

Aus der Neurologischen Klinik

Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Peter Hartung

**Untersuchungen zur Wirkung des Anthracenedions Mitoxantron auf die
Migrationsfähigkeit immunkompetenter Zellen - *ex vivo* und *in vitro*.
Effekte im Kontext der immunsuppressiven Therapie
der Multiplen Sklerose**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Tea Kopadze

2006

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Dekan: Univ-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Nürnberg

Referent: Prof. Dr. med. Kieseier

Korreferentin: Priv-Doz. Dr. med. Neuen-Jacob

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	IV
1.1 Multiple Sklerose	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie	1
1.1.3 Pathophysiologisches Modell	2
1.1.4 Matrix-Metalloproteinasen	7
1.1.5 Matrix-Metalloproteinasen bei EAE und MS	10
1.1.6 Klinik der MS	12
1.1.7 Therapie der MS	13
1.2 Mitoxantron zur Therapie der MS	14
1.2.1 Die Substanz Mitoxantron	14
1.2.2 Vorklinische und klinische Erfahrungen	15
2 Fragestellung	18
3 Material und Methode	19
3.1 <i>Ex vivo</i> Untersuchungen	19
3.1.1 Charakteristik der MS-Patienten	19
3.1.2 Isolierung von PBMCs	19
3.2 <i>In vitro</i> Mitoxantron-Behandlung von PBMCs	20
3.2.1 Isolierung von PBMCs aus dem venösen Blut der gesunden Probanden	20

3.2.2	<i>In vitro</i> Mitoxantrongabe	21
3.3	Migrationsassay	21
3.3.1	Aufbau	21
3.3.2	Durchführung	22
3.3.3	Auswertung	22
3.4	Durchflußzytometrie	22
3.4.1	Durchführung	22
3.4.2	Auswertung	23
3.5	Gelatinzymographie	24
3.5.1	Durchführung	24
3.6	Bestimmung der Expression von MMP-9	25
3.6.1	RNA-Isolierung aus PBMCs	26
3.6.2	Konzentrationsbestimmung von RNA	26
3.6.3	Reverse Transkription	26
3.6.4	Quantitative PCR (qPCR)	28
3.7	Inhibition von MMPs <i>in vitro</i>	28
3.8	Statistische Auswertung	28
4	Ergebnisse	29
4.1	Effekt der <i>in vivo</i> Mitoxantronbehandlung	29
4.2	<i>In vitro</i> Effekt von Mitoxantron	32
4.3	Mitoxantron und MMP-Aktivität	36
4.4	Mitoxantron und MMP-9-Expression	38

4.5	Migration von PBMCs nach MMP-Inaktivierung	39
5	Diskussion	41
6	Zusammenfassung	46
7	Literatur	47
8	Danksagung	59
9	Curriculum vitae	60

Abkürzungen

Abb	Abbildung
APC	Allophycocyanin
Ag	Antigen
APC	antigenpräsentierende Zellen
AB	Applied Biosystems
Abs	Autoantikörper
BD	Becton Deckinson
BHS	Blut-Hirn-Schranke
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	Desoxyribonukleinsäure –Kopie
DMSG	deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft
DEPC	Diethyl Pyrophosphat
ED	Encephalomyelitis Disseminata
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDSS	Expanden Disability Status Scale
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
ECM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetales Kälber Serum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FACS	Fluoreszenz aktivierter Zellsorter
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
IF	Interferon
IL	Interleukin
KOF	Körperoberfläche
LT	Lymphotoxin
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MF	Makrophagen
MMPs	Matrixmetalloproteinasen
MT-MMP	membranständige Matrixmetalloproteinase

MS	Multiple Sklerose
MSTKG	Multiples Sklerose-Therapie-Konsensus-Gruppe
MAG	myelinassoziertes Glykoprotein
n.d.	nicht detektierbar
n.s.	nicht signifikant
OD	optische Dichte
PerCP	Peridinichlorophylprotein
PBMCs	periphere mononukleäre Blutzellen
PE	Phycoerythrin
PPMS	primär chronisch progrediente Multiple Sklerose
qPCR	quantitative-Polymerase-Ketten-Reaktion
RT	Reverse Transkriptase
BSA	Rinderserumalbumin
RRMS	schubförmige Multiple Sklerose
SPMS	sekundär chronisch-progrediente Multiple Sklerose
NO	Stickoxid
TIMP	tissue inhibitors of metalloproteinases
TGF	transformierenden Wachstumsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
TCR	T-Zell-Rezeptor
ZNS	Zentralnervensystem

Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS), auch Encephalomyelitis Disseminata (ED) genannt, ist eine chronische entzündliche demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die sehr heterogene, schubförmige oder progrediente klinische Manifestationen verursacht (Compston and Coles, 2002). Sie ist mit einer Prävalenz von 60 bis 100 auf 100 000 Einwohnern in Nordeuropa und Nordamerika (Noseworthy et al., 2000) die häufigste und klinisch relevanteste demyelinisierende Erkrankung, die im jungen Erwachsenenalter zu bleibender neurologischer Behinderung führt. Die Forschung hat bisher nur einige Teilbereiche der Pathogenese dieser Erkrankung erkannt. Die Zusammenhänge und Abfolge bekannter Pathomechanismen sowie einzelne Aspekte in der inflammatorischen Kaskade sind weiterhin ungeklärt. Die existierenden Konzepte unterliegen ständiger Erneuerung und Erweiterung.

1.1.1 Epidemiologie

Der Erkrankungsgipfel liegt um das 30. Lebensjahr, wobei die MS immer häufiger auch bereits bei Kindern und Jugendlichen diagnostiziert wird (Ruggieri et al., 1999). Frauen sind häufiger als Männer betroffen. Weltweit gibt es ca. 2,5 Mio. Menschen, die an MS erkrankt sind, in Deutschland werden 100 000-120 000 Erkrankte geschätzt (Hein and Hopfenmüller, 2000). Die jährliche Inzidenz liegt bei ca. 3,5-5 pro 100 000 Einwohner (Flachenecker et al., 2005).

1.1.2 Ätiologie

Umwelt und genetische Faktoren beeinflussen maßgeblich die Erkrankungswahrscheinlichkeit (Compston and Coles, 2002). Die hohe Prävalenz der MS bei Kaukasiern im Vergleich zu Afrikanern und Asiaten spiegelt die Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund wider (Rosati, 2001).

Basierend auf verschiedenen genomweiten Kopplungsanalysen und Assoziationstudien ist man heute übereinstimmend der Meinung, dass für das Erkrankungsrisiko eine große Anzahl unterschiedlicher Gene eine Rolle spielt (polygenetische Vererbung) (Compston, 1999). Versuche, die Krankheitsbestimmende Gene zu definieren, blieben bisher weitgehend erfolglos (Oksenberg et al., 2001). Neben den genetischen Faktoren belegten epidemiologische Studien den Einfluss von

Umweltfaktoren auf die Pathogenese der MS. Fallhäufungen von MS, wie sie unter anderem auf den Färöer Inseln oder auf Island beobachtet wurden, gaben Anlass zu der Vermutung, dass es sich bei den Umweltfaktoren um infektiöse übertragbare Agentien, möglicherweise einen von mehreren verschiedenen Viren handelt (Kurtzke, 2000).

1.1.3 Pathophysiologisches Modell

Die wesentlichen Strukturmerkmale der MS sind fokale, scharf begrenzte Entmarkungsherde, die mit Entzündung, astrozytärer Gliose und variabler Axondestruktion assoziiert sind (Hemmer et al., 2003). Die Läsionen sind im ZNS zu finden und zeigen eine Prädisposition für die Sehnerven, den Hirnstamm, das Rückenmark, das Kleinhirn und periventriculäre weiße Substanz. Der einer MS-Läsion zugrunde liegenden Pathomechanismus ist trotz intensiver Untersuchung in den letzten Jahren immer noch unvollständig verstanden.

Das entzündliche Infiltrat der MS-Läsion besteht im wesentlichen aus T-Lymphozyten, wenigen B-Lymphozyten und Plasmazellen sowie ausgedehnten Makrophagen-Mikroglia Ansammlungen (Kieseier et al., 2005). Die Entzündungsreaktion in der MS-Plaques ist mit einer Aufregulation verschiedener Zytokine assoziiert (Cannella and Raine, 1995), die ebenfalls im Liquor von MS-Patienten mit aktiver Erkrankung gefunden werden (Link, 1998). Dazu zählen die Zytokine Interleukin-2 (IL-2), Interferon (IFN)- γ und Tumornekrosefaktor (TNF)- α . Daneben werden eine Reihe von Adhäsionsmolekülen, Histokompatibilitätsantigenen, Chemokinen, sowie Stressproteinen von aktivierten Endothelzellen in Läsionen exprimiert (Hartung et al., 1995).

T-Zellen (CD4⁺ T-Helferzellen sowie CD8⁺ zytotoxische T-Zellen) spielen eine Schlüsselrolle bei der gerichteten Immunantwort gegen das ZNS. Initial wird eine Phase durchlaufen, in der die inflammatorischen Vorgänge im Vordergrund stehen. Klinisch entspricht dies der Abfolge von Schüben und Remissionen in den frühen Phasen der Erkrankung. Im Verlauf folgt eine zweite Phase, in der Demyelinisierung und axonaler Schaden zunehmen, während die inflammatorischen Komponenten weniger Bedeutung zu haben scheinen („neurodegeneratives Stadium“). Klinisch entspricht dies dem Stadium der sekundär chronischen Progression (Hohlfeld, 1997), (Noseworthy et

al., 2000); (Hemmer et al., 2003). Prineas und Barnett (Barnett and Prineas, 2004) postulieren hingegen die Möglichkeit, dass die inflammatorischen Reaktionen ein sekundäres Ereignis darstellen. Demnach wird der programmierte Zelltod von Oligodendrozyten als initiales Ereignis bei der Entstehung einer neuen MS-Läsion angesehen, mit konsekutiver Aktivierung von Mikroglia, infolgedessen es möglicherweise zu einer Amplifizierung der Entzündung und zum Untergang von Myelin kommt (Trapp, 2004).

