

Aus dem Deutschen Rheuma-Forschungszentrum

DISSERTATION

Überaktivierung der NADPH Oxidasen –
Ein pathophysiologisches Korrelat der Multiplen Sklerose?

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Julian Johannes Pohlen
aus Berlin

Datum der Promotion: 25.06.2017

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung und Abstract.....	5
1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG.....	6
1.1 Das Immunsystem – Monozyten/Makrophagen als Effektoren.....	6
1.2 Reaktive Sauerstoffspezies.....	7
1.2.1 Oxidativer Stress – Gefahrenpotential reaktiver Sauerstoffspezies.....	7
1.2.2 Antioxidative Mechanismen des Organismus.....	8
1.3 Die NADPH Oxidasen – Funktion und Aktivierung.....	8
1.4 Oxidativer Stress im Zentralnervensystem – ein empfindliches Organ.....	11
1.5 Neuroinflammation im Tiermodell – Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis.....	12
1.5.1 Vor- und Nachteile als Modell der Multiplen Sklerose.....	12
1.5.2 Die Rolle der NADPH Oxidasen.....	12
1.6 Multiple Sklerose – Erkrankung des ZNS.....	13
1.6.1 Klinik der Multiplen Sklerose.....	13
1.6.2 Pathogenese der Multiplen Sklerose.....	15
1.7 Therapie der Multiplen Sklerose.....	16
1.7.1 Aktuelle Therapieoptionen.....	16
1.7.2 Therapie der Zukunft – EGCG als Neuroprotektivum.....	17
1.7.3 Sozioökonomische Aspekte der Multiplen Sklerose.....	19
1.8 Ziel der Arbeit.....	20
2 MATERIAL UND METHODEN.....	21
2.1 Allgemeiner Versuchsaufbau.....	21
2.2 Laborartikel.....	22
2.2.1 Puffer.....	22
2.2.2 Medien.....	22
2.2.3 Antikörper.....	22
2.2.4 Fluoreszenzfarbstoffe.....	22
2.2.5 Agenzien.....	23

2.3	Zellen.....	23
2.3.1	CD11b ⁺ humane Monozyten.....	23
2.3.2	THP-1 Zelllinie.....	26
2.4	Fluorescence lifetime imaging microscopy – FLIM.....	26
2.4.1	Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie.....	26
2.4.2	Besonderheiten der Zweiphotonenmikroskopie.....	29
2.4.3	FLIM – Abklingverhalten von Fluoreszenzfarbstoffe.....	29
2.4.4	Messung von NAD(P)H mit FLIM.....	30
2.4.5	Detektion der NADPH-Oxidasen-Aktivierung.....	33
2.4.6	Imaging - Systeme in Berlin (DRFZ) und UCI (LFD).....	35
2.5	Methodik zur Validierung der NAD(P)H-FLIM-Daten in Patientenproben.....	39
2.5.1	Dihydrodichlorofluoreszein-Assay für reaktive Sauerstoffspezies.....	39
2.5.2	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion der gp91phox-Expression.....	40
2.6	Statistische Auswertung.....	40
3	ERGEBNISSE.....	41
3.1	Monozytäre NADPH-Oxidasen-Überaktivierung in Multipler Sklerose.....	41
3.2	Detektion verlängerter Fluoreszenzlebensdauern mittels Phasor.....	44
3.3	EGCG-Wirkung in Monozyten im Phasor.....	48
3.4	EGCG – weitere Evaluation des Effekts.....	50
3.5	Altersabhängigkeit der NADPH-Oxidasen-Aktivierung.....	52
3.6	Simultane Messung von NAD(P)H-FLIM und Antikörpermarkierung.....	55
4	DISKUSSION.....	57
4.1	Oxidativer Stress in Multipler Sklerose – Überaktivierung der NADPH Oxidasen.....	57
4.2	Therapieevaluation – NAD(P)H-FLIM als Marker-freier Ansatz?.....	59
4.3	NADPH-Oxidasen-Inhibition als therapeutisches Prinzip.....	61
4.4	Methodische Weiterentwicklung von NAD(P)H-FLIM.....	65
4.5	Conclusio.....	68
	Literaturverzeichnis.....	70

Abkürzungsverzeichnis.....	89
Abbildungsverzeichnis.....	92
Eidesstattliche Erklärung.....	93
Lebenslauf.....	94
Publikationen.....	96
Danksagung.....	97

Zusammenfassung

In der Multiplen Sklerose sind Monozyten/Makrophagen als pathogenetisch relevante Immunzellen umfangreich beschrieben. Möglichweise leisten NADPH Oxidasen einen Beitrag zum Krankheitsgeschehen und dem Untergang von Nervenzellen, wobei deren Rolle bislang unklar ist.

Die Aktivierung von NADPH Oxidasen lässt sich mit Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) direkt, d.h. Marker-frei auf molekularer Ebene visualisieren.

In CD11b⁺ Monozyten aus dem Vollblut von Patienten mit Multipler Sklerose konnte so zum ersten Mal ein differenziertes Aktivierungsmuster in Abhängigkeit von der Krankheitsphase sowie der Therapie gezeigt werden.¹ Zudem konnte der Effekt von Grüntee-extrakt EGCG auf das Immunsystem genauer charakterisiert werden.

Die Ergebnisse belegen einen Nutzen der Methode FLIM für das Monitoring entzündlicher Erkrankungen. Die detektierte Überaktivierung von NADPH Oxidasen in Multipler Sklerose impliziert neuartige Therapieansätze.

Abstract

The role of monocytes/macrophages in the course of the neuro-inflammatory disease multiple sclerosis has long been established. Though the definite mechanisms of damage to neurons were less obvious until recently. Potentially, NADPH oxidases are involved in the pathogenesis of multiple sclerosis.

The activation of NADPH oxidases can now be visualized directly on a molecular level with a marker-free approach using Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM).

CD11b⁺ monocytes from whole-blood in multiple sclerosis reveal a distinctive pattern of activation depending on the phase and the therapy of the disease.¹ Furthermore, the evaluation of the effect of green-tea extract EGCG on immune function provides a better insight in its potential actions in multiple sclerosis.

The results point to a benefit of monitoring disease activity in inflammatory conditions with FLIM and hereby evaluate treatments. The overactivation of NOX enzymes warrants a new therapeutic approach in multiple sclerosis.

1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG

1.1 Das Immunsystem – Monozyten/Makrophagen als Effektoren

Die Effektoren des Immunsystems bekämpfen Mikroorganismen wie Bakterien, Viren und Pilze. Darüber hinaus ist eine wesentliche Funktion des Immunsystems die Erkennung und gezielte Elimination von entarteten körpereigenen Zellen.² Das Immunsystem besteht aus zellulären Komponenten wie Monozyten/Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten sowie aus humoralen Bestandteilen wie Antikörpern und Zytokinen. Das Immunsystem wird grundsätzlich in angeboren und adaptiv unterteilt. Charakteristikum der angeborenen Immunität ist seine rasche Unterscheidung in fremd und selbst sowie in normal und anormal anhand hoch konservierter Muster.³ Die adaptive Immunität ist in der Lage, nach einer stattgehabten Infektion ein Gedächtnis auszubilden. Somit verläuft eine zweite Attacke durch die gleichen Erreger in der Regel deutlich abgeschwächt.⁴ Beide Elemente des Immunsystems sind an vielen Stellen miteinander verknüpft und daher nicht isoliert zu betrachten.⁵

Für die vorliegende Arbeit sind die für wenige Stunden im Blut zirkulierenden Monozyten und der final differenzierte Zelltyp der Makrophagen relevant, deren Lebenswege in Abb. 1 nachvollzogen werden können.⁶ Makrophagen sind entsprechend ihrer gewebsspezifischen Differenzierung – beispielsweise als Alveolarmakrophagen oder Peritonealmakrophagen – heterogene Zellen. Auch Monozyten im Blut liegen bereits in unterschiedlichen Populationen vor, die anhand ihrer migratorischen Eigenschaften differenziert werden können.⁷

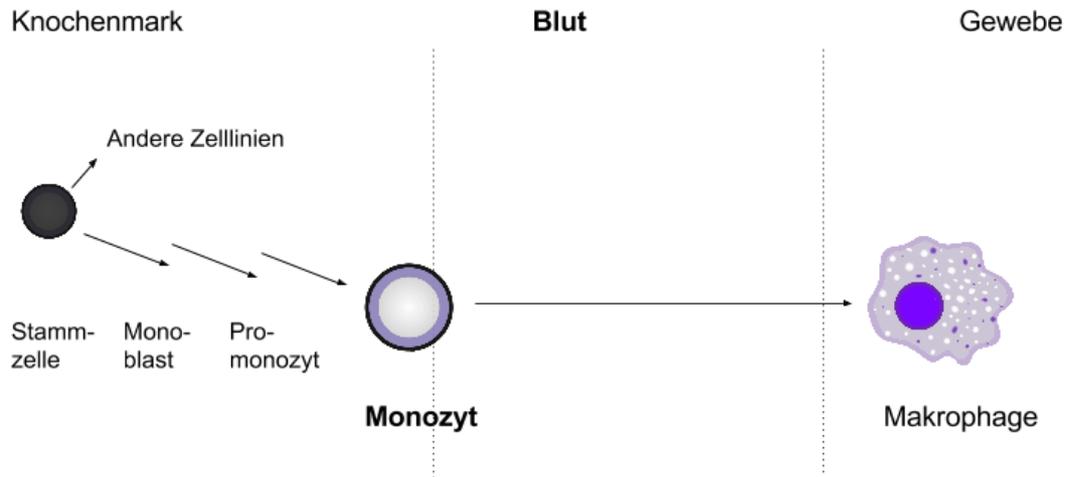


Abb. 1: Der Weg des Monozyten/Makrophagen

Monozyten/Makrophagen und ihre Vorläuferzellen in den Kompartimenten Knochenmark, Blut und Zielgewebe. Monozyten verlassen das Knochenmark, zirkulieren im Blut und gelangen ins Zielgewebe, wo die terminale Differenzierung erfolgt. *Adaptiert nach: Bildquelle s. Text*

Mit ihrer Phagozytosefunktion verbinden Monozyten/Makrophagen als wichtige Stellglieder angeborene und erworbene Abwehr.⁸ Konkret können die Zellen des mononukleären Phagozytose-Systems Mikroorganismen aufnehmen und diese zerstören, um sie danach den übrigen Effektoren des Immunsystems in Form von prozessierten Antigenen zu präsentieren.⁹ Dabei ist die Degradation von endozytiertem Material in Monozyten/Makrophagen u.a. von der Generierung sog. Reaktiver Sauerstoffspezies abhängig.¹⁰

1.2 Reaktive Sauerstoffspezies

1.2.1 Oxidativer Stress – Gefahrenpotential reaktiver Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) reagieren aufgrund ihrer ungepaarten Elektronen rasch mit anderen Verbindungen. Dadurch verursachte strukturelle Veränderungen von Lipiden, Proteinen, DNA und Kohlenhydraten können als oxidativer Schaden die Integrität von Zellen stören.¹¹ Trotz der biologischen Gefahren spielen reaktive Sauerstoffspezies im Organismus eine wichtige Rolle wie z.B. beim *signaling* zwischen Zellen und Kompartimenten.¹² Diese stehen optimaler Weise in einem Gleichgewicht mit den u.g. antioxidativen Mechanismen des Körpers. Oxidativer Stress lässt sich als Exzess pro-

oxidativer Aktivität verstehen, die vom antioxidativen Schutz nicht mehr aufgewogen werden kann.¹³ Anders als reaktive Sauerstoffspezies entstehen reaktive Stickstoffspezies (RNS) durch NO-Synthasen (NOS) aus Arginin.¹⁴ Dabei sind die beiden konstitutiv exprimierten Isoformen endotheliale (eNOS) und neuronale NOS (nNOS) sowie die induzierbare Form (iNOS) bekannt. In der folgenden Arbeit stehen reaktive Sauerstoffspezies im Vordergrund; RNS finden also lediglich der Vollständigkeit halber Erwähnung. Signifikante Quellen für reaktive Sauerstoffspezies sind im biologischen Kontext vor allem Mitochondrien – dort insbesondere der Anfall von reaktiven Sauerstoffspezies in der Atmungskette – und die membranständigen NADPH Oxidasen.¹⁰

1.2.2 Antioxidative Mechanismen des Organismus

Der menschliche Organismus verfügt über potente antioxidative Schutzmechanismen, sodass physiologischer Weise ein Gleichgewicht zwischen pro-oxidativen und antioxidativen Faktoren besteht. Es gibt enzymatische antioxidative Mechanismen wie die Superoxid-Dismutase, die Glutathion-Peroxidase und die Katalase sowie nicht-enzymatische Antioxidantien, zu denen Vitamin C, E, Glutathion, β -Caroten und Vitamin A zählen.¹⁵ Die Superoxid-Dismutase ist das zuerst entdeckte Enzym, das freie Radikale intrazellulär wirksam in weniger reaktive Moleküle umwandelt.¹⁶ Das Glutathion-System wiederum entgiftet reaktive Sauerstoffspezies über die Bereitstellung von reduzierendem Glutathion mit einer Peroxidase, woraufhin Glutathiondisulfid regenerativ zu Glutathion reduziert werden muss. Ein Ausfall der Glutathion-Peroxidase resultiert in einer verstärkten Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress und unterstreicht damit deren hohe Relevanz in der antioxidativen Abwehr.¹⁷ Einige Vitamine wie zum Beispiel Vitamin C und E wirken nicht-enzymatisch antioxidativ, wobei deren chemischer Aufbau ihre unmittelbar reduzierenden Eigenschaften bedingt. Gleiches gilt für die Harnsäure, der ebenso eine wichtige Rolle als Radikal-Falle zugesprochen wird.¹⁸

1.3 Die NADPH Oxidasen – Funktion und Aktivierung

Schon früh hat man gezeigt, dass der Prozess der Phagozytose mit einem erhöhten Sauerstoffverbrauch einhergeht und diesen als Extrarespiration betitelt.¹⁹ In Leukozyten von Meerschweinchen fand die Reaktion der NADPH Oxidase in der Phagozytose zuerst Er-

wähnung.²⁰ Das mittlerweile als *respiratory burst* von Phagozyten bezeichnete Phänomen wurde mit der verstärkten enzymatischen Aktivität der NADPH Oxidase in folgender Reaktionsgleichung erklärt:



NADPH Oxidasen (NOX) liegen als Enzymkomplexe vor, deren Systematik umfangreich charakterisiert ist. Es existieren die sieben Isoformen NOX2, NOX1, NOX3, NOX4, NOX5 sowie DUOX1 und DUOX2, die ein zell- und gewebsspezifisches Expressionsmuster aufweisen. Die NADPH Oxidasen bestehen jeweils aus mehreren Untereinheiten, deren Funktionen mittlerweile weitgehend aufgeklärt sind. Die verschiedenen Isoformen besitzen allesamt die Untereinheit p22phox, differieren allerdings vor allem in Hinsicht auf zytosolische Bestandteile.²² Von besonderer Bedeutung ist für die folgende Arbeit die Isoform NADPH-Oxidase-2 (NOX2), auch phagozytische NOX, und wird daher *en detail* erläutert.

Die NADPH-Oxidase-2 besteht – wie in Abb. 2 nachzuvollziehen – aus den Untereinheiten p22phox, gp91phox, p47phox, p40phox und p67phox sowie RAC.²³ Zur Aktivierung der NOX2 müssen sich die Anteile aus dem Zytosol – p40phox, p47phox, p67phox und RAC – mit den membranständigen Untereinheiten p22phox und gp91phox zusammenschließen. Erst im assemblierten Zustand kann NADPH an das Enzym binden und ihre Reaktion katalysieren, d.h. die schrittweise Übertragung von Elektronen auf molekularen Sauerstoff.²⁴ NADPH Oxidasen lassen sich auf direktem Wege durch pro-inflammatorische Stimuli aktivieren, wie mit LPS²⁵ sowie TNF α oder PMA gezeigt wurde.²⁶ Die Expression von gp91phox ist abhängig vom entzündungsrelevanten Transkriptionsfaktor NF- κ B und wird entsprechend von den Aktivatoren LPS/IFN γ verstärkt.²⁷

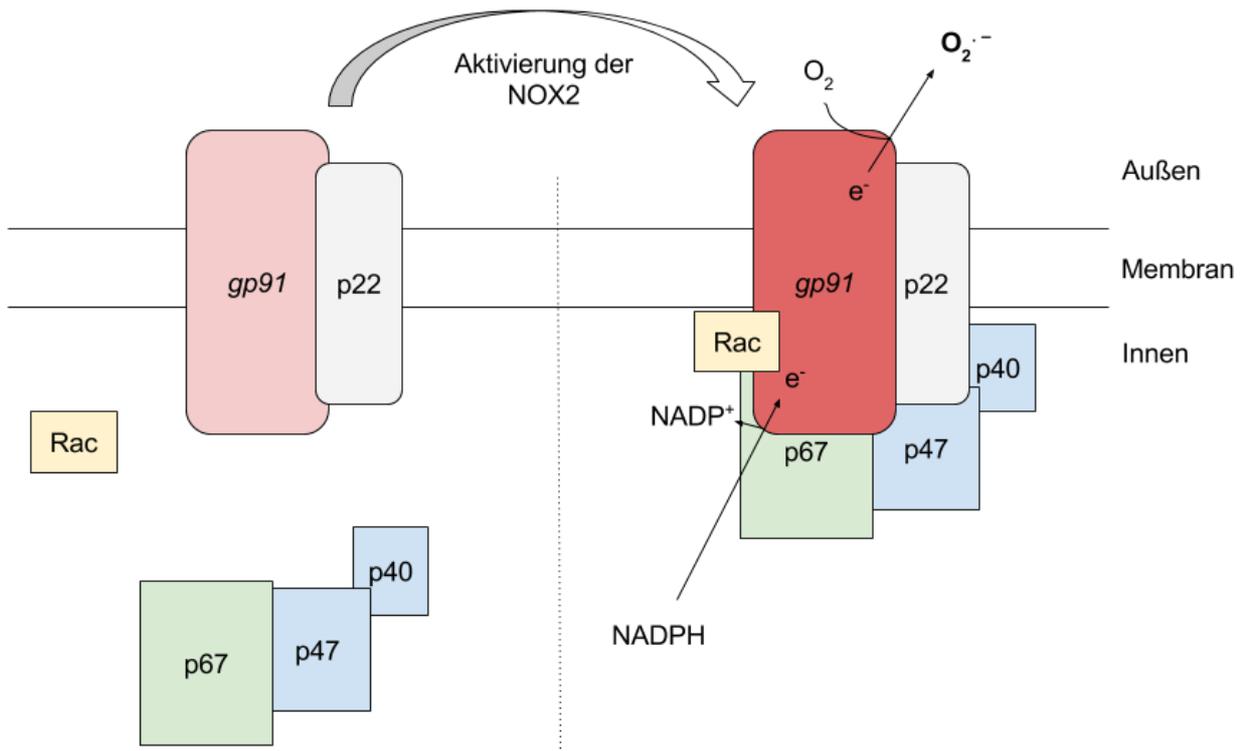


Abb. 2: NADPH-Oxidase-2

Aufbau und Zusammenlagerung der phagozytischen NADPH-Oxidase-2 in der Zellmembran. Die NADPH Oxidase im Ruhezustand (l. im Bild). In aktivierter Form lagern sich unter Mitwirkung der GTPase Rac die Komponenten zu einem Enzymkomplex zusammen. Das katalytische Zentrum, an das NADPH bindet, liegt an der Untereinheit gp91 (rechts im Schaubild). *Adaptiert nach: Bildquelle s. Text*

Mehrere Untereinheiten der NADPH-Oxidase scheinen essentiell für das Funktionieren des Enzymkomplexes zu sein – so beispielsweise die Untereinheit gp91phox (s.u.). Es verdichten sich die Hinweise, dass über das Vorhandensein der Untereinheit gp91phox die Expression der funktionellen NADPH-Oxidasen reguliert wird. In der Entwicklung des Monozyten steigt die Expression von gp91phox vom späten Monozyten-Stadium bis zum terminal differenzierten Makrophagen stark an.²⁸ In direkt aus dem Vollblut extrahierten humanen Monozyten sind bereits die relevanten Untereinheiten p22phox, p47phox, p67phox und gp91phox nachweisbar.²⁹

1.4 Oxidativer Stress im Zentralnervensystem – ein empfindliches Organ

In vielen Hinsichten ist das Zentralnervensystem (ZNS) ein Sonderfall. Für Nervenzellen gehen mit ihrer hohen Spezialisierung auch Nachteile *in puncto* Resistenz einher, sodass sie gegenüber diversen schädigenden Faktoren äußerst empfindlich sind.³⁰ Das Regenerationspotential von Nervengewebe ist höchst gering, da die Neurone des ZNS postmitotisch sind bis auf diejenigen Ausnahmen, die heute als neuronale Stammzellen bekannt sind. Allenfalls im Hippocampus und in der Subventrikulären Zone des lateralen Ventrikels ist eine adulte Neurogenese gesichert.³¹

Aufgrund ihres hohen Energiebedarfs, den Neurone mit oxidativer Phosphorylierung decken, sind sie von der steten Versorgung mit Sauerstoff abhängig. Hypoxie führt innerhalb von Sekunden zu einem Verlust neuronaler Funktion und endet mit dem Zelltod.³² Nervenzellen benötigen Glucose als Substrat – in Fastenzeiten metabolisieren sie zudem Ketone – und es ist bekannt, dass sie von Astrozyten mit Laktat versorgt werden.³³ Auch mittelkettige Fettsäuren tragen bereits unter normalen Bedingungen zum Energieumsatz bei.³⁴ Der hohe Sauerstoffumsatz im neuronalen Stoffwechsel bedingt den regelhaften Anfall von reaktiven Sauerstoffspezies in Mitochondrien, die unter physiologischen Bedingungen (s.o. antioxidative Mechanismen des Organismus) keine Gefahr darstellen. Im geschädigten Gewebe allerdings – beispielsweise in neurodegenerativen Erkrankungen – trägt eine mitochondriale Dysfunktion zu oxidativem Stress und dem Absterben von Nervenzellen bei.³⁵

In der Betrachtung von oxidativem Stress im ZNS ist insbesondere das Immunsystem wichtig. Historisch wurde aufgrund seiner phänotypischen Besonderheiten vom Immprivileg des ZNS gesprochen. Es sind hier kaum Immunzellen zu finden, die beispielsweise experimentell eingebrachtes, fremdes Gewebe abstoßen. Die Blut-Hirn-Schranke galt vormals – u.a. wegen ihrer *tight junctions* – als für Zellen und große, polare Moleküle weitgehend dichte Barriere, die von Immunzellen nur bei gestörter Integrität überwunden wird.³⁶ Es ist allerdings bekannt, dass mononukleäre Zellen auch transendothelial *via* Diapedese aus dem Gefäß ins Hirnparenchym wandern können.³⁷ Die absolute Zahl von eingewanderten Leukozyten ist im gesunden ZNS-Gewebe hingegen sehr gering, was mit einer geringen Expression von ICAM-1 am Gefäßendothel in Abwesenheit inflammatorischer Zustände assoziiert ist.³⁸ Das ZNS-Parenchym scheint zudem durch ein anti-

inflammatorisches Milieu geprägt zu sein.³⁹ Eine Sonderrolle nehmen im ZNS die Mikroglia-Zellen ein, da diese die ortsständigen, gewebsspezifischen Phagozyten des ZNS sind. Mikroglia-Vorläufer wandern wahrscheinlich während der Entwicklung aus dem Dottersack ein und reproduzieren sich lokal. Auf einen entzündlichen Stimulus hin werden Mikroglia-Zellen aktiviert, was sich in einer veränderten Morphologie und Phagozytosefähigkeit zeigt.⁴⁰

1.5 Neuroinflammation im Tiermodell – Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

1.5.1 Vor- und Nachteile als Modell der Multiplen Sklerose

Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist ein verbreitetes Tiermodell, das überwiegend als Mausmodell verwendet wird, um die Entzündung von Nervengewebe in Analogie zur Multiplen Sklerose zu untersuchen. Es wird zwischen der aktiven Immunisierung mit Myelinbestandteilen wie Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein sowie dem adoptiven Transfer von T-Zellen unterschieden, was zu der Multiplen Sklerose ähnlichen Infiltraten im ZNS und konsekutiver Symptomatik führt.⁴¹ Der Vorteil der EAE ist, dass unter standardisierten Bedingungen einzelne Aspekte von neuroinflammatorischen Vorgängen untersucht werden können. Allerdings sind einige Aspekte der Multiplen Sklerose im Modell nicht repräsentiert, sodass Rückschlüsse auf die Erkrankung des Menschen teilweise nicht zulässig sind.⁴² Ein axonaler Schaden als Zeichen des Angriffs auf Neurone wurde sowohl in der Multiplen Sklerose als auch in der EAE der Ratte unter Verwendung des Markers *β-Amyloid precursor protein* nachgewiesen.⁴³ In der EAE der Maus konnte die fokale axonale Dissektion, vermittelt durch reaktive Sauerstoffspezies, als pathomechanistisches Korrelat der neuronalen Schädigung festgestellt werden,⁴⁴ was die Validität des Modells für die Untersuchung von oxidativem Stress untermauert.

1.5.2 Die Rolle der NADPH-Oxidasen

Die NADPH-Oxidasen sind in im ZNS von Mäusen mit experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE) wahrscheinlich überaktiviert.⁴⁵ Die Autoren haben in ihrer Arbeit durch enzymatische Messungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dihydroethidium eine allgemeine Aktivierung der NADPH-Oxidasen im Hirngewebe nachgewiesen. Allerdings ist mit ihrem Versuchsaufbau keine Zuordnung der NADPH-Oxidasen-Aktivierung zu einzelnen Zellen möglich. Ein indirekter Hinweis für eine verstärkte NADPH-Oxidasen-Aktivierung von Monozyten/Makrophagen ist die pathogene Wirkung von NF- κ B in der EAE.⁴⁶ Interessanterweise ist die NADPH-Oxidasen-Aktivität in der EAE im entzündeten ZNS-

Gewebe von sechs Monate alten gegenüber sechs Wochen alten Mäusen gesteigert.⁴⁷ Diese Daten lassen vermuten, dass sich oxidativer Stress im entzündeten ZNS altersabhängig verändert.

