Krankheitsverlauf verschlechterte [42], wirkte diese sich bei bereits etablierter EAE in Mäusen günstig auf den Schweregrad der Erkrankung aus [43]. HO-1-defiziente Mäuse entwickelten einen schwereren EAE-Verlauf im Vergleich zum Wildtyp, und die Induktion der HO-1 nach Krankheitsausbruch mittels Kobalt-Protoporphyrin IX zeigte einen therapeutischen Nutzen sowohl bei schubförmig verlaufender als auch in chronischer EAE [44]. Allerdings scheint die anhaltende Induktion der HO-1 durch Kobalt-Protoporphyrin IX [45] und die übermäßige Expression der HO-1 im Allgemeinen [46] zu pathologischer Eisenablagerung und mitochondrialer Autophagie zu führen - beides Prozesse, die mit neurodegenerativen Erkrankungen [47], MS [48] und EAE [16] in Verbindung gebracht werden. Es bleibt unklar, ob die Hochregulation der HO-1 eine physiologische antiinflammatorische und zytoprotektive Antwort auf schädliche Stimuli ist oder ob sie einen entscheidenden Beitrag zur Krankheitsentwicklung leistet [49].

Obwohl sicherlich weitere Untersuchungen zur Rolle der HO-1 bei chronischer Neuroinflammation unabdingbar sind, ist eine mögliche Erklärung dieser widersprüchlichen Befunde, dass die HO-1 abhängig von der Krankheitsphase günstige oder schädliche Auswirkungen haben kann. So bewirkt die Hemmung des Enzyms vor oder nach Beginn der EAE gegenläufige Effekte, da initial die HO-1 eine protektive, antioxidative Funktion ausübt, indem das prooxidative Häm beschleunigt zu den radikalfangenden Gallenfarbstoffen Biliverdin und Bilirubin abgebaut wird [47]. Im weiteren Krankheitsverlauf jedoch wirkt die stetige Überexpression der HO-1 sich schädlich auf das Fortschreiten der Erkrankung aus, da durch den Hämabbau freigesetztes Eisen im ZNS akkumuliert. In einer Umgebung gekennzeichnet durch chronische Neuroinflammation, der damit verbundenen Aktivierung von Mikroglia und Generierung freier Radikale entstehen zweiwertige Eisenkationen, die zur Bildung hochreaktiver Hydroxylradikale beitragen und weitere Schäden verursachen [50]. Zusätzlich könnte die altersabhängige Akkumulation von Eisen diesen Circulus vitiosus bei Patienten mit PPMS oder SPMS verstärken. Eisen wird im Gehirn überwiegend in Oligodendrozyten gespeichert. Gehen diese beispielsweise durch oxidativen Stress in MS-Läsionen zu Grunde, wird dabei abermals massiv Eisen freigesetzt, was wiederum zur Generierung von ROS beiträgt [31]. Auch unsere Ergebnisse sind mit dieser Hypothese in Einklang zu bringen. Entgegen der Effekte bei schubförmig-verlaufender EAE beruht die therapeutische Wirksamkeit von EGCG bei chronischer EAE auf der Herunterregulierung der HO-1 in Krankheitsphasen, in denen als pathogenetischer Mechanismus oxidativer Stress eine Hauptursache neurodegenerativer Prozesse darstellt.

Zusammenfassend unterstreichen oben genannte Erkenntnisse und Ergebnisse die Komplexität der Regulation der HO-1 sowie des Eisenstoffwechsels. Weitere Untersuchungen zum Redox-Gleichgewicht während Zuständen chronischer Neuroinflammation und insbesondere bei chronischer EAE sind erforderlich. Ein besseres Verständnis dieser Prozesse ist grundlegend für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien für die Behandlung der progredienten MS-Verlaufsformen.

### **Literaturverzeichnis**

1. Infante-Duarte, C., Waiczies, S., Wuerfel, J., Zipp, F., New developments in understanding and treating neuroinflammation. *J Mol Med (Berl)*, 2008. 86(9): p. 975-985.
2. Aktas, O., Ullrich, O., Infante-Duarte, C., Nitsch, R., Zipp, F., Neuronal damage in brain inflammation. *Arch Neurol*, 2007. 64(2): p. 185-189.
3. Polman, C.H., Reingold, S.C., Edan, G., Filippi, M., Hartung, H.P., Kappos, L., Lublin, F.D., Metz, L.M., McFarland, H.F., O'connor, P.W., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A.J., Weinshenker, B.G., Wolinsky, J.S., Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol*, 2005. 58(6): p. 840-846.