Autoimmune T-Zellen, die bei jedem Individuum vorhanden sind, jedoch normalerweise immunologischen Kontrollmechanismen unterliegen, werden im peripheren Immunsystem, beispielsweise im Lymphknoten aktiviert. Welche Mechanismen beim MS-Kranken, aber nicht beim Gesunden zur pathologischen Aktivierung der T-Zellen führen, ist bislang unklar. Diskutiert wird auch „Molekulares Mimikry“. Dieses Modell besagt, dass ein Pathogen mit struktureller Ähnlichkeit zu Myelin-Antigenen in der Peripherie in der Lage ist, T-Zellen zu aktivieren, die dann die Blut-Hirn-Schranke passieren können und körpereigenes Myelin als fremd erkennen (Wucherpfennig and Strominger, 1995).

In einem anderen Modell wird postuliert, dass die Immunantwort sehr schnell und effektiv durch Superantigene induziert werden kann (Schiffenbauer et al., 1998). Diese stark immunogenen, durch Bakterien oder Viren produzierten Proteine werden nicht durch Antigen-präsentierende Zellen prozessiert, sondern sind in der Lage, direkt an den MHC (Haupthistokompatibilitätskomplex (von engl: Major Histocompatibility Complex)–Klasse-II-CD4⁺ Zell-Komplex zu binden. Andere Denkmodelle fokussieren auf ein relatives funktionelles Defizit in der Ausprägung so genannter regulatorischer T-Zellen sowie bei der T-Zell-Tolerisierung (Compston and Coles, 2002).

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass in den MS-Läsionen vorwiegend CD8⁺ T-Zellen zu finden sind, während in den Meningen und den gefäßnahen Regionen CD4⁺ T-Zellen dominieren (Babbe et al., 2000). Aktivierte CD4⁺ Zellen, die Myelin-Antigene erkennen, können gehäuft im Blut von Patienten nachgewiesen werden. *In vitro* – Untersuchungen zeigten, dass CD8⁺ Zellen Oligodendrozyten direkt zytotoxisch schädigen können (Jurewicz et al., 1998) und dies neben der

klassischen TH1-medierte Entzündung eine zweite Möglichkeit darstellt, Oligodendrozytenschädigung und Entmarkung zu induzieren.

Die humorale Immunantwort durch B-Zellen in der MS zeigt sich in der erhöhten intrathekalen IgG-Antikörper-Produktion und dem Nachweis Oligoklonaler Banden im Liquor, was für diagnostische Zwecke genutzt wird (Ritchie et al., 2004), (Monson et al., 2005). Bis heute ist allerdings die Antigenspezifität der oligoklonalen Banden unbekannt. Die Pathogenese der Multiplen Sklerose ist in *Abbildung 1.* schematisch dargestellt.

Zusammenfassend sind die T-Zellen für die Initiation der Inflammation in der Immunpathogenese der MS verantwortlich. Die T-Zell-Aktivierung ermöglicht die Migration über die Blut-Hirn-Schranke, ein Vorgang, der durch eine komplexe Kaskade von Adhäsionsmolekülen, chemotaktischen Signalen und Migrationspromotoren gesteuert wird. Im ZNS findet eine lokale Reaktivierung von CD4⁺ als auch von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen statt (Babbe et al., 2000). Es kommt zur Freisetzung proinflammatorischer TH1-Zytokine und zur Zerstörung der Myelinscheide durch verschiedene Typen von Entzündungszellen.

Histopathologische Untersuchungen erbrachten Hinweise auf vier verschiedene Typen von Demyelinisierung bei Patienten mit MS. Die Muster der Demyelinisierung waren heterogen zwischen Patienten, aber verschiedene Läsionen desselben Patienten wiesen dasselbe Muster der Demyelinisierung auf (Lucchinetti et al., 2000). In den Typen I und II zeigte sich eine ausgeprägte entzündliche Komponente mit Infiltration der Läsionen mit T-Zellen und Monozyten/Makrophagen. Im Typ II fand sich zusätzlich zu der T-Zell- und Monozyten/Makrophageninfiltration der Nachweis von Komplementfaktoren und Immunglobulinen. In den Typen III und IV zeigten sich als typische Merkmale Störungen der Oligodendrozyten. Im Typ III wurden Zeichen der Oligodendrozytenapoptose gefunden sowie ein bevorzugter Verlust des myelinassoziierten Glykoproteins (MAG). Der Typ IV zeichnete sich durch einen Untergang der Oligodendrozyten insbesondere in der periläsionalen weißen Substanz aus (Lassmann et al., 2003). Aufgrund dieser Heterogenität im histopathologischen Bild wurde postuliert, dass den einzelnen Typen verschiedene pathogenetische Mechanismen in der Läsionsentstehung zugrunde liegen. So wird angenommen, dass es sich bei den Typen I und II um eine

primär (autoimmun) entzündlich vermittelte Demyelinisierung handelt. Für die Typen III und IV wird eine primäre Schädigung der Oligodendrozyten vermutet. Die entzündliche Infiltration wird hier als Sekundärphänomen betrachtet. Das Konzept von Barnett und Prineas (Barnett and Prineas, 2004), dass die Oligodendrozytenschädigung ein initiales Ereignis bei der Läsionsbildung darstellt, unterscheidet sich zunächst nicht von den pathogenetischen Mechanismen, die der Entstehung von Typ-III-Läsionen zugrunde gelegt werden.

In dem autoaggressiven, inflammatorischen Stadium kommt es bereits früh zur Axonschädigung und zum Axonverlust (Trapp et al., 1999); (Kuhlmann et al., 2002). Die Mechanismen, die zur axonalen Schädigung bei der MS führen, sind im Detail noch unbekannt. Einige Untersuchungen zeigen eine Assoziation der Axonschädigung mit der Anzahl von Makrophagen und CD8⁺ T-Lymphozyten in den Läsionen (Bitsch et al., 2000). Experimentelle Untersuchungen legen eine Rolle von CD8⁺ T-Lymphozyten bei der axonalen Schädigung nahe (Rivera-Quinones et al., 1998; Medana et al., 2001). In der oben genannten neuropathologischen Untersuchung zeigte sich auch eine gewisse Dissoziation zwischen aktiver Entmarkung und Axonschädigung. Die daraus resultierende Hypothese ist, dass die Destruktion von Myelin und Axonen durch unterschiedliche Mediatoren vermittelt wird.

Die vorgestellten Konzepte deuten darauf hin, dass sowohl eine autoimmun entzündlich vermittelte Demyelinisierung als auch eine primäre Oligodendrozytenschädigung die Entstehung einer MS-Läsion auslösen können. Somit ist das Konzept der Läsionsauslösung ohne Entzündung zwar neu aufgegriffen, sollte aber nur als Bestätigung der seit einigen Jahren postulierten Heterogenität der Läsionsentstehung aufgefasst werden. Offen bleibt weiterhin, wie es zu dem einen bzw. anderen Ereignis kommt, denn weder der Auslöser einer Oligodendrozytenapoptose, noch die initiale Aktivierung der Entzündungsreaktion sind bekannt. Bislang ist auch noch ungeklärt, ob die eine Form in die andere übergehen kann; die Daten sprechen aber dafür, dass es tatsächlich unterschiedliche pathophysiologische Entstehungsmechanismen von MS-Läsionen gibt (Trebst et al., 2006).