1.6 Multiple Sklerose – Erkrankung des ZNS

1.6.1 Klinik der Multiplen Sklerose

MS-Patienten können sich mit unterschiedlichsten Symptomen und Funktionsstörungen vorstellen. Sehr häufig sind sensible Störungen wie beispielsweise Parästhesien. Häufig leiden die Patienten anfangs an einer Schwäche, die allerdings ein unspezifisches Zeichen darstellt. Sehstörungen – i.d.R. bedingt durch eine Optikusneuritis – sind eine weitere häufige Erstmanifestation. Im Krankheitsverlauf der Multiplen Sklerose treten bei über der Hälfte der Patienten in abnehmender Reihenfolge die Symptome Schwäche, sensible Störungen, Ataxie, Blasenstörungen, Fatigue, Krämpfe und Doppelbilder/Sehstörungen auf.⁴⁸ Im Gegensatz zur Progression, d.h. dem graduellen Symptomzuwachs, ist ein Schub definiert als ein über 24 Stunden währendes Symptom, das neu oder reaktiviert ist und subjektiv berichtet oder objektiv festgestellt wird. Dabei zählen alle innerhalb von 30 Tagen auftretende Symptome zu einem Schubereignis. Abzugrenzen von einem tatsächlichen Schub ist eine Pseudoexazerbation, die als kurzzeitige Verschlechterung durch einen Infekt oder als Uhthoff-Phänomen bei exogener Erwärmung wie z.B. beim Baden auftreten kann.⁴⁹

Die Diagnose Multiple Sklerose erfolgt klinisch und wird wesentlich durch die Magnetresonanztomographie (MRT) und zusätzliche Untersuchungen wie die Liquoranalyse und evozierte Potenziale gestützt.⁵⁰ Wichtige diagnostische Hinweise finden sich in der Liquoranalyse, so gelten die ausschließlich im Liquor befindlichen oligoklonalen Banden als Beleg für eine intrathekale Immunglobulin-Synthese.⁵¹ Insgesamt bleibt die Multiple Sklerose durch ihre mannigfaltigen Differentialdiagnosen wie Infektionen usw. eine Herausforderung für den Neurologen.⁵²

Das Clinically Isolated Syndrome (CIS) ist *per definitionem* ein erstmalig aufgetretenes Schubereignis. Häufig ist initial eine Affektion des Nervus opticus, des Hirnstamms oder des Rückenmarks festzustellen. Von den Patienten mit CIS gehen circa 30-70 % in eine definitive Multiple Sklerose über.⁵³ Teilweise werden MS-typische Läsionen im MRT be-

reits vor einer Symptommanifestation entdeckt; die Konversionsrate bei radiologisch isoliertem Syndrom, d.h. klinisch unauffälligen Probanden mit den beschriebenen Läsionen, zum CIS betrug in einer Studie 37 % nach einer mittleren Zeitdauer von 2,3 Jahren.⁵⁴

Die meisten MS-Patienten erleiden einen schubförmigen Verlauf.⁵⁵ Charakteristisch ist das totale oder anteilige Abklingen der Symptome nach Tagen bis Wochen, das als Remission bezeichnet wird.⁵⁶ Die Verläufe der Multiplen Sklerose differieren allerdings stark.⁵⁷ Die Maximalform ist als Marburg-Variante oder maligne Multiple Sklerose beschrieben, die bei fulminantem Verlauf innerhalb weniger Monate letal enden kann.⁵⁸ Nach Jahren der Krankheitsaktivität erlebt die Mehrzahl der Patienten eine Konversion zur progressiven Multiple Sklerose.⁵⁵ Die sekundär progrediente Multiple Sklerose ist durch eine graduelle Zunahme der Behinderung bei initial schubförmiger Krankheit charakterisiert, wobei auch weiterhin Schübe auftreten können.⁵⁶ Mit 10-15 % präsentiert sich ein kleinerer Teil der MS-Patienten mit einem primär progredienten Verlauf.⁵⁹ Dieser ist durch eine kontinuierliche Zunahme der Behinderung gekennzeichnet, ohne dass Schübe auftreten. Ein progredient schubförmiger Verlauf liegt vor, wenn nach einer Progredienz auch Schübe auftreten, was eine seltenere Form der Multiplen Sklerose darstellt.⁵⁶

In Europa leiden bei eingeschränkter Lebenserwartung 83 von 100.000 Menschen unter Multipler Sklerose (Prävalenz), während die Inzidenz bei 4,3 Fällen pro 100.000 pro Jahr liegt.⁶⁰ Die Erkrankung verläuft chronisch, was sich klinisch in einer Zunahme der Behinderung äußert. Als Score für die Einschätzung der Krankheitslast wird der von Kurtzke entwickelte EDSS mit Zahlenwerten von 0 (normaler neurologischer Untersuchungsbe fund) bis 10 (Tod durch Multiple Sklerose) verwendet. Im EDSS finden sich 8 Funktionssysteme wieder, deren Einschränkung jeweils klinisch bewertet wird. Ab einem EDSS von 4 steht die Gehfähigkeit der Patienten im Vordergrund. Trotz seiner hohen Untersucherabhängigkeit bietet der EDSS eine in Studien verwendete orientierende Einschätzung der Klinik von MS-Patienten.⁶¹ Klinisch hat sich unterdessen die Existenz zweier Komponenten in der Pathogenese abgezeichnet: die Schubaktivität ist in der Multiplen Sklerose spätestens ab einem fortgeschrittenen Stadium unabhängig von der Krankheitsprogression.⁶²

1.6.2 Pathogenese der Multiplen Sklerose

Die Multiple Sklerose bleibt seit der sehr frühen Beschreibung von Charcot in 1868 als demyelinisierende Erkrankung des ZNS⁶³ noch immer unheilbar. Sie wird mittlerweile als ein Zusammenspiel von Umwelt und genetischen Faktoren verstanden.⁶⁴ MS-Patienten besitzen autoreaktive T-Zellen, d.h. anders als bei Gesunden reagieren diese experimentell mit einer pro-entzündlichen Antwort auf Bestandteile des Myelins.⁶⁵ Durch eine molekulare Mimikry können virale Peptide, die dem Myelin-basischen Protein ähnlich sind, eine autoaggressive Antwort von T-Zellen induzieren.⁶⁶ In der Multiplen Sklerose wandern u.a. Th17 Zellen – möglicherweise nach einem solchen infektiösen Trigger – ins ZNS ein, wo sie die Bluthirnschranke in ihrer Integrität stören und CD4 pos. T-Zellen rekrutieren.⁶⁷ Chemokine und ihre Rezeptoren sind neben weiteren Zytokin-Rezeptor-Paaren an der anschließenden Rekrutierung und Migration von Immunzellen wie Monozyten, T- und B-Zellen in das ZNS-Parenchym beteiligt.⁶⁸ B-Zellen beeinflussen wahrscheinlich den Verlauf der Multiplen Sklerose, indem sie Follikel-ähnliche Strukturen in den Meningen bilden, wo sie zu Plasmazellen differenziert – in unmittelbarer Nähe zum Kortex gelegen – Antikörper produzieren.⁶⁹

In MS-Läsionen ist neben der vielbeschriebenen Demyelinisierung des Gewebes eine axonale Transsektion nachweisbar, die als Ausdruck der neuronalen Schädigung gilt und vermutlich die Progression der Erkrankung bestimmt.⁷⁰ Ein direkter zellulärer Angriff des Immunsystems könnte für diese Schädigung neuronaler Strukturen ursächlich sein.⁷¹ Zusätzlich wirkt auf humoraler Ebene wahrscheinlich in einem Teil der MS-Patienten eine Antikörperantwort gegen MOG, das sich auf Oligodendroglia befindet, pathogen.⁷² Außerdem findet sich in MS-Läsionen an neuronalen Strukturen ein beträchtlicher oxidativer Schaden, wie anhand von Lipidperoxidation und oxidiertes DNA nachgewiesen wurde.⁷³

Die Präsenz von Makrophagen in MS-Läsionen ist genauestens charakterisiert und wird auf eine Einwanderung aus der Peripherie zurückgeführt.⁷⁴ In der Experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) gibt es seit längerem Hinweise auf einen wesentlichen Beitrag von Makrophagen zur Pathogenese.⁷⁵ Tatsächlich scheint die Infiltration des ZNS durch Monozyten aus dem Blut hochrelevant für die Progression der EAE zu sein.⁷⁶ Nach der Induktion der EAE steigt die Zahl CD11b⁺CCR2⁺Ly6C⁺⁺ Monozyten im Blut stark an und fällt dort mit dem Symptombeginn ab, während am EAE-peak wiederum

im ZNS eine stark erhöhte Zellzahl zu finden ist. Die Autoren schließen aus der Korrelation von klinischem Score und der Zahl o.g. Zellen im ZNS, dass diese pathogenetisch relevant sind.⁷⁷ Tierexperimente legen nahe, dass Makrophagen myelomonozytärer Herkunft wichtiger für die Pathogenese der Multiplen Sklerose sein könnten als Mikroglia, da erstere in der EAE immunaktiviert und letztere immunsupprimiert sind.⁷⁸ Es bleibt zu erwähnen, dass Ly6G neg. CD11b⁺ Monozyten eine supprimierende Funktion mit anti-entzündlicher Wirkung haben können.⁷⁹ Die funktionelle Charakterisierung monozytärer Zellsubtypen ist noch nicht abschließend erfolgt. Mäuse mit konstitutiver NF- κ B-Aktivierung zeigen eine deutliche Verschlechterung der EAE, die mit einer T-Zell-unabhängigen, merklich erhöhten Zahl von aktivierten monozytären CD11b⁺ Splenozyten einhergeht.⁴⁶ Dies ist ein weiterer Beleg für die Pathogenität von myelomonozytären Zellen in der EAE und der Multiplen Sklerose.

1.7 Therapie der Multiplen Sklerose

1.7.1 Aktuelle Therapieoptionen

Die aktuelle Therapie der Multiplen Sklerose besteht aus der Therapie im Schub und der Basis- sowie der Eskalationstherapie. Im Schub werden Kortikosteroide hochdosiert (Methylprednisolon 1000 mg/d) für 3-5 Tage verabreicht, wobei die Verabreichungen *per os* und intravenös äquivalent sind.⁸⁰ Zur Basistherapie der schubförmigen Multiplen Sklerose (RRMS) sind sowohl Glatirameracetat, ein synthetisches Polypeptid, sowie Interferon- β , ein rekombinantes Zytokin, empfohlen. Die beiden subkutan verabreichten Medikamente haben eine vergleichbare Wirksamkeit und ein Therapiewechsel zwischen den beiden o.g. bei Unwirksamkeit ist häufig effektiv.⁸¹ Die Eskalationstherapie besteht aus hocheffektiven Therapeutika, die allerdings ein umfangreiches Nebenwirkungsprofil besitzen. Natalizumab ist ein humanisierter Antikörper aus der Gruppe der α -Integrine, der gegen *very-late-antigen-4* auf T-Zellen, Monozyten und Granulozyten gerichtet ist und deren Einwanderung ins Hirnparenchym unterbinden kann.⁸² Vor allem die Progressive Multifokale Leukenzephalopathie limitiert als Komplikation den Einsatz von Natalizumab trotz seiner starken Wirksamkeit. Fingolimod blockiert als Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoragonist die Evasion von Immunzellen aus dem Lymphknoten, wodurch eine deutliche Schubreduktion erfolgt.⁸³ Für die Therapie der SPMS sind wenige Medikamente wirksam und zugelassen wie z.B. Mitoxantron,⁸⁴ das auch in der RRMS zur Eskalation eingesetzt wird. In der PPMS beschränkt sich die Therapie auf Versuche mit Cyclophosphamid und Steroiden; eine nachgewiesenermaßen wirksame Behandlung existiert

nicht.⁵⁹ Wichtig ist zudem die Erwähnung von partiellen Therapieerfolgen mit Rituximab, einem Anti-CD20 Antikörper, u.a. in der RRMS. Ausreichende Evidenz für die Therapie der Multiplen Sklerose mit Rituximab ergibt sich bislang nicht, eine Rolle von B-Zellen in der Pathogenese scheint aber naheliegend.⁸⁵

Die aufgeführten Therapiestrategien sind hocheffektiv in ihren anti-inflammatorischen Eigenschaften und führen zu einer Schubreduktion (s.o.) oder können die Konversion von Clinically Isolated Syndrome (CIS) zu definitiver Multipler Sklerose verzögern.⁸⁶ Eine Wirkung der MS-Therapie auf die Progression ist nicht sicher nachgewiesen und wird z.B. bei Interferon- β und GA vermutet.⁸⁷ Dimethylfumarat, ein kürzlich in der Multiplen Sklerose zugelassenes Therapeutikum, wirkt möglicherweise neuroprotektiv über eine Reduktion von oxidativem Stress.⁸⁸ Neuroprotektive Ansätze sind vielversprechend, wobei die klinische Evaluation der Wirksamkeit laut Goodin und Kollegen u.a. wegen der teilweise nicht ausreichenden Länge von Therapiestudien schwierig ist. Die Frage nach geeigneten Surrogatparametern für die Schädigung von Neuronen wird vor der tatsächlichen Untersuchung neuroprotektiver Wirkstoffe zu klären sein, wobei einige Marker vielversprechend sind.⁸⁹ Die Untersuchung des Potentials antioxidativ wirksamer Medikamente in der MS-Behandlung erfordert zudem verlässliche Marker für oxidativen Stress.

1.7.2 Therapie der Zukunft – EGCG als Neuroprotektivum

Eine größere Anzahl von epidemiologischen Daten legen seit längerem einen Zusammenhang zwischen dem Konsum von grünem Tee und einer verringerten Risiko von Krebserkrankungen wie beispielsweise dem Magenkarzinom nahe.⁹⁰ Daten in autoimmunen Konditionen zeigen eine anti-inflammatorische Wirkung von Grünteeextrakt.⁹¹ Epidemiologische Daten lassen auch einen positiven Einfluss auf das ZNS vermuten, nachdem der Konsum von grünem Tee mit einer besseren kognitiven Funktion assoziiert ist.⁹² Die Effekte von grünem Tee – so beispielsweise seine antioxidativen Eigenschaften – lassen sich wesentlich dem Polyphenol Epigallocatechin Gallat (EGCG) zuschreiben.⁹³ Das Grünteeextrakt EGCG scheint anti-inflammatorische sowie antioxidative Eigenschaften zu besitzen und steht im Verdacht, in verschiedenen Konditionen neuroprotektiv zu wirken.⁹⁴ Neben der bislang üblichen Gewinnung von EGCG (s. Abb. 3) durch Extraktion aus grünem Tee ist mittlerweile die Synthese gelungen.⁹⁵

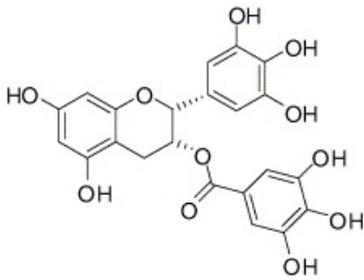


Abb. 3: EGCG

Struktureller Aufbau von Epigallocatechin Gallat.⁹⁶

EGCG zeigt eine anti-inflammatorische Wirkung auf Phagozyten.⁹⁷ Es könnte sich um einen verzögerten Effekt von EGCG auf Expressionsebene handeln, da die Faktoren NRF2 und NF- κ B beeinflusst werden.⁹⁸ Auch unmittelbare Effekte von EGCG werden diskutiert und sind für diese Arbeit von besonderer Relevanz. Es bleibt zu betonen, dass die antioxidative Wirkung von EGCG auf Leukozyten dosis-abhängig in pro-oxidative und damit nachteilige Effekte umschlagen kann.⁹⁹ EGCG hat bei oraler Aufnahme unterdessen eine deutliche Verbesserung der Experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) unter Beweis gestellt – sowohl der EAE-score als auch der entzündliche Schaden im ZNS werden durch EGCG wirksam bekämpft.¹⁰⁰

Die Plasmakinetik von EGCG wurde in gesunden Probanden mit Dosen von 50 bis 1.600 mg untersucht und ergab Spitzenkonzentrationen im Plasma von 130 bis 3.392 ng/ml 1,3 bis 2,2 h nach oraler Aufnahme.¹⁰¹ Dabei war EGCG sicher und wurde bei rascher Resorption gut toleriert. 800 mg oral pro Tag wurden auch über einen Zeitraum von vier Wochen gut vertragen und für sicher befunden.¹⁰² Allerdings sollte eine mögliche Hepatotoxizität von EGCG beachtet werden.¹⁰³ Angesichts der vorklinischen Daten sowie den Erfahrungen in gesunden Probanden liegt es nahe, die explizite Wirkung von EGCG in der Multiplen Sklerose zu erforschen und sein Potential als Neuroprotektivum zu bestimmen. Hierzu werden u.a. die Daten aus den Placebo-kontrollierten Studien (Vgl. NCT00799890 sowie NCT01417312) mit oraler Gabe von EGCG in verschiedenen Formen der Multiplen Sklerose relevant sein.¹⁰⁴

1.7.3 Sozioökonomische Aspekte der Multiplen Sklerose

Die Multiple Sklerose verursacht hohe Kosten durch Therapie und indirekt für die Gesellschaft. In den USA lagen diese bei 34.000 \$ jährlich.¹⁰⁵ In Kanada hat sich gezeigt: je höher ihr EDSS und somit der Grad ihrer körperlichen Einschränkung, desto weniger Patienten gehen einer Arbeit nach.¹⁰⁶ Bei einem EDSS von 6 arbeiten so nur noch 5 % in Vollzeit. Insgesamt entstehen pro durchschnittlichem MS-Patienten mit einem EDSS 6 tatsächlich 51.608 \$ Behandlungskosten pro Jahr, im Unterschied zu 10.598 \$ bei einem EDSS 1 (Zahlen exklusive Schubkosten s.u.). Die Kosten durch MS-Patienten im Gesundheitssystem werden von den Autoren in Remissionskosten und Kosten im Schub unterteilt: in Remission entstehen dabei vor allem Kosten im ambulanten Bereich.¹⁰⁶ Zum Zeitpunkt der Studie waren Medikamente nicht wesentlicher Kostentreiber, was sich mit Interferon- β sowie neuartigen Antikörper-Therapien vermutlich verändert hat. Die Kosten durch neuere Medikamente wurden zum Zeitpunkt der Studie auf jährlich 13.000-22.000 \$ geschätzt. Im stationären Bereich entstehen jährliche Schubkosten von 3.113 \$, die bei unveränderter Schubtherapie auf einem ähnlichen Niveau geblieben sein könnten.¹⁰⁶ Interferon- β ist ein Beispiel einer effektiven MS-Therapie, deren Einfluss auf die Erkrankung gut studiert ist. So zeigen Daten aus Großbritannien, dass Interferon- β die Lebensqualität gemessen in *quality-adjusted life years* positiv beeinflusst.¹⁰⁷ Allerdings sind die Kosten pro vermiedenem Schub hoch, *ergo* ist die Kosteneffektivität gering. Das Beispiel illustriert, dass der Therapiestandard im Sinne o.g. gemessener Parameter verbesserungswürdig ist. Die Multiple Sklerose verursacht wie oben beschrieben abhängig vom Grad der Betroffenheit hohe Kosten. Eine verzögerte Krankheitsprogression könnte also durch einen Einfluss auf die Arbeitsfähigkeit die Kosten reduzieren, während die Lebensqualität deutlich steigt. Die Modifikation des Krankheitsverlaufs durch zukünftige Therapieansätze ist damit aus Sicht der Gesellschaft ein wichtiges Ziel wissenschaftlicher Bemühungen.

1.8 Ziel der Arbeit

Bislang lässt sich der progrediente Verlauf der Multiplen Sklerose bei einem unvollständigen Verständnis der Pathogenitätsfaktoren unzureichend therapieren. In der vorliegenden Arbeit soll daher die Rolle von oxidativem Stress im Krankheitsverlauf der Erkrankung untersucht werden. Trotz zahlreicher Belege für einen definitiven oxidativen Scha-

den im Zentralnervensystem von Patienten mit Multipler Sklerose ist der relevante Mechanismus in der Entstehung von oxidativem Stress weniger gut charakterisiert. Daher soll die Aktivierung von NADPH Oxidasen in der Multiplen Sklerose untersucht werden, um zu klären, ob diese ein pathophysiologisches Korrelat der Erkrankung bildet. Es soll insbesondere untersucht werden, ob und inwieweit sich die Aktivierung der NADPH Oxidasen im Verlauf verschiedener Krankheitsphasen verändert. Da Immunmechanismen im Alter teils erhebliche Veränderungen durchlaufen, soll auch der Einfluss des Lebensalters auf die Aktivierung von NADPH Oxidasen eruiert werden.

Bei verschiedentlichen Hinweisen auf eine positive Wirkung von Grünteeextrakt EGCG in Multipler Sklerose, sollte diese genauer untersucht werden. Dabei soll mit einer funktionalen Charakterisierung des EGCG-Effekts auf Immunzellen sein Potential als Neuroprotektivum ermittelt werden. *Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM)* ist eine in ihrer biomedizinischen Anwendung junge Methode und wird erst seit wenigen Jahren zur Detektion von oxidativem Stress angewandt. Daher erscheint die Validierung des experimentellen Aufbaus mit unterschiedlichen Methoden von höchster Wichtigkeit. Um ein Monitoring von neuroinflammatorischen Konditionen zu ermöglichen, muss FLIM von der bisherigen Anwendung weiterentwickelt werden, wozu im Folgenden Vorarbeiten angestellt werden. Mit FLIM soll in dieser Arbeit die Krankheitsaktivität in der Multiplen Sklerose detektiert werden, um künftig eine Verlaufsbeurteilung sowie eine Testung von Medikamenten auf molekularer Ebene zu ermöglichen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

In Abb. 4 ist der Aufbau für die Fluoreszenzmikroskopie-Versuche mit humanen Zellen verschiedener Probanden und Zellen in Kultur schematisch dargestellt. Nach vorherigen ZNS-Experimenten von Mäusen mit Experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE) *in vivo* werden die Monozyten/Makrophagen der Peripherie in allen Phasen/Formen der Multiplen Sklerose sowie in jeweiligen gesunden Kontrollen mit NAD(P)H FLIM untersucht. Für die Untersuchung der humanen CD11b⁺ Monozyten werden Blutproben von MS-Patienten verschiedener Krankheitsphasen sowie gesunder Kontrollprobanden aufgearbeitet. Kultivierte Zellen werden nach jeweiliger Behandlung wie die isolierten humanen Zellen in eigens dafür angefertigten Kammern mit dem Fluoreszenzmikroskop gemessen. Ein Teil der Patienten hat vor der Blutentnahme eine Behandlung wie EGCG oder Placebo erhalten.¹

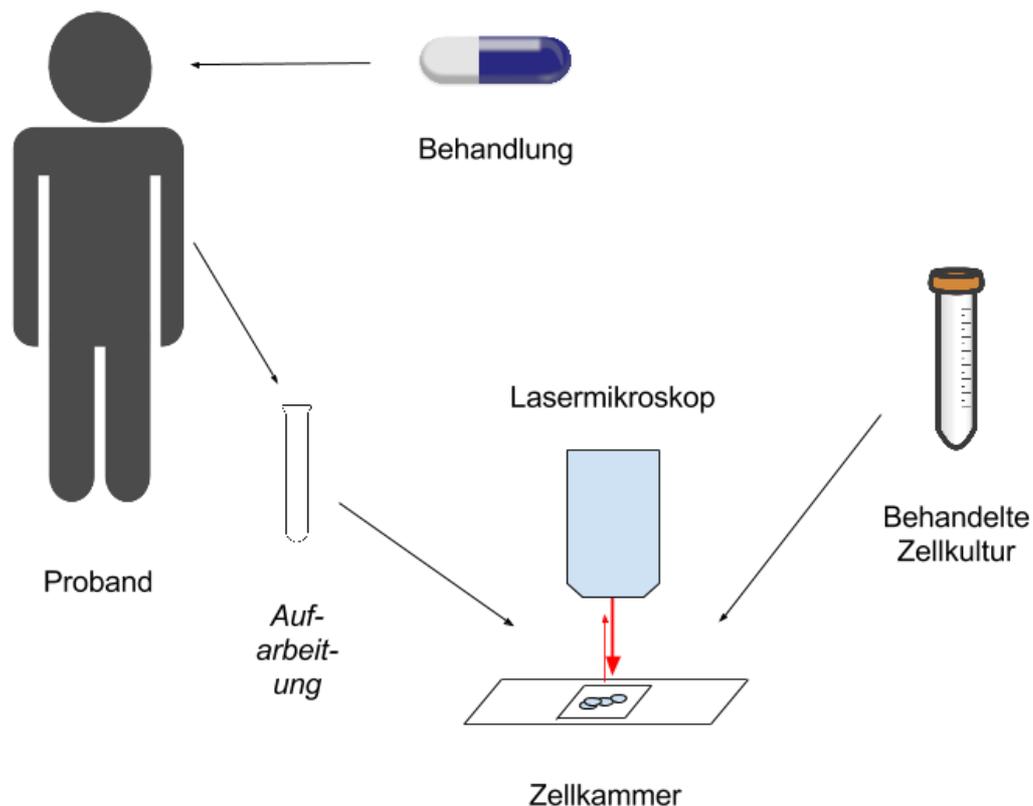


Abb. 4: Versuchsaufbau

Versuchsaufbau von NAD(P)H FLIM in extrahierten Zellen von Probanden und in kultivierten Zellen.

2.2 Laborartikel

2.2.1 Puffer

PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	Gibco In vitrogen, Karlsruhe
PBS/BSA	PBS	s.o.
	BSA	Serva, Heidelberg
FACS Puffer	PBS	s.o.
	0,5% BSA	s.o.
	0,5% NaN ₃	Merck, Darmstadt
MACS Puffer	PBS	s.o.
	0,5% BSA	s.o.
	EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.2.2 Medien

RPMI 1640	Zellkulturmedium mit 25mM HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
RPMI 1640 in der	Zellkulturmedium (s.o.)	Sigma-Aldrich, Steinheim
THP-1 Kultur	10% FBS	Sigma-Aldrich, Steinheim
	1% Pen/Strep	Thermo-Fisher, Waltham

2.2.3 Antikörper

CD11b human, Microbeads	Oberflächenmarker myeloider Zellen wie Monozyten/Makrophagen für MACS	Miltenyi, Bergisch Glad- bach
CD14	Marker für Monozyten/Makrophagen	DRFZ
CD45Ro	Auf THP-1 Zellen (s.u.)	DRFZ
CD62L	Auf THP-1 Zellen (s.u.)	DRFZ

2.2.4 Fluoreszenzfarbstoffe

Alexa 546	Gekoppelt an CD62L	DRFZ
FITC	CD45Ro	DRFZ
Alexa 647	CD14	DRFZ

2.2.5 Agenzien

EGCG	Antioxidans, >95 % Reinheit, gelöst in PBS	Sigma-Aldrich, Steinheim
PMA	Pro-oxidative Substanz, >99 % Reinheit, gelöst in DMSO und verdünnt mit PBS	Sigma-Aldrich, Steinheim s.o.
AEBSF	Serinprotease-Inhibitor mit antioxidativer Wirkung durch Hemmung von NADPH Oxidasen, gelöst in PBS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rotenone	Komplex-I-Inhibitor der mitochondrialen Atmungskette, wirkt antioxidativ in Hypoxie-Versuchen, >95 % Reinheit	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.3 Zellen

2.3.1 CD11b⁺ Monozyten

In der untersuchten Kohorte sind gesunde Probanden, Patienten mit RRMS, SPMS, CIS eingeschlossen.¹ Die Probanden sind soweit möglich *alters-* und *geschlechtsgematcht*. Der klinische Status wurde mittels EDSS erhoben. Die SPMS Patienten haben unterschiedliche Behandlung, die anderen Patienten erhielten GA und/oder EGCG 600 mg pro Tag oder Placebo (s. Tabelle, dort unter keine Behandlung). Die MS-Studie erfolgte in Kooperation mit der Hochschulambulanz für Neuroimmunologie der Charité unter Leitung von Prof. Friedemann Paul; s. NCT00799890 sowie NCT01417312.¹⁰⁸ Alle Proben sind nach umfangreicher Aufklärung und im vollen Einverständnis der Probanden erfolgt. Wie der Tabelle zu entnehmen, sind die Probanden im Durchschnitt 43 (RRMS), 33 (CIS), 39 (gesunde Kontrollen) und 50 Jahre alt (SPMS).

Tabelle 1: Patientenproben

Kohorte	Geschlecht (w/m)	Alter (J.)	Dauer der Erkrankung (M.)	EDS	Schub in den letzten 12 M.	NOX Aktivierungsfläche (%)		
						GA	GA+EG CG	Keine Behandlung
RRMS	w	43	73	3.5	2	10.85	6.36	
	w	49	73	3.0	0	6.04	6.95	
	w	42	77	4.0	1	14.3	4.8	
	w	34	57	3.5	1	12.38		
	w	55	208	2.5	0	11.85		
	m	49	10	0	1		8.31	
	w	44	28	3.5	0	9.56	5.34	
	w	38	31	2.5	1		6.75	
	w	29	114	3.5	3			19.37
	w	60	43	2.5	1			17.48
	w	32	19	2.0	1			14.72
	m	33	77	2.0	0			16.88
	w	44	132	2.5	0			19.51
	w	45	50	1.5	2			21.93
CIS	m	33	5	0	1			3.46
	w	32	6	1.0	1			4.58
	w	47	5	2.5	1			2.73
	w	26	3	2.0	1			2.13
	w	28	5	1.0	1			5.08
Gesunde Kontrollen	m	22						3.59
	w	26						3.77
	m	53						3.89
	w	52						3.79
	m	28						3.31
	w	50						2.02

Ko- horte	Ge- schlec ht (w/ m)	Alter (J.)	Dauer der Krankheit (M.)	EDSS	Schub in- nerhalb der letzten 12 M.	NOX (%)	Aktivierungsfläche
SPMS	m	58	153	6.0	0	10.83	
	w	54	336	2.5	0	13.09	
	m	33	123	6.5	0	16.59	
	m	53	360	3.5	0	15.17	
	m	49	203	6.5	0	20.28	
	w	55	352	4.0	0	14.48	

Nach der vorsichtigen Blutentnahme in *cell preparation tubes* (BD, New Jersey) und mehrfachem Schwenken derselben wird in einem Zeitfenster von maximal 2 h mit der Aufbereitung der Zellen begonnen.¹⁰⁹ Zuerst werden die Röhrchen bei 1.800 rpm, 20 min zentrifugiert. Anschließend wird schrittweise die zellreiche Schicht auf PBS auf Eis pipetiert. Es folgen zwei Waschschrte mit PBS (500 x g, 5 min).

Die Zellsuspension wird gezählt und in MACS-Puffer aufgenommen. Es erfolgt eine Markierung mit CD11b *MACS-Microbeads* (Miltenyi, Bergisch Gladbach) für 20 min auf Eis.¹¹⁰ Die Menge an Antikörper-Lösung ist der Zellzahl angepasst. Nach einem Waschschrte zur Entfernung ungebundener Antikörper mit MACS Puffer wird die Zellsuspension in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen. Die MACS-Säule wird in ihrem Magneten positioniert und mit MACS-Puffer vorgewässert, dann die Zellsuspension vorsichtig darauf gegeben und nach dem Durchlaufen dreimalig mit 0,5 ml gespült. Schließlich wird die Säule aus dem Magneten gelöst und mit dem Stößel kräftig mit 1 ml MACS-Puffer durchgespült. Das Protokoll orientiert sich an der Literatur.¹¹¹ Die gewonnene Zellsuspension wird nun auf ihre Zellzahl untersucht und ein ausreichendes Volumen für die nachträgliche *FACS*-Kontrolle aufbewahrt.