4. Gold, R., Linington, C., Lassmann, H., Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*, 2006. 129(Pt 8): p. 1953-1971.
5. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., Ugolini, S., Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*, 2008. 9(5): p. 503-510.
6. Fogel, L.A., Yokoyama, W.M., French, A.R., Natural killer cells in human autoimmune disorders. *Arthritis Res Ther*, 2013. 15(4): p. 216.
7. Munschauer, F.E., Hartrich, L.A., Stewart, C.C., Jacobs, L., Circulating natural killer cells but not cytotoxic T lymphocytes are reduced in patients with active relapsing multiple sclerosis and little clinical disability as compared to controls. *J Neuroimmunol*, 1995. 62(2): p. 177-181.
8. Morse, R.H., Seguin, R., Mccrea, E.L., Antel, J.P., NK cell-mediated lysis of autologous human oligodendrocytes. *J Neuroimmunol*, 2001. 116(1): p. 107-115.
9. Saikali, P., Antel, J.P., Newcombe, J., Chen, Z., Freedman, M., Blain, M., Cayrol, R., Prat, A., Hall, J.A., Arbour, N., NKG2D-mediated cytotoxicity toward oligodendrocytes suggests a mechanism for tissue injury in multiple sclerosis. *J Neurosci*, 2007. 27(5): p. 1220-1228.
10. Morandi, B., Bramanti, P., Bonaccorsi, I., Montalto, E., Oliveri, D., Pezzino, G., Navarra, M., Ferlazzo, G., Role of natural killer cells in the pathogenesis and progression of multiple sclerosis. *Pharmacol Res*, 2008. 57(1): p. 1-5.
11. Hamann, I., Unterwalder, N., Cardona, A.E., Meisel, C., Zipp, F., Ransohoff, R.M., Infante-Duarte, C., Analyses of phenotypic and functional characteristics of CX3CR1-expressing natural killer cells. *Immunology*, 2011. 133(1): p. 62-73.
12. Infante-Duarte, C., Weber, A., Kratzschmar, J., Prozorovski, T., Pikol, S., Hamann, I., Bellmann-Strobl, J., Aktas, O., Dorr, J., Wuerfel, J., Sturzebecher, C.S., Zipp, F., Frequency of blood CX3CR1-positive natural killer cells correlates with disease activity in multiple sclerosis patients. *FASEB J*, 2005. 19(13): p. 1902-1904.
13. Bielekova, B., Catalfamo, M., Reichert-Scrivner, S., Packer, A., Cerna, M., Waldmann, T.A., Mcfarland, H., Henkart, P.A., Martin, R., Regulatory CD56(bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2Ralpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(15): p. 5941-5946.
14. Chanvillard, C., Millward, J.M., Lozano, M., Hamann, I., Paul, F., Zipp, F., Dorr, J., Infante-Duarte, C., Mitoxantrone induces natural killer cell maturation in patients with secondary progressive multiple sclerosis. *PLoS One*, 2012. 7(6): p. e39625.
15. Bjartmar, C., Wujek, J.R., Trapp, B.D., Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. *J Neurol Sci*, 2003. 206(2): p. 165-171.
16. Forge, J.K., Pedchenko, T.V., Levine, S.M., Iron deposits in the central nervous system of SJL mice with experimental allergic encephalomyelitis. *Life Sci*, 1998. 63(25): p. 2271-2284.
17. Geromel, V., Darin, N., Chretien, D., Benit, P., Delonlay, P., Rotig, A., Munnich, A., Rustin, P., Coenzyme Q(10) and idebenone in the therapy of respiratory chain diseases: rationale and comparative benefits. *Mol Genet Metab*, 2002. 77(1-2): p. 21-30.
18. Heitz, F.D., Erb, M., Anklin, C., Robay, D., Pernet, V., Gueven, N., Idebenone protects against retinal damage and loss of vision in a mouse model of Leber's hereditary optic neuropathy. *PLoS One*, 2012. 7(9): p. e45182.
19. Rego, A.C., Santos, M.S., Oliveira, C.R., Influence of the antioxidants vitamin E and idebenone on retinal cell injury mediated by chemical ischemia, hypoglycemia, or oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 1999. 26(11-12): p. 1405-1417.
20. Fiebiger, S.M., Bros, H., Grobosch, T., Janssen, A., Chanvillard, C., Paul, F., Dorr, J., Millward, J.M., Infante-Duarte, C., The antioxidant idebenone fails to prevent or attenuate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *J Neuroimmunol*, 2013. 262(1-2): p. 66-71.
21. Schroeder, E.K., Kelsey, N.A., Doyle, J., Breed, E., Bouchard, R.J., Loucks, F.A., Harbison, R.A., Linseman, D.A., Green tea epigallocatechin 3-gallate accumulates in mitochondria and displays a selective antiapoptotic effect against inducers of mitochondrial oxidative stress in neurons. *Antioxid Redox Signal*, 2009. 11(3): p. 469-480.
22. Aktas, O., Prozorovski, T., Smorodchenko, A., Savaskan, N.E., Lauster, R., Kloetzel, P.M., Infante-Duarte, C., Brocke, S., Zipp, F., Green tea epigallocatechin-3-gallate mediates T cellular NF-kappa B inhibition and exerts neuroprotection in autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 2004. 173(9): p. 5794-5800.
23. Wang, J., Ren, Z., Xu, Y., Xiao, S., Meydani, S.N., Wu, D., Epigallocatechin-3-gallate ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by altering balance among CD4+ T-cell subsets. *Am J Pathol*, 2012. 180(1): p. 221-234.
24. Herges, K., Millward, J.M., Hentschel, N., Infante-Duarte, C., Aktas, O., Zipp, F., Neuroprotective effect of combination therapy of glatiramer acetate and epigallocatechin-3-gallate in neuroinflammation. *PLoS One*, 2011. 6(10): p. e25456.