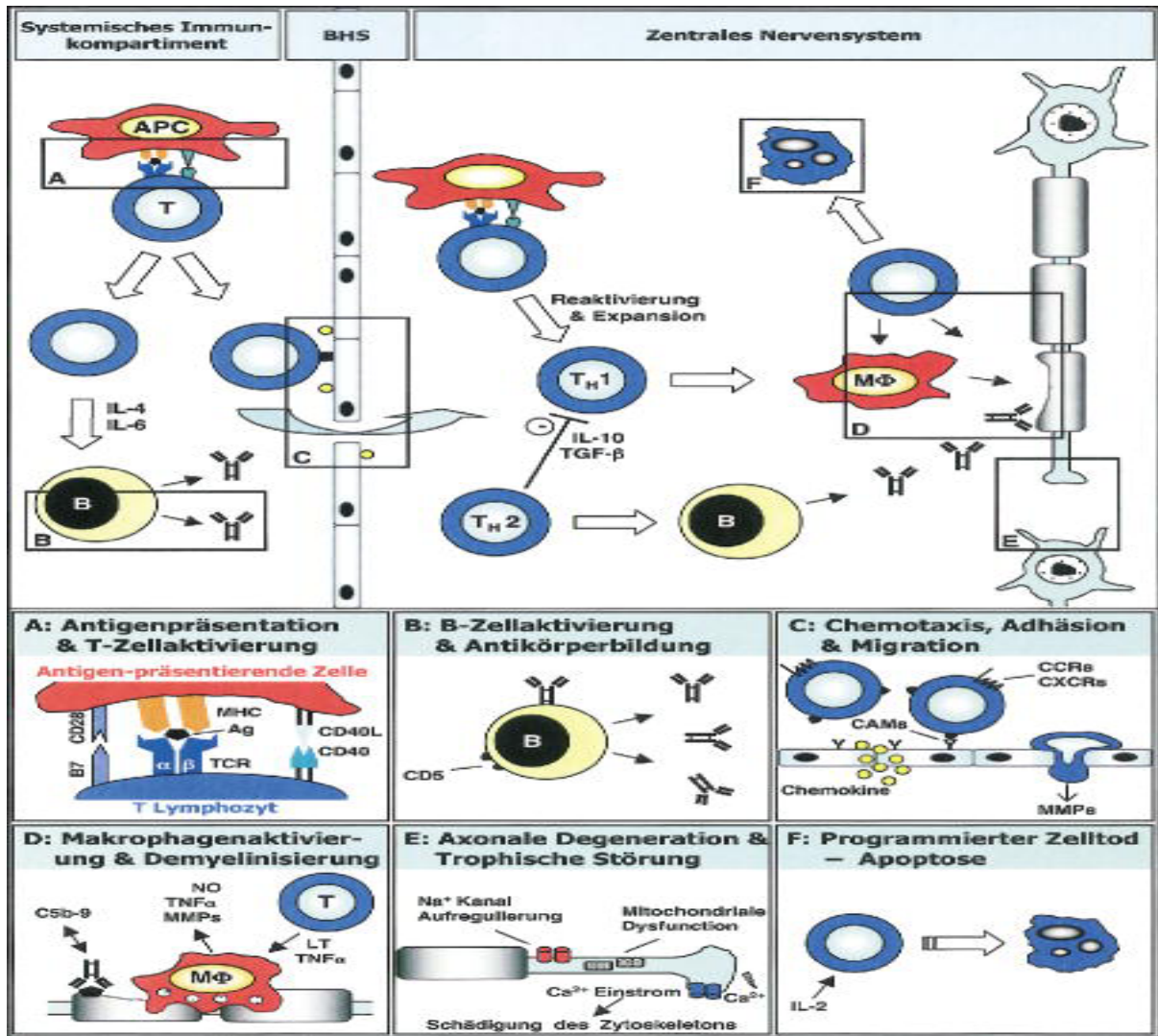


Abbildung 1: Schematische Darstellung der MS-Pathogenese (Wiendl et al., 2004). Im systemischen Immunkompartiment erkennen autoreaktive T-Zellen (T) über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) ein spezifisches (Auto-)Antigen (Ag), das über das Haupthistokompatibilitätsmolekül (MHC) und die gleichzeitige Präsentation kostimulatorischer Signale (CD28-B7, CD40-CD40L) auf der Zelloberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie beispielsweise Monozyten oder Makrophagen, präsentiert wird (*dargestellt in A*). Aktivierte T-Lymphozyten können die Blut-Hirn-Schranke (BHS) überqueren, um in das zentrale Nervensystem (ZNS) zu gelangen (*dargestellt in C*). Im ZNS erfolgt eine Reaktivierung und Expansion von T-Zellen, die bei Mikroglia Zellen/Makrophagen (MF) eine vermehrte phagozytotische Aktivität, Produktion von Zytokinen, wie beispielsweise dem Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Lymphotoxin (LT), und der Freisetzung toxischer Mediatoren, wie Stickoxid (NO), induzieren und somit die Demyelinisierung und axonale Schädigung vorantreiben. Autoantikörper (Abs), die die BHS überqueren oder im ZNS lokal von B-Lymphozyten oder Mastzellen (B*) produziert werden, tragen zu diesem Prozess bei. Die Bindung von Abs an Autoantigene aktiviert die Komplementkaskade, die zur Bildung des terminalen lytischen Komplexes

(C5b-9) und der nachfolgenden Lyse der Zielstruktur führt (*dargestellt in B und D*). Die Aufregulierung von Na⁺- und Ca²⁺-Kanälen auf der Axonoberfläche, die Fehlfunktion von Mitochondrien und der Verlust trophischer Signale tragen zur axonalen Disintegration und Degeneration bei (*dargestellt in E*). Die entzündliche Reaktion wird durch antiinflammatorische Zytokine, wie beispielsweise Interleukin (IL)-10 oder dem transformierenden Wachstumsfaktor (TGF)-β, reguliert. Darüber hinaus induziert IL-2 einen programmierten Zelltod (Apoptose) bei enzephalitogenen T-Lymphozyten (*dargestellt in F*)

1.1.4 Matrix-Metalloproteinasen

Die gegen bestimmte Antigene des ZNS gerichteten T-Zellen nehmen nur einen sehr kleinen Teil des zirkulierenden Lymphozytenpools ein. Sie müssen nach ihrer Aktivierung in der Peripherie erst die BHS überwinden, um den Entzündungsprozess in Gang setzen zu können. Das morphologische Korrelat der BHS stellen das Kapillarendothel und perivaskuläre Strukturen wie die Membrana limitans gliae perivascularis dar (Engelhardt, 2003). Die Endothelzellen werden durch so genannte „Tight Junctions“ fest miteinander verbunden und sind für die Permeabilitätseigenschaften der BHS entscheidend. Die Membrana limitans gliae perivascularis wird von den Astrozytenfortsätzen gebildet. Zusammengenommen bewirken Tight Junctions und mehrschichtige dichte Interzellularkontakte zwischen den Endothelzellen, dass der Durchtritt mononukleärer Zellen, aber auch von Medikamenten und anderen Substanzen, in das Hirnparenchym erschwert ist.

Heute ist bekannt, dass die Auswanderung immunkompetenter Zellen aus den Blutgefäßen über die BHS in das Gehirnparenchym hinein ein komplexer Vorgang ist. Bei der Multiplen Sklerose kommt es als Reaktion auf den entzündlichen Stimulus zu einer Hochregulierung von Chemokine (Taub et al., 1995) und später Adhäsionsmolekülen. Die beiden Substanzen spielen eine besondere Rolle bei der Migration der immunkompetenten Zellen (Hartung et al., 1995) (siehe *Abbildung 1 (C)*). Außerdem um die Basallmembrane der Blut-Hirn Schranke zu durchdringen, bedienen sich die aktivierten T-Zellen einer besonderen Klasse von Proteasen, der so genannten Matrix-Metalloproteinasen (Lindberg et al., 2001).

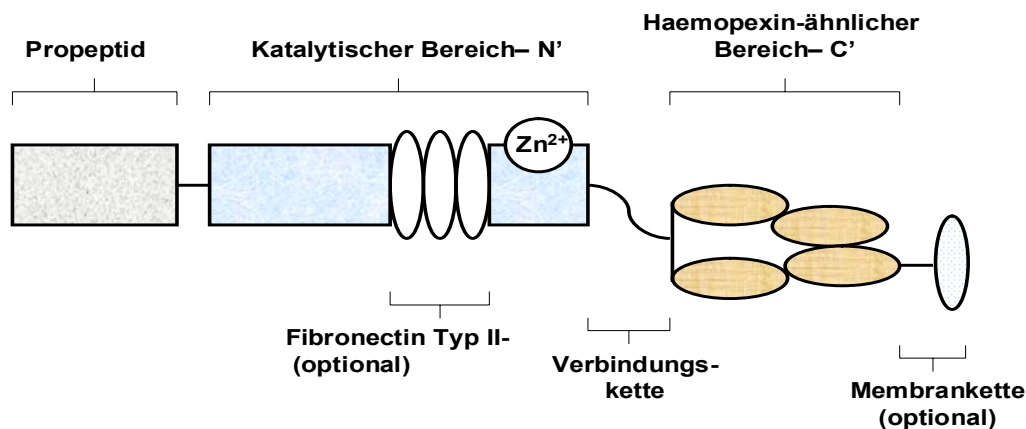
Die Familie Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) umfasst eine Gruppe strukturell verwandter zinkhaltiger Endoproteasen. Zu ihr zählen die Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysin, sowie die membranständige MMP (MT-MMP, für „membrane-type MMP“). Derzeit sind mehr als 23 unterschiedliche Metalloproteinasen bekannt. Zur Wahrung der Übersichtlichkeit wurde eine Nomenklatur geschaffen, bei der, neben dem ursprünglichen Eigennamen, jeder einzelnen MMP eine entsprechende Nummer zugeordnet wurde (Tabelle 1). Strukturell gemeinsam ist all diesen eine Hämopexin-ähnliche Domäne, so wie der zur Aktivierung relevante „Cystein-Schalter“ (Kieseier et al., 1999a; Hartung and Kieseier, 2000; Yong, 2005; Bar-Or et al., 2003). (Abb 2).

Tabelle 1: Übersicht über die bekannten Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)

<i>Gruppe</i>	<i>Enzym</i>	<i>MMP Nr.</i>
Kollagenasen	Interstitielle Kollagenase	MMP-1
	Neutrophile Kollagenase	MMP-8
	Kollagenase-3	MMP-13
	Kollagenase-4	MMP-18
Gelatinasen	Gelatinase A	MMP-2
	Gelatinase B	MMP-9
Stromelysine	Stromelysin-1	MMP-3
	Stromelysin-2	MMP-10
	Stromelysin-3	MMP-11
Matrilysin	Matrilysin-1	MMP-7
	Matrilysin-2	MMP-26
MT-MMP	MT-1-MMP	MMP-14
	MT-2-MMP	MMP-15
	MT-3-MMP	MMP-16
	MT-4-MMP	MMP-17
	MT-5-MMP	MMP-24
	MT-6-MMP	MMP-25
Andere	Makrophagen-Metalloelastase	MMP-12
	Enamelysin	MMP-20
	Xenopus MMP	MMP-21
	RASI 1	MMP-19

Während die MT-MMPs an der Zelloberfläche gebunden vorliegen, werden alle übrigen MMPs von einer Vielzahl verschiedener Zellen in den Extrazellularraum als latente Pro-Enzyme sezerniert und durch entsprechende proteolytische Schritte aktiviert (Birkedal-Hansen, 1995).

Die Regulation der MMP-Aktivität wird auf unterschiedlichen Ebenen streng kontrolliert (Ries and Petrides, 1995): auf der Ebene der Gentranskription, auf der Ebene der Sezernierung, oder auch extrazellulär durch spezifische Inhibitoren, den so genannten TIMPs (Visse and Nagase, 2003). Zahlreiche Zytokine wie z.B. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α (Gbadamosi et al., 2003, Unemori et al., 1991), Interleukin-1 (Lyons et al., 1993), Transformations-Wachstumsfaktor (von engl: tumor growth factor TGF)- β (Edwards et al., 1987) und Eicosanoide, insbesondere Prostaglandin E₂ (Busiek et al., 1995) können die MMP-Expression unmittelbar auf dem Tanskriptionsniveau regulieren.