Die isolierten CD11b⁺ Zellen werden in RPMI-Medium gewaschen (300 x g, 10 min) und in ein je nach Zellzahl variierendes Volumen des RPMI-Mediums aufgenommen, sodass

später eine optimale Zelldichte in der Kammer besteht (zumeist 100 μ l). Es wird aus einem Objektträger und einem Deckgläschen mittels einer flüssig-heißen Bienenwachs-/Vaseline-Mischung (Verhältnis ca. 5:1) eine Kammer für die Zellsuspension vorbereitet. Die Zellen können nun in die Kammer gegeben werden und diese wird abgedichtet. Eine lichtmikroskopische Kontrolle bestätigt, dass die Zellen gleichmäßig verteilt sind. Die Zellkammer wird nun für 30 min bei 37 °C inkubiert und steht danach für die Messung zur Verfügung.

Nach dem Experiment wird eine Kontrolle mittels FACS durchgeführt. Dazu wird der aufbewahrte Teil der Zellen nach einem Waschschrift in FACS-Puffer aufgenommen (300 x g, 10 min). Die Markierung erfolgt mit CD14, CD16, CD11b im Verhältnis der Volumina Zellsuspension : Antikörpermenge = 100 : 1. Nach einer Inkubation auf Eis von 20 min wird die Lösung gewaschen und der Überstand verworfen. Die Kontrolle dient der Sicherstellung der Reinheit des MACS-Vorgangs. Neben der Kontrolle der Oberflächenmarker bietet später der Phänotyp der Zellen in der Mikroskopie einen Nachweis über den Erfolg der Sortierung.

2.3.2 THP-1 Zelllinie

Zur Etablierung der Antikörpermarkierung werden Zellen vom Typ THP-1 verwendet.¹¹² Dies ist eine leicht zu kultivierende humane, monozytäre Zelllinie eines Leukämiepatienten. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in RPMI 1640, 10 % FBS, 1 % PenStrep, CO₂ 5%. Die Zellen werden nativ gemessen oder mit Antikörpern markiert. U.a. erfolgte eine Behandlung mit Aktivatoren der NADPH-Oxidasen wie PMA (s.o.). Die Messung wurde in geeigneten Gefäßen wie *microscopic petri dishes* oder *8-well plates* am 2-Photonen-Mikroskop durchgeführt. Zur Markierung werden die Antikörper für die Dauer von 20 min auf Eis bzw. im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Anschließend werden nach einem Zentrifugationsvorgang (300 x g, 10 min) ungebundene Antikörper im Überstand entfernt. Die Kontrolle über den Erfolg der Fluoreszenzfärbung erfolgt mittels einer gleichzeitigen Detektion von in der Probe gemischten gefärbten und ungefärbten Zellen in der Einzelphotonen-Mikroskopie. Über den Kontrast des Fluoreszenzfarbstoffs kann damit schließlich das FLIM-Signal den gefärbten und ungefärbten Zellen zugeordnet werden. Gleichmaßen ist auch der potentielle Einfluss der Antikörpermarkierung auf das FLIM-Signal zu eruieren. Fluoreszenzfarbstoffe werden nach ihrer Anregbarkeit mit dem verfügbaren Laser und den verschiedenen Messkanälen ausgesucht. Da die Autofluoreszenz im blauen

Kanal die Detektion der Farbstoffe beeinträchtigen würde, sind diejenigen Farbstoffe ausgewählt worden, die Licht in den Kanälen *green*, *red* und *far-red* emittieren (u.a. Alexa 488, Alexa 546, Alexa 647, Alexa 660, Alexa 700, PE, Cy5, FITC). Die Antikörper wurden passend zum Antigenexpressionsprofil der THP-1 Zellen nach Herstellerangabe ausgesucht (u.a. CD14, CD45Ro, CD45RA, CD62L, HLA-DR, CD71; s.o. für die Antikörper-Markierung). Die Hypoxie-Experimente wurden mit einer Hypoxie-Kammer (UCI, LFD) durchgeführt, die 4 min mit einem 5 % CO₂, 1 % O₂, 94 % Stickstoff-Gasgemisch geflutet wird. Danach wird die Kammer luftdicht verschlossen und für die Dauer von 36 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Kammer geöffnet und die Zellen werden in eine luftdichte *Imaging*-Kammer übertragen und bis zum Zeitpunkt der Messung inkubiert.

2.4 Fluorescence lifetime imaging microscopy – FLIM

2.4.1 Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie

Für das Verständnis der Fluoreszenzmikroskopie ist wichtig, die für eine Messung relevanten Elemente zu kennen (s. Abb. 5).

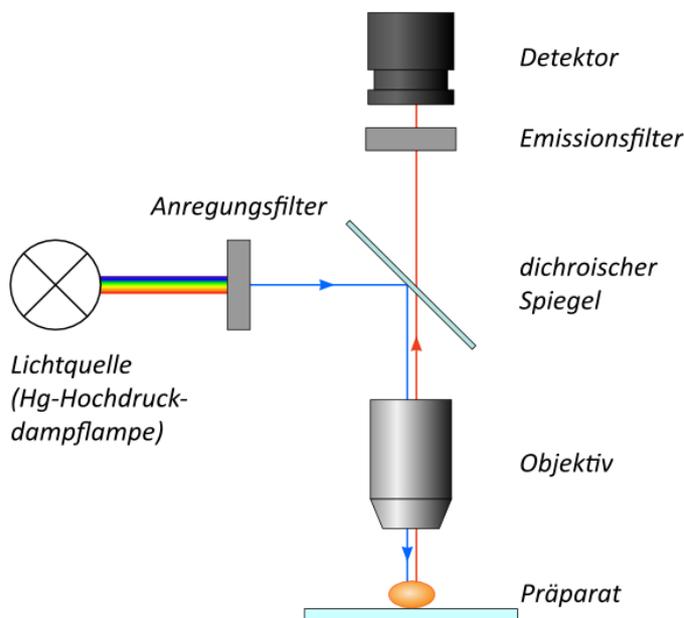


Abb. 5: Das Fluoreszenzmikroskop

Grundlegender Aufbau der Fluoreszenzmikroskopie. *Quelle Uni Göttingen (s. Text)*

Prinzipiell gibt es in der Fluoreszenzmikroskopie eine Lichtquelle, die auf ein Präparat gerichtet ist. Dieses Präparat besitzt fluoreszierende Eigenschaften durch den Aufbau von Molekülen, Zugabe eines Farbstoffs oder Expression eines Proteins. Der Laserstrahl vermag bei genauer Einstellung das Absorptionsspektrum bzw. -maximum des Fluorophors zu treffen und dadurch anzuregen. Die Anhebung des Farbstoffs auf ein höheres Energielevel entlädt sich in der Emission von Licht einer entsprechend größeren Wellenlänge und geringerer Energie im Vgl. mit dem auf die Probe eintreffenden Laserstrahl: auch bekannt als *Stokes-Shift* (s. Abb. 6). Mit einem geeigneten Photodetektor kann das Signal gemessen und anschließend digital aufbereitet werden.¹¹³

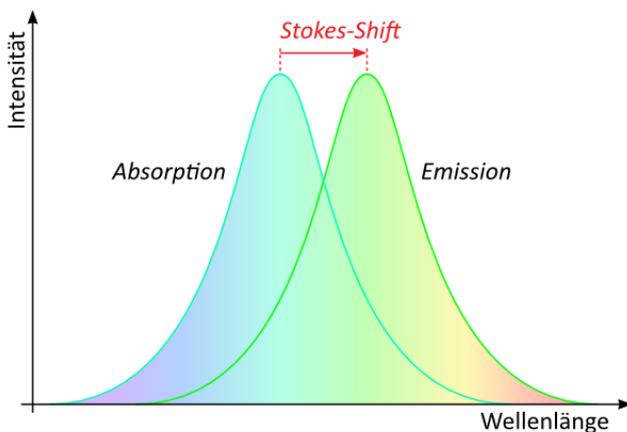


Abb. 6: Stokes-Shift

Stokes-Shift als Differenz aus Absorptions- und Emissionsmaxima. *Quelle Uni Göttingen* (s. Text)

Ein Anregungsfilter lässt selektiv nur bestimmte Wellenlängen passieren; dieser wird bei monochromatischen Lasern nicht benötigt. Unter Ablenkung mit einem dichroischen Spiegel wird das Anregungslicht im Objektiv gesammelt und zum Präparat gelenkt. Die Emission des Präparats passiert aufgrund ihrer höheren Wellenlänge den dichroischen Spiegel in Richtung des Detektors. Der Emissionsfilter ist lediglich für einen Teil des Spektrums durchlässig, damit nur das gewünschte Signal zum Detektor gelangt.¹¹³

Seit der Erfindung des Mikroskops sind Fortschritte in der optischen Physik beträchtlich und haben die biomedizinische Forschung mit dem Verständnis von Pathomechanismen revolutioniert.¹¹⁴ Mit modernen mikroskopischen Methoden gelingt heutzutage eine extreme Vergrößerung von untersuchtem Material, sodass mittlerweile Prozesse lebender Zellen im Nanometer-Bereich visualisiert werden können.¹¹⁵

2.4.2 Besonderheiten der Zweiphotonenmikroskopie

Die Zweiphotonenmikroskopie funktioniert im Gegensatz zur o.g. Methode mittels eines gepulsten Lasers konstanter Wellenlänge als Lichtquelle, d.h. mit einem diskontinuierlichen Lichtstrahl. Das kann je nach Gerät beispielsweise ein Titan-Saphir Laser sein, der durch präzise Schwingungen gepulstes Licht im Bereich von Femto-Sekunden generiert. Die monochromatischen Laserstrahlen treffen in dichter Folge nacheinander auf das Präparat und regen bei entsprechender Wellenlänge den Fluorophor an. Das Signal der Emission wird anschließend vom Detektor registriert und digital aufgezeichnet wie oben beschrieben. Besonderheit der Zweiphotonenmikroskopie gegenüber der *Single-Photon-Microscopy* ist, dass nur in der Fokusebene mit hoher Wahrscheinlichkeit zwei Photonen gleichzeitig eintreffen. Da sich die Energie beider Photonen addiert, wird der Fluorophor also im Fokus mit ausreichender Energie angeregt. Die Exposition der umliegenden Teile der Probe ist geringer, wodurch Phototoxizität und damit ein Ausbleichen der Probe reduziert werden.¹¹⁶

2.4.3 FLIM – Abklingverhalten von Fluoreszenzfarbstoffen

Zusätzlich zur Höhe der Intensität erhalten wir bei der Detektion Informationen zur Dauer der Fluoreszenz. Dabei kann der Abfall der Fluoreszenz vereinfacht mit folgender Gleichung beschrieben werden: $I(t) = \alpha e^{-\frac{t}{\tau}}$.¹¹⁷ Hierbei ist α die Intensität der Fluoreszenz bei Zeitpunkt $t = 0$, t die Zeit nach der Absorption, τ die definierte Lebensdauer, d.h. die Zeit nach der die Intensität auf $\frac{1}{e}$ oder 37 % abgefallen ist, vorausgesetzt, dass vor der Absorption $I(t) = 0$. Doch der komplexen Umgebung mit mannigfaltigen Einflussfaktoren werden für FLIM in der Auswertung nur höhere Annäherungen gerecht (s.u.).

2.4.4 Messung von NAD(P)H mit FLIM

NAD(H) und NADP(H) sind komplexe Moleküle, die als Koenzyme von Redoxreaktionen des Stoffwechsels in allen lebenden Zellen des Körpers vorkommen. In Abb. 7 ist die Molekülstruktur der über Phosphatgruppen gekoppelten Nukleotide Adenin und Nicotinamid nachzuvollziehen. Unterschied zwischen NAD(H) und NADP(H) ist eine Phosphatgruppe am Riboserest; in der vorliegenden Arbeit werden beide Moleküle aufgrund ihrer ähnlichen Fluoreszenzeigenschaften als NAD(P)H zusammengefasst.

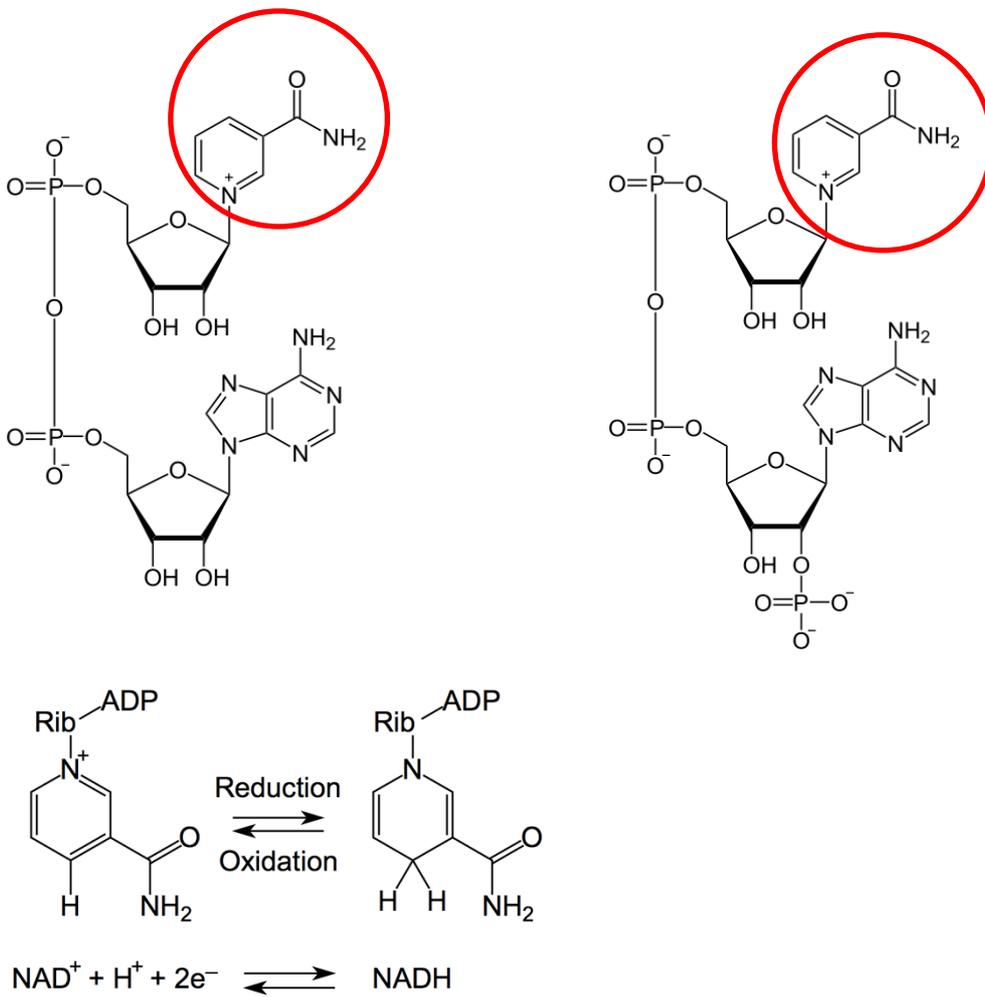


Abb. 7: Aufbau von NAD(P)H

NAD⁺ (l.o.) und NADP⁺ (r.o.); Redoxreaktion des Moleküls (u.). Im Kreis befindet sich die fluoreszierende Komponente.¹¹⁸

Ausschließlich im hydrierten Zustand kann das fluoreszierende NADH – wie gleichfalls NADPH (NAD⁺ und NADP⁺ sind jedoch nicht fluoreszent) – im UV-Bereich mit einem Absorptionsmaximum bei 340 nm angeregt werden (s. Abb. 8); das Emissionsmaximum von NADH (wie auch NADPH) liegt bei 460 nm.¹¹⁹ Anders als die Messung der Intensität von Fluorophoren ist die Lebensdauer-Messung von NAD(P)H in Lösung wie in Zellen konzentrationsunabhängig und benötigt daher keine Kalibration.¹²⁰

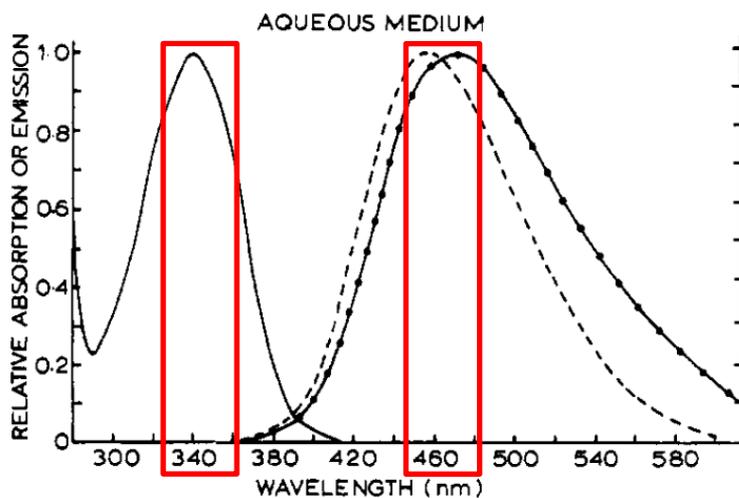


Abb. 8: Einzelphotonen-Absorptions- und Emissionsspektrum von NADH

Absorptions- und Emissionsspektren von NADH mit Markierung der Maxima in Single-Photon-Microscopy. Absorptionsspektrum (-); technisches Emissionsspektrum (- - -); korrigiertes molekulares Emissionsspektrum (-.-.-). *Bildquelle s. Text*

Im beschriebenen Versuchsaufbau wird die Probe mit zwei Photonen angeregt, sodass die Eigenschaften von NAD(P)H in der Zweiphotonenmikroskopie kurz beschrieben werden. Wie in Abb. 9 zu sehen, fällt die Absorption von NAD(P)H in Zweiphotonenmikroskopie von 700 bis 800 nm exponentiell ab.¹²¹ D.h. eine Messung bei 760 nm Anregung (Berlin, DRFZ) oder 740 nm (UCI, LFD) eignet sich zur gezielten Anregung von NAD(P)H.

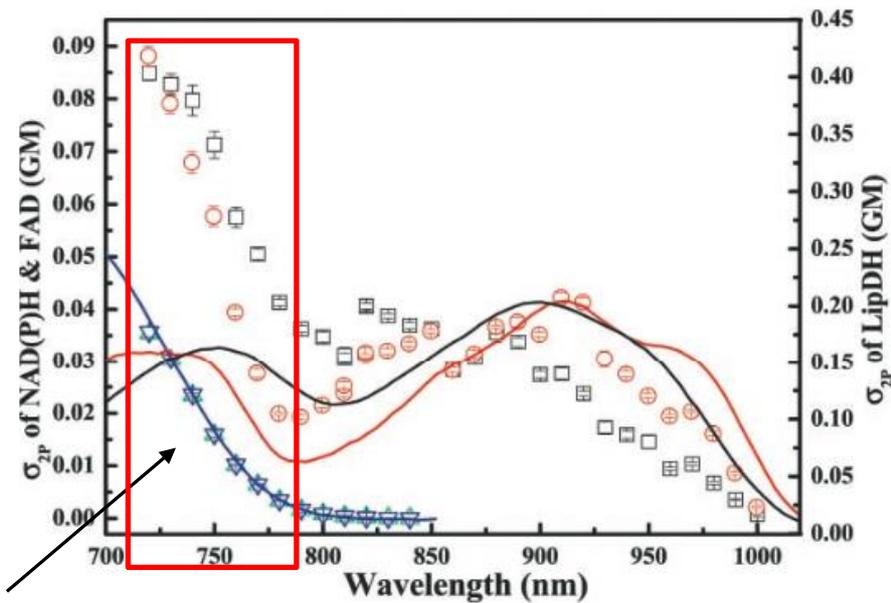


Abb. 9: Zweiphotonen-Absorptionsspektrum von NAD(P)H

Absorptionsspektren von NADH (grüne Dreiecke *n. oben*) und NADPH (blaue Dreiecke *n. unten*) in der Zweiphotonenmikroskopie; mit schwarzem Pfeil und rotem Kasten hervorgehoben. Im Vergleich dazu sind andere Autofluorophore wie FAD (schwarze Rechtecke) und LipDH (rote Kreise; *rechte Achse*) dargestellt. Die Absorptionsspektren in Single-Photon-Microscopy von NADH (blaue Linie), FAD (schwarze Linie), und LipDH (rote Linie) sind zum Vgl. ebenfalls abgebildet. *Bildquelle siehe Text*

Die Anregung von NAD(P)H mit Zweiphotonenmikroskopie besitzt ein Emissionsmaximum im blauen Bereich nahe 460 nm (bei Anregung mit 730 nm), wie in Abb. 10 nachzuvollziehen ist.¹²¹ Die Emission von NAD(P)H bei Anregung mit Zweiphotonenmikroskopie entspricht also weitgehend der Anregung mit *Single-Photon-Microscopy* (s.o.).

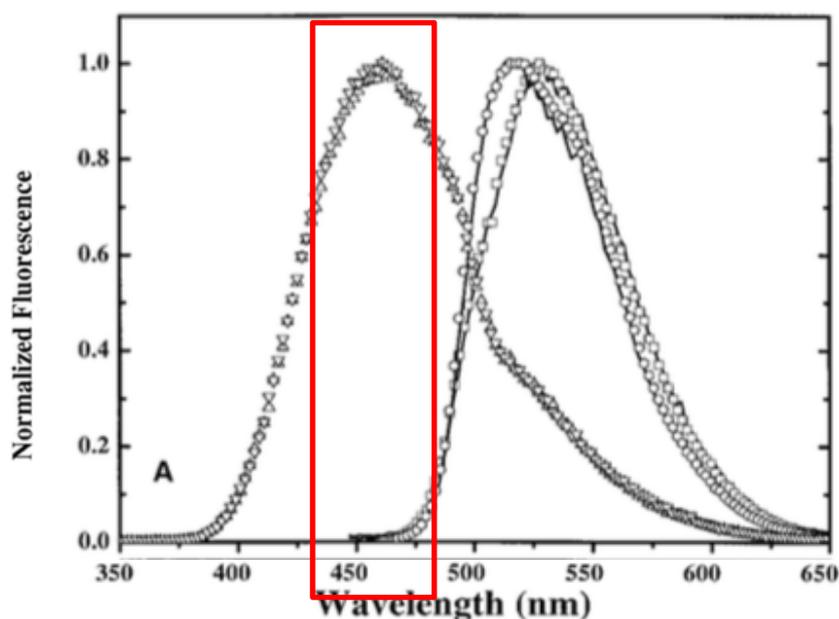


Abb. 10: Zweiphotonen-Emissionsspektrum von NAD(P)H

Die Zweiphotonenmikroskopie-Emissionsspektren von NADH (Dreieck n. oben; s. Markierung) und NADPH (Dreieck n. unten) emittieren im blauen Bereich nahe 460 nm Anregung. FAD und LipDH rechts im Graphen zum Vergleich. *Bildquelle siehe Text*

Durch die Anregung im roten Bereich mit Zweiphotonenmikroskopie ist die Eindringtiefe des Laserlichts größer und beispielsweise Gewebe kann gut penetriert werden.¹ Zudem vermeidet die Zweiphotonenanregung von NAD(P)H die Verwendung von UV-Licht, wie dies bei Ein-Photon-Anregung nötig wäre (Vgl. Anregungsspektrum in Abb. 8). UV-Licht ist in der Tat für die Induktion von Schäden durch Generation von oxidativem Stress bekannt.¹²² Es ist daher anzunehmen, dass die Verwendung von UV-Licht die Detektion von oxidativem Stress und somit die folgenden Experimente verfälschen könnte.

2.4.5 Detektion der NADPH-Oxidasen-Aktivierung

Die Unterscheidung von freiem und an das Enzym Malat-Dehydrogenase gebundene NAD(P)H anhand seiner Fluoreszenzlebensdauer mittels FLIM ist gut dokumentiert¹²³. Daten unserer Gruppe zeigen (s. Abb. 11), dass die Bindung von NAD(P)H an unterschiedliche Enzyme die Fluoreszenzlebensdauer spezifisch verändern kann.¹ Die beschriebenen Messungen sind in Lösung erfolgt, was für die als Multi-Enzym-Komplex in Assoziation mit Membranen funktionierende NADPH Oxidase nicht durchführbar ist. Ein

Einfluss der Enzymstruktur auf die Fluoreszenzlebensdauer von NAD(P)H wurde schon vormals berichtet.¹²⁴

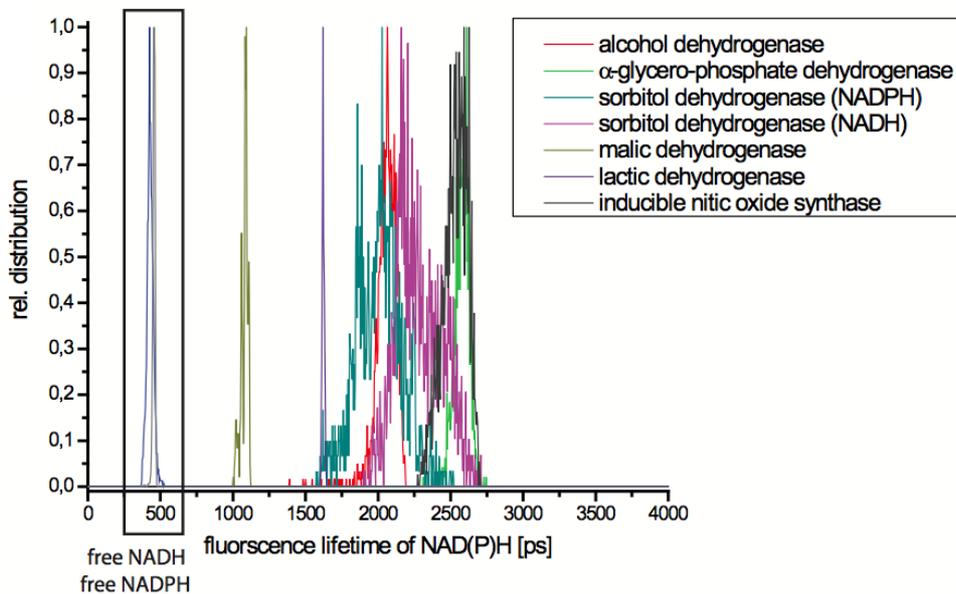


Abb. 11: Fluoreszenzlebensdauer von NAD(P)H

Messungen von NAD(P)H in Lösung frei (in Abb. mit Kasten hervorgehoben) und unter Zugabe verschiedener Enzyme. *Quelle s. Text*

Daten von diversen Zelltypen belegen eine mit 3,6 ns deutlich verlängerte Fluoreszenzlebensdauer von NAD(P)H bei Aktivierung der NADPH Oxidase. Dieses Signal einer längeren Fluoreszenzlebensdauer ist reversibel durch Zugabe von NADPH-Oxidase-Inhibitoren wie AEBSF. Somit lässt sich in Zellen und Geweben die Aktivierung der NADPH-Oxidase unter Verwendung von FLIM mit Zweiphotonenmikroskopie messen.¹²⁰

2.4.6 Imaging – Systeme in Berlin (DRFZ) und UCI (LFD)

System Berlin (DRFZ)

Die FLIM-Experimente wurden mit einem speziellen Zweiphotonen Laser-Mikroskop mit kommerziellem *Scanning System* durchgeführt (TriMScope, LaVision BioTec, Bielefeld). TCSPC detektiert mit Hilfe einer ultraschnellen Photodiode selektiv diejenigen Photonen, die zeitlich an die Laserpuls-Emissionen gekoppelt im Detektor eintreffen. Neben der hier beschriebenen und in den Experimenten verwendeten zeitkorrelierten Messung gibt es den Ansatz einer phasen-modulierten FLIM-Analyse. Diese nutzt – anders als der gepulste Laser – eine sinusförmige Anregung der Fluorophore und misst die phasenverschobene Emission, um daraus die Fluoreszenzlebensdauer zu bestimmen.