25. Hamann, I., Dorr, J., Glumm, R., Chanvillard, C., Janssen, A., Millward, J.M., Paul, F., Ransohoff, R.M., Infante-Duarte, C., Characterization of natural killer cells in paired CSF and blood samples during neuroinflammation. *J Neuroimmunol*, 2013. 254(1-2): p. 165-169.
26. Janssen, A., Fiebiger, S., Bros, H., Hertwig, L., Romero-Suarez, S., Hamann, I., Chanvillard, C., Bellmann-Strobl, J., Paul, F., Millward, J.M., Infante-Duarte, C., Treatment of Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis with Epigallocatechin-3-Gallate and Glatiramer Acetate Alters Expression of Heme-Oxygenase-1. *PLoS One*, 2015. 10(6): p. e0130251.
27. Aharoni, R., Eilam, R., Domev, H., Labunskay, G., Sela, M., Arnon, R., The immunomodulator glatiramer acetate augments the expression of neurotrophic factors in brains of experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(52): p. 19045-19050.
28. Aharoni, R., Herschkovitz, A., Eilam, R., Blumberg-Hazan, M., Sela, M., Bruck, W., Arnon, R., Demyelination arrest and remyelination induced by glatiramer acetate treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(32): p. 11358-11363.
29. Weinreb, O., Amit, T., Mandel, S., Youdim, M.B., Neuroprotective molecular mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate: a reflective outcome of its antioxidant, iron chelating and neurotogenic properties. *Genes Nutr*, 2009.
30. Gundimeda, U., Mcneill, T.H., Schiffman, J.E., Hinton, D.R., Gopalakrishna, R., Green tea polyphenols potentiate the action of nerve growth factor to induce neuritogenesis: possible role of reactive oxygen species. *J Neurosci Res*, 2010. 88(16): p. 3644-3655.
31. Stahnke, T., Stadelmann, C., Netzler, A., Bruck, W., Richter-Landsberg, C., Differential upregulation of heme oxygenase-1 (HSP32) in glial cells after oxidative stress and in demyelinating disorders. *J Mol Neurosci*, 2007. 32(1): p. 25-37.
32. Van Horssen, J., Schreibelt, G., Drexhage, J., Hazes, T., Dijkstra, C.D., Van Der Valk, P., De Vries, H.E., Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. *Free Radic Biol Med*, 2008. 45(12): p. 1729-1737.
33. Wu, C.C., Hsu, M.C., Hsieh, C.W., Lin, J.B., Lai, P.H., Wung, B.S., Upregulation of heme oxygenase-1 by Epigallocatechin-3-gallate via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK pathways. *Life Sci*, 2006. 78(25): p. 2889-2897.
34. Vitale, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Romagnani, C., Thiel, A., Moretta, L., Moretta, A., The small subset of CD56brightCD16- natural killer cells is selectively responsible for both cell proliferation and interferon-gamma production upon interaction with dendritic cells. *Eur J Immunol*, 2004. 34(6): p. 1715-1722.
35. Kivisakk, P., Mahad, D.J., Callahan, M.K., Trebst, C., Tucky, B., Wei, T., Wu, L., Baekkevold, E.S., Lassmann, H., Staugaitis, S.M., Campbell, J.J., Ransohoff, R.M., Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(14): p. 8389-8394.
36. Ransohoff, R.M., Kivisakk, P., Kidd, G., Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol*, 2003. 3(7): p. 569-581.
37. Huang, D., Shi, F.D., Jung, S., Pien, G.C., Wang, J., Salazar-Mather, T.P., He, T.T., Weaver, J.T., Ljunggren, H.G., Biron, C.A., Littman, D.R., Ransohoff, R.M., The neuronal chemokine CX3CL1/fractalkine selectively recruits NK cells that modify experimental autoimmune encephalomyelitis within the central nervous system. *FASEB J*, 2006. 20(7): p. 896-905.
38. Lassmann, H., Van Horssen, J., The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis. *FEBS Lett*, 2011. 585(23): p. 3715-3723.
39. Di Prospero, N.A., Baker, A., Jeffries, N., Fischbeck, K.H., Neurological effects of high-dose idebenone in patients with Friedreich's ataxia: a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*, 2007. 6(10): p. 878-886.
40. Klopstock, T., Yu-Wai-Man, P., Dimitriadis, K., Rouleau, J., Heck, S., Bailie, M., Atawan, A., Chattopadhyay, S., Schubert, M., Garip, A., Kernt, M., Petraki, D., Rummey, C., Leinonen, M., Metz, G., Griffiths, P.G., Meier, T., Chinnery, P.F., A randomized placebo-controlled trial of idebenone in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*, 2011. 134(Pt 9): p. 2677-2686.
41. Civenni, G., Bezzi, P., Trotti, D., Volterra, A., Racagni, G., Inhibitory effect of the neuroprotective agent idebenone on arachidonic acid metabolism in astrocytes. *Eur J Pharmacol*, 1999. 370(2): p. 161-167.
42. Liu, Y., Zhu, B., Luo, L., Li, P., Paty, D.W., Cynader, M.S., Heme oxygenase-1 plays an important protective role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroreport*, 2001. 12(9): p. 1841-1845.
43. Chakrabarty, A., Emerson, M.R., Levine, S.M., Heme oxygenase-1 in SJL mice with experimental allergic encephalomyelitis. *Mult Scler*, 2003. 9(4): p. 372-381.
44. Chora, A.A., Fontoura, P., Cunha, A., Pais, T.F., Cardoso, S., Ho, P.P., Lee, L.Y., Sobel, R.A., Steinman, L., Soares, M.P., Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation. *J Clin Invest*, 2007. 117(2): p. 438-447.
45. Unuma, K., Aki, T., Matsuda, S., Funakoshi, T., Yoshida, K., Uemura, K., Inducer of heme oxygenase-1 cobalt protoporphyrin accelerates autophagy and suppresses oxidative damages during lipopolysaccharide treatment in rat liver. *Hepatol Res*, 2013. 43(1): p. 91-96.