Ab

bildung 2: Die allgemeine Domänenstruktur der Matrixmetalloproteinasen (Lindberg et al., 2001). Alle Enzyme der MMP-Familie besitzen eine ähnliche Grundstruktur, welche aus mindestens drei Domäne besteht: 1) einer Propeptidsequenz, welche bei Aktivierung gespalten oder entfernt wird, 2) einer N-terminalen katalytischen Domäne, welche die Zink-Bindungsstelle beinhaltet und 3) einer C-terminalen, hemopexinähnlichen Domäne, welche die Bindung von TIMP (tissue inhibitors of metalloproteinases), verschiedenen Substraten und einen Teil der proteolytischen Aktivitäten beeinflussen. Zusätzlich besitzen die Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) jeweils drei fibronectinähnliche Domänen, die erforderlich sind um Kollagen, Gelatin und Elastin zu binden und zu spalten.

MMPs können nahezu alle Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM), wie beispielsweise Kollagen, Elastin, Fibronectin oder Laminin abbauen (Chandler et al., 1997). Der Verdau extrazellulärer Matrixproteine ist ein wichtiger Schritt bei zahlreichen physiologischen als auch pathologischen Vorgängen, bei denen die Beteiligung von MMPs und ihrer Inhibitoren wichtig erscheint (Birkedal-Hansen, 1995). Zu den physiologischen Prozessen zählen beispielsweise die Angiogenese (Hiraoka et al., 1998), die Ovulation und der Knochenaufbau (Clark Ian M., 2001). Pathologische Vorgänge umfassen Entzündungsreaktionen, Osteoarthritis, Kornealulzeration, Tumorinvasion und Metastasierung (Woessner, Jr., 1994); (Giannelli et al., 1997); (Wilson et al., 1997).

1.1.5 Matrix-Metalloproteinasen bei EAE und MS

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist eine entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems und wird häufig als Tiermodell zur Untersuchung möglicher pathogenetisch relevanter Mechanismen und deren therapeutischer Modulation bei der MS benutzt. Bei Nagetieren kann EAE aktiv durch die Injektion von Proteinen des zentralen Nervensystems oder durch Transfer aktivierter enzephalitogener T-Zellen induziert werden (Swanborg, 1995); (Wekerle, 1993)).

Es gibt Hinweise, dass MMPs einen mannigfaltigen Beitrag zur Entstehung der EAE leisten (Pagenstecher et al., 1998). Eine Vielzahl von Zellen, einschließlich aktivierter T-Lymphozyten, Makrophagen, Astrozyten und Mikroglia, sind in der Lage, MMPs zu exprimieren. Im Liquor von EAE erkrankten Tieren fanden sich erhöhte Spiegel der Gelatinase B (Kieseier et al., 1998); (Gijbels et al., 1992). Die intrazerebrale Injektion bzw. Induktion von Gelatinase A und B *in vivo* führten zu einem Abbau der extrazellulären Matrix sowie einer Öffnung der Blut-Hirn-Schranke ((Rosenberg et al., 1992), (Rosenberg et al., 1994)). Darüber hinaus zeigte sich, daß die transmembranöse Migration von T-Zellen einen durch Gelatinase-B-vermittelten Prozeß darstellt (Leppert et al., 1995). Da die Migration autoreaktiver T-Lymphozyten vom Blutstrom ins ZNS bei der Entstehung autoimmunvermittelter entzündlicher Demyelinisierung von grundlegender Bedeutung erscheint, wurde diese Beteiligung den MMPs eine strategisch entscheidende Rolle beimessen (Kieseier et al., 1998). Ein weiterer möglicher Angriffspunkt dieser Proteasen bei der Pathogenese entzündlicher

Erkrankungen des Nervensystems ist die Markscheide. *In vitro*-Experimente zeigten, dass MMPs bzw. Gelatinase A, Stromelysin-1, interstitiale Kollagenase, Matrilysin und Gelatinase B in der Lage sind, einzelne Proteinbestandteile des Myelins abzubauen und deshalb höchstwahrscheinlich zum Myelin-Zerfall beizutragen (Chandler et al., 1997).

In Untersuchungen, die das zeitliche Verteilungsmuster verschiedener MMPs während des gesamten klinischen Verlaufs der EAE analysierten, konnte gezeigt werden, dass MMPs nicht gemäß einer Alles-oder-Nichts-Regel antworten, sondern differenziert reguliert werden (Kieseier et al., 1998); (Clements et al., 1997). Insbesondere wurde eine signifikante Aufregulierung von Matrilysin und der Gelatinase B zum Zeitpunkt maximaler Erkrankung gefunden, was auf eine mögliche Schlüsselrolle dieser beiden MMPs bei der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen des zentralen Nervensystems hinweist (Hartung and Kieseier, 2000).

Zahlreiche Ergebnisse aus *ex-vivo* als auch *in-vitro*-Experimenten weisen klar auf eine mögliche pathogenetisch wichtige Rolle von MMPs bei entzündlichen und demyelinisierenden Erkrankungen des zentralen Nervensystems hin (Yong, 2005).

Die Markscheide enthält eine Vielzahl verschiedener Proteine, die potentiell durch neutrale Proteasen verdaut werden können. Eine erhöhte Aktivität solcher Proteasen, insbesondere der Gelatinase B, konnte im Liquor von MS-Patienten während eines Krankheitsschubes nachgewiesen werden (Gijbels et al., 1992). Verschiedene Untersuchungen versuchten Gelatinase B innerhalb der MS Läsion zu lokalisieren. So konnte gezeigt werden, dass in demyelinisierenden Läsionen Gelatinase B sowohl von Astrozyten als auch von Makrophagen exprimiert wird. Gelatinase B-induzierende Zytokine wurden ebenfalls in aktiven MS-Läsionen gefunden, sowohl in perivaskulären Zellen als auch in aktivierter Mikroglia. Darüber hinaus fanden sich noch andere MMPs in MS-Plaques: Makrophagen exprimierten interstitielle Kollagenase, Gelatinase A und Stromelysin- 1. Die beiden letztgenannten konnten auch Astrozyten zugeordnet werden (Hartung and Kieseier, 2000), (Cuzner et al., 1996), (Maeda and Sobel, 1996).

Zahlreiche Befunde deuten auf eine Beteiligung der MMPs bei der Störung der Blut-Hirn-Schranke hin. Erhöhte Gelatinase B-Spiegel im Liquor sind mit einer Blut-Hirn-Schranken-Störung assoziiert, wie durch Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) gezeigt werden konnte. Darüber hinaus führte die

Behandlung mit hochdosiertem Methylprednisolon, einer die MMP-Transkription hemmenden Substanz, sowohl zu einer Verminderung der Gadolinium-aufnehmenden Läsionen als auch der Liquorspiegel der Gelatinase B (Rosenberg et al., 1996). Aus der Vielzahl bekannter MMPs wurde insbesondere der Gelatinase A und B eine Rolle bei der Migration von T-Zellen durch die Basalmembran zugesprochen (Leppert et al., 1996). Stüve und Kollegen postulieren die Möglichkeit (Stüve et al., 1996), dass das verminderte Migrationsverhalten der T-Lymphozyten *in vitro* mit einer verminderten proteolytischen Aktivität von Gelatinase B korrespondieren könnte.

Alle bisher erhobenen Befunde ergeben sich folgende Mechanismen, durch die MMPs zur Pathogenese und Progression entzündlich demyelinisierender Erkrankungen des zentralen Nervensystems beizutragen scheinen: Förderung der T-Zell-Migration, Schädigung der Blut-Hirn-Schranke, Abbau von Myelin und die Freisetzung des entzündungsfördernden Zytokins TNF- α (Hartung and Kieseier, 2000), (Kieseier et al., 1999c)

1.1.6 Klinik der MS

Das klinische Bild der Multiplen Sklerose umfasst eine große Vielfalt an möglichen neurologischen und psychiatrischen Symptomen. Grundsätzlich kann bei der MS jeder zentrale Ausfall gefunden werden. Als typische Symptome gelten spastische Paresen, Extremitäten- und Gangataxie, zentrale Visusmindeung, Doppelbilder, Parästhesien, Dysarthrie sowie Blasen und Sexualstörungen. Andererseits gibt es kein Symptom, das für die MS spezifisch wäre. In Kombination gelten sie als typisch für dieses Krankheitsbild.

Der Krankheitsverlauf ist bei den meisten Patienten zu Beginn der Erkrankung schubförmig („relapsing remitting MS“; RRMS). Bei etwa 10 % der Patienten verläuft die Krankheit von Beginn an chronisch-progredient („primary progressive MS“; PPMS). Primär schubförmige Erkrankungen gehen nach 10-20 jährigem Krankheitsverlauf in vielen Fällen in einen sekundär chronisch-progredienten Verlauf über („secondary progressive MS“; SPMS).

Um den Verlauf und den Schweregrad der Erkrankung in einer Art Skalierung zu erfassen und die Vergleichbarkeit der Aussagen und Befunde herzustellen, hat sich international am verbreitetsten die

Skala nach Kurtze, der Expanded Disability Status Scale (EDSS) für MS-Patienten durchgesetzt. Bei der Einstufung werden durch die verschiedenen Systeme des ZNS hindurch Graduierungen für das Maß der funktionellen Behinderung angegeben. Die Skala rangiert von 0 (neurologisch unauffällig) bis 10 (verstorben aufgrund der MS) (Schmidt R.M.Hoffmann F.A., 2006).

1.1.7 Therapie der MS

Da die Pathogenese der Multiplen Sklerose bisher nicht vollständig geklärt ist, gibt es auch noch keine kausale Therapie. Die Therapie der Multiplen Sklerose gliedert sich in drei Teilbereiche: die Akuttherapie der MS-Schubs, die langfristig angelegte immunmodulatorische Therapie mit dem Ziel der Einflussnahme auf den zukünftigen Krankheitsverlauf und die symptomatische Therapie, die darauf abzielt, Symptome, die durch die MS hervorgerufen wurden, zu mildern. Der Verlauf der MS spielt eine entscheidende Rolle dafür, welche Therapie gewählt werden muss. Die Schubtherapie mit Glukokortikosteroiden ist zurzeit die einzige etablierte Behandlung einer akuten Verschlechterung bei MS, für die auch Studien relativ guten Evidenzgrades vorliegen (Grauer et al., 2001).