Die Detektion des Fluoreszenzsignals wurde mit *photomultiplier tubes* in einem 16-Kanal parallelisierten TCSPC-Detektor (FLIM-X16, LaVision BioTec, Bielefeld) realisiert. NAD(P)H wurde bei 760 nm angeregt, während die Detektion mit Emissionsfiltern bei 460 ± 30 nm erfolgte. Für die Messung von Intensität und Fluoreszenzlebensdauer wurde eine durchschnittliche maximale Laser-Power von 8 mW verwendet, um Phototoxizität zu vermeiden. Die experimentellen Parameter für FLIM umfassten einen Histogramm-*bin* von 160 ps für NAD(P)H-FLIM. Das Zeitfenster, innerhalb dessen das Abklingen der Fluoreszenz gemessen wurde, setzten wir auf 9 ns. Für die FLIM-Datenanalyse wurden selbstgeschriebene Programme verwendet (Python, R Niesner), die auf der Grundlage von Levenberg-Marquardt Algorithmen für nichtlineares *Fitting* agieren (s.u.). Der Versuchsaufbau ist in Gänze publiziert.¹

Zur Messung wird nach dem Einschalten und Überprüfen der Gerätschaften und Software, sowie einem Testlauf mit definiertem Fluorophor, mit dem Experiment begonnen. Dazu wird die Zellkammer aus dem Inkubator auf einer Heizplatte mit 37 °C gebettet. Die Ebene, auf der die Zellen zum Liegen gekommen sind, wird sorgfältig adjustiert. Es werden mehrere Aufnahmen von repräsentativen Arealen der Zellkammer angefertigt, so dass eine absolute Zahl von circa 100 Zellen pro Proband/Patient erreicht wird. Nach dem Experiment werden die Utensilien fachgerecht entsorgt.

In Abb. 12 sind links monozytäre Zellen in der Intensitätsdarstellung von NAD(P)H zu sehen.¹ Die Abklingkurve zeigt nach Laser-Anregung das Fluoreszenzsignal und wie über die Zeit weniger Photonen-Counts registriert werden. Die abgebildete Gleichung nach Levenberg-Marquardt hält beim *Fitting* die übrigen Parameter konstant, um die Fluoreszenzlebensdauer τ_2 zu ermitteln, unter der zulässigen vereinfachten Annahme, τ_1 entspräche dem Abklingensignal des freien NAD(P)H. Die biexponentielle Analyse approximiert also mit *Fitting* in jedem einzelnen Pixel die Lebensdauer der fluoreszierenden Komponenten.¹²⁵ Im rechten Bild ist in einer Farbkodierung das NAD(P)H-FLIM-Signal dargestellt. Werte über 3.300 ps gehen auf die NADPH-Oxidase-Aktivierung zurück und werden rot angezeigt.¹

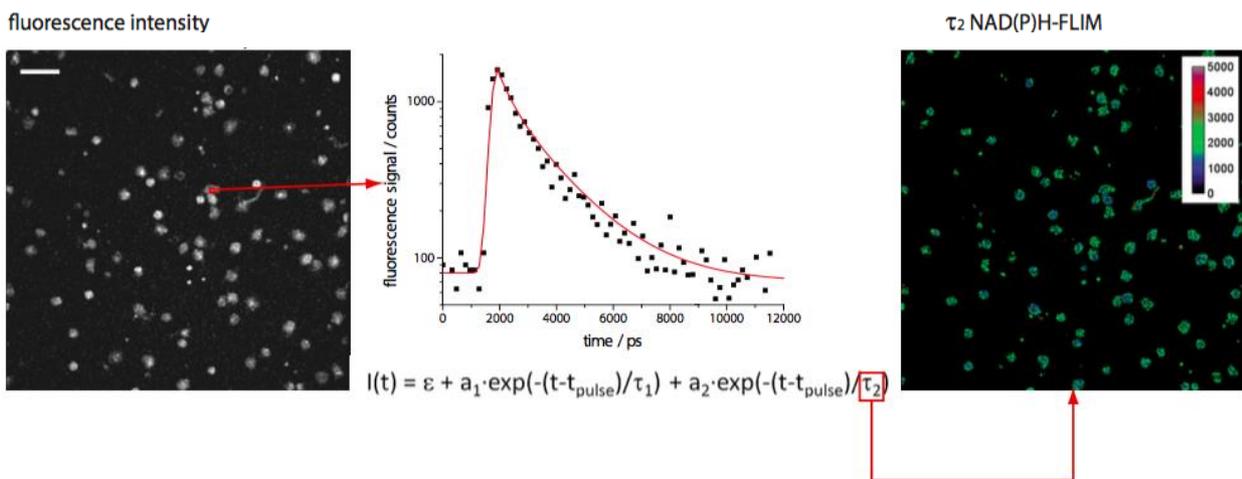


Abb. 12: Biexponentieller Ansatz der FLIM-Auswertung

Darstellung der Auswertung von NAD(P)H-FLIM-Daten; l. Intensitätsbild, Mitte Abklingkurve, darunter Gleichung nach Levenberg-Marquardt, r. farbliche Darstellung von τ_2 mit Lebensdauerlegende. *Bildquelle im Text*

Abb. 13 demonstriert die Diskrimination von aktivierten und nicht-aktivierten Zellen anhand ihrer NADPH-Oxidasen-Werte: ein „NOX-only“ gate mit Werten von 3.300 bis 3.900 ps garantiert eine hohe Selektivität.¹ Diese Ausführungen bilden die Grundlage der Datenauswertung der Experimente in Berlin (DRFZ) – im Ggs. zu den Daten, die mit UCI (LFD) gekennzeichnet sind. Die Auswertung erfolgt mit Python (programmiert von R Niesner) und ImageJ (Open Source, Java). Es erfolgt eine Kontrolle der Zellen nach Größe und Morphologie, sodass kein Zelldebris, Lymphozyten oder andere Verunreinigungen das Ergebnis beeinflussen. Die Aktivierung der zellulären NADPH Oxidasen in % wird für die jeweiligen experimentellen Gruppen gesammelt und schließlich im Vergleich mit Kontrollgruppen statistisch getestet (s.u.).

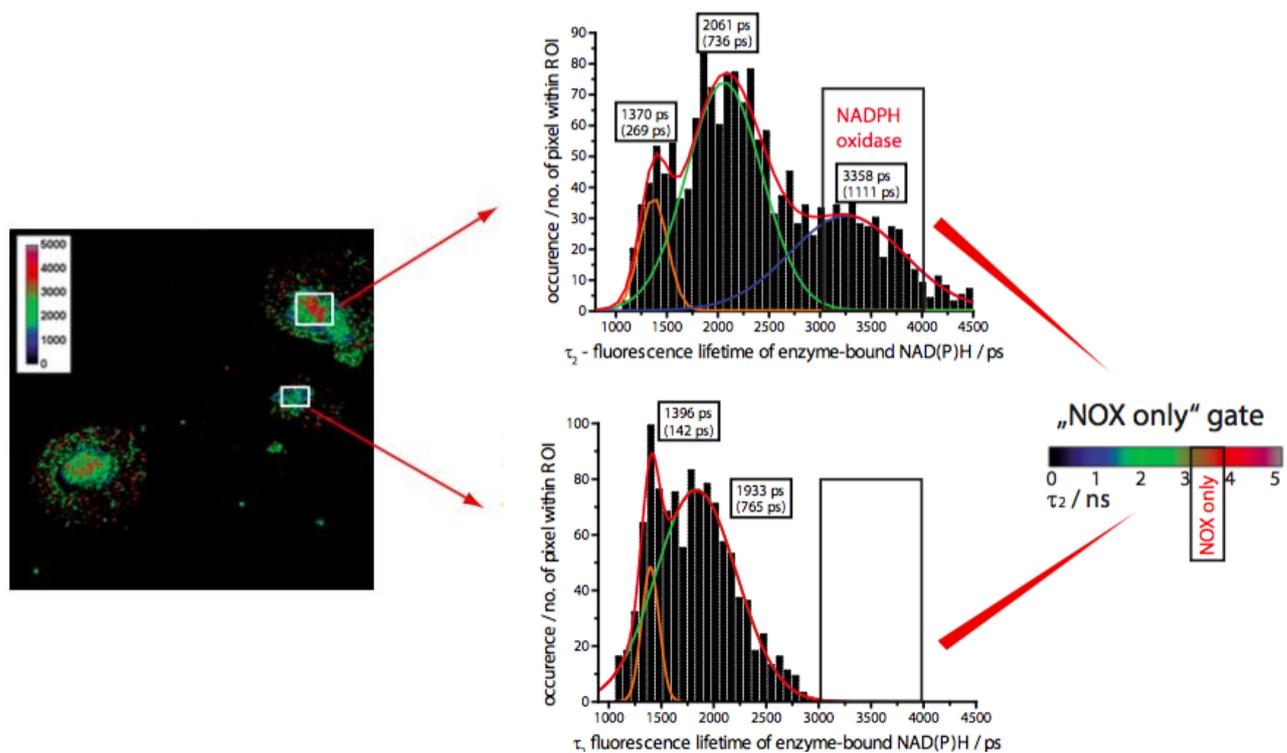


Abb. 13: NAD(P)H-FLIM zur Aktivitätsmessung

NAD(P)H-FLIM zur Unterscheidung von Zellen mit aktivierter und solchen mit nicht-aktivierter NADPH Oxidase. L.: bildliche Darstellung von τ_2 ; Mitte: Histogramme der oberen und unteren Zelle zeigen die Fluoreszenzlebensdauer des Enzym-gebundenen NAD(P)H in der *region of interest*, wobei im „NOX-only“ gate der unteren Zelle kein Signal zu sehen ist. *Bildquelle im Text*

System UCI (LFD)

Die Daten von der University of California, Irvine sind an einem Zeiss 710 Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) aufgenommen worden. Das System funktioniert mit einem Titanium:Sapphire MaiTai Laser (Spectra-Physics, Mountain View, CA). Die Anregung erfolgt bei 80 MHz. Die Daten werden mit einer ISS A320 FastFLIM FLIMBox (ISS, Champaign, IL) aufgenommen. Es handelt sich bei dem Aufbau um einen GaAs PMT (H7422P-40, Hamamatsu, Japan) und um ein Objektiv mit 40 x und 1.2 NA (Carl Zeiss, Oberkochen). Die *Power* wurde auf ~ 5 mW konstant gehalten. Die Aufnahmen wurden mit einer *Pixel dwell time* = 25 μ s und einer Bildgröße von 256 x 256 Pixeln angefertigt. Zur FLIM-Anregung wurde 740 nm gewählt und die Emission mit 460 ± 40 nm gefiltert; die genaue Beschreibung der Messung findet sich veröffentlicht.¹²⁶

Die Datenakquise und Auswertung erfolgte mit SimFCS software (LFD, UC Irvine) auf der Grundlage des *Phasor-approach*. Die Ergebnisse von der UCI (LFD) sind daher gemäß der Beschreibung der Autoren in *Phasor-Plots* dargestellt.¹²⁷ Vor der Messung erfolgt eine Kalibration mit einem Fluorophor bekannter Lebensdauer wie Rhodamin 110 (FL = 4 ns), um einen Referenzwert für die aufzunehmenden Daten zu erhalten. Anschließend wird die Lebensdauer von jedem Pixel eines aufgenommenen Bildes nach Gratton *fit-frei* im *Phasor-Plot* zur Darstellung gebracht. Die Messung selbst erfolgt durch das Auflegen der Probe in den auf 37 °C vorgeheizten Inkubator des Mikroskops. Manuell wird die zellreiche Ebene eingestellt und schließlich werden einzelne Zellen aufgenommen.

Die Gruppe um Gratton hat die NAD(P)H FLIM-Detektion zur Untersuchung metabolischer Zustände in zellulären Systemen validiert. Somit lässt sich das Verhältnis von freiem und enzymgebundenem NAD(P)H bestimmen und darüber Aufschluss über einen tendenziell glykolytischen Stoffwechsel gegenüber Zuständen mit mehrheitlich oxidativer Phosphorylierung in Zellen bestimmen.¹²⁸ Kürzlich hat die Gruppe auch oxidativen Stress mit FLIM detektieren können, dessen Signal sie oxidierten Lipiden zuschreibt.¹²⁶ Die Autoren haben mittels Raman-Spektroskopie die Existenz oxidierter Lipide in membranären Strukturen nachgewiesen, die eine verlängerte Fluoreszenzlebensdauer mit FLIM zeigten. Daher gehen sie bei oxidativ gestresste Zellen mit einer im Phasor verlängerten Fluoreszenzlebensdauer vom monoexponentiellen Korrelat oxidierter Lipide aus (FL = 7,8 ns).

Oxidativer Stress wird im Phasor entsprechend seiner verlängerten Fluoreszenzlebensdauer linksseitig der normalen Zellpopulation abgebildet (Vgl. Abb. 14). In der Auswertung werden die Populationen von Photonen-Counts in der Phasor-Darstellung markiert. Gleichzeitig wird die Zellmorphologie und -markierung im Intensitäts-Bild kontrolliert. Dabei wird jede experimentelle Gruppe spezifisch gekennzeichnet, was anschließend den Vergleich unterschiedlicher Populationen ermöglicht. Die Resultate der jeweiligen Gruppen werden tabellarisch exportiert und gemäß der Hypothese statistisch getestet (s.u.). Im Schema sind die Grundlagen der Auswertung nachzuvollziehen, wobei eine längere Fluoreszenzlebensdauer linksseitig im Phasor mit einem veränderten Bindungsverhalten von NAD(P)H sowie einer Zunahme von oxidierten Lipiden einhergeht.

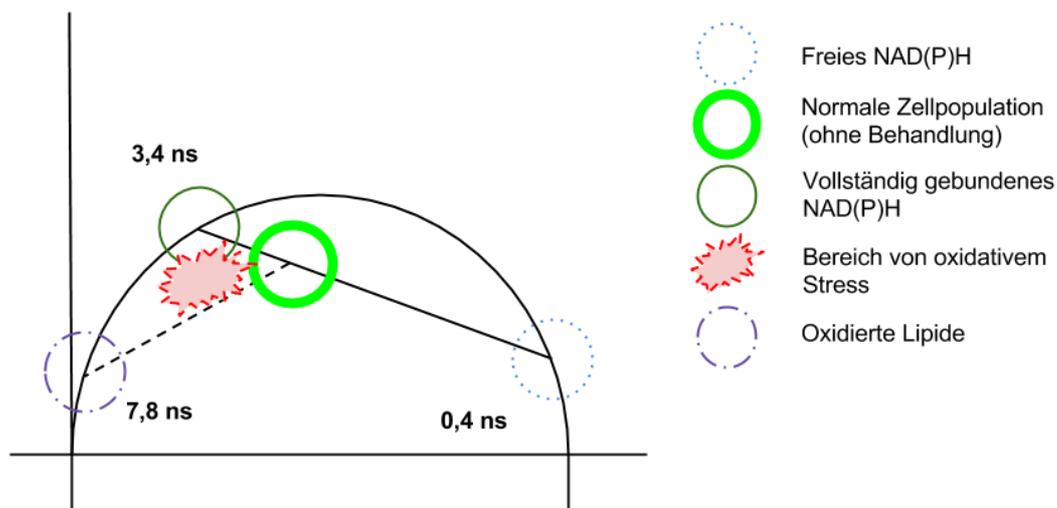


Abb. 14: Oxidativer Stress im Phasor

Schema der Phasor-Detektion von oxidativem Stress, die sich im Halbkreis links von einer normalen, nicht behandelten Zellpopulation darstellt, d.h. mit einer verlängerten Fluoreszenzlebensdauer.

2.5 Methodik zur Validierung der NAD(P)H FLIM-Daten in Patientenproben

2.5.1 Dihydrodichlorofluoreszein-Assay für Reaktive Sauerstoffspezies

Für den Assay wurde mit dem Detektions-Kit H2DCFDA (Thermo-Fisher, Waltham) nach Protokoll gearbeitet.¹²⁹ Die gesammelten Serum-Proben der RRMS-Patientenkohorte Placebo-behandelter und EGCG-behandelter Patienten wurden vorsichtig von -80 °C

aufgetaut. Anschließend wurde der Fluoreszenzfarbstoff bei Raumtemperatur mit den Proben vermischt. Die Messung des durch reaktive Sauerstoffspezies irreversibel in fluoreszierenden Farbstoff umgewandelten Reagens erfolgte umgehend im Fluorometer bei 488 nm Anregung.

2.5.2 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion der gp91phox-Expression

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurde mit SYBR green Reagenzien (Life technologies, Carlsbad) gemäß dem Protokoll durchgeführt.¹³⁰ Das *Housekeeper*-Gen GAPDH wurde als endogene Kontrolle verwendet. Mit Hilfe der komparativen Methode wurde cDNA von PBMCs nach reverser-Transkriptase-Reaktion zwischen Placebo-behandelten und EGCG-behandelten RRMS-Patienten verglichen. Primer wurden wie folgt verwendet; GAPDH, vorwärts: 5'-GCCTTCCGTGTTCCCTACC-3', rückwärts: 5'-GCCTGCTTCACCACCTTC-3'; gp91phox, vorwärts: 5'-CAGGAGTTCCAAGATGCCTG-3', rückwärts: 5'-GATTGGCCTGAGATTCATCC-3. Die Auswertung der Daten erfolgte doppel-blind.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und graphische Präsentation der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5 (Graphpad Software, USA) und Excel (Windows, USA). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD der Zellen in einem Probanden gezeigt. Zum Vergleichen der Gruppen wurden ANOVA und t-Test verwendet, dabei i.d.R. Gruppengrößen von 6 oder mehr. Bei identischen Subjekten wurde eine gepaarte Analyse durchgeführt (*paired* t-Test). Bei multipler Testung wurde die Bonferroni-Korrektur verwendet. Korrelationsanalysen wurden nach Pearson durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Monozytäre NADPH-Oxidasen-Überaktivierung in Multipler Sklerose

Vorherige Experimente zeigten eine NADPH-Oxidasen-Aktivierung von Monozyten/Makrophagen im ZNS bei symptomatischen Mäusen mit Experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis.¹ Eine neuronale Dysfunktion als Folge der NADPH-Oxidasen-Aktivierung konnte explizit nachgewiesen werden. Diese NADPH-Oxidasen-Aktivierung war ebenso in peripheren CD11b⁺ Monozyten messbar, die aus der Milz von aktiv erkrankten Tieren extrahiert wurden. Wir stellten die Hypothese einer monozytären NADPH-Oxidasen-Aktivierung außerhalb des ZNS in Multipler Sklerose auf. Um den Status der NADPH-Oxidasen-Aktivierung in der Peripherie zu erheben, analysierten wir Proben aus dem Vollblut.

NAD(P)H FLIM in CD11b⁺ Monozyten aus dem Vollblut von gesunden Probanden zeigt eine geringe Aktivierung der NADPH Oxidasen mit einem Mittelwert (MW) von 3,4 % bei einer Standardabweichung (SD) von 0,7. Um eine frühe Krankheitsphase in der Multiplen Sklerose zu charakterisieren, untersuchten wir Patienten mit einem Clinically Isolated Syndrome (CIS). Diese zeigen einen im Vergleich mit gesunden Probanden nicht signifikant unterschiedlichen Aktivierungswert bei MW 3,6 % (SD 1,23). In unbehandelten Patienten mit RRMS war in unseren Experimenten eine hohe Aktivierung der NADPH-Oxidasen mit MW 18,32 % (SD 2,5) feststellbar. Der Unterschied der unbehandelten RRMS-Gruppe zu gesunden Kontrollen fiel hochsignifikant mit $p < 0,01$ aus. Die RRMS-Patienten mit Standardtherapie GA unterscheidet sich signifikant mit $p < 0,05$ von den mit GA und EGCG behandelten RRMS-Patienten mit einem MW von 6,42 % (SD 1,25). Somit bewirkte EGCG im Vergleich mit Placebo eine signifikante Reduktion der NADPH-Oxidasen-Aktivierung in Patienten mit RRMS.

Die Gruppe der mit GA behandelten RRMS-Patienten zeigt Aktivierungswerte mit einem MW von 10,83 % (SD 2,83). Um nun die spätere Phase der Erkrankung zu analysieren, verwendeten wir Proben von MS-Patienten mit sekundär-progressivem Verlauf. Die untersuchten SPMS-Patienten zeigen eine NADPH-Oxidasen-Aktivierung von MW 15,07 % (SD 3,22).

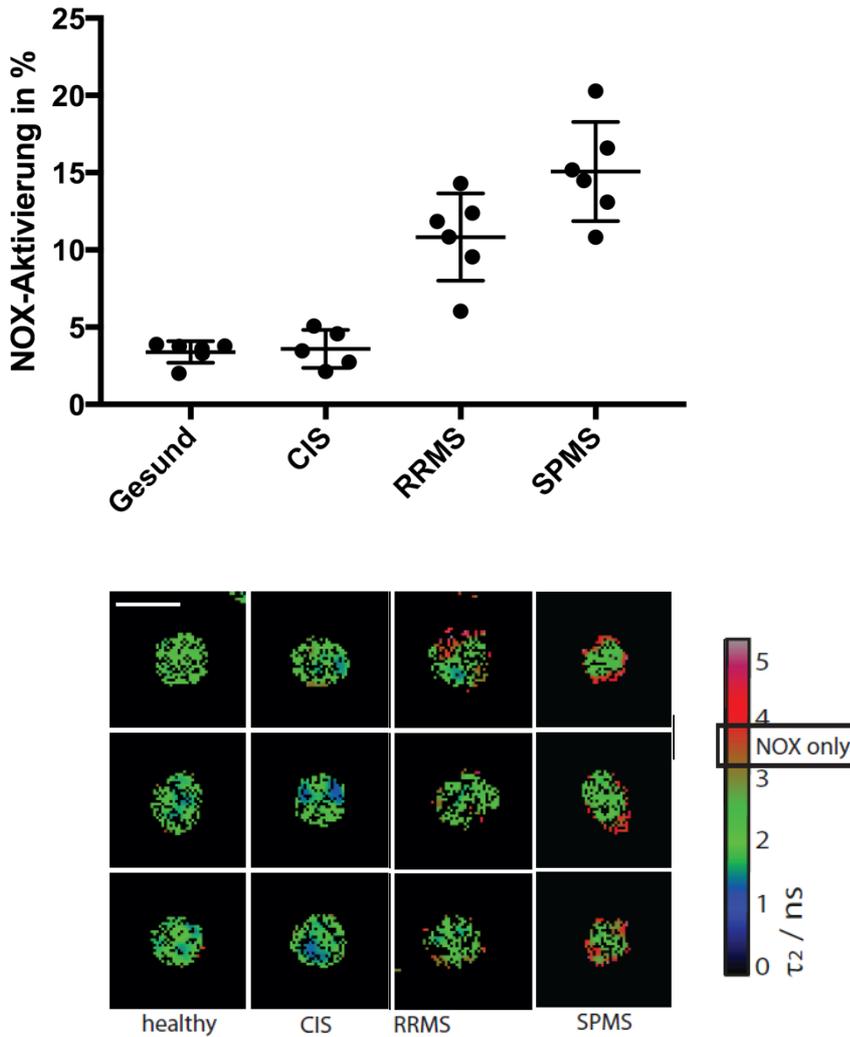


Abb. 15: NADPH-Oxidasen-Aktivierung in Multipler Sklerose

NADPH-Oxidasen-Aktivierung in CD11b⁺ Monozyten aus dem Vollblut gesunder Probanden und Patienten in verschiedenen Stadien der Multiplen Sklerose; Messung Berlin (DRFZ). CD11b⁺ Monozyten zeigen eine Stadien-abhängige NADPH-Oxidasen-Aktivierung in Multipler Sklerose: Gesunde Probanden und CIS-Patienten haben eine geringe nicht-signifikant unterschiedliche Aktivierung, die in der RRMS (mit Standardtherapie GA behandelt) signifikant ansteigt und in der SPMS nochmals ansteigt (Testung mit ANOVA). Graphisch dargestellt sind Mittelwert und SD, pro Patient mind. 50 gemessene Zellen. NADPH-Oxidasen-Aktivierung in rot; Maßstabsleiste 10 μm . *Anteilig veröffentlicht: Gesunde/RRMS in Promotion von A Mossakowski als Kontrollen verwendet sowie in gemeinsamer Publikation.¹*

Die mittleren Altersunterschiede der Gruppen untersuchter Probanden/Patienten sind teilweise signifikant – insbesondere die SPMS- und RRMS-Patienten liegen gemittelt sieben Jahre auseinander – und sollen daher im Folgenden als mögliche *confounder* weitergehend untersucht werden.

In Gesunden, in der Gruppe der CIS-Patienten sowie in der EGCG-behandelten Gruppe zeigen sich jeweils Aktivierungswerte unter 10 %. Sowohl unbehandelte RRMS- als auch SPMS-Patienten hingegen zeigen eine NADPH-Oxidasen-Aktivierung von über 10 %. Basierend auf unserer Analyse scheint es in der Multiplen Sklerose also einen Schwellenwert der NADPH-Oxidasen-Aktivierung bei circa 10 % zu geben. Diese Aktivierungsschwelle gilt es zukünftig mit größeren Datenmengen zu belegen und einen präzisen *cutoff* zu definieren.

Die Auftragung der NADPH-Oxidasen-FLIM-Werte gegen die klinischen Angaben des EDSS der Patienten zeigt eine Korrelation nach Pearson mit $r = 0,63$ bei einem Determinationskoeffizienten $r^2 = 0,39$. Die NADPH-Oxidasen-Aktivierung korreliert also mittelstark mit der Klinik der Multiplen Sklerose (Vgl. Abb. 16).

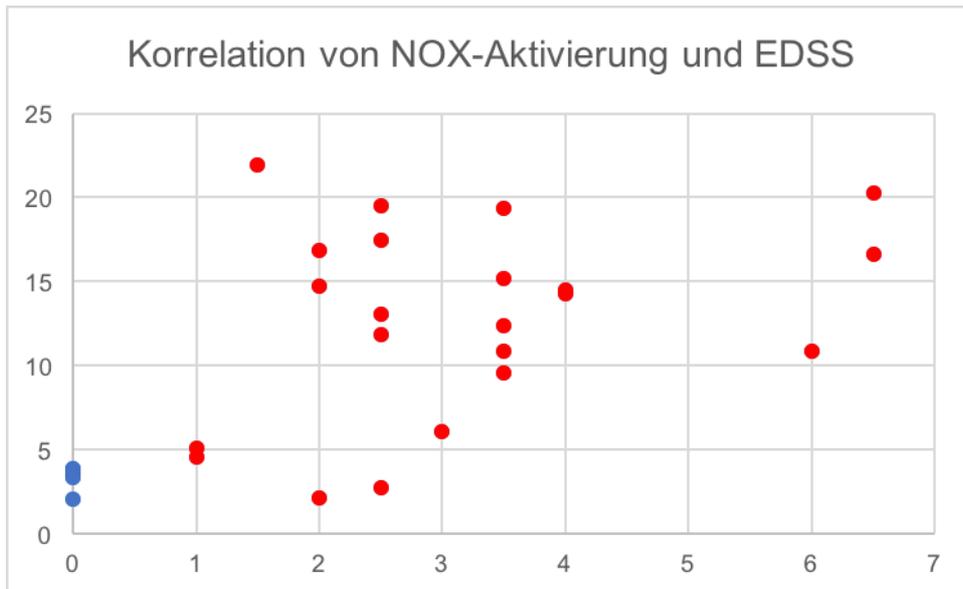


Abb. 16: NADPH-Oxidasen-Aktivierung und EDSS

Die y-Achse zeigt die NADPH-Oxidasen-Aktivierung in %. Die x-Achse repräsentiert den EDSS-Wert des jeweiligen Probanden. MS-Patienten sind rot hervorgehoben, blau gesunde Probanden; Messung Berlin (DRFZ).

3.2 Detektion verlängerter Fluoreszenzlebensdauern mittels Phasor

In Abb. 21 und 22 sind Versuche mit der monozytären Zelllinie THP-1 mit verschiedenen Auslösern für oxidativen Stress gezeigt. Die von der Gratton-Gruppe in anderen Zellen validierte Hypoxie-Behandlung zur Induktion von oxidativem Stress bewirkt auch in THP-1 Zellen eine relativ verlängerte Fluoreszenzlebensdauer (s. Abb. 21). Dies ist über eine veränderte Lage im Phasor-Halbkreis nachvollziehbar. Die Vorbehandlung mit AEBSF, einem NADPH-Oxidasen-Inhibitor, sowie Rotenon, einem Hemmer der mitochondrialen Atemkette, reduzieren bei 36-stündiger Hypoxie jeweils signifikant die Entstehung von oxidativem Stress ($p < 0,05$ t-Test), wie mit Phasor-FLIM gezeigt. AEBSF führt im Experiment zu einer deutlichen Verschiebung in Richtung freies NAD(P)H. Die starke Streuung der Phasor-Daten der mit Rotenon behandelten Zellen weist auf einen zellulären Schaden hin. Die Behandlung mit PMA 300 nmol/L, 1h Inkubation (s. Abb. 22) führte ebenso wie die Hypoxie-Behandlung zur Entstehung von oxidativen Stress in THP-1 Monozyten, wie hier mit Phasor-FLIM gezeigt ($p < 0,05$ t-Test).