46. Song, W., Zukor, H., Lin, S.H., Liberman, A., Tavitian, A., Mui, J., Vali, H., Fillebeen, C., Pantopoulos, K., Wu, T.D., Guerquin-Kern, J.L., Schipper, H.M., Unregulated brain iron deposition in transgenic mice overexpressing HMOX1 in the astrocytic compartment. *J Neurochem*, 2012. 123(2): p. 325-336.
47. Schipper, H.M., Song, W., Zukor, H., Hascalovici, J.R., Zeligman, D., Heme oxygenase-1 and neurodegeneration: expanding frontiers of engagement. *J Neurochem*, 2009. 110(2): p. 469-485.
48. Levine, S.M., Bilgen, M., Lynch, S.G., Iron accumulation in multiple sclerosis: an early pathogenic event. *Expert Rev Neurother*, 2013. 13(3): p. 247-250.
49. Emerson, M.R., Levine, S.M., Heme oxygenase-1 and NADPH cytochrome P450 reductase expression in experimental allergic encephalomyelitis: an expanded view of the stress response. *J Neurochem*, 2000. 75(6): p. 2555-2562.
50. Jomova, K., Valko, M., Importance of iron chelation in free radical-induced oxidative stress and human disease. *Curr Pharm Des*, 2011. 17(31): p. 3460-3473.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Antonia Janssen, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Neurodegenerative Prozesse als therapeutisches Target bei Multipler Sklerose“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

---

Unterschrift

## Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Antonia Janssen hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

**Publikation 1:** *Hamann I, Dörr J, Glumm R, Chanvillard C, Janssen A, Millward JM, Paul F, Ransohoff RM, Infante-Duarte C.* Characterization of natural killer cells in paired CSF and blood samples during neuroinflammation. *J Neuroimmunol*, 2013. 254(1-2): p. 165-9.