Zur immunmodulatorische Basistherapie (*Tabelle 2*) mit dem Ziel der Reduktion der Schubfrequenz und der Verhinderung der Akkumulation neurologischer Defizite im Krankheitsverlauf sollten vorzugsweise die drei Interferon-Präparate sowie Copaxone eingesetzt werden. Bei Unverträglichkeit dieser Substanzen oder Ablehnung einer parenteralen Therapie kann in zweiter Linie Azathioprin gegeben werden. Üblicherweise sollte der Einsatz von Mitoxantron im Rahmen einer Eskalationstherapie bei Patienten mit hochaktivem schubförmigen Verlauf und progredientem Verlauf bei Therapieversagen der immunmodulatorischen Basistherapie erwogen werden (Rieckmann and Toyka, 2002).

Tabelle 2: Zugelassene Substanzen für die Immuntherapie der MS

<i>Substanz</i>	<i>Handelsnahme</i>	<i>Dosierung</i>	<i>Zulassung</i>	<i>Indikation</i>
Interferon-beta 1b	Betaferon ®	250µg sc., jeden 2.Tag	1995, 1999	RR, SP
Interferon-beta 1a	Avonex ®	30µg i.m., 1x pro Woche	1997	RR, CIS
Interferon-beta 1a	Rebif ®	3 x 22µg/Woche,sc., 3 x 44µg/Woche,sc.	1998	RR

Glatirameracetat	Copaxone ®	20mg/Tag sc.	2001	RR
Azathioprin	Imurek ®	2,5mg/kgKG, täglich p.o.	2001	RR
Mitoxantrone	Ralenova ®	12mg/kgKG, i.v.alle 3 Monate	2002	RR, SP

1.2 Mitoxantron zur Therapie der MS

1.2.1 Die Substanz Mitoxantron

Mitoxantron - $C_{22}H_{28}N_4O_6 \cdot 2HCl$, Molekulargewicht von 517,4 kDa - ein vollsynthetisch hergestelltes Aminoanthracenedion (*Abb. 3*), ist ein Zytostatikum aus der Klasse der Anthracenedione und weist strukturelle Ähnlichkeiten zu den Anthracyclin-antibiotika Daunorubicin und Doxorubicin auf (Jeffery and Herndon, 2004). Dieses Medikament wurde im Jahre 1970 entwickelt, wird seit 1979 in der Onkologie eingesetzt und zeigt eine große Effektivität bei der Behandlung der verschiedenen malignen Erkrankungen wie z.B. bei dem Brustkrebs, metastasierten Prostatacarcinom, der Leukämie und der malignen Lymphomen (Shenkenberg and Von Hoff, 1986).

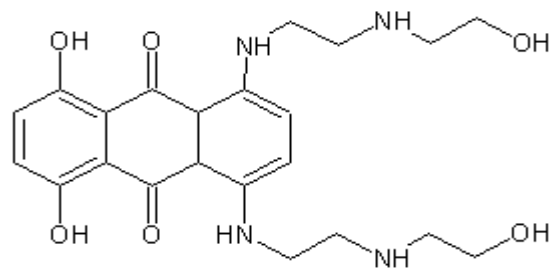


Abbildung 3: Chemische Struktur von Mitoxantron

Die Halbwertszeit von Mitoxantron wird, aufgrund der erheblichen Verteilung in verschiedenem Gewebekompartimenten, mit bis zu 25 h angegeben (Faulds et al., 1991). Die Ausscheidung erfolgt langsam sowohl renal als auch hepatobiliär. In pharmakologischen Studien an Affen zeigte sich, dass Mitoxantron nicht die intakte Blut-Hirn-Schranke zu überwinden vermag (Lenk et al., 1987).

Die zytotoxische Wirkung von Mitoxantron ergibt sich im Wesentlichen aus folgenden Mechanismen: durch Interkalation in die DNA, bevorzugt bei G-C-Basenpaaren, über eine Interaktion mit der

Topoisomerase-2, treten DNA-Strangbrüche auf, wodurch die Aktivität der RNA-Polymerase und damit das Zellwachstum in proliferierenden Geweben gehemmt wird (Faulds et al., 1991). Durch Metabolismus über die mikrosomale Cytochrom P 450-Reductase entstehen freie Radikale und Superoxidanionen, die zusätzlich einen direkten toxischen Einfluss auf die Zelle ausüben (Dollery, 1991).

Die Wirkweise von Mitoxantron auf das Immunsystem ist noch nicht vollständig verstanden. Zum einen zeigt es immunsuppressive Effekte auf Makrophagen, B-Lymphozyten, T-Helfer-Zellen und zytotoxische T-Zellen (Fidler et al., 1986a), zum anderen wirkt es immunmodulatorisch durch eine Verstärkung der Aktivität von T-Suppressor-Zellen (Fidler et al., 1986b). Es gibt Hinweise, dass Mitoxantron sowohl Apoptose (also den programmierten Zelltod) als auch die Nekrose von B-Lymphozyten, Monozyten und dendritischen Zellen als Antigen präsentierender Zellen verursachen kann (Bellosillo et al., 1998); (Neuhaus et al., 2005).

1.2.2 Vorklinische und klinische Erfahrungen

In den 1980er Jahren konnten Ridge und Mitarbeiter zeigen, dass die Gabe von Mitoxantron im EAE-Modell der Ratte sowohl das Auftreten von Lähmungen als auch die Entstehung charakteristischer histopathologischer Veränderungen verhinderte (Ridge et al., 1985). Interessanterweise ließ sich die Erkrankung auch durch mit Mitoxantron vorbehandelte T-Zellen nicht mehr übertragen, was einen hemmenden Effekt der Substanz auf T-Lymphozyten unterstreicht. Das Auftreten von Schüben konnte in entsprechenden Modellen verhindert oder abgeschwächt werden (Levine and Saltzman, 1986); (Lublin et al., 1987), so dass diese vorklinischen Studien einen potenziellen therapeutischen Effekt von Mitoxantron bei der MS nahe legten.

1987 begann Gonsette (Gonsette et al., 1987) mit einer Pilotstudie. Es stellte sich nach Gabe einer initialen Dosis von 14 mg/m^2 Körperoberfläche (KOF) alle 3 Wochen und dann alle 3 Monate für 2 Jahre eine Stabilität bei 80% der so behandelten MS-Kranken mit vorher aktiv fortschreitender MS fest.

1997 wurden die Daten der italienischen Mitoxantronstudie publiziert (Millefiorini et al., 1997), 51 MS-Kranke wurden entweder mit 8 mg/m^2 KOF Mitoxantron oder Placebo über 12 Monate behandelt

und 24 Monate beobachtet. Es ergaben sich signifikante Unterschiede bezüglich der Schubrate (minus 70% der Mitoxantrongruppe), darüber hinaus waren 63% der Mitoxantron behandelten Patienten, aber nur 23% der Patienten des Placeboarmes ohne Progression.

Die französisch-britische Studie schloss (Edan et al., 1997) zur Klärung der Wirksamkeit von Mitoxantron 42 Patienten mit aktiven Gadolinium-positiven MRT-Befunden ein. Primäres Zielkriterium war die Zahl Gadolinium-positiver Herde. Die Patienten erhielten entweder 20 mg/m² KOF Mitoxantron plus 1g Methylprednisolon monatlich oder nur 1g Methylprednisolon monatlich über 6 Monate. Der Unterschied bezüglich der Gadolinium-positiven Herden war hochsignifikant und die Mitoxantron behandelte Gruppe hatte sich in der Mehrzahl um einen Punkt in der EDSS-Skala verbessert.

Letzlich hat die europäische MIMS-Studie (Mitoxantron in Multiple Sclerosis) zur Zulassung des Medikamentes zur MS-Therapie durch die Gesundheitsbehörden in Deutschland geführt (Hartung et al., 2002). Hierbei handelte es sich um eine randomisierte, placebokontrollierte, untersuchergeblindete Studie. 194 Patienten aus 17 Zentren Europas waren in dieser Studie eingeschlossen. Sie hatten einen schubförmig progredienten oder sekundär chronischen Krankheitsverlauf (mit oder ohne Schübe) und eine dokumentierte Krankheitsaktivität in den 18 Monaten vor Beginn der Therapie. Mitoxantron wurde den Patienten in zwei randomisierten Gruppen mit unterschiedlichen Dosierungen (5 bzw. 12 mg/m² Körperoberfläche) über 2 Jahre lang alle 3 Monate (insgesamt 8 Infusionstermine) intravenös verabreicht. Eine dritte Gruppe erhielt ein Placebo. Im Ergebnis zeigte sich, dass folgende therapeutischen Effekte, im Vergleich der Placebogruppe, deutlich wurden: leichte Verbesserungen oder eine langsames Fortschreiten des Behinderungsstatus (EDSS), deutlich weniger Schübe, Verzögerung im Auftreten neuer Schübe, weniger neue aktive Läsionen im MRT.

Auch 12 Monate nach Beendigung der Behandlung waren die therapeutischen Effekte von Mitoxantron noch offensichtlich.

Aufgrund dieser Daten ist Mitoxantron für die Therapie rasch-progredienter MS-Verläufe unter dem Handelsnamen Ralenova[®] im Dezember 2002 in Deutschland zugelassen worden. Nach Empfehlung der deutschsprachigen internationalen MS-Therapie-Konsensus-Gruppe (MSTKG) sollte Mitoxantron vor allem bei Patienten mit hochfrequent schubförmigem Verlauf und schlechter Remissionstendenz

bzw. bei sekundär-progredientem Verlauf mit rascher Progression (≥ 1 EDSS-Punkt/Jahr) eingesetzt werden (Rieckmann and Toyka, 2002).

2 Fragestellung

Grundlage dieser Arbeit ist die Frage nach dem Einfluss von Mitoxantron auf die Migrationsfähigkeit mononukleärer Zellen aus dem peripher-venösen Blut (PBMCs). Die Arbeit wurde in zwei folgende Hauptexperimente gegliedert: als erstes wurde der *ex vivo* Effekt von Mitoxantron auf die Migrationsfähigkeiten mononukleärer Zellen von MS-Patienten untersucht, anschließend wurde die *in vitro* Wirkung dieses Präparats auf die Migration oben genannter Zellen von der gesunden Probanden erforscht. Das Migrationsverhalten von PBMCs wurde in einem *in vitro* Migrationsassay über eine artifizielle BHS beobachtet.