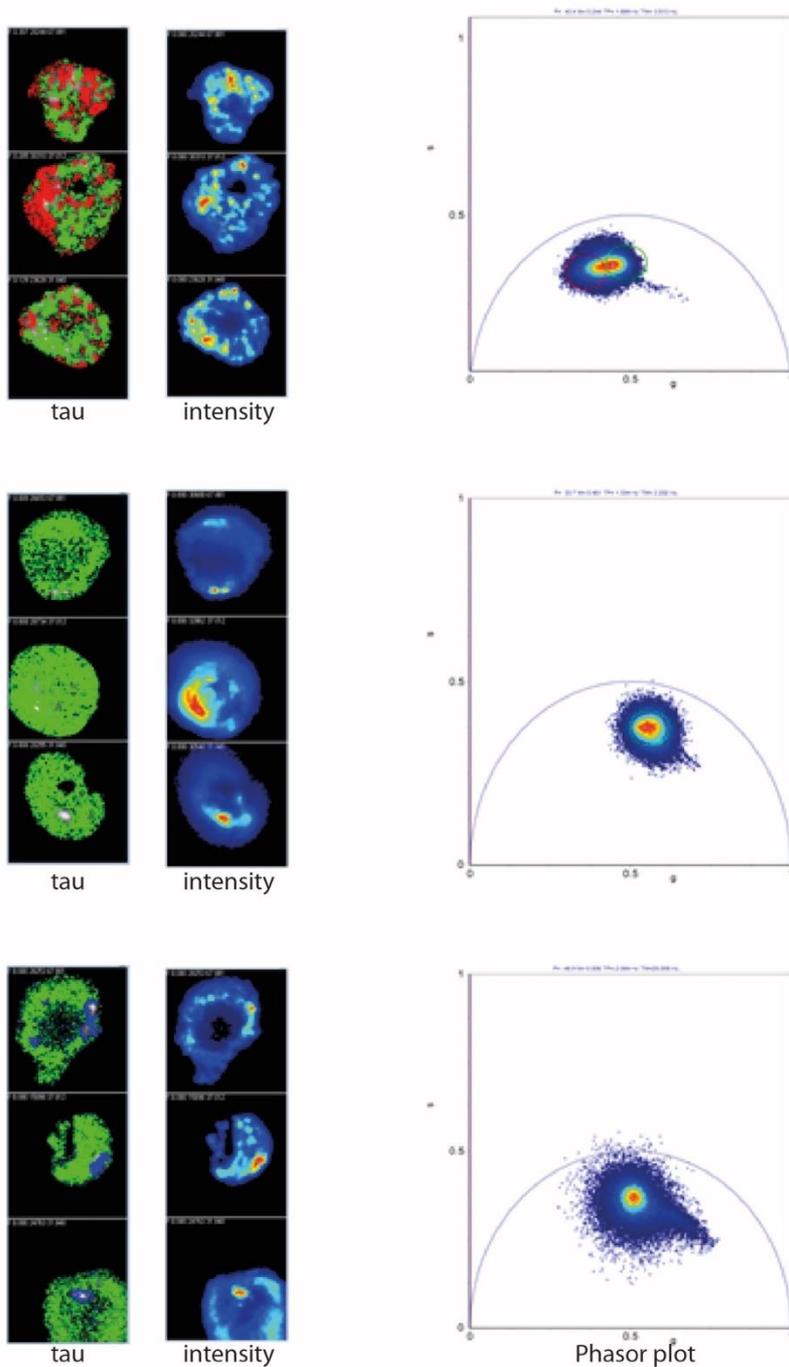


Abb. 17.1: NAD(P)H-FLIM in Hypoxie

THP-1 Zellen nach 36h Hypoxie. Bilder l.v.o.n.u.: unbehandelt, Behandlung mit AEBSF $300 \mu\text{M}$ (NADPH-Oxidasen-Inhibitor) und Rotenone $12,5 \mu\text{M}$ (Komplex-I-Inhibitor der mitochondrialen Atmungskette); es sind jeweils das Fluoreszenzlebensdauerbild (tau), das Intensitätsbild sowie rechts der Phasor-Plot abgebildet. Messung UCI (LFD). Maßstab $10 \mu\text{m}$.

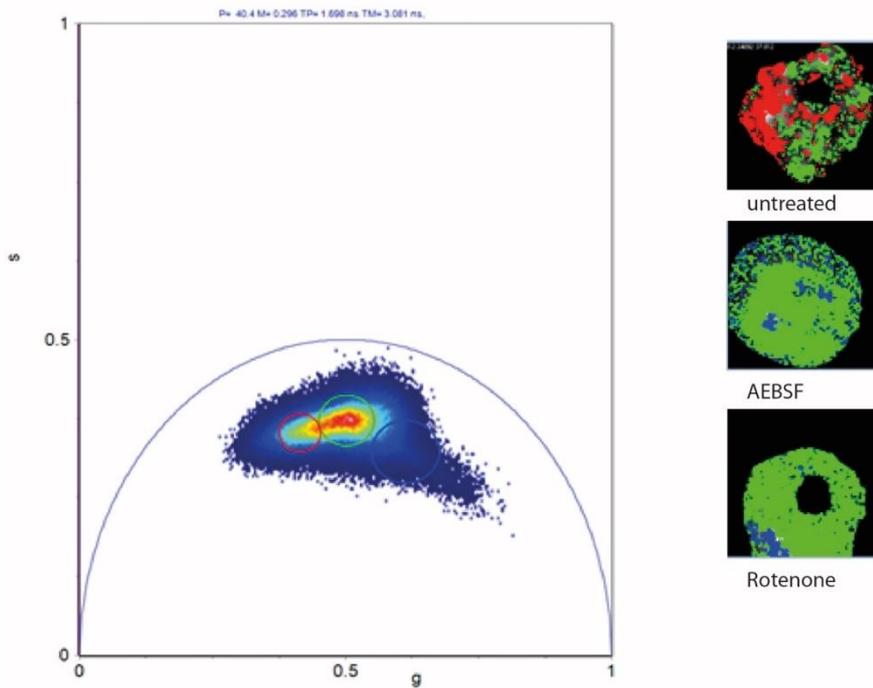


Abb. 17.2: NAD(P)H-FLIM in Hypoxie

THP-1 Zellen nach 36h Hypoxie in integrierter Darstellung. FLIM-Bilder r.v.o.n.u.: Unbehandelt, Behandlung mit AEBSF $300 \mu\text{M}$ (NADPH-Oxidasen-Inhibitor) und Rotenone $12,5 \mu\text{M}$ (Komplex I-Inhibitor der mitochondrialen Atemkette); es sind der Phasor-Plot sowie die Fluoreszenzlebensdauer-Darstellung gezeigt. Messung UCI (LFD). Maßstab $10 \mu\text{m}$, Unterschiede signifikant ($p < 0,05$).

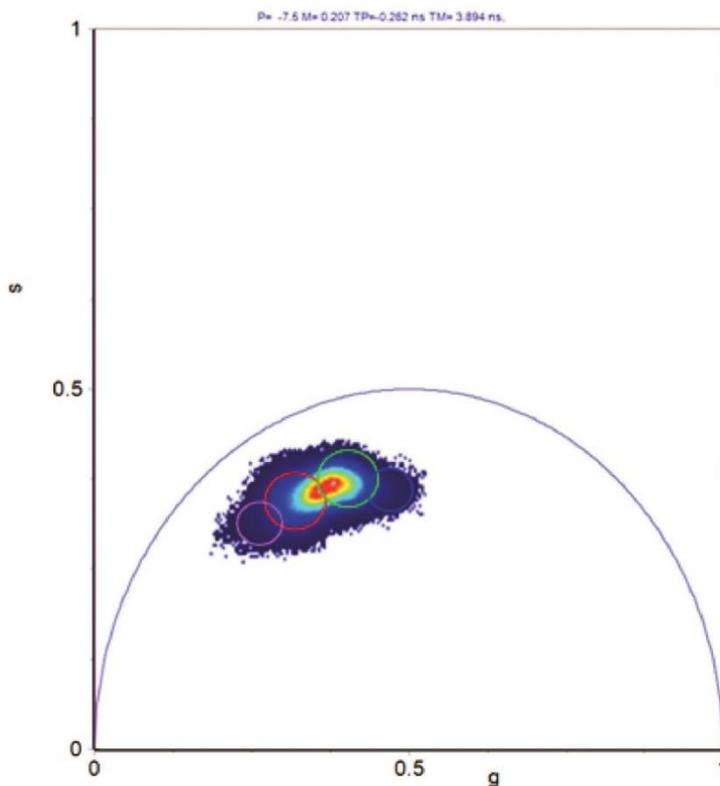
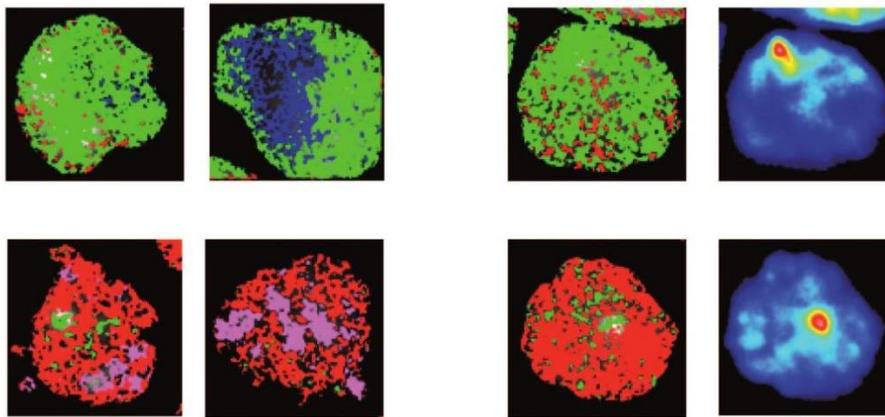


Abb. 18: NAD(P)H-FLIM in PMA-behandelten Zellen

THP-1 Zellen vor (grün) und nach (rot) 1h Inkubation mit 300 nmol/L PMA, Aktivator der NADPH Oxidasen; Messung UCI (LFD). Die behandelten Zellen zeigen einen *Shift* zu längerer Fluoreszenzlebensdauer als Kontrollen. Es sind die Fluoreszenzlebensdauer-Abbildung, die Intensitätsbild-Kontrolle sowie der Phasor-Plot gezeigt. Maßstab 10 μm ; Unterschiede signifikant ($p < 0,05$).

3.3 EGCG-Wirkung auf Monozyten im Phasor

Nach den Ergebnissen der EGCG-Studie in Multipler Sklerose (s.o.) stellt sich die Frage, ob eine direkte Wirkung von EGCG in Zellkultur objektivierbar ist. Zur Untersuchung der EGCG-Wirkung in vitro wurden THP-1 Zellen für 1 h mit 100 μ M EGCG behandelt, wie in Abb. 19 zu sehen (> 10 Z. pro Gr.). Der Anteil an freiem NAD(P)H nahm in den behandelten Zellen signifikant zu ($p < 0,05$ t-Test). Die Behandlung von Monozyten (s. Abb. 20) aus dem Vollblut von gesunden Probanden mit PMA und EGCG ließen den Marker für oxidativen Stress im Phasor verglichen mit reiner PMA Behandlung verschwinden (> 10 Z. pro Gr.). Zudem führte die gleichzeitige EGCG-Behandlung zu einer signifikanten Erhöhung des Anteils von freiem NAD(P)H ($p < 0,05$ t-Test).

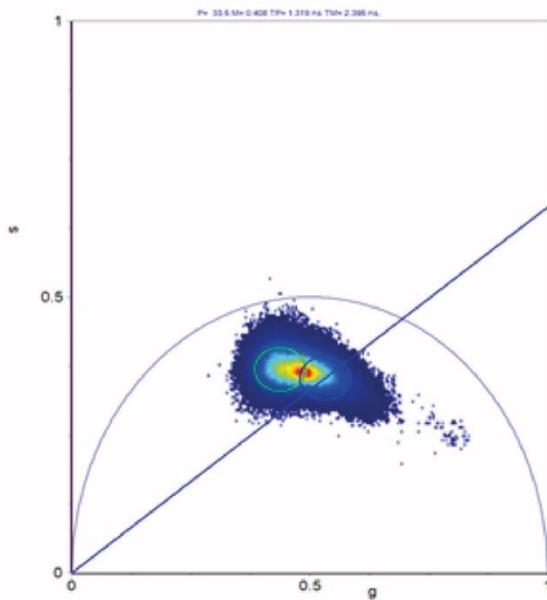
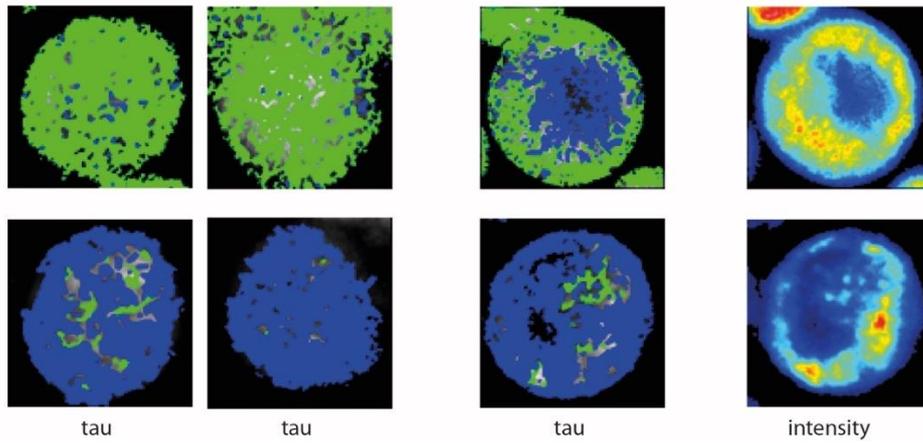


Abb. 19: EGCG-Wirkung in Monozyten

THP-1 Zellen vor (grün) und nach (blau) 1 h Inkubation mit EGCG 100 μM ; Messung UCI (LFD). Die behandelten Zellen zeigen einen *Shift* zu mehr freiem NAD(P)H als Kontrollen. Maßstab 10 μm . Es sind das Fluoreszenzlebensdauerbild (tau), die Intensitätsdarstellung und der Phasor-Plot gezeigt. Maßstab 10 μm ; Unterschiede signifikant ($p < 0,05$).

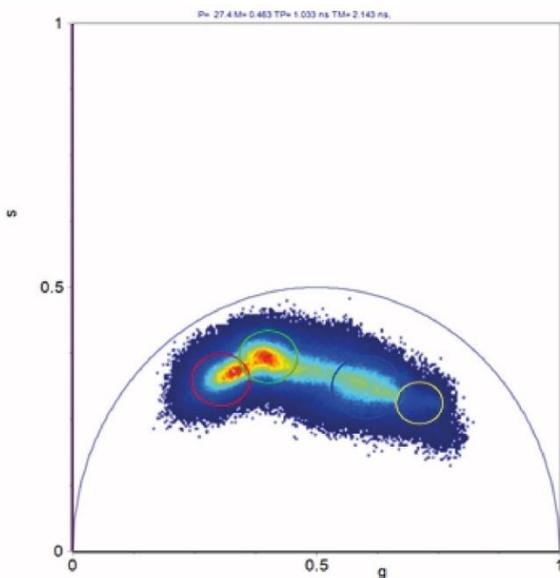
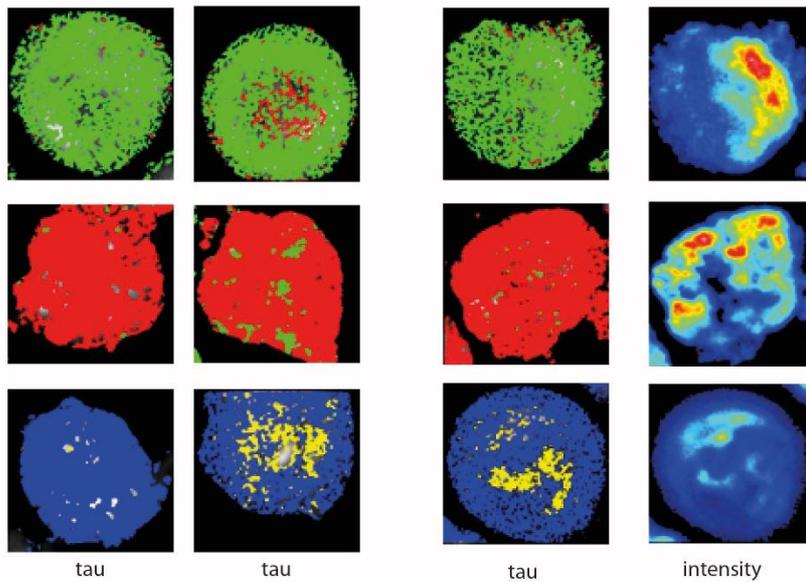


Abb. 20: Wirkung von EGCG in PMA-behandelten Monozyten

Monozytäre Zellen humaner PBMCs vor (obere Bildreihe), nach (mittlere Bildreihe) Behandlung mit PMA 300 nmol/L sowie nach Inkubation mit EGCG 100 μ M 1h und PMA gleichzeitig (untere Bildreihe); Messung UCI (LFD). Es sind die Fluoreszenzlebensdauer-Abbildung (tau), die Intensitätsdarstellung sowie der Phasor-Plot gezeigt. Maßstab 10 μ m; Unterschiede signifikant ($p < 0,05$).

3.4 EGCG – weitere Evaluation des Effekts

Der mit NAD(P)H-FLIM beobachtete Effekt von EGCG könnte direkt oder durch andere Faktoren vermittelt sein. Daher sollte untersucht werden, ob die Wirkung von EGCG in

der Multiplen Sklerose auf seine reduzierenden Eigenschaften zurückzuführen ist. Außerdem ist fraglich, ob die Behandlung mit EGCG die Menge der verfügbaren NADPH-Oxidasen in MS-Patienten herabreguliert hat. In Abb. 21 und 22 ist daher die Untersuchung der EGCG-Therapie der RRMS-Patienten mit den alternativen Methoden des DCF-ROS-Assay und der qPCR für die essentielle Untereinheit gp91phox der NADPH-Oxidasen abgebildet. Die EGCG-Therapie führt (im Vgl. zu Placebo-Kontrollen) zu keiner Veränderung der ROS-Ladung im Serum, wie mit dem ROS-Indikator DCF untersucht (n=6, t-Test, gepaarte Analyse, $p > 0,05$ n.s.). Des Weiteren zeigte sich in der Expressionsanalyse, dass sich EGCG im Vergleich mit Placebo in der cDNA von PBMCs nicht auf die Expression der Untereinheit gp91phox der NADPH-Oxidase-2 auswirkt (n=8, t-Test, gepaarte Analyse, $p > 0,05$ entspricht n.s. Unterschied).

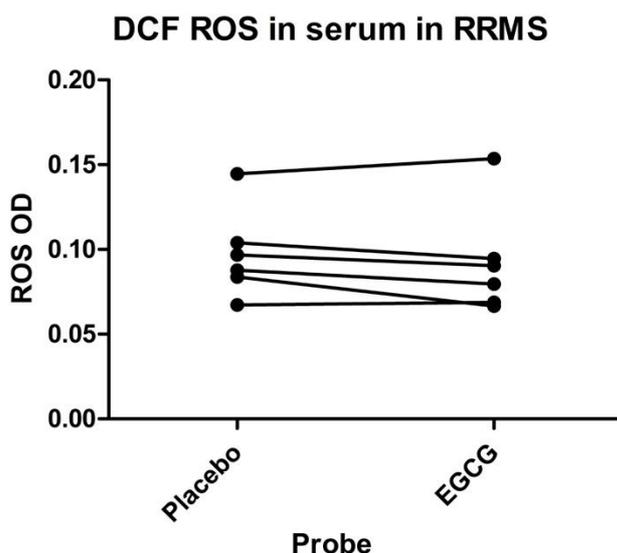


Abb. 21: Wirkung von EGCG auf Reaktive Sauerstoffspezies in Multipler Sklerose
 Reaktive Sauerstoffspezies in Serum, Messung mit DCF und dargestellt als relative *optical density* (OD); Messung Berlin (DRFZ). RRMS-Patienten zeigen bei Behandlung mit EGCG im Vergleich zu Placebo ($p > 0,05$, *paired* t-Test) keine signifikanten Unterschiede.¹

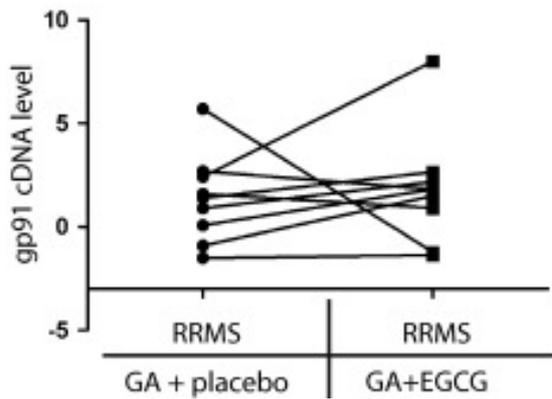


Abb. 22: Wirkung von EGCG auf Expressionsebene in Multipler Sklerose

Ergebnisse der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion der Untereinheit gp91 bzw. gp91phox der NADPH Oxidasen in EGCG-behandelten MS-Patienten im Vergleich mit Placebo-behandelten Patienten, dargestellt als relative *levels* (normalisiert auf endogene Kontrolle s.o.); Messung Berlin (DRFZ). Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$, *paired t*-Test) im Expressionsmuster der NADPH Oxidase durch die Therapie mit EGCG.¹

3.5 Altersabhängigkeit der NADPH-Oxidasen-Aktivierung

Aus den obigen Daten ergibt sich die Frage, ob das unterschiedliche Lebensalter der Probanden und MS-Patienten (s. Tabelle in Methoden) einen Einfluss auf die NADPH-Oxidasen-Aktivierung darstellt. In Abb. 23 sind daher die NADPH-Oxidasen-Aktivierung und das Lebensalter der Probanden aufgetragen; hierbei sind alle untersuchten Subgruppen, wie MS-Patienten unterschiedlicher Stadien, und Gesunde in die Analyse eingeschlossen worden. Die Korrelationsanalyse ergibt eine nicht-signifikante Korrelation von $r = 0,023$. In der retrospektiven Analyse gibt es also keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Alter der Probanden und der Aktivierung der NADPH-Oxidasen.

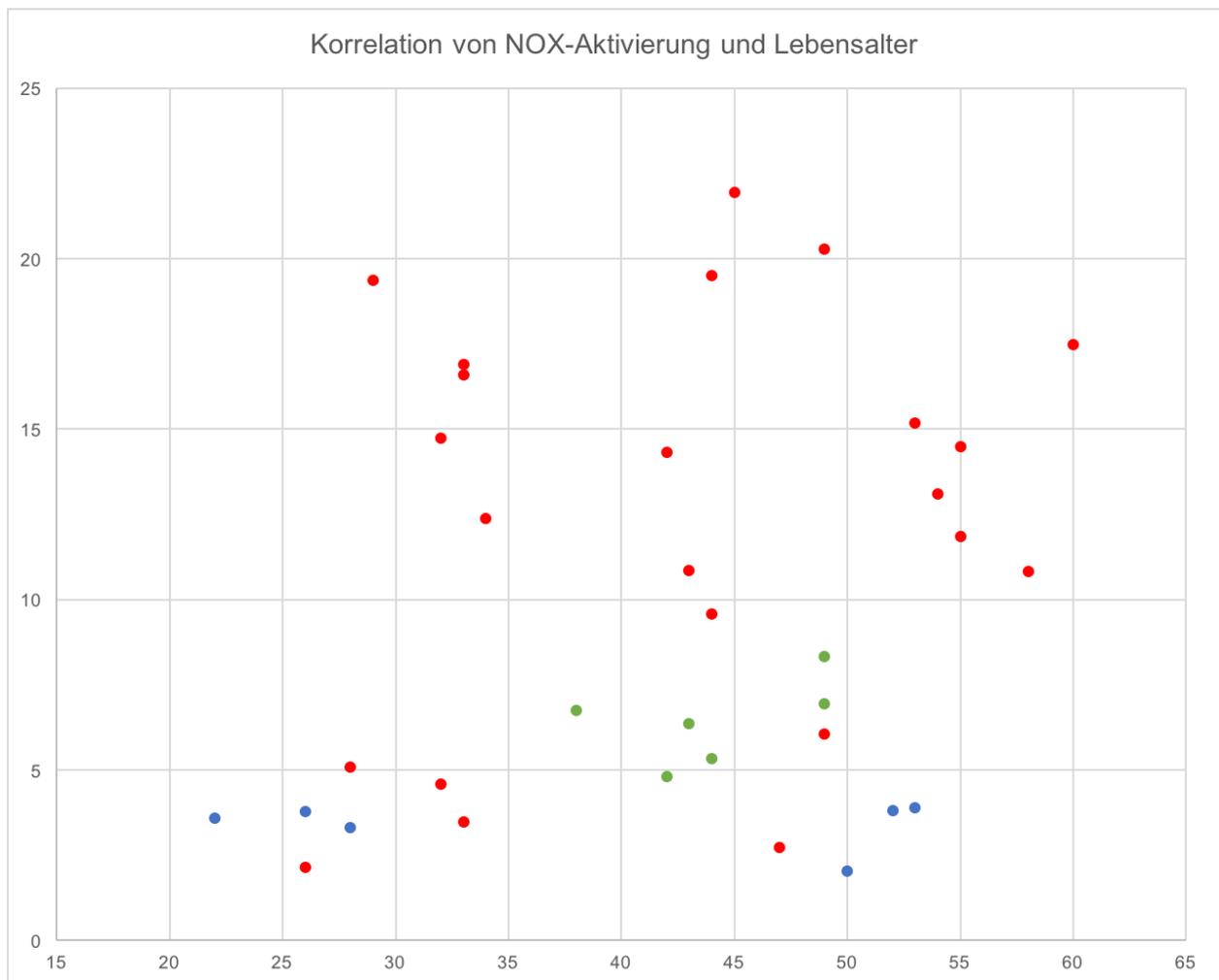


Abb. 23: NADPH-Oxidasen-Aktivierung in Multipler Sklerose nach Lebensalter

Auftragung der NADPH-Oxidasen-Aktivierung auf der y-Achse in % aller bisher gesammelten Probanden (n = 29, davon 23 Multiple Sklerose und 6 gesund) gegen das Alter (x-Achse). Korrelation $r = 0,023$ ($p = 0,26$, n.s.), keine signifikante Korrelation zwischen NADPH-Oxidasen-Aktivierung und Alter. MS-Patienten sind rot hervorgehoben, grün EGCG-behandelte Patienten, blau gesunde Probanden; Messung Berlin (DRFZ).

Es erscheint sinnvoll, die NADPH-Oxidasen-Aktivierung in unterschiedlichem Alter weiterhin prospektiv zu erheben. Dazu wurden in zwei Kohorten gesunder Probanden unterschiedlichen Alters CD11b⁺ Monozyten des Vollbluts gemessen (s. Abb. 18). Die jüngeren Probanden waren 20-30 Jahre sowie die älteren Probanden über 60 Jahre. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der NADPH-Oxidasen-Aktivierung zwischen beiden

Alterskohorten. Auffällig war lediglich die größere Streuung der Werte in der Kohorte der über 60-jährigen: SD 1,53 (alt) vs. 0,84 (jung). Außerdem zeigten die CD11b⁺ Monozyten der Älteren dreimal so häufig inaktivierte Zellen, d.h. NADPH-Oxidasen-Aktivierung 0 %, wie die ihrer Vergleichsgruppe: 25 inaktivierte auf 437 untersuchte Zellen (alt) vs. 8 inaktivierte auf 466 untersuchte Zellen (jung). Die Verteilung der NADPH-Oxidasen-Aktivierung zeigt altersabhängige Unterschiede, für deren genauere Charakterisierung größere Datenmengen nötig sein werden.

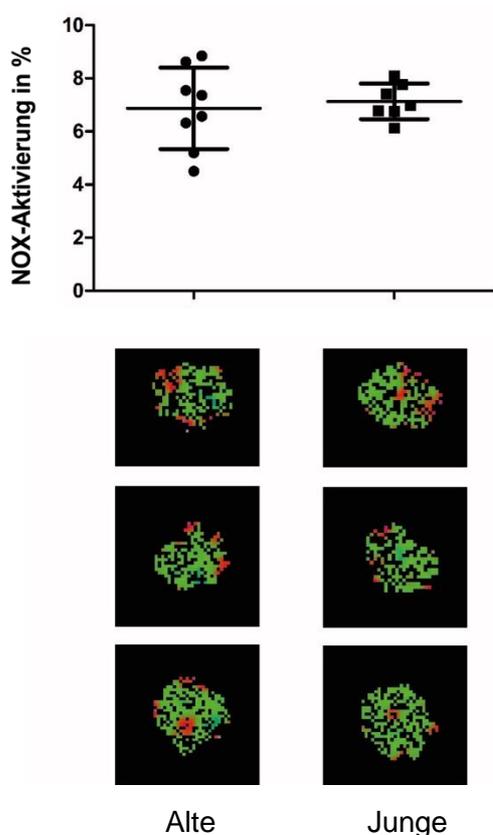


Abb. 24: NADPH-Oxidasen-Aktivierung nach Alter bei Gesunden

NADPH-Oxidasen-Aktivierung in % in CD11b⁺ Monozyten in zwei Alterskohorten gesunder Probanden von 20-30 Jahren (n = 7) sowie Probanden über 60 J. (n = 8). Die Gruppe der älteren Probanden hatte eine Aktivierung von 6,87 % (SD 1,53) im Durchschnitt. Die jungen Probanden haben eine durchschnittliche Aktivierung von 7,28 % (SD 0,84). Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Altersgruppen (p = 0,54); Messung Berlin (DRFZ).