Beitrag im Einzelnen (10 %): Einteilung der Patienten in die Studiengruppen, Mitarbeit bei der Durchführung der Experimente

**Publikation 2:** *Fiebiger SM, Bros H, Grobosch T, Janssen A, Chanvillard C, Paul F, Dörr J, Millward JM, Infante-Duarte C.* The antioxidant idebenone fails to prevent or attenuate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *J Neuroimmunol*, 2013. 262(1-2): p. 66-71.

Beitrag im Einzelnen (15%): Mitarbeit bei den histopathologischen Untersuchungen, Mitarbeit bei der Durchführung der tierexperimentellen Arbeiten, Betreuung der HT22-Zellkultur, Mitarbeit bei der Durchführung der Zytotoxizität-Assays

**Publikation 3:** *Janssen A, Fiebiger SM, Bros H, Hertwig L, Romero-Suarez S, Hamann I, Chanvillard C, Bellmann-Strobl J, Paul F, Millward JM, Infante-Duarte C.* Treatment of Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis with Epigallocatechin-3-Gallate and Glatiramer Acetate Alters Expression of Heme-Oxygenase-1. *PLoS One*, 2015. 10(6): p. e0130251.

Beitrag im Einzelnen (70 %): konzeptionelle Planung des Projektes, Durchführung der Experimente, Datenanalyse, Anfertigung des Manuskriptes, Revision des Manuskriptes

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

---

## **1. Publikation**

Hamann I, Dörr J, Glumm R, Chanvillard C, Janssen A, Millward JM, Paul F, Ransohoff RM, Infante-Duarte C. Characterization of natural killer cells in paired CSF and blood samples during neuroinflammation. *J Neuroimmunol*, 2013. 254(1-2): p. 165-9.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.08.009>

Seite 26-30









## **2. Publikation**

Fiebiger SM, Bros H, Grobosch T, Janssen A, Chanvillard C, Paul F, Dörr J, Millward JM, Infante-Duarte C. The antioxidant idebenone fails to prevent or attenuate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *J Neuroimmunol*, 2013. 262(1-2): p. 66-71.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.07.002>

Seite 31-36











### **3. Publikation**

Janssen A, Fiebiger SM, Bros H, Hertwig L, Romero-Suarez S, Hamann I, Chanvillard C, Bellmann-Strobl J, Paul F, Millward JM, Infante-Duarte C. Treatment of Chronic Experimental Auto-immune Encephalomyelitis with Epigallocatechin-3-Gallate and Glatiramer Acetate Alters Expression of Heme- Oxygenase-1.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130251>

Seite 37-53

































## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **Komplette Publikationsliste**

Hamann I, Dörr J, Glumm R, Chanvillard C, **Janssen A**, Millward JM, Paul F, Ransohoff RM, Infante-Duarte C. Characterization of natural killer cells in paired CSF and blood samples during neuroinflammation. *J Neuroimmunol*, 2013. 254(1-2): p. 165-9.

Fiebiger SM, Bros H, Grobosch T, **Janssen A**, Chanvillard C, Paul F, Dörr J, Millward JM, Infante-Duarte C. The antioxidant idebenone fails to prevent or attenuate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *J Neuroimmunol*, 2013. 262(1-2): p. 66-71.

**Janssen A**, Fiebiger SM, Bros H, Hertwig L, Romero-Suarez S, Hamann I, Chanvillard C, Bellmann-Strobl J, Paul F, Millward JM, Infante-Duarte C. Treatment of Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis with Epigallocatechin-3-Gallate and Glatiramer Acetate Alters Expression of Heme- Oxygenase-1.

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Carmen Infante-Duarte für die exzellente Betreuung und die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten. Sie hat mit die Welt der Neuroimmunologie eröffnet. Auch Ihre Herzlichkeit und die Eigenschaft, stets den Optimismus zu bewahren, waren eine große Unterstützung.

Dr. Jason Millward danke ich dafür, dass er immer ein offenes Ohr für mich hatte und stets kompetent mit bestem Rat an meiner Seite stand. Vor allem seine anregenden Diskussionen möchte ich nicht missen.

Nicht weniger Dank gebührt allen Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe für Ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ich danke Sebastian Fiebiger, Elena Bros, Laura Hertwig, Isabell Hamann, Coralie Chanvillard und Silvina Romero-Suarez für Ihre Unterstützung meines Projektes. Für die technische Assistenz möchte ich mit bei Natalie Asselborn und Bibiane Seeger bedanken.

Nicht zu vergessen sind meine Familie und Freunde, die mir auf vielfältige Weise Beistand geleistet haben. Ich danke meinen Eltern für das Vertrauen und den stetigen Zuspruch, zu guter Letzt Holger für seine unendliche Geduld.