Die Ergebnisse dieser Versuchsteile waren ausschlaggebend für die weiteren Ziele der Arbeit: die Korrelation zwischen der reduzierten Migrationsfähigkeit von PBMCs und der MMP-Expression zu finden und die Rolle der MMPs bei der Zellmigration zu verifizieren.

3 Material und Methode

3.1 *Ex vivo* Untersuchungen

3.1.1 Charakteristik der MS-Patienten

Venöses Blut wurde von 11 MS Patienten aus der neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf mit deren Zustimmung unmittelbar vor und nach der Mitoxantron-Infusion in Röhrchen mit EDTA (als Antikoagulant) abgenommen. Die Untersuchungen wurden von der Ethik-Kommission des Universitätsklinikums genehmigt. Bei allen Patienten wurde bereits eine Multiple Sklerose anhand der McDonald-Kriterien diagnostiziert. Von denen waren 9 Patienten mit sekundär progredienter und 2 mit schubförmiger MS. Die detaillierte Charakteristik der Patienten ist in *Tabelle 3* erfasst.

Aus dem Blut der MS-Patienten wurde durch Dichtegradienten-Zentrifugation über Ficoll- Paque™ Plus PBMCs gewonnen.

Tabelle 3: Charakteristik der MS-Patienten

<i>Patienten</i>	<i>MS-Form</i>	<i>Alter</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>EDSS</i>	<i>Kum.MX.Dos</i>
K-G	SPMS	35	M	5,5	130
S-D	RRMS	22	W	5,0	19
D-D	RRMS	25	M	3,5	24
S-H	SPMS	49	W	6,5	20
H-H	SPMS	54	W	6,5	111
R-O	SPMS	50	W	5,0	19
U-D	SPMS	42	W	5,0	16
D-S	SPMS	39	M	6,5	72
S-M	SPMS	49	M	5,0	42
K-H	SPMS	43	M	6,0	20
K-A	SPMS	43	W	6,0	80
Mean ± SD	SP:RR = 2:9	41 ± 10	W:M = 6:5	5,5 ± 0,9	42 ± 37

Kum. MX. Dos: kumulative Dosis von Mitoxantron (mg/m^2) KOF. EDSS: Expanded Disability Status Score

3.1.2 Isolierung von PBMCs

4 ml venöses Blut vor und nach der *ex vivo* Mitoxantrongabe wurde mit gleichem Volumen PBS (phosphatgepufferte Salzlösung mit Standardzusammensetzung), bestehend aus 0,2 g KCL, 8,0 g NaCl,

1,42 g Na_2HPO_4 und 1,38 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ (Wang et al., 1984), gemischt, in 50 ml Falcon-Tubes im nächsten Schritt vorsichtig auf 8ml Ficoll-Paque überschichtet und 45min bei 1500 rpm (+18°C) zentrifugiert.

Daraufhin wurden die PBMCs, die sich in der Interphase zwischen Gradient und Plasmaüberstand gesammelt haben, mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette in einem Zentrifugenröhrchen (15 mL) vorsichtig abgesaugt, mit Waschmedium (RPMI-1640 Medium mit 10 % FCS) aufgefüllt und 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert (1. Waschgang). Danach wurde der Überstand mit Hilfe einer Pasteurpipette, die mit einer Saugflasche verbunden war, abgesaugt. Das Zellpellet im Konus des Zentrifugenröhrchens wurde mit Waschmedium resuspendiert und 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert (2. Waschgang). Die langsameren Zentrifugationsschritte beim Waschen der Zellen bewirken die Sedimentation der mononukleären Zellen, wobei die in der Zellkultur unerwünschten Thrombozyten im Überstand verbleiben; Nach dieser Zentrifugation wurde das Zellpellet mit nur soviel Zellkulturmedium mit 10 % Serum resuspendiert, dass eine deutliche Trübung erhalten blieb, d.h. eine Zahl von einer Million Zellen pro mL nicht unterschritten wurde. Daraus wurde 10µl Zellsuspension entnommen, mit 10 µl Trypan-Blau verdünnt und von dieser Verdünnung 10 µl in die mit einem Deckglas versehene Neubauer[®] - Zählkammer (Scherf Präzision, Meiningen, Deutschland) gegeben. Es wurden alle vier Quadranten mit ihren je 16 Feldern ausgezählt und die allgemeine Zellzahl bestimmt. Außerdem ermöglichte das Trypanblau die Markierung der toten Zellen, die sich aufgrund der erhöhten Membranpermeabilität blau färbten. Ihr Anteil betrug i.d.R. unter 1 %.

3.2 *In vitro* Mitoxantron-Behandlung von PBMCs

3.2.1 Isolierung von PBMCs aus dem venösen Blut der gesunden Probanden

Es wurde venöses Blut von fünf gesunden Probanden (1 Frau und 4 Männer, Durchschnittsalter = 31±6 Jahre), ohne aktuelle oder frühere immunmodulatorische Behandlung, in EDTA Röhrchen abgenommen und daraus PBMCs, wie oben beschrieben, isoliert.

3.2.2 *In vitro* Mitoxantrongabe

1×10^6 ml Zellen aus den PBMCs wurden mit $10 \mu\text{M}$ Mitoxantron (Wyeth, Münster, Deutschland) *in vitro* behandelt und für eine Stunde im Brutschrank bei 37°C mit 95 % iger Luftfeuchtigkeit unter 5 % iger CO_2 -Begasung inkubiert. Die Dosis des Medikaments entsprach den von Chan et al publizierten Angaben. Diese Menge von Mitoxantron zeichnet sich durch die Effektivität bei der *in vitro* Behandlung und außerdem ist *in vitro* Äquivalent der den Patienten *ex vivo* gegebene Mitoxantrondosis (Chan et al., 2005).

3.3 Migrationsassay

Die Migration von PBMCs vor und nach der *ex vivo* bzw. *in vitro* Mitoxantron-Behandlung wurde in einem *in vitro* Migrationsassay (modifiziert nach Stüve (Stuve et al., 1997)) erfasst.

3.3.1 Aufbau

Der Migrationsassay wurde in einer Chemotaxis-Kammer durchgeführt. Diese Doppelkammer oder Boyden Chamber besteht aus zwei Teile: aus einer Polystyrolplatte (untere Kammer) und einem Einsatz (obere Kammer). Die Einsätze (Abb.4) sind mit Fibronektin beschichteten Polyethyleneterephthalat- Membranfilter (Durchmesser -10,5 mm und Porengröße $3 \mu\text{m}$) ausgestattet.

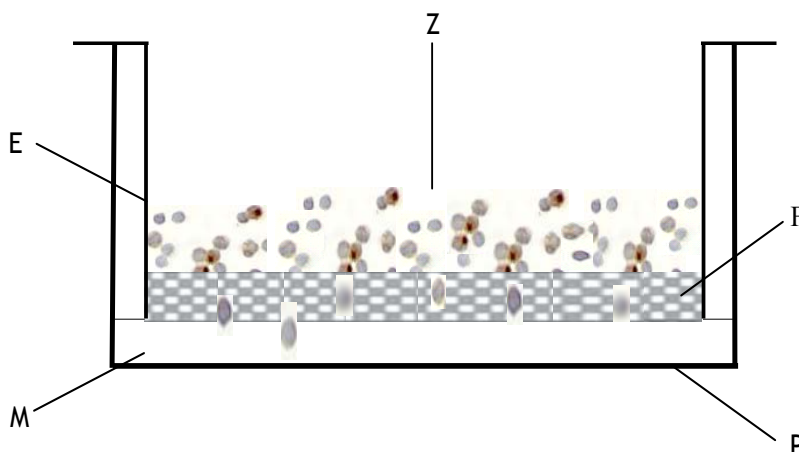


Abbildung 4 : Schematische Darstellung eines Migrationsassays. P: Polystyrolplatte. E: Einsatz mit Filter. M: Medium mit 10 % FCS. Z: Zellen im 2,5 % FCS Medium. F: mit Fibronektin beschichtete Filter.

3.3.2 Durchführung

600µl Medium (RPMI 1640-Medium plus 10 % FCS) wurde in die untere Kammer gegeben. Die isolierten PBMCs vor und nach der *in vitro* bzw. *ex vivo* Mitoxantron-Behandlung wurden auf eine Konzentration von 6×10^5 Zellen/ml eingestellt, im Medium (RPMI 1640-Medium mit 2,5 % FCS) aufgenommen und in die obere Kammer übertragen. Der Konzentrationsunterschied des FCS enthaltenden Mediums zwischen der unteren und oberen Kammer diente als ein Chemotaktischer Gradient für die PBMCs. Als Alternative waren dem Medium in der unteren Kammer zur Atraktion der Zellen rekombinantes menschliches RANTES (CCL5) und MCP-1(CCL2, beide R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) zugesetzt worden. Die Chemokine wurden in PBS mit 0,1% BSA (bovine serum Albumin) gelöst und in einer Endkonzentration von 100 ng/ml dem RPMI-1640 Medium zugegeben (Stuve et al., 1997). Der Migrationsassay wurde für 90 min im Brutschrank inkubiert (37°C, 5% CO₂).

3.3.3 Auswertung

Nach der Inkubationszeit wurden die PBMCs von beiden Kammern (obere und untere) gesammelt, mittels Trypan-Blau-Färbung visualisiert und unter Lichtmikroskop in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Da es bekannt ist, dass Mitoxantron den Zelltod verursacht, war es sehr wichtig mit der Hilfe des Trypan-Blau die Vitalität der Zellen zu bestimmen.

Um das Migrationsverhalten der verschiedenen Subpopulationen von PBMCs beurteilen zu können, wurde die Durchflußzytometrie verwendet.