3.6 Simultane Messung von NAD(P)H FLIM und Antikörpermarkierung

Die Abb. 25 zeigt ungefärbte und Fluoreszenz-Antikörper-markierte THP-1 Monozyten in der simultanen Messung mit FLIM. Der Vergleich von ungefärbten Zellen und solchen mit Fluoreszenzfarbstoff – im Experiment anhand von Alexa 647, gekoppelt an Antikörper CD14 untersucht und gemessen mit *Single-Photon-Microscopy* – zeigt in der Zuordnung zum FLIM-Signal keinerlei Unterschiede (s. *Phasor-Plot* rechts in Abb. 25).

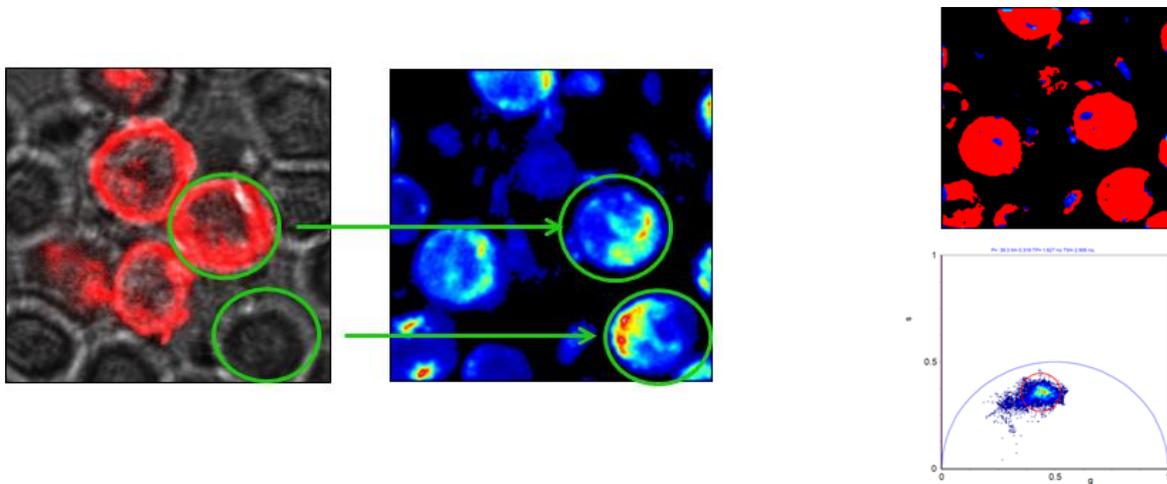


Abb. 25: NAD(P)H-FLIM in fluoreszenzmarkierten und nichtmarkierten Zellen

THP-1 Monozyten und Fluoreszenzfarbstoff; Messung UCI (LFD). Das NAD(P)H-FLIM-Signal zeigt keine Unterschiede zwischen gefärbten und ungefärbten Zellen; es sind die *Single-Photon* Aufnahme, Intensitätsdarstellung, Fluoreszenzlebensdauer-Abbildung und Phasor-Kontrolle zu sehen. Maßstab $40 \mu m$; Unterschied nicht signifikant ($p > 0,05$).

In Abb. 26 sind THP-1 Monozyten in einer Mehrfachfärbung gezeigt. Zusätzlich zur FLIM-Detektion sind die Farbstoffe FITC, Alexa 546 und Alexa 647 dargestellt (Vgl. Methoden). Im Fusionsbild sind die drei Fluoreszenzfarbstoffe mit der Durchlicht-Mikroskopie addiert. So lassen sich die markierten Zellen der FLIM-Repräsentation zuordnen.

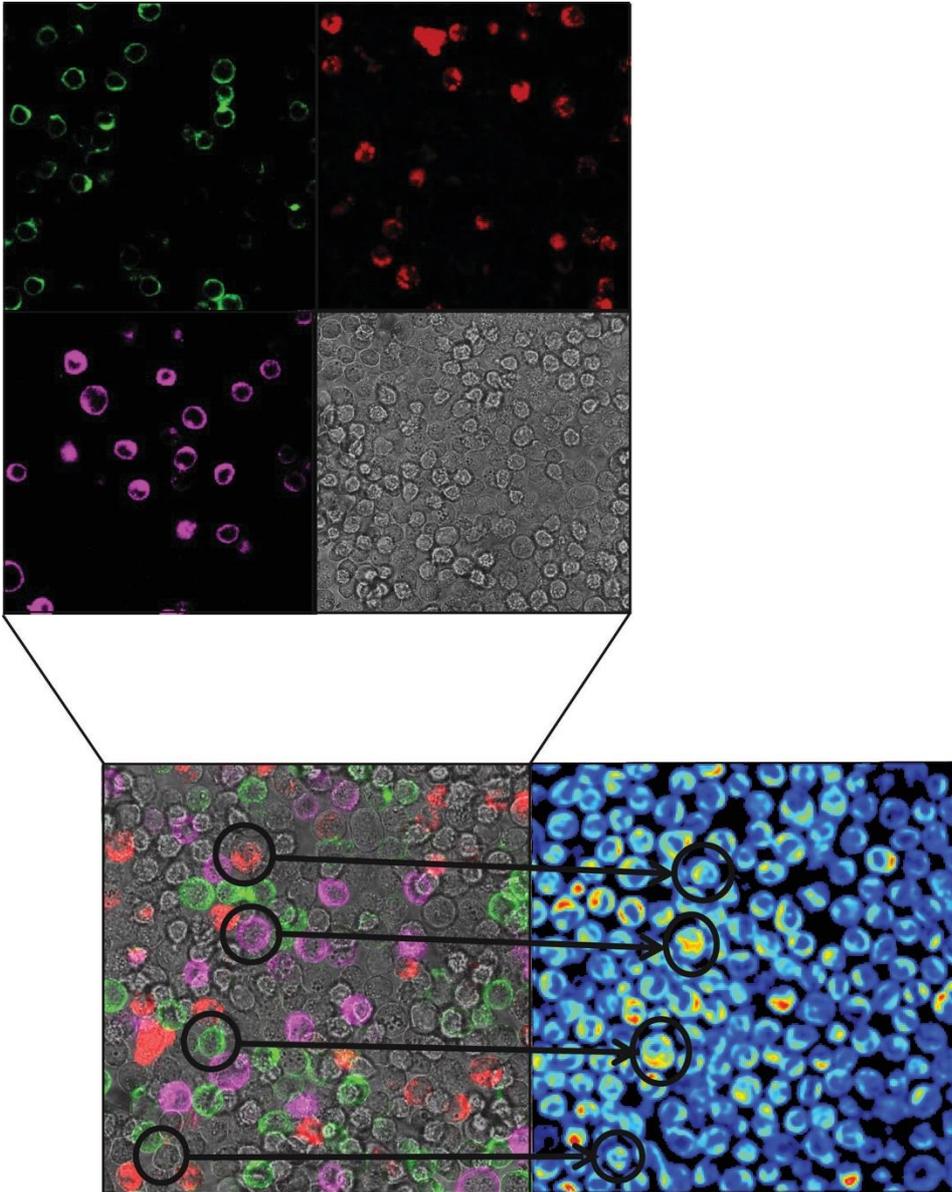


Abb. 26: NAD(P)H-FLIM in mehrfachgefärbten Zellen

Mehrfachfärbung in THP-1 Monozyten; Messung UCI (LFD), Maßstab 200 μm .

4 DISKUSSION

4.1 Oxidativer Stress in Multipler Sklerose – Überaktivierung der NADPH-Oxidasen

In MS-Läsionen ist bereits seit längerem die axonale Transsektion als Korrelat einer neuronalen Schädigung bekannt.⁷⁰ An entsprechenden axonalen Sphäroiden zeigt sich ein oxidativer Schaden, der einen Hinweis auf die exzessive Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies in der Pathogenese sein könnte.⁷³ Zum ersten Mal scheint zudem die Reversibilität von oxidativem Stress unter Hinzugabe von ROS-Scavengers in der Experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) bei der fokalen axonalen Transsektion bewiesen.⁴⁴ Die Autoren vermuten einen relevanten Beitrag von Makrophagen und Mikroglia. In infiltrierenden Makrophagen von MS-Läsionen ist in der Tat die Expression von NADPH-Oxidase-2 beschrieben.¹³¹ Daten aus der EAE unserer Arbeitsgruppe unterstützen eine Schädigung von Axonen durch aktivierte NADPH Oxidasen von Monozyten/Makrophagen *in vivo*.¹ Diese Monozyten/Makrophagen haben einen myelomonozytären Ursprung, weshalb die Untersuchung einer NADPH-Oxidasen-Aktivierung in der Peripherie, d.h. in der Milz der Maus oder dem Vollblut von MS-Patienten, sinnvoll erschien.

Tatsächlich hat sich in unserer Untersuchung ein differenziertes Aktivierungsmuster der NADPH Oxidasen in CD11b⁺ Monozyten der Multiplen Sklerose ergeben. Im Verlauf ihrer Erkrankung zeigten Patienten eine Überaktivierung der NADPH-Oxidasen, die bei Patienten mit CIS noch nicht in Erscheinung trat. Wohl aber sind in der Kohorte der RRMS-Patienten und in der – mit 50 Jahren durchschnittlich sieben Jahre älteren – SPMS-Kohorte eine Überaktivierung der NADPH-Oxidasen feststellbar. Die Krankheitsphasen-abhängige Aktivierung ist interessanterweise analog zum Krankheitsverlauf der MOG-Peptid-induzierten EAE der Maus, die in CD11b⁺ Monozyten der Milz im Vergleich zu gesunden Tieren zu Krankheitsbeginn (*Onset*) keine und später im *Peak* eine erhöhte Aktivierung zeigt.¹

Insbesondere stimmen die Daten der CD11b⁺ Monozyten in Multipler Sklerose mit der Literatur überein, die eine erhöhte Radikalproduktion von Monozyten in Patienten mit MS nahegelegt hat. Die Untersuchung toxischer Sauerstoffmetabolite zeigte, dass Monozyten aus dem Blut von Patienten mit Multipler Sklerose nach entsprechender Stimulation eine signifikant stärkere Produktion von Superoxidanion und H₂O₂ zeigen.¹³² Eine weitere

Studie ergab, dass mononukleäre Zellen aus dem Vollblut von MS-Patienten PKC-abhängig mehr reaktive Sauerstoffspezies produzieren als gesunde Kontrollen.¹³³ Unsere Ergebnisse weisen darüber hinaus erstmalig NADPH Oxidasen als die wahrscheinliche Quelle der exzessiven Radikalproduktion nach.

Die Korrelation der NADPH-Oxidasen-Aktivierung in CD11b⁺ Monozyten mit dem EDSS der untersuchten Individuen (s.o.) unterstützt die Relevanz der monozytären NADPH-Oxidasen für den klinischen Verlauf der Multiplen Sklerose. Ergebnisse aus parabiotischen EAE-Mäusen legen in der Tat für die Multiple Sklerose nahe, dass die aus der Peripherie einwandernden Monozyten/Makrophagen tatsächliche Treiber der Krankheitsprogression sind.¹³⁴ Es ist zwar unumstritten, dass Monozyten/Makrophagen eine Rolle im Krankheitsverlauf der Multiplen Sklerose spielen (s. Einleitung), dennoch scheint deren konkreter Beitrag im Einzelnen komplexer. Bei der Auswertung der FLIM-Daten fiel auf, dass einige der CD11b⁺ Monozyten stark aktiviert waren und daneben einige keinerlei Aktivierung zeigen. Dies bedarf vorerst der Quantifikation, jedoch lassen sich bereits Hypothesen anhand der Literatur erstellen.

Es ist denkbar, dass Subtypen von Monozyten unterschiedlich in ihrem Zielgewebe agieren. So wurde gezeigt, dass Monozyten vom Typ II anti-inflammatorische Eigenschaften besitzen und den Verlauf der EAE zu lindern vermögen.¹³⁵ Diese Zellen wurden in der Studie durch Behandlung mit GA induziert und entfalteten ihre Wirkung nach adoptivem Transfer über die Exkretion anti-inflammatorischer Zytokine. Seit längerem ist bekannt, dass im Blut unterschiedliche Monozyten-Populationen existieren, die u.a. in ihrem Rezeptorbesatz variieren. So wandert nur die CX3CR1 neg. CCR2-exprimierende Population in entzündetes Gewebe, während die CX3CR1 pos. CCR2 neg. Population in nicht-entzündetes Gewebe wandert.⁷

In der EAE ließe sich mit entsprechender Monozyten-Markierung herausfinden, welche Subpopulation der Monozyten eine aktivierte NADPH-Oxidase-2 zeigt und anschließend im ZNS der EAE-Tiere nachweisbar ist. Im Menschen könnte das NADPH-Oxidasen-Aktivierungsmuster der Immunzellen und insbesondere der Monozyten (-subpopulationen) differenziert prospektiv untersucht werden. Eventuell ergäbe sich hieraus ein „Fingerabdruck“ der Krankheitsphasen und -aktivität, sodass die Therapie entsprechend optimiert werden kann.

Das unterschiedliche Alter der initial untersuchten Kohorten in unterschiedlichen Phasen der Multiplen Sklerose, sowie der gesunden Kontrollen erfordert eine Kontrolle des Lebensalters als Einflussfaktor auf die NADPH-Oxidase-Aktivität. Sowohl die Korrelation der retrospektiven Daten aller gesammelten NADPH-Oxidase-FLIM-Experimente als auch die prospektive Untersuchung in gesunden Probanden unterschiedlichen Alters sprechen deutlich gegen einen Einfluss des Alters.

Diese Ergebnisse reichen somit zur Validierung von NADPH-Oxidase-FLIM in Patientengruppen, die eine Altersdifferenz aufweisen, wie dies in der MS-Kohorte der Fall ist. Unsere Daten stützen daher bei erster Betrachtung nicht die Hypothese einer Veränderung von oxidativem Stress im Alter.¹³⁶ Unsere Experimente mit NADPH-Oxidase-FLIM zeigten jedoch nur im Vergleich des basalen Aktivierungswerts keine signifikant unterschiedlichen Mittelwerte. Zudem streuen die Aktivierungswerte im Alter stärker, was ein zusätzlicher Hinweis auf eine veränderte Regulation von oxidativem Stress sein könnte. So ist denkbar, dass die Reaktion der monozytären NADPH Oxidase auf inflammatorische Stimuli in Zellen alter Individuen deutlich verändert ist. Die antioxidative Abwehr (s.o.) könnte dabei eine Rolle für Altersunterschiede spielen. Aktuelle Untersuchungen deuten auf eine abweichende Funktion der NADPH-Oxidase-2 in verschiedenen Zelltypen im höheren Lebensalter hin.¹³⁷

4.2 Therapieevaluation – NAD(P)H-FLIM als Marker-freier Ansatz?

Es war in der Tat ein Einfluss der Therapie auf die Aktivierung der NADPH Oxidase in CD11b⁺ Monozyten in der Multiplen Sklerose feststellbar (s. Ergebnisse). Die Behandlung mit Glatirameracetat (GA) – aktueller Therapiestandard der RRMS – brachte eine Reduktion der NADPH-Oxidase-Aktivierung mit sich. EGCG reduzierte signifikant und mit höherer Wirksamkeit als GA und Placebo die Aktivierung der NADPH Oxidase in Multipler Sklerose auf ein annähernd gesundes Niveau.

Ein Effekt von GA auf CD11b⁺ Monozyten scheint wahrscheinlich, nachdem die behandelten Patienten eine geringere NADPH-Oxidase-Aktivierung zeigten und die Literatur entsprechende Hinweise liefert. GA kann Monozyten vermutlich direkt binden, wodurch die Funktion von Monozyten im Sinne einer anti-inflammatorischen Wirkung beeinflusst

wird.¹³⁸ Zudem ist ein synergistischer Effekt von EGCG und GA denkbar, wie er bereits in der Experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) beschrieben wurde.¹³⁹

Die Reversibilität von oxidativen Schäden am Axon wurde bereits mit diversen antioxidativen Substanzen in der EAE demonstriert.¹⁴⁰ Die lokale antioxidative Intervention ist also vermutlich neuroprotektiv. Die Effekte einer systemischen Applikation von zielgerichteten antioxidativen Therapien bleiben aber schwer vorherzusagen. EGCG hat bekanntermaßen antioxidative Eigenschaften und ist in der Lage reaktive Sauerstoffspezies direkt abzufangen.¹⁴¹ Da es in unseren Experimenten keine signifikanten Unterschiede von reaktiven Sauerstoffspezies im Serum von MS-Patienten mit EGCG oder Placebo gab, erscheint eine Wirkung von EGCG als *Scavenger* in diesem Fall weniger wahrscheinlich. Einige Autoren haben Effekte von EGCG auf die NADPH-Oxidasen-Expression festgestellt.¹⁴² Unsere Daten können jedoch keinen signifikanten Unterschied der Expression der essentiellen Untereinheit gp91phox zwischen EGCG- und Placebo-Behandlung in Multipler Sklerose bestätigen.

Die valide Detektion der NADPH-Oxidasen-Aktivierung als Marker für oxidativen Stress in biexponentieller FLIM nach Levenberg-Marquardt wurde von unserer Gruppe zuvor hinreichend demonstriert.¹²⁰ Anhand der obigen Experimente konnte mittels Hypoxie- sowie PMA-Behandlung in THP-1 Monozyten nun auch mit Phasor-FLIM die Detektion von oxidativem Stress anhand einer verlängerten Fluoreszenzlebensdauer validiert werden. Die Autoren hatten die Detektion von oxidativem Stress mit Phasor zuvor an anderen Zelltypen gezeigt.¹²⁶ Insbesondere die oben durchgeführte separate Hemmung der NADPH Oxidasen und der Atmungskette bestätigt die Verwendbarkeit des experimentellen Ansatzes zur Detektion von oxidativem Stress in monozytären Zellen.

Die mit Phasor durchgeführten Untersuchungen des Effekts von EGCG *in vitro* lassen eine direkte Wirkung der Substanz vermuten. In THP-1 Monozyten zeigte sich ein vermehrter Anteil an freiem NAD(P)H. Zudem ließ EGCG in PMA-stimulierten Monozyten den Marker für oxidativen Stress im Phasor verschwinden, während der *Shift* zu freiem NAD(P)H sichtbar wurde. Möglicherweise ist die Hemmung der NADPH Oxidasen, die in CD11b⁺ Monozyten beobachtbar war, also durch einen verdrängenden Mechanismus zu erklären. EGCG hemmt in der Tat kompetitiv NADP⁺ abhängige Enzyme, sodass der Zelle weniger NADPH z.B. für Verbraucher wie NADPH Oxidasen zur Verfügung steht.¹⁴³

Andere Autoren beschreiben eine hemmende Wirkung von EGCG auf NADPH Oxidasen durch eine verhinderte Translokation von zytosolischen Untereinheiten an den Membran- gebundenen Komplex.¹⁴⁴ Mit FLIM wurde in anderen Zelltypen *in vitro* ebenfalls eine verkürzte Fluoreszenzlebensdauer von NAD(P)H gemessen.¹⁴⁵ Unsere Daten in CD11b⁺ Monozyten sowie THP-1 Monozyten legen einen direkten inhibitorischen Effekt auf die Aktivierung der NADPH Oxidasen nahe. Im Zusammenspiel mit überaktivierten NADPH Oxidasen in der Multiplen Sklerose könnte EGCG also eine ursächliche Intervention bieten.

Die NADPH-Oxidase-2 ist in Phagozyten wie Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen bekanntermaßen stark exprimiert. Die Expression der NADPH-Oxidase-2 oder gp91phox-homologen Isoformen ist jedoch in etlichen weiteren Geweben und Zellen beschrieben worden.¹⁴⁶ Auch von B-Zellen ist bereits länger bekannt, dass sie NADPH Oxidasen exprimieren.¹⁴⁷ So wurde beispielsweise für B-Zellen gezeigt, dass diese unter Phagozytose-Bedingungen mittels NADPH-Oxidase-2 hohe Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies produzieren.¹⁴⁸ Bei Stimulation des B-Zell-Rezeptors generiert die NADPH-Oxidase-2 in B-Zellen reaktive Sauerstoffspezies, jedoch sind NADPH-Oxidase-2 *knock-out* bzw. Ncf1 ^{-/-} B-Zellen funktionell nicht eingeschränkt.¹⁴⁹ Mittlerweile ist von CD8 pos. regulatorischen T-Zellen bekannt, dass sie NADPH-Oxidase-2 exprimieren und diese für die Zellfunktion unabdingbar ist.¹³⁷ Das Expressionsmuster von NADPH Oxidasen und insbesondere NADPH-Oxidase-2 ist hochrelevant, um die Wirkung und Nebenwirkungen von zielgerichteten Therapien abzuschätzen

4.3 NADPH-Oxidasen-Inhibition als therapeutisches Prinzip

Ein genetisch bedingter Funktionsausfall von Untereinheiten der NADPH Oxidasen führt zum klinischen Bild der Septische Granulomatose oder *Chronic Granulomatous Disease* im Englischen.¹⁵⁰ Die Septische Granulomatose ist eine seltene genetische Erkrankung, die X-chromosomal-rezessiv oder auch autosomal-rezessiv vererbt wird.¹⁵¹ Mutationen in den vier Genen CYBB, CYBA, NCF-1 und NCF-2 für die entsprechenden Proteine gp91phox, p22, p47 und p67 – wie auch Defekte von Rac2, einer NADPH-Oxidasen-aktivierenden GTPase – haben allesamt einen Funktionsverlust des Enzymkomplexes zur Folge.²³ Patienten mit Septischer Granulomatose erleiden multiple Infektionen mit bakteriellen Erregern wie Staphylokokken sowie auch mit Pilzen wie Aspergillus.¹⁵² Diese

Erkrankung geht mit einer verringerten Lebenserwartung einher, wobei bereits im Kindesalter mitunter letale Infektionserkrankungen auftreten können.¹⁵³ Es sind in der Literatur tatsächlich keine Fälle von Septischer Granulomatose und gleichzeitiger Multipler Sklerose beschrieben.

Auf der Basis der Septischen Granulomatose sind Tiermodelle generiert worden, die eine Mutation der NADPH-Oxidasen-Gene besitzen, wie beispielsweise die p47phox^{-/-}-Maus.¹⁵⁴ Der Ausfall der NADPH Oxidasen hat in zwei dieser CGD-Tiermodelle ebenso für B-Zellen eine reduzierte Bakterienabwehr gezeigt.¹⁴⁸ Paradox erscheint, dass ROS-defiziente Mäuse mit einer NCF-1-Mutation, d.h. p47phox^{-/-}, altersabhängig eine spontane Arthritis entwickeln.¹⁵⁵ Dies könnte sich durch eine Rolle der reaktiven Sauerstoffspezies im *signaling* der Immunzellen erklären.

Zu entgegengesetzt über-exprimierten NADPH Oxidasen und den Konsequenzen für den menschlichen Organismus liegen kaum Daten vor. Im Mausmodell für Arteriosklerose hat die alleinige Überexpression von NADPH-Oxidasen-Genen zu einer verstärkten Radikalbildung, aber keiner verstärkten Arteriosklerose geführt.¹⁵⁶ Die heraufregulierte Expression von NADPH-Oxidasen-Genen ist in unterschiedlichen pro-inflammatorischen Zuständen bzw. Prozessen beschrieben worden wie in Allergie¹⁵⁷ sowie Karzinogenese.¹⁵⁸

Die Überaktivierung der NADPH Oxidasen in Monozyten/Makrophagen ist wahrscheinlich ein wichtiger Pathomechanismus der Multiplen Sklerose.¹ Monozyten/Makrophagen exprimieren die Isoform NADPH-Oxidase-2, die in der Höhe ihrer Expression für Phagozyten typisch ist.²² Demgemäß würde sich die Untersuchung einer selektiven Hemmung der NADPH-Oxidase-2 empfehlen, um den Effekt der Medikation in der Multiplen Sklerose zu beobachten (Vgl. Abb. 27). Theoretisch müsste mit der Dosierung eines NADPH-Oxidase-2-Inhibitors ein mittleres Aktivierungsniveau, d.h. eines im Bereich von Gesunden erzielt werden. Eine darüberhinausgehende Hemmung auf ein zu geringes Aktivierungsniveau könnte allerdings entsprechend der o.g. genetischen Dysfunktion eine gefährliche Immunsuppression bewirken und den Organismus angesichts mikrobieller Infektionen ungeschützt lassen.¹⁵⁰

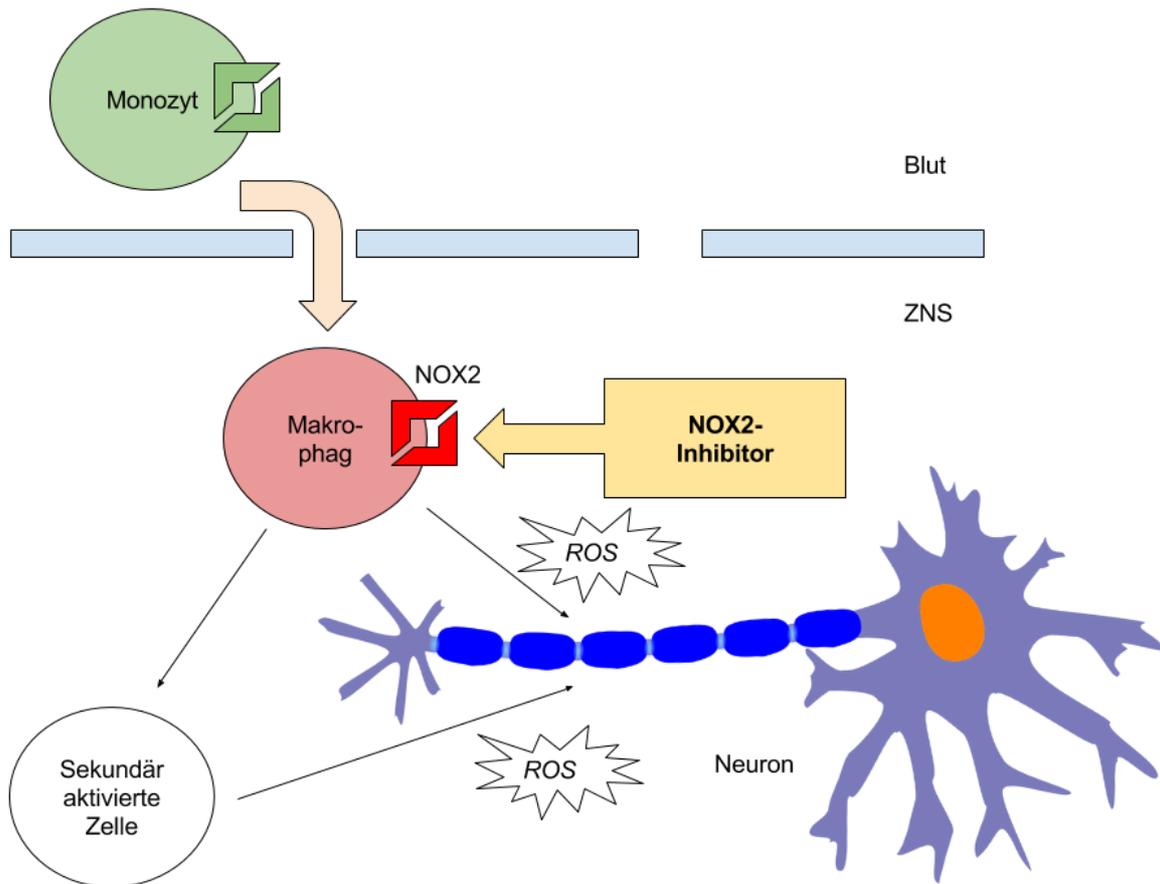


Abb. 27: NADPH-Oxidase-2 in Neuroinflammation

Modell des Beitrags der NADPH-Oxidase-2 zur Pathogenese der Multiplen Sklerose und die gezielte Inhibition zur Verhinderung von neuronalen Schäden.