3.4 Durchflußzytometrie

3.4.1 Durchführung

Es wurden jeweils 100µl der Zellsuspension von oberer und unterer Kammer des Migrationsassays vor und nach *ex vivo* bzw. *in vitro* Mitoxantronbehandlung in eine spezielle Mikrotiterplatte gebracht (96- Loch- Mikrotiterplatte, runder Boden, BD) und in dieser für 4 min bei 1200rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Anschließend begann die Inkubation mit den Antikörpern.

Wir verwendeten kommerziell erhältliche Antikörper der Firma Becton Dickinson - monoklonale Antikörper gegen CD4, CD8, CD14 und CD19. *Tabelle 4* zeigt die jeweilige Antikörper-Fluorochrom-Kombination sowie die PBMC-Subpopulationen, die mit diesen Antikörpern detektiert werden könnten.

Tabelle 4. Bei der durchflußzytometrischen Messung verwendete Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Konjugiertes Fluorochrom</i>	<i>Antigen/Zellen Spezifität</i>
Anti-human CD4	PE	T-Helper-Zellen
Anti-human CD8	PerCP	Zytotoxische T-Zellen
Anti-human CD14	FITC	Monozyten
Anti-human CD19	APC	B-Lymphozyten

PE: Phycoerythrin; PerCP: peridinichlorophylprotein; FITC: fluoresceinisothiocyanat; APC: Allophycocyanin

Nach der Zugabe von 5 µl einer Antikörper-Ausgangslösung (ca. 1µl je Antikörper aufgelöst in PBS), wurden die Zellen 30 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden sie 1-mal mit PBS gewaschen, für 4 min bei 1200rpm zentrifugiert, abschließend mit 140 µl PBS resuspendiert und durchflußzytometrisch analysiert.

3.4.2 Auswertung

Für die computergestützte Datenauswertung wurde das Programm CellQuest (BD) verwendet. Um die Reinheit der Zellen zu dokumentieren wurden die Messergebnisse als Punktdiagramm (Dot Plot) in einem Koordinatensystem dargestellt. Nach dem Setzen eines Gates auf die Zielpopulation (Lymphozyten bzw. Monozyten) wurde die Fluoreszenz in einem Schaubild dargestellt. Mit Hilfe der Software konnte dann die Häufigkeit der Punktverteilungen in den einzelnen Quadranten berechnet werden.

3.5 Gelatinzymographie

Es ist bekannt, dass Matrixmetalloproteinasen an der Migration der immunkompetenten Zellen aktiv beteiligt sind. Aus diesem Grund, wurden in den Überständen von PBMCs vor und nach Mitoxantrontherapie die proteolytische Aktivität von MMPs mittels Gelatinzymographie bestimmt.

3.5.1 Durchführung

Zur Vorbereitung gehört das gründliche Reinigen von Glasplatten und Spacern mit Ethanol. Die Glasplatten zwischen die das Gel später gegossen wurde, wurden mit Spacern auf 1mm Abstand gehalten und mit Schraubklammern fixiert, bevor sie in die Halterung gesetzt wurden. Als nächstes wurde das Trenngel nach folgendem Schema angesetzt:

Trenngel (10%):

Aqua bidest	4 ml
1,5M Tris pH 8,8	2,5 ml
SDS 10%	0,1 ml
Gelatine 0,1%	0,1 ml
Bisacrylamid 30% 19:1	3,3 ml
APS 10%	0,1 ml
TEMED	4 µl

Das Trenngel wurde vorsichtig in die Gelkammer eingefüllt. Es wurde mit 1ml Buthanol überschichtet, um das Gel vor dem Austrocknen zu schützen und eine saubere Phasengrenze zu gewährleisten. Nachdem es für mindestens 20 min polymerisiert war, konnte das Sammelgel angesetzt werden:

Sammelgel (5%):

Aqua bidest	2,1 ml
1 M Tris pH 6,8	0,38 ml
SDS 10%	0,03 ml
Bisacrylamid 30% 19:1	0,5 ml

APS 10%	0,03 ml
TEMED	3 μ l

Danach wurde das überstehende Butanol abgegossen und das Sammelgel eingefüllt. In das Sammelgel wurde ein Gelkamm eingesetzt, der die Taschen formte. In die später die Proben eingefüllt wurden. Während das Sammelgel für 30 min polymerisierte, wurde der Probenpuffer (Tris Glycin SDS Sample Buffer, Invitrogen) angesetzt. Die Überstände von PBMCs vor und nach *in vitro* bzw. *ex vivo* Mitoxantron Behandlung wurden aus dem Freezer genommen, aufgetaut, 1:1 mit Probenpuffer verdünnt, und nach abgeschlossener Polymerisation in die Taschen des Gels eingefüllt. Außerdem wurden Marker für MMP-2 und MMP-9 einzeln in zwei Geltaschen gegeben. Nach dem vollständigen Beladen des Gels wurden alle Taschen mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Die Elektrophorese erfolgte bei 1,30 V und dauerte ca. 1,5 Stunden bis die Bromphenol-Lauffront den unteren Gelrand erreicht hatte. Wenn die Gel-Elektrophorese beendet war, wurden die Glasplatten mit einem Spatel vorsichtig voneinander getrennt. Das Gel wurde danach folgendermaßen behandelt:

- 30 min im 100 ml 1×Renaturing Buffer langsam geschüttelt
- 30 min im 100 ml 1×Developing Buffer langsam geschüttelt
- 18 Stunden in 100 ml 1×Developing Buffer bei 37°C inkubiert
- 6 Stunden mit Coomassie Blue bei RT gefärbt (schütteln)
- kurz in 1×Gel Drying Solution gegeben
- zwischen Cellophan-Folien über Nacht getrocknet

3.6 Bestimmung der Expression von MMP-9

Die Ergebnisse der oben beschriebenen Untersuchungen haben den weiteren Ablauf der Arbeit beeinflusst. Als nächstes war die Frage nach der Expression von MMP-9 auf mRNA-Ebene zu klären. Aus diesem Grund wurde quantitative PCR (qPCR)-Analyse durchgeführt, aber als erstes wurde aus PBMCs vor und nach *in vitro* bzw. *ex vivo* Mitoxantrongabe RNA isoliert.

3.6.1 RNA–Isolierung aus PBMCs

Die RNA aus PBMCs wurde mit Hilfe des Trizol RNA Isolation Reagens (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) nach dem Herstellerprotokoll isoliert.

2×10^6 Zellen aus gesamten PBMCs vor und nach *in vitro* bzw. *ex vivo* Mitoxantron-Behandlung wurden in ein Eppendorf vereinigt und 5 min bei 7000 rpm, 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und auf das Pellet 500 µl Trizol gegeben, vorgetext und 5 min bei RT inkubiert. Als nächster Schritt wurde 100 µl Chloroform zugegeben, vorgetext und 2 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die ganze Mischung 15 min bei 10000 rpm, 4 ° C zentrifugiert. Nachher wurde die farblose Phase abpipetiert und in ein neues Eppendorf überführt (ca. 200 µl), 250 µl Isopropanol und 1µl Glycocen zugegeben, vorsichtig gemischt und über Nacht bei -80° C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Zellen 15 min bei 10000 rpm, 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und 500 µl RNase free EtOH zugegeben. Abschließend wurden die Proben 5 min bei 7000 rpm, 4 °C zentrifugiert, EtOH wurde so gut wie möglich abgesaugt und der Rest wurde abgedampft. RNA-Pellet wurde in 20 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

3.6.2 Konzentrationbestimmung von RNA

Konzentration und Reinheit der RNA wurden durch die photometrische Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260nm durch das Programm des Photometers automatisch umgerechnet und bestimmt. Für unsere Experimente waren nur die OD-Werte zwischen 0,1 und 1 aussagekräftig.

3.6.3 Reverse Transkription

Bei der Reversen-Transkriptase-Reaktion wurde mit Hilfe des Enzyms TaqMan Reverse Transkriptase (RT) von Biosystems (AB) aus RNA nach dem Herstellerprotokoll eine DNA – Kopie (cDNA) angefertigt.

Die Anzahl der Ansätze ergab sich aus der Anzahl der Proben plus zwei Kontrollansätzen. Ein Kontrollansatz war RNA-frei, der andere RT-frei. Sämtliche Schritte wurden auf Eis ausgeführt. Das hier angegebene Protokoll galt für RNA-Proben mit einer Konzentration von 1 µg/µl.

Sämtliche Reagenzien wurden unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut, gut gemischt und kurz abzentrifugiert. Für den Mastermix wurden die folgenden Reagenzien (Menge jeweils pro Ansatz) in der unten beschriebenen Reihenfolge in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen zusammengegeben:

RT-Buffer	2 µl
dNTP	4 µl
H ₂ O	6,7 µl
RNAse-Inhibitor	0,4 µl
Random Hexal	1 µl
MgCl ₂	4,4 µl

An dieser Stelle musste die Menge 19,5 µl für den RT-freien Kontrollansatz entnommen werden. Bei der Zugabe der RT musste beachtet werden, dass sich die Anzahl der Ansätze um eins reduziert hat.

RT	0,5 µl
----	--------

Alles wurde noch einmal gut gemischt und zu je 19 µl auf die vorbereiteten und beschrifteten 500 µl Eppendorf-Röhrchen verteilt. Zum zweiten Kontrollansatz (RNAfrei) wurden nun statt der RNA-Probe 1 µl H₂O hinzugegeben und zum RT-freien Kontrollansatz 0,5 µl H₂O anstatt der RT.

Jetzt wurden die RNA-Proben zu den Ansätzen zupipettiert (1 µg). Zur RT-freien Kontrolle wurde eine gesichert positive RNA-Probe hinzugegeben. Die Proben wurden noch einmal gut gemischt und in ein PCR-System (GeneAmp PCR System 9700) gestellt. Das Gerät wurde folgenderweise programmiert: 10 min/ 25°C, 30 min/48°C, 5min/95°C. Nach der RT wurde umgeschrieben cDNA auf 20 µl mit RNase- freiem Wasser verdünnt. Anschließend folgte die quantitative-PCR Analyse.