Die Inhibition der NADPH Oxidasen ist bereits in der Experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) untersucht worden. Die Behandlung der EAE mit niedriger Dextromorphan-Dosis war mit der Hemmung der NADPH-Oxidase-2 assoziiert. Mit der Behandlung wurden in der Studie Demyelinisierung und axonale Schäden bei geringem entzündlichen Infiltrat reduziert.¹⁵⁹ Mittlerweile ist die direkte Inhibition von NADPH Oxidasen in der EAE mit dem Wirkstoff Apocynin untersucht worden, was zu einer Abschwächung der Symptomatik bei verringerten Immunzellinfiltraten führt.¹⁶⁰ Es ist fraglich, wie selektiv die beiden getesteten Substanzen die NADPH-Oxidase-2 inhibieren. Die beobachtete Verbesserung der EAE sowohl bei Dextromorphan (s.o.), als auch Apocynin könnte aufgrund ihrer geringen Selektivität durch andere Zielstrukturen als die NADPH-Oxidase-2

bedingt sein.¹⁶¹ Mit nicht-selektiven NADPH-Oxidasen-Inhibitoren ließe sich eine spezifische Inhibition von Monozyten folgendermaßen experimentell testen: der Maus könnten in der EAE Monozyten entnommen und *in vitro* mit einem NADPH-Oxidasen-Inhibitor behandelt werden. Diese könnten anschließend – im Sinne eines adoptiven Transfers und verglichen mit Placebo- und *Sham*-behandelten Tieren – anderen Mäusen injiziert und der Effekt auf die EAE untersucht werden. Bislang liegen dazu jedoch keine Daten vor.

Die Frage ist: Wo genau müsste ein NADPH-Oxidasen-Inhibitor für einen entsprechenden Effekt angreifen? Unsere Daten in CD11b⁺ Monozyten sprechen dafür, dass eine periphere Hemmung der NADPH-Oxidase-2 effektiv sein könnte. Es sei darauf hingewiesen, dass eine systemische Inhibition der NADPH-Oxidase-2 in Anbetracht der Besonderheiten des ZNS (s.o.) nicht mit einer lokalen Applikation gleichzusetzen ist. Unsere Daten in der EAE legen nahe, dass neben Phagozyten auch andere Zellen des ZNS – wie die Astroglia und auch die Neurone selbst – zu oxidativem Stress beitragen.¹ Dies könnte allerdings ein von Monozyten/Makrophagen abhängiges Epiphänomen sein, d.h. eine sekundäre Aktivierung. In diesem Falle könnte bereits die Hemmung der ROS-Produktion von Monozyten/Makrophagen mit NADPH-Oxidase-2-selektiven Medikamenten eine fortgesetzte Gewebsdestruktion unterbrechen. Es bleibt aber bislang offen, ob eine NADPH-Oxidase-2-selektive Hemmung bei systemischer Applikation effektiv sein wird – insbesondere bei vorrangiger Wirkung in der Peripherie.

Spezifische NADPH-Oxidase-2-Hemmer sind erst seit kurzem bekannt. *Nox2ds* ist ein effektives, inhibitorisches Peptid mit einer hohen Selektivität für die NADPH-Oxidase-2. Es erreicht eine Hemmung von 85 % der enzymatischen Aktivität bei 10 µM des Wirkstoffs und wirkt sehr potent mit einer IC₅₀ von 0,74 µM auf die NADPH-Oxidase-2, d.h. bei dieser Konzentration sind bereits 50 % der enzymatischen Aktivität gehemmt.¹⁶² Zudem ist neuerdings die Synthese sog. *Bridged tetrahydroisoquinoline* gelungen, die als *small molecules* mit einer IC₅₀ von 20 bzw. 32 µM selektiv die NADPH-Oxidase-2 hemmen.¹⁶³ Somit ist die Synthese von NADPH-Oxidase-2-spezifischen Therapeutika für eine Testung in der Multiplen Sklerose in erreichbare Nähe gelangt. Es bleibt dennoch unklar, ob sich eine NADPH-Oxidasen-Inhibition im Menschen – egal ob nicht-selektiv oder hoch-selektiv für NADPH-Oxidase-2 – nebenwirkungsarm durchführen lässt und ob es in der Multiplen Sklerose eine vergleichbare Wirkung geben könnte wie in der EAE.

Aktuelle Daten zeigen eine altersabhängige Dysfunktion CD8⁺ regulatorischer T-Zellen, als deren Ursache eine NADPH-Oxidasen-Defizienz vermutet wird.¹³⁷ Die Autoren konnten elegant die Wiederherstellung der zellulären Funktion durch NADPH-Oxidasen-Überexpression zeigen. Angesichts dieser Erkenntnisse erscheint es sinnvoll, Lymphozyten wie T- und B-Zellen, sowie ihre Subtypen im Verlauf der Multiplen Sklerose auf eine veränderte Aktivierung der NADPH Oxidasen zu untersuchen. Die anzunehmende Relevanz der NADPH Oxidasen in regulatorischen Zellen könnte zudem *a priori* den Erfolg einer NADPH-Oxidasen-Inhibition in Multipler Sklerose kompromittieren, nachdem die wiederhergestellte NADPH-Oxidasen-Funktion in der, von den Autoren untersuchten, autoimmunen Riesenzell-Arteriitis von Vorteil war.

4.4 Methodische Weiterentwicklung von NAD(P)H FLIM

Die Detektion der NADPH-Oxidasen-Aktivierung mit FLIM als Nachweis für die Entstehung von oxidativem Stress ist unterdessen in einer Vielzahl von Zellen und Geweben erprobt. Die Aktivierung der NADPH Oxidasen lässt sich dabei insbesondere im inflammatorischen *Setting* nachweisen, was zunächst in Phagozyten¹²⁰ und nun auch in der Multiplen Sklerose¹ gezeigt werden konnte. Daten, wie die Messung verschiedener Enzyme mit NAD(P)H *in vitro* (s.o.), sowie die Aktivierung der NADPH Oxidasen in Zellen mit einer deutlich verlängerten Fluoreszenzlebensdauer und deren Reversibilität bei NADPH-Oxidasen-Inhibition (s.o.) scheinen den Ursprung des Signals bei Detektion mit FLIM zu belegen.

Im Vergleich von biexponentieller FLIM nach Levenberg-Marquardt (Berlin, DRFZ) mit Phasor-basierter FLIM (UCI/LFD) zeigen sich Vor- und Nachteile beider Ansätze. Der Vorteil der biexponentiellen Auswertung nach Levenberg-Marquardt ist die präzise Approximierung der FLIM-Daten in Hinblick auf die Aktivierung der NADPH Oxidasen. Allerdings zeigen sich teilweise irreführende Ergebnisse bei niedrigen Intensitätswerten der FLIM-Daten oder Rückreflexionen. Dies kann zu einer Pseudoaktivierung der NADPH Oxidasen und demzufolge falschen Schlüssen angesichts der Ergebnisse führen. Unter Berücksichtigung der Intensitäten lässt sich dies konsequent vermeiden. Vorteil des *Phasor-approach* ist die unmittelbare graphische Darstellung der quasi unveränderten Daten im *Phasor-Plot*. Somit erhält der oder die Auswertende einen wenig verfälschten Überblick und kann durch die Verteilung der Messpunkte erste Schlüsse ziehen. Dennoch

scheint die Phasor-Methode anfällig für Rauschen zu sein, sodass deutlich mehr Photonen gesammelt werden müssen, um eine adäquate *signal-to-noise ratio* zu erzielen. Dabei ist die Exposition der Probe mit Laserlicht deutlich länger. Weiterhin ist mit Phasor keine präzise Quantifizierung der NADPH-Oxidasen-Aktivierung möglich. Auch erfordert die Phasor-Auswertung eine Kalibrierung bei jeder Messung, da kleine Abweichungen zu einer Lage außerhalb des Phasor-Halbkreises führen und die Auswertung erschweren. Diese Abweichungen machen den experimentellen Aufbau sehr störanfällig. Im Bewusstsein der Limitationen sind Schlussfolgerungen unter Verwendung jeder der beiden Methoden valide. Zudem wurde eine Kontrolle der Daten mit der jeweils anderen Methode durchgeführt. Für die quantitative Abbildung der NADPH-Oxidasen-Aktivierung hat sich der im DRFZ verwendete Levenberg-Marquardt-Ansatz mit biexponentieller Auswertung bewährt.

Gratton und Kollegen gehen von oxidierten Lipiden als Signalgeber der verlängerten Fluoreszenzlebensdauer in oxidativem Stress aus.¹²⁶ Diese oxidierten Lipide besitzen eine Fluoreszenzlebensdauer von 7,8 ns und könnten aufgrund ihres mit NAD(P)H vergleichbaren Emissionsspektrums zu einer verlängerten Fluoreszenzlebensdauer der Zelle oder des Gewebes führen. Der Nachweis mit Raman-Spektroskopie hat die Existenz von oxidierten Lipiden in Assoziation mit Membranen belegt und mit dem FLIM-Signal kolokalisiert. Allerdings kommt die NADPH-Oxidase als membranärer Enzymkomplex auch an ebenjener Stelle vor. Unsere Gruppe geht davon aus, dass die Lipide aufgrund ihrer sehr langen Fluoreszenzlebensdauer lediglich ein Hintergrund-Rauschen verursachen und nicht das FLIM-Signal bestimmen. Mit einer differenzierten Behandlung von Zellen mit Radikalfängern, die quasi *Downstream* angreifen, und der Blockade der Atemkette in Mitochondrien als *Upstream*-Eingriff sowie einem selektiven NADPH-Oxidase-2-Inhibitor könnte die Methode in Monozyten/Makrophagen weiter validiert werden. Während unselektive NADPH-Oxidasen-Inhibitoren erhältlich sind, lassen sich selektive NADPH-Oxidase-2-Inhibitoren nicht über den Handel beziehen. Es wurde allerdings bereits gezeigt, dass deren Synthese möglich ist.¹⁶³ Insbesondere die in vorherigen Experimenten unserer Arbeitsgruppe gezeigte Reversibilität der mit FLIM detektierten NADPH-Oxidase-2-Aktivierung bei transients oxidativer Belastung ist ein wichtiger Hinweis, da oxidierte Lipide einem permanenten – also unumkehrbaren – Schaden entsprechen. Es gibt folglich erhebliche Evidenz für den Ursprung des verlängerten Fluoreszenzlebensdauer-Signals in der Bindung von NAD(P)H an die NADPH-Oxidasen-Untereinheiten.

Die Herkunft des Signals von oxidativem Stress in FLIM ist jedoch unerheblich für die Schlüsse aus der Aktivierung der Monozyten/Makrophagen. Von hoher Relevanz für eine in Zukunft durchführbare differenziertere Untersuchung aktivierter Immunzell-Subtypen ist die simultane Phänotypisierung der Zellen. Eine hybride Technik im Sinne von FACS-FLIM, d.h. einer Messung der Fluoreszenzlebensdauer im Zytometer, oder dualen *scanning devices* könnte definierten zellulären Subgruppen das FLIM-Signal direkt zuordnen. In Abb. 26 ist das Prinzip einer simultanen Detektion von endogenen Fluorophoren und exogenen Fluoreszenzfarbstoffen schematisch dargestellt. Die bekannten *Subsets* mit unterschiedlichen migratorischen Eigenschaften⁷ der Monozyten könnten so erstmalig funktionell anhand ihrer NADPH-Oxidasen-Aktivierung charakterisiert werden.

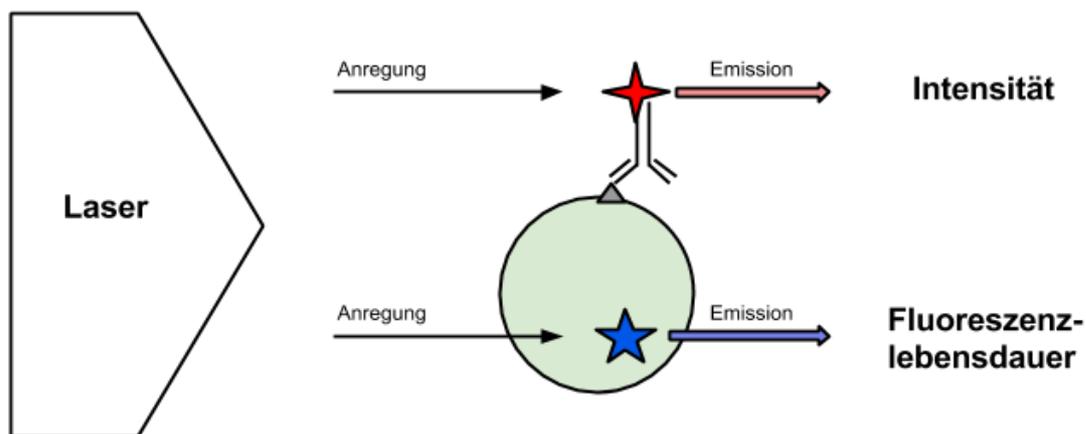


Abb. 28: Simultanmessung fluoreszenzmarkierter Zellen mit FLIM

Schema einer simultanen Messung von NAD(P)H FLIM und Fluoreszenzfarbstoffen.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, lassen sich THP-1 Monozyten mit mehreren Fluoreszenzfarbstoffen markieren, ohne dass die FLIM-Messung beeinträchtigt wird (Vgl. Abb. 26). Es bleiben bei der Auswahl die geeigneten Fluorophore und Antikörper zu finden. Die simultane Messung von FLIM und der Oberflächenmarkierung ist also sinnvoll und machbar für eine weitergehende Erforschung der Funktion definierter Zellgruppen. Es bleibt zudem zu klären, ob die Verwendung von FACS-FLIM im Zytometer oder aber der o.g. Einsatz dualer *scanning*-Systeme, d.h. FLIM kombiniert mit Ein-Photon-Anregung im Laser-Raster-System, dem wissenschaftlichen und eventuell klinischen Gebrauch eher gerecht werden.

Als Marker für die Progression der Multiplen Sklerose werden bislang klinisch und in Studien neben dem MRT die Schubrate und der EDSS verwendet. Für eine Messung der Progression werden präzisere Biomarker gesucht, die eine neuronale Schädigung akkurat abbilden können.⁸⁹ Die Detektion von oxidativem Stress auf zellulärer Ebene mit weiterentwickelten NAD(P)H-FLIM-Apparaturen könnte nach jetzigem Kenntnisstand in der Tat eine Lösung darstellen. Unser experimenteller Aufbau unter Verwendung von FLIM zur Detektion von oxidativem Stress erlaubt neuartige Einblicke in die Pathogenese der Multiplen Sklerose. Dennoch machen sowohl die Vielfalt der Erkrankung, als auch die unterschiedlichen im Krankheitsgeschehen involvierten Zellen eine Analyse mit höherem Durchsatz und in einem größeren Patientenkollektiv nötig. Es wird hier gezeigt und ist ebenso aus der Literatur ersichtlich, dass das Potential von FLIM für einen klinisch-diagnostischen Einsatz immens ist und eine weitere Erforschung absolut sinnvoll.¹⁶⁴

4.5 Conclusio

Es ist uns gelungen mit NAD(P)H FLIM ein besseres Verständnis der Pathogenese in Multipler Sklerose zu erreichen. Die Monozyten der Peripherie tragen nach dem Einwandern ins ZNS höchstwahrscheinlich signifikant zum Untergang von Neuronen bei. Dabei ist die Aktivierung der NADPH Oxidasen einer der Schädigungsmechanismen, vor dem Nervenzellen nicht ausreichend geschützt sind. Aus unseren Daten lässt sich eine, vom Krankheitsstadium abhängige und im Verlauf zunehmende, Überaktivierung der NADPH Oxidasen schließen. Die initial formulierte Frage, ob die Aktivierung der NADPH Oxidasen einem pathophysiologischen Korrelat der Multiplen Sklerose entspricht, lässt sich hiernach also bejahen.

Die Untersuchung des Profils der NADPH-Oxidasen-Aktivierung unterschiedlicher Immunzelltypen erscheint angesichts der Datenlage sowohl in der Multiplen Sklerose, als auch in verschiedenen anderen entzündlichen Krankheitsentitäten sinnvoll. So wird die Untersuchung des Systemischen Lupus Erythematoses und der Rheumatoiden Arthritis ein besseres Verständnis von Mechanismen der Autoimmunität ermöglichen.

Für die Multiple Sklerose stellt sich auf der Basis unserer Daten nun folgende Frage: Wie wirkt sich ein spezifischer Inhibitor der NADPH Oxidasen auf den Krankheitsverlauf aus? Aus tierexperimentellen Daten in der Experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis

(EAE) lässt sich definitiv ein potentieller Nutzen der Therapie ableiten. Auch Grünteeextrakt EGCG scheint eine direkte Wirkung auf NADPH Oxidasen zu entfalten und kommt damit als mögliches Therapeutikum in Frage. Dennoch sind voreilige Schlüsse zu vermeiden, da im Menschen bislang kein Nutzen belegt und das Nebenwirkungsprofil wenig bekannt ist. Ein kompletter Ausfall der NADPH-Oxidasen-Funktion im Menschen ist angesichts der Septischen Granulomatose als äußerst gefährlich einzustufen, weswegen eine potentielle Therapie eine ausreichende Restfunktion der Enzyme gewährleisten muss. Neuere Daten lassen jedoch eine vielfältige Funktion der NADPH Oxidasen in unterschiedlichen Zellen des Immunsystems annehmen, weswegen an dieser Stelle ein differenzierteres Verständnis nötig ist. Spezifische NADPH-Oxidase-2-Inhibitoren sind noch nicht kommerziell erhältlich, wobei die Synthese potenter Stoffe möglich ist, wie in der vorliegenden Arbeit weiter ausgeführt wurde.

Für die Multiple Sklerose ergeben sich aus der genaueren Charakterisierung der Überaktivierung der NADPH Oxidasen also Möglichkeiten zielgerichteter Therapieansätze. NAD(P)H FLIM wird – zumal in seiner weiteren Entwicklung – zur Untersuchung von Pathomechanismen beitragen und eine weitere Option zum Monitoring von entzündlichen Erkrankungen sein. Gerade als sogenannte Marker-freie Methode in der Visualisierung zellulärer Prozesse auf molekularer Ebene wird der Fluoreszenzlebensdauer-Messung eine besondere Rolle zukommen. Den Beitrag der NADPH Oxidasen unterschiedlicher Immunzellsubtypen gilt es weiter zu eruieren, sodass ein spezifischer Fingerabdruck der NADPH-Oxidasen-Aktivierung zukünftig helfen könnte, die Therapie zu überwachen.

Literaturverzeichnis

1. Mossakowski AA, Pohlan J, Bremer D, Lindquist R, Millward JM, Bock M, Pollok K, Mothes R, Viohl L, Radbruch M, Gerhard J, Bellmann-Strobl J, Behrens J, Infante-Duarte C, Mähler A, Boschmann M, Rinnenthal JL, Fuchtemeier M, Herz J, Pache FC, Bardua M, Priller J, Hauser AE, Paul F, Niesner R, Radbruch H. Tracking CNS and systemic sources of oxidative stress during the course of chronic neuroinflammation. *Acta neuropathologica* 2015;130:799-814.
2. Houghton AN. Cancer antigens: immune recognition of self and altered self. *The Journal of experimental medicine* 1994;180:1-4.
3. Medzhitov R, Janeway CA. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science (New York, NY)* 2002;296:298-300.
4. Kamradt T, Ferrari-Kühne K. Das adaptive Immunsystem. *Dtsch Med Wochenschr* 2011;136:1678-83.
5. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science (New York, NY)* 2010;327:291-5.
6. Furth Rv. Origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1976;278:161-75.
7. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity* 2003;19:71-82.
8. Van Furth R, Cohn Z, Hirsch J, Humphrey J, Spector W, Langevoort H. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bulletin of the World Health Organization* 1972;46:845.
9. Langermans JAM, Hazenbos WLW, van Furth R. Antimicrobial functions of mononuclear phagocytes. *Journal of Immunological Methods* 1994;174:185-94.

10. Hancock JT, Jones OT. The inhibition by diphenyleneiodonium and its analogues of superoxide generation by macrophages. *Biochemical Journal* 1987;242:103-7.
11. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology* 2004;142:231-55.
12. Ray PD, Huang B-W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling* 2012;24:981-90.
13. Sies H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine* 1991;91:S31-S8.
14. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal* 2001;357:593-615.
15. MatÉs JM, Pérez-Gómez C, De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* 1999;32:595-603.
16. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological chemistry* 1969;244:6049-55.
17. de Haan JB, Bladier C, Griffiths P, Kelner M, O'Shea RD, Cheung NS, Bronson RT, Silvestro MJ, Wild S, Zheng SS, Beart PM, Hertzog PJ, Kola I. Mice with a Homozygous Null Mutation for the Most Abundant Glutathione Peroxidase, Gpx1, Show Increased Susceptibility to the Oxidative Stress-inducing Agents Paraquat and Hydrogen Peroxide. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:22528-36.
18. Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Barclay LRC, Locke SJ. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1987;924:408-19.
19. Baldrige C, Gerard R. The extra respiration of phagocytosis. *American Journal of Physiology--Legacy Content* 1932;103:235-6.

20. Iyer GYN, Quastel JH. NADPH and NADH oxidation by guinea pig polymorphonuclear leucocytes. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 1963;41:427-34.
21. Babior BM, Curnutte JT, McMurrich BJ. The particulate superoxide-forming system from human neutrophils. Properties of the system and further evidence supporting its participation in the respiratory burst. *J Clin Invest* 1976;58:989-96.
22. Bedard K, Krause K-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiological reviews* 2007;87:245-313.
23. Heyworth PG, Cross AR, Curnutte JT. Chronic granulomatous disease. *Current opinion in immunology* 2003;15:578-84.
24. Vignais P. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 2002;59:1428-59.
25. Thakur V, Pritchard MT, McMullen MR, Wang Q, Nagy LE. Chronic ethanol feeding increases activation of NADPH oxidase by lipopolysaccharide in rat Kupffer cells: role of increased reactive oxygen in LPS-stimulated ERK1/2 activation and TNF- α production. *Journal of leukocyte biology* 2006;79:1348-56.
26. Li J-M, Mullen AM, Yun S, Wientjes F, Brouns GY, Thrasher AJ, Shah AM. Essential role of the NADPH oxidase subunit p47phox in endothelial cell superoxide production in response to phorbol ester and tumor necrosis factor- α . *Circulation research* 2002;90:143-50.
27. Anrather J, Racchumi G, Iadecola C. NF- κ B regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281:5657-67.
28. Rouzaut A, López-Moratalla N, de Miguel C. Differential Gene Expression in the Activation and Maturation of Human Monocytes. *Archives of biochemistry and biophysics* 2000;374:153-60.

29. Dusi S, Donini M, Lissandrini D, Mazzi P, Bianca VD, Rossi F. Mechanisms of expression of NADPH oxidase components in human cultured monocytes: role of cytokines and transcriptional regulators involved. *European journal of immunology* 2001;31:929-38.
30. Bell Karen FS. Insight into a neuron's preferential susceptibility to oxidative stress. *Biochemical Society transactions* 2013;41:1541-5.
31. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell* 2008;132:645-60.
32. Martin RL, Lloyd HGE, Cowan AI. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends in Neurosciences* 1994;17:251-7.
33. Pellerin L, Magistretti PJ. Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *Neuroscientist* 2004;10:53-62.
34. Ebert D, Haller RG, Walton ME. Energy Contribution of Octanoate to Intact Rat Brain Metabolism Measured by ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *The Journal of Neuroscience* 2003;23:5928-35.
35. Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 2006;443:787-95.
36. Carson MJ, Doose JM, Melchior B, Schmid CD, Ploix CC. CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunological Reviews* 2006;213:48-65.
37. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Engelhardt B. Diapedesis of mononuclear cells across cerebral venules during experimental autoimmune encephalomyelitis leaves tight junctions intact. *Acta neuropathologica* 2005;109:181-90.
38. Man S, Ubogu EE, Ransohoff RM. Inflammatory Cell Migration into the Central Nervous System: A Few New Twists on an Old Tale. *Brain Pathology* 2007;17:243-50.

39. Strle K, Zhou J-H, Shen W-H, Broussard SR, Johnson RW, Freund GG, Dantzer R, Kelley KW. Interleukin-10 in the Brain. 2001;21:23.
40. Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of Microglia. *Physiological reviews* 2011;91:461-553.
41. Rangachari M, Kuchroo VK. Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology. *Journal of autoimmunity* 2013;45:31-9.
42. Steinman L, Zamvil SS. Virtues and pitfalls of EAE for the development of therapies for multiple sclerosis. *Trends in Immunology* 2005;26:565-71.
43. Kornek B, Storch MK, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, Olsson T, Linington C, Schmidbauer M, Lassmann H. Multiple Sclerosis and Chronic Autoimmune Encephalomyelitis: A Comparative Quantitative Study of Axonal Injury in Active, Inactive, and Remyelinated Lesions. *The American Journal of Pathology* 2000;157:267-76.
44. Nikic I, Merkler D, Sorbara C, Birnkoetter M, Kreutzfeldt M, Bareyre FM, Brück W, Bishop D, Misgeld T, Kerschensteiner M. A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nature medicine* 2011;17.
45. Kandagaddala LD, Kang M-J, Chung BC, Patterson TA, Kwon O-S. Expression and activation of matrix metalloproteinase-9 and NADPH oxidase in tissues and plasma of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Experimental and toxicologic pathology* 2012;64:109-14.
46. Ellrichmann G, Thöne J, Lee D-H, Rupec RA, Gold R, Linker RA. Constitutive activity of NF-kappa B in myeloid cells drives pathogenicity of monocytes and macrophages during autoimmune neuroinflammation. *Journal of neuroinflammation* 2012;9:1-11.
47. Seo J-E, Hasan M, Han J-S, Kang M-J, Jung B-H, Kwok S-K, Kim H-Y, Kwon O-S. Experimental autoimmune encephalomyelitis and age-related correlations of NADPH

oxidase, MMP-9, and cell adhesion molecules: The increased disease severity and blood–brain barrier permeability in middle-aged mice. *Journal of neuroimmunology* 2015;287:43-53.

48. Swingler R, Compston D. The morbidity of multiple sclerosis. *QJM* 1992;83:325-37.

49. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung H-P, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, Van Den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of neurology* 2001;50:121-7.

50. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Annals of neurology* 2011;69:292-302.

51. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, Öhman S, Racke MK, Sharief M, Sindic CJ. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Archives of neurology* 2005;62:865-70.

52. Rolak LA, Fleming JO. The Differential Diagnosis of Multiple Sclerosis. *The Neurologist* 2007;13:57-72.

53. Miller D, Barkhof F, Montalban X, Thompson A, Filippi M. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *The Lancet Neurology* 2005;4:281-8.

54. Lebrun C, Bensa C, Debouverie M, De Seze J, Wiertlievski S, Brochet B, Clavelou P, Brassat D, Labauge P, Roullet E, CFSEP obo. Unexpected multiple sclerosis: follow-up of 30 patients with magnetic resonance imaging and clinical conversion profile. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2008;79:195-8.

55. Weinshenker BG, Bass B, Rice GPA, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis: A geographically based study. I Clinical course and disability. 1989;112:133-46.
56. Lublin FD, Reingold SC, Sclerosis* NMSSACoCToNAiM. Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey. *Neurology* 1996;46:907-11.
57. Weinshenker BG, Bass B, Rice GPA, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis: A geographically based study. 2 Predictive value of the early clinical course. 1989;112:1419-28.
58. Marburg O. Die sogenannte akute multiple Sklerose: Рипол Классик; 1906.
59. Miller DH, Leary SM. Primary-progressive multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 2007;6:903-12.
60. Pugliatti M, Rosati G, Carton H, Riise T, Drulovic J, Vécsei L, Milanov I. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *European Journal of Neurology* 2006;13:700-22.
61. Noseworthy J, Vandervoort M, Wong C, Ebers G. Interrater variability with the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and Functional Systems (FS) in a multiple sclerosis clinical trial. *Neurology* 1990;40:971-.
62. Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. Relapses and Progression of Disability in Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine* 2000;343:1430-8.
63. Charcot J-M. *Histologie de la sclerose en plaques*. 1868.
64. Ebers GC. Environmental factors and multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 2008;7:268-77.

65. Olsson T, Zhi WW, Höjeberg B, Kostulas V, Jiang Y, Anderson G, Ekre H, Link H. Autoreactive T lymphocytes in multiple sclerosis determined by antigen-induced secretion of interferon-gamma. *Journal of Clinical Investigation* 1990;86:981.
66. Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995;80:695-705.
67. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, Giuliani F, Arbour N, Becher B, Prat A. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nature medicine* 2007;13:1173-5.
68. Krumbholz M, Theil D, Cepok S, Hemmer B, Kivisäkk P, Ransohoff RM, Hofbauer M, Farina C, Derfuss T, Hartle C, Newcombe J, Hohlfeld R, Meinl E. Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain* 2006;129:200-11.
69. Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, Reynolds R, Aloisi F. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 2007;130:1089-104.
70. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal Transection in the Lesions of Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine* 1998;338:278-85.
71. Siffrin V, Radbruch H, Glumm R, Niesner R, Paterka M, Herz J, Leuenberger T, Lehmann SM, Luenstedt S, Rinnenthal JL, Laube G, Luche H, Lehnardt S, Fehling H-J, Griesbeck O, Zipp F. In Vivo Imaging of Partially Reversible Th17 Cell-Induced Neuronal Dysfunction in the Course of Encephalomyelitis. *Immunity* 2010;33:424-36.
72. Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Grummel V, Sommer N, Brück W, Hartung H-P, Stadelmann C, Hemmer B. Identification of a pathogenic antibody response to native myelin oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006;103:19057-62.

73. Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Höftberger R, Botond G, Esterbauer H, Binder CJ, Witztum JL, Lassmann H. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* 2011;134:1914-24.
74. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassman H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of neurology* 2000;47:707-17.
75. Bauer J, Sminia T, Wouterlood FG, Dijkstra CD. Phagocytic activity of macrophages and microglial cells during the course of acute and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroscience research* 1994;38:365-75.
76. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, McNagny KM, Rossi FMV. Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci* 2011;14:1142-9.
77. Mishra MK, Wang J, Silva C, Mack M, Yong VW. Kinetics of Proinflammatory Monocytes in a Model of Multiple Sclerosis and Its Perturbation by Laquinimod. *The American Journal of Pathology* 2012;181:642-51.
78. Vainchtein ID, Vinet J, Brouwer N, Brendecke S, Biagini G, Biber K, Boddeke HWGM, Eggen BJL. In acute experimental autoimmune encephalomyelitis, infiltrating macrophages are immune activated, whereas microglia remain immune suppressed. *Glia* 2014;62:1724-35.
79. Slaney CY, Toker A, Fraser JD, Harper JL, Bäckström BT. A modified superantigen rescues Ly6G⁻ CD11b⁺ blood monocyte suppressor function and suppresses antigen-specific inflammation in EAE. *Autoimmunity* 2013;46:269-78.
80. Barnes D, Hughes RAC, Morris RW, Wade-Jones O, Brown P, Britton T, Francis DA, Perkin GD, Rudge P, Swash M, Katifi H, Farmer S, Frankel J. Randomised trial of oral and intravenous methylprednisolone in acute relapses of multiple sclerosis. *The Lancet* 1997;349:902-6.

81. Gajofatto A, Bacchetti P, Grimes B, High A, Waubant E. Switching first-line disease-modifying therapy after failure: impact on the course of relapsing–remitting multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 2008.
82. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A, Toal M, Lynn F, Panzara MA, Sandrock AW. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine* 2006;354:899-910.
83. Kappos L, Radue E-W, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, Selmaj K, Agoropoulou C, Leyk M, Zhang-Auberson L, Burtin P. A Placebo-Controlled Trial of Oral Fingolimod in Relapsing Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine* 2010;362:387-401.
84. Hartung H-P, Gonsette R, Konig N, Kwiecinski H, Guseo A, Morrissey SP, Krapf H, Zwingers T, Group MiMSS. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *The Lancet* 2002;360:2018-25.
85. He D, Guo R, Zhang F, Zhang C, Dong S, Zhou H. The use of the monoclonal antibody rituximab in patients with relapsing remitting multiple sclerosis (RRMS). *Health* 2013.
86. Kappos L, Polman C, Freedman M, Edan G, Hartung H, Miller D, Montalban X, Barkhof F, Bauer L, Jakobs P. Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology* 2006;67:1242-9.
87. Goodin D, Frohman E, Garmany G, Halper J, Likosky W, Lublin F. Disease modifying therapies in multiple sclerosis. *Neurology* 2002;58:169-78.
88. Albrecht P, Bouchachia I, Goebels N, Henke N, Hofstetter HH, Issberner A, Kovacs Z, Lewerenz J, Lisak D, Maher P, Mausberg A-K, Quasthoff K, Zimmermann C, Hartung H-P, Methner A. Effects of dimethyl fumarate on neuroprotection and immunomodulation. *Journal of Neuroinflammation* 2012;9:1-10.

89. Gunnarsson M, Malmeström C, Axelsson M, Sundström P, Dahle C, Vrethem M, Olsson T, Piehl F, Norgren N, Rosengren L, Svenningsson A, Lycke J. Axonal damage in relapsing multiple sclerosis is markedly reduced by natalizumab. *Annals of neurology* 2011;69:83-9.
90. Bushman JL. Green tea and cancer in humans: A review of the literature. *Nutrition and Cancer* 1998;31:151-9.
91. Haqqi TM, Anthony DD, Gupta S, Ahmad N, Lee M-S, Kumar GK, Mukhtar H. Prevention of collagen-induced arthritis in mice by a polyphenolic fraction from green tea. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999;96:4524-9.
92. Kuriyama S, Hozawa A, Ohmori K, Shimazu T, Matsui T, Ebihara S, Awata S, Nagatomi R, Arai H, Tsuji I. Green tea consumption and cognitive function: a cross-sectional study from the Tsurugaya Project. *The American journal of clinical nutrition* 2006;83:355-61.
93. Chen C-W, Ho C-T. Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black black teas. *Journal of Food Lipids* 1995;2:35-46.
94. Weinreb O, Amit T, Mandel S, Youdim MBH. Neuroprotective molecular mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate: a reflective outcome of its antioxidant, iron chelating and neuritogenic properties. *Genes & Nutrition* 2009;4:283-96.
95. Li L, Chan TH. Enantioselective Synthesis of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), the Active Polyphenol Component from Green Tea. *Organic Letters* 2001;3:739-41.
96. Nagle DG, Ferreira D, Zhou Y-D. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Chemical and biomedical perspectives. *Phytochemistry* 2006;67:1849-55.
97. Zhong Y, Chiou Y-S, Pan M-H, Shahidi F. Anti-inflammatory activity of lipophilic epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives in LPS-stimulated murine macrophages. *Food chemistry* 2012;134:742-8.

98. Zhang H-S, Wu T-C, Sang W-W, Ruan Z. EGCG inhibits Tat-induced LTR transactivation: role of Nrf2, AKT, AMPK signaling pathway. *Life sciences* 2012;90:747-54.
99. Kanadzu M, Lu Y, Morimoto K. Dual function of (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) in healthy human lymphocytes. *Cancer Letters* 2006;241:250-5.
100. Aktas O, Prozorovski T, Smorodchenko A, Savaskan NE, Lauster R, Kloetzel P-M, Infante-Duarte C, Brocke S, Zipp F. Green tea epigallocatechin-3-gallate mediates T cellular NF- κ B inhibition and exerts neuroprotection in autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* 2004;173:5794-800.
101. Ullmann U, Haller J, Decourt J, Girault N, Girault J, Richard-Caudron A, Pineau B, Weber P. A single ascending dose study of epigallocatechin gallate in healthy volunteers. *Journal of International Medical Research* 2003;31:88-101.
102. Chow HS, Cai Y, Hakim IA, Crowell JA, Shahi F, Brooks CA, Dorr RT, Hara Y, Alberts DS. Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals. *Clinical Cancer Research* 2003;9:3312-9.
103. Mazzanti G, Menniti-Ippolito F, Moro PA, Cassetti F, Raschetti R, Santuccio C, Mastrangelo S. Hepatotoxicity from green tea: a review of the literature and two unpublished cases. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2009;65:331-41.
104. Mähler A, Steiniger J, Bock M, Klug L, Parreidt N, Lorenz M, Zimmermann BF, Krannich A, Paul F, Boschmann M. Metabolic response to epigallocatechin-3-gallate in relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomized clinical trial. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2015;101:487-95.
105. Whetten-Goldstein K, Sloan FA, Goldstein LB, Kulas ED. A comprehensive assessment of the cost of multiple sclerosis in the United States. *Multiple sclerosis* 1998;4:419-25.

106. Grima D, Torrance G, Francis G, Rice G, Rosner A, Lafortune L. Cost and health related quality of life consequences of multiple sclerosis. *Multiple sclerosis* 2000;6:91-8.
107. Parkin D, Jacoby A, McNamee P, Miller P, Thomas S, Bates D. Treatment of multiple sclerosis with interferon β : an appraisal of cost-effectiveness and quality of life. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2000;68:144-9.
108. Studienprotokoll:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01417312?term=egcg+ms&rank=4>. zugriff am 22.3.2016.
109. Herstellerinfo: <http://www.bdbiosciences.com/us/applications/blood-collection/cell-biomarker-preservation/bd-vacutainerreg-cpttrade-mono-nuclear-cell-preparation-tube---sodium-heparin/p/362753>. Zugriff am 22.3.2016.
110. Herstellerinfo. <http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macscell-separation/cell-separation-reagents/monocytes-and-macrophages/cd11b-microbeads-human-and-mouse.aspx>. Zugriff am 22.3.2016.
111. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990;11:231-8.
112. Herstellerinfo: <http://www.atcc.org/products/all/TIB-202.aspx>. Zugriff am 22.3.2016.
113. Aufbau der Fluoreszenzmikroskopie, Universität Göttingen: <https://lp.uni-goettingen.de/get/text/6741>. Zugriff am 22.3.2016.
114. Virchow R. Cellular-Pathologie. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* 1871;8:3-39.
115. Shroff H, Galbraith CG, Galbraith JA, Betzig E. Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. *Nat Meth* 2008;5:417-23.

116. Methodik der Zweiphotonenmikroskopie: https://en.wikipedia.org/wiki/Two-photon_excitation_microscopy. Zugriff am 22.3.2016.
117. Formel der Fluoreszenzlebensdauer:
<http://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Documents/Fluorescence/F-10.pdf>.
Zugriff am 22.3.2016.
118. Bildquelle NAD(P)H:
<https://de.wikipedia.org/wiki/Nicotinamidadenindinukleotidphosphat>
<https://de.wikipedia.org/wiki/Nicotinamidadenindinukleotid>. Zugriff am 22.3.2016.
119. Scott TG, Spencer RD, Leonard NJ, Weber G. Synthetic spectroscopic models related to coenzymes and base pairs. V. Emission properties of NADH. Studies of fluorescence lifetimes and quantum efficiencies of NADH, AcPyADH, [reduced acetylpyridineadenine dinucleotide] and simplified synthetic models. *Journal of the American Chemical Society* 1970;92:687-95.
120. Niesner R, Narang P, Spiecker H, Andresen V, Gericke KH, Gunzer M. Selective detection of NADPH oxidase in polymorphonuclear cells by means of NAD(P)H-based fluorescence lifetime imaging. *Journal of biophysics (Hindawi Publishing Corporation : Online)* 2008;2008:602639.
121. Huang S, Heikal AA, Webb WW. Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD (P) H and flavoprotein. *Biophysical journal* 2002;82:2811-25.
122. Yasui H, Sakurai H. Chemiluminescent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA. *Biochemical and biophysical research communications* 2000;269:131-6.
123. Lakowicz JR, Szmajcinski H, Nowaczyk K, Johnson ML. Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1992;89:1271-5.

124. Jameson DM, Thomas V, Zhou D. Time-resolved fluorescence studies on NADH bound to mitochondrial malate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1989;994:187-90.
125. Verveer PJ, Bastiaens PI. Evaluation of global analysis algorithms for single frequency fluorescence lifetime imaging microscopy data. *Journal of microscopy* 2003;209:1-7.
126. Datta R, Alfonso-Garcia A, Cinco R, Gratton E. Fluorescence lifetime imaging of endogenous biomarker of oxidative stress. *Scientific reports* 2015;5:9848.
127. Digman MA, Caiolfa VR, Zamai M, Gratton E. The phasor approach to fluorescence lifetime imaging analysis. *Biophysical journal* 2008;94:L14-L6.
128. Stringari C, Edwards RA, Pate KT, Waterman ML, Donovan PJ, Gratton E. Metabolic trajectory of cellular differentiation in small intestine by Phasor Fluorescence Lifetime Microscopy of NADH. *Scientific reports* 2012;2:568.
129. Herstellerinfo: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D399>. Zugriff am 22.3.2016.
130. Herstellerinfo:
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/general-documents/cms_042179.pdf. Zugriff am 22.3.2016.
131. Fischer MT, Sharma R, Lim JL, Haider L, Frischer JM, Drexhage J, Mahad D, Bradl M, van Horssen J, Lassmann H. NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain* 2012;135:886-99.
132. Fisher M, Levine PH, Weiner BH, Vaudreuil CH, Natale A, Johnson MH, Hoogasian JJ. Monocyte and polymorphonuclear leukocyte toxic oxygen metabolite production in multiple sclerosis. *Inflammation* 1988;12:123-31.

133. Vladimirova O, Lu MF, Shawver L, Kalman B. The activation of protein kinase C induces higher production of reactive oxygen species by mononuclear cells in patients with multiple sclerosis than in controls. *Inflammation Research* 1999;48:412-6.
134. Miller SD, Karpus WJ. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Curr Protoc Immunol* 2007;Chapter 15:Unit 15 1.
135. Weber MS, Prod'homme T, Youssef S, Dunn SE, Rundle CD, Lee L, Patarroyo JC, Stuve O, Sobel RA, Steinman L, Zamvil SS. Type II monocytes modulate T cell-mediated central nervous system autoimmune disease. *Nature medicine* 2007;13:935-43.
136. Pandey KB, Rizvi SI. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2010;3:2-12.
137. Wen Z, Shimojima Y, Shirai T, Li Y, Ju J, Yang Z, Tian L, Goronzy JJ, Weyand CM. NADPH oxidase deficiency underlies dysfunction of aged CD8+ Tregs. *The Journal of Clinical Investigation* 2016;126.
138. Toker A, Slaney CY, Bäckström BT, Harper JL. Glatiramer Acetate Treatment Directly Targets CD11b+Ly6G⁻ Monocytes and Enhances the Suppression of Autoreactive T cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Scandinavian Journal of Immunology* 2011;74:235-43.
139. Herges K, Millward JM, 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:e25456.
140. Nikić I, Merkler D, Sorbara C, Brinkoetter M, Kreutzfeldt M, Bareyre FM, Brück W, Bishop D, Misgeld T, Kerschensteiner M. A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nature medicine* 2011;17:495-9.

141. Salah N, Miller NJ, Paganga G, Tijburg L, Bolwell GP, Rice-Evans C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of biochemistry and biophysics* 1995;322:339-46.
142. Han SG. Protective effects of EGCG through Inhibition of NADPH oxidase expression in endothelial cells. *Food Science and Biotechnology* 2014;23:1611-4.
143. Shin ES, Park J, Shin J-M, Cho D, Cho SY, Shin DW, Ham M, Kim JB, Lee TR. Catechin gallates are NADP⁺-competitive inhibitors of glucose-6-phosphate dehydrogenase and other enzymes that employ NADP⁺ as a coenzyme. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2008;16:3580-6.
144. Nishikawa H, Wakano K, Kitani S. Inhibition of NADPH oxidase subunits translocation by tea catechin EGCG in mast cell. *Biochemical and biophysical research communications* 2007;362:504-9.
145. Blacker TS, Mann ZF, Gale JE, Ziegler M, Bain AJ, Szabadkai G, Duchon MR. Separating NADH and NADPH fluorescence in live cells and tissues using FLIM. *Nature communications* 2014;5.
146. Cheng G, Cao Z, Xu X, Meir EGV, Lambeth JD. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 2001;269:131-40.
147. Maly F, Nakamura M, Gauchat J, Urwyler A, Walker C, Dahinden C, Cross A, Jones O, De Weck A. Superoxide-dependent nitroblue tetrazolium reduction and expression of cytochrome b-245 components by human tonsillar B lymphocytes and B cell lines. *The Journal of Immunology* 1989;142:1260-7.
148. Kovács I, Horváth M, Lányi Á, Petheő GL, Geiszt M. Reactive oxygen species-mediated bacterial killing by B lymphocytes. *Journal of leukocyte biology* 2015;97:1133-7.
149. Wheeler ML, DeFranco AL. Prolonged production of reactive oxygen species in response to B cell receptor stimulation promotes B cell activation and proliferation. *The Journal of Immunology* 2012;189:4405-16.

150. Forehand JR, Johnston Jr RB. Chronic granulomatous disease: newly defined molecular abnormalities explain disease variability and normal phagocyte physiology. *Current opinion in pediatrics* 1994;6:668-75.
151. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston Jr RB, Boyle J, Curnutte J, Gallin JI, Malech HL, Holland SM, Ochs H, Quie P. Chronic granulomatous disease: report on a national registry of 368 patients. *Medicine* 2000;79:155-69.
152. Henriot S, Verweij PE, Holland SM, Warris A. Invasive fungal infections in patients with chronic granulomatous disease. *Hot Topics in Infection and Immunity in Children IX: Springer*; 2013:27-55.
153. Liese J, Kloos S, Jendrossek V, Petropoulou T, Wintergerst U, Notheis G, Gahr M, Belohradsky BH. Long-term follow-up and outcome of 39 patients with chronic granulomatous disease. *The Journal of pediatrics* 2000;137:687-93.
154. Jackson nSH, Gallin JI, Holland SM. The p47phox mouse knock-out model of chronic granulomatous disease. *The Journal of experimental medicine* 1995;182:751-8.
155. Wing K, Klocke K, Samuelsson A, Holmdahl R. Germ-free mice deficient of reactive oxygen species have increased arthritis susceptibility. *European journal of immunology* 2015;45:1348-53.
156. Douglas G, Bendall JK, Crabtree MJ, Tatham AL, Carter EE, Hale AB, Channon KM. Endothelial-specific Nox2 overexpression increases vascular superoxide and macrophage recruitment in ApoE^{-/-} mice. *Cardiovascular research* 2012;94:20-9.
157. Moon JH, Kim TH, Lee HM, Lee SH, Choe W, Kim HK, Lee JH, Oh KH, Lee SH. Overexpression of the superoxide anion and NADPH oxidase isoforms 1 and 4 (NOX1 and NOX4) in allergic nasal mucosa. *American journal of rhinology & allergy* 2009;23:370-6.
158. Wang R, Dashwood WM, Nian H, Löhr CV, Fischer KA, Tsuchiya N, Nakagama H, Ashktorab H, Dashwood RH. NADPH oxidase overexpression in human colon

cancers and rat colon tumors induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine (PhIP). *International Journal of Cancer* 2011;128:2581-90.

159. Chechneva OV, Mayrhofer F, Daugherty DJ, Pleasure DE, Hong J-S, Deng W. Low dose dextromethorphan attenuates moderate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting NOX2 and reducing peripheral immune cells infiltration in the spinal cord. *Neurobiology of disease* 2011;44:63-72.

160. Choi BY, Kim JH, Kho AR, Kim IY, Lee SH, Lee BE, Choi E, Sohn M, Stevenson M, Chung TN, Kauppinen TM, Suh SW. Inhibition of NADPH oxidase activation reduces EAE-induced white matter damage in mice. *Journal of neuroinflammation* 2015;12:1-15.

161. Cifuentes-Pagano E, Meijles DN, Pagano PJ. The quest for selective nox inhibitors and therapeutics: challenges, triumphs and pitfalls. *Antioxidants & redox signaling* 2014;20:2741-54.

162. Csányi G, Cifuentes-Pagano E, Al Ghouleh I, Ranayhossaini DJ, Egaña L, Lopes LR, Jackson HM, Kelley EE, Pagano PJ. Nox2 B-loop peptide, Nox2ds, specifically inhibits the NADPH oxidase Nox2. *Free Radical Biology and Medicine* 2011;51:1116-25.

163. Cifuentes-Pagano E, Saha J, Csányi G, Al Ghouleh I, Sahoo S, Rodríguez A, Wipf P, Pagano PJ, Skoda EM. Bridged tetrahydroisoquinolines as selective NADPH oxidase 2 (Nox2) inhibitors. *Medchemcomm* 2013;4:1085-92.

164. Ebrecht R, Don Paul C, Wouters FS. Fluorescence lifetime imaging microscopy in the medical sciences. *Protoplasma* 2014;251:293-305.

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikro-Liter
µM	Mikro-Molar
µs	Mikro-Sekunden
AEBSF	Aminoethylbenzensulfonylfluorid
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
CGD	Chronic granulomatous disease
CFA	Complete Freund's Adjuvans
CIS	Clinically Isolated Syndrome
DA	Dark Agouti
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DRFZ	Deutsches Rheuma Forschungszentrum
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDSS	Expanded Disability Status Scale
EDTA	Ethylendianetetraacetic Acid
EGCG	Epigallocatechin Gallat
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FAD	Flavinadenindinucleotid
FBS	Fetal bovine serum
FL	Fluoreszenzlebensdauer
FLIM	Fluorescence lifetime imaging measurement
fs	Femto-Sekunden
GA	Glatirameracetat
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gd	Gadolinium
Ggs.	Gegensatz
Gr.	Gruppe
GSH	Glutathion
GTPase Rac	Guanosintriphosphat-abhängiges Schalterprotein
h	Stunde(n)
IC50	inhibitorische Konzentration 50

IFN γ	Interferon γ
insges.	insgesamt
J.	Jahre
l.	links
LFD	Laboratory for Fluorescence Dynamics
LipDH	Lipoamid-Dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
m.	männlich
M.	Monat
MHz	Mega-Hertz
min.	Minute
ml	Milli-Liter
MACS	Magnetic cell sorting
mg	Milligramm
MR(T)	Magnetresonanz(-tomographie)
MS	Multiple Sklerose
mW	Milli-Watt
MW	Mittelwert
n.	nach
NA	numerische Apertur
NAD(H)	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP(H)	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaN ₃	Natriumazid
Ncf1	Neutrophil cytosolic factor 1
neg.	negativ
NF- κ B	Nuclear Factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells
NFL	Neurofilament light
ng	Nano-Gramm
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NOX	NADPH Oxdasen
NRF2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2,
ns	Nano-Sekunden
n.s.	nicht signifikant
o.	oben

o.g.	oben genannt
p	p-Wert
PBMCs	Polymorphonuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PenStrep	Penicillin/Streptomycin
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-myristat-13-acetat
PMTs	Photomultiplier tubes
pos.	positiv
PPMS	Primary progressive MS / Primär progrediente MS
ps	Pico-Sekunden
r.	rechts
RNS	Reactive nitrogen species / Reaktive Stickstoff Spezies
ROS	Reactive oxygen species / Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (medium)
RRMS	Relapsing remitting MS / Remittierend schubförmige MS
s.	siehe
SD	standard deviation / Standardabweichung
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannte
SPMS	Secondary progressive MS / Sekundär progrediente MS
s.u.	siehe unten
TCSPC	Time-correlated single photon count
TNF α	Tumor necrosis factor α
u.	unten
u.a.	unter anderem
UCI	University of California, Irvine
v.	von
Vgl.	vergleiche
w	weiblich
Z.	Zellen
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abb. 24: Der Weg des Monozyten/Makrophagen.....	7
Abb. 25: NADPH-Oxidase-2.....	10
Abb. 26: EGCG.....	18
Abb. 27: Versuchsaufbau.....	21
Abb. 28: Das Fluoreszenzmikroskop.....	27
Abb. 29: Stokes-Shift.....	28
Abb. 30: Aufbau von NAD(P)H.....	30
Abb. 31: Einzelphotonen-Absorptions- und Emissionsspektrum von NADH.....	31
Abb. 32: Zweiphotonen-Absorptionsspektrum von NAD(P)H.....	32
Abb. 33: Zweiphotonen-Emissionsspektrum von NAD(P)H.....	33
Abb. 34: Fluoreszenzlebensdauer von NAD(P)H.....	34
Abb. 35: Biexponentieller Ansatz der FLIM-Auswertung.....	36
Abb. 36: NAD(P)H-FLIM zur Aktivitätsmessung.....	37
Abb. 37: Oxidativer Stress im Phasor.....	39
Abb. 38: NADPH-Oxidasen-Aktivierung in Multipler Sklerose.....	42
Abb. 39: NADPH-Oxidasen-Aktivierung und EDSS.....	44
Abb. 40.1: NAD(P)H-FLIM in Hypoxie.....	45
Abb. 41.2: NAD(P)H-FLIM in Hypoxie (integrierte Darstellung).....	46
Abb. 42: NAD(P)H-FLIM in PMA-behandelten Zellen.....	47
Abb. 43: EGCG-Wirkung in Monozyten.....	49
Abb. 44: Wirkung von EGCG in PMA-behandelten Monozyten.....	50
Abb. 45: Wirkung von EGCG auf Reaktive Sauerstoffspezies in Multipler Sklerose.....	51
Abb. 46: Wirkung von EGCG auf Expressionsebene in Multipler Sklerose.....	52
Abb. 47: NADPH-Oxidasen-Aktivierung in Multiple Sklerose nach Lebensalter.....	53
Abb. 24: NADPH-Oxidasen-Aktivierung nach Alter bei Gesunden.....	54
Abb. 25: NAD(P)H-FLIM in fluoreszenzmarkierten und nichtmarkierten Zellen.....	55
Abb. 26: NAD(P)H-FLIM in mehrfachgefärbten Zellen.....	56
Abb. 27: NADPH-Oxidase-2 in Neuroinflammation.....	63
Abb. 28: Simultanmessung fluoreszenzmarkierter Zellen mit FLIM.....	67

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Julian Johannes Pohlan, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Überaktivierung der NADPH Oxidasen – Ein pathophysiologisches Korrelat der Multiplen 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“ des ICMJE - 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 etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation 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

Lebenslauf

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

Publikationen

Julian Pohlan hatte folgenden Anteil an den aufgeführten Publikationen:

Publikation 1: Bayerl SH, Niesner R, Cseresnyes Z, Radbruch H, **Pohlan J**, Brandenburg S, Czabanka M, Vajkoczy P.

„Time lapse in vivo microscopy reveals distinct dynamics of microglia-tumor environment interactions – a new role for the tumor perivascular space as highway for trafficking microglia.“ *Glia*, 2016.

Beitrag im Einzelnen: Auswertung/Interpretation der Daten, Erstellung von Abbildungen, Verfassen des Manuskripts.

Publikation 2: Mossakowski A, **Pohlan J**, Hauser AE, Paul F, Niesner R, Radbruch H.

“Tracking CNS and systemic sources of oxidative stress during the course of chronic neuroinflammation.” *Acta Neuropathologica*, 2015.

Beitrag im Einzelnen: Studiendesign und Versuchsaufbau, Erhebung der Primärdaten (Zweiphotonenmikroskopie mit Fluoreszenzlebensdauerermessung, Zellisolation, Validierung/Optimierung der *invitro*-Messungen), Auswertung/Interpretation der Daten, Erstellung von Abbildungen, Verfassen des Manuskripts.

Publikation 3: Radbruch H, Bremer D, Mothes R, Günther R, Rinnenthal JL, **Pohlan J**, Ulbricht C, Hauser AE, Niesner R.

„Intravital FRET: Probing Cellular and Tissue Function in Vivo.“ *International journal of molecular sciences*, 2015.

Beitrag im Einzelnen: Auswertung/Interpretation der Daten, Verfassen des Manuskripts.

Publikation 4: Radbruch H, Mossakowski A, **Pohlan J**, Niesner R.

„Fluorescence lifetime imaging reveals NADPH oxidase overactivation as a mechanism of multiple sclerosis pathogenesis.“ *Journal of Neuroimmunology*, 2014.

Beitrag im Einzelnen: Datenacquire, Auswertung/Interpretation, Verfassen des Manuskripts.

Unterschrift des Doktoranden

Unterschrift, Datum und Stempel
der betreuenden Hochschullehrerin

Danksagung

Mein besonderer Dank für jahrelange Unterstützung sowie intellektuellen Austausch gilt Helena Radbruch, Raluca Niesner, Anja Hauser und Agata Mossakowski sowie den weiteren Kolleginnen und Kollegen des *Deutschen Rheuma-Forschungszentrums* und des *Instituts für Neuropathologie der Charité, Berlin*. Besonders danken möchte ich auch Peggy, Robert und Daniel, die mich viel unterstützt haben, und Jan-Leo Rinnenthal, nicht zuletzt für fruchtbare Diskussionen.

Im Rahmen meiner Promotion hatte ich die Chance, meine Arbeit während eines Forschungsaufenthaltes an der *University of California, Irvine* in den Labors von Prof. Enrico Gratton fortzuführen, dem ich – ebenso wie seinem Team – für den freundlichen Empfang und die wesentliche Unterstützung danke. Carmine, ruhe in Frieden; ich denke oft an unsere gemeinsame Zeit zurück und besonders an unseren Ausflug. Weiterhin möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung meines Vorhabens durch das *Carl-Duisberg Fellowship* bedanken.

Außerdem möchte ich mich für die Förderung durch das *Berlin Institute of Health* bedanken, die mir die Fertigstellung meiner Arbeit ermöglicht hat.

Schließlich danke ich meiner Familie, vor allen meinen beiden sehr lieben und hilfsbereiten Eltern, und meinen Freunden, deren Unterstützung ich so oft genossen habe und der ich mir sicher sein kann. Vielen Dank an dich, Toni, du bist die Beste!