3.6.4 Quantitative PCR (qPCR)

Die in der reversen Transkription hergestellte cDNA wurde zur Erstellung des Expressionsprofils von MMP9 durch qPCR untersucht. Für jede untersuchende Probe wurde ein zweifacher Reaktionsansatz aus TaqMan Polymerase, MMP-9 spezifischen Primern (AB) und cDNA in eine 96-Lochplatte pipettiert und anschließend in einem ABI PRISM 7000 (AB) System analysiert, wobei als Referenz das Hauskeeping-Gen 18S diente.

3.7 Inhibition von MMPs *in vitro*

Um den inhibitorischen Effekt von Mitoxantron mit der Wirkung eines MMP-Inhibitors zu vergleichen wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt. 2×10^6 PBMCs /ml von gesunden Probanden wurden *in vitro* mit 0,5 μ M EDTA-als MMP-Inhibitor behandelt (Jung et al., 1998); (Zeng et al., 2005). Nach der EDTA-Gabe wurden die Zellen bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Die Untersuchung der Migrationsfähigkeiten der behandelten und nicht behandelten Zellen wurde im oben beschriebenen *in vitro* Migrationsassay durchgeführt.

3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung in dieser Arbeit erhobenen Daten erfolgte mit der Hilfe des Softwareprogramms Statgraphics Plus 5,0. Zur Analyse der Migration von PBMCs wurde die Zellzahl in der oberen und unteren Kammer vor und nach Mitoxantrongabe mittels Wilcoxon – Test für Paardifferenzen verglichen. Das Signifikanzniveau lag bei $p \leq 0,05$ (=signifikant), bzw. $p \leq 0,005$ (=hoch signifikant). Die Ergebnisse sind als Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwerts dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Effekt der *in vivo* Mitoxantronbehandlung

Die allgemeine Migrationsfähigkeit immunkompetenter Zellen aus dem venösen Blut der MS-Patienten war nach der i.v. Verabreichung von Mitoxantron deutlich vermindert ($p = 0,002$). Die Werte wurden als Prozentzahl der migrierten Zellen angegeben. Wie aus *Abb. 5*. ersichtlich, betrug der Mittelwert der mittels Neubauer- Kammer unter Lichtmikroskop gezählten, im unteren Kammer der Migrationsassay migrierten Zellen vor der Mitoxantrongabe 20 %. Im Gegensatz dazu, nahm die Migration von PBMCs nach der Applikation von Mitoxantron um 18% ab.

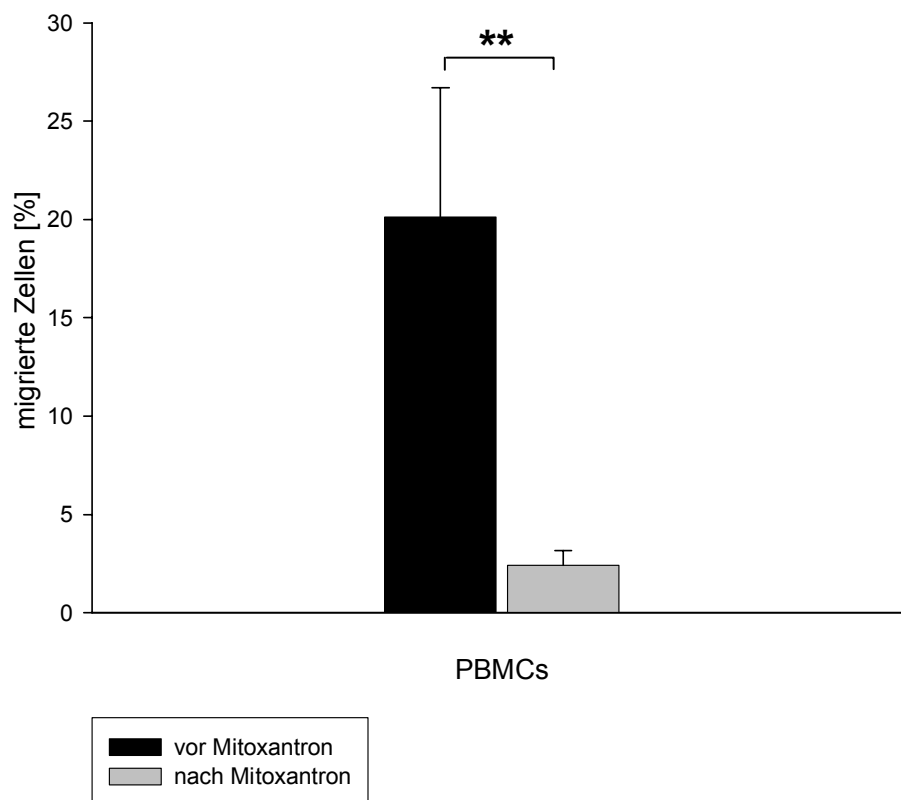


Abbildung 5: Migration von PBMCs vor und nach *ex vivo* Mitoxantronbehandlung. Die Migration von PBMCs war deutlich vermindert nach der Mitoxantron-Behandlung. Die Zahl der migrierten Zellen wurde unter dem Lichtmikroskop bestimmt (** $p < 0,005$).

In *Abb.6.* ist die Prozentzahl der migrierten PBMCs aus dem Blut der allen an diesem Experiment beteiligten 11 MS-Patienten vor und nach der Mitoxantrontherapie als Punktdiagramm dargestellt.

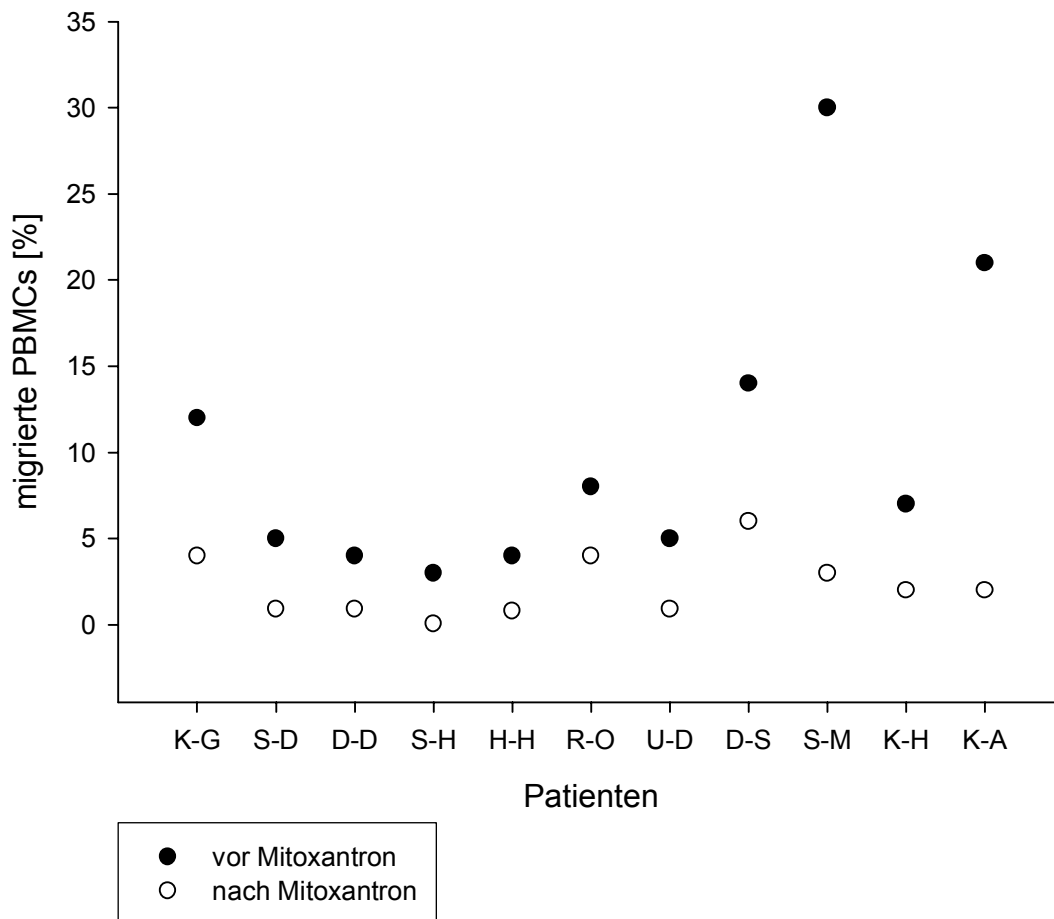


Abbildung 6: Die Prozentzahl der migrierten PBMCs aus MS-Patienten vor und nach Mitoxantrontherapie

Um den Einfluss von Mitoxantron auf das Migrationsverhalten der unterschiedlichen Zellpopulationen zu bestimmen, wurden die zu untersuchenden PBMCs mit entsprechenden Antikörper gefärbt und mittels der Durchflußzytometrie analysiert (*Abb 7*). Bei der Untersuchung ergab sich, dass Mitoxantron die Migration der einzelnen Zellpopulationen in unterschiedlichem Ausmaß beeinflusste. Die graphisch dargestellten Ergebnisse (*Abb. 8*) zeigen, dass $CD14^+$ Monozyten nach Mitoxantrongabe deutlich schlechter migrierten ($p=0,003$), als $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Lymphozyten.

Das Migrationsverhalten der CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten war zwar nach der Mitoxantrongabe auch signifikant vermindert, aber es ließ sich keine deutliche Differenz zwischen den verminderten Migrationsfähigkeiten beider Subpopulationen beobachten. Der Effekt von Mitoxantron auf die Migrationsfähigkeit der B- Lymphozyten war wegen der sehr niedrigen Zahl in der unteren Kammer, sowohl vor als auch nach der Mitoxantrongabe migrierten CD19⁺ Zellen nicht nachweisbar (Abb. 8). Die Betrachtung aller an der vorliegenden Studie teilnehmenden MS-Patienten zeigte, dass Mitoxantron unabhängig von der MS-Verlaufsform (RRMS oder SPMS), der Krankheitsdauer, des ermittelten EDSS-Scores, des Patientenalters die Migration der immunkompetenten Zellen inhibierte. Es bestand keine signifikante Korrelation auch zwischen dem Effekt von Mitoxantron und der den Patienten verabreichten kumulativen Dosis des Medikaments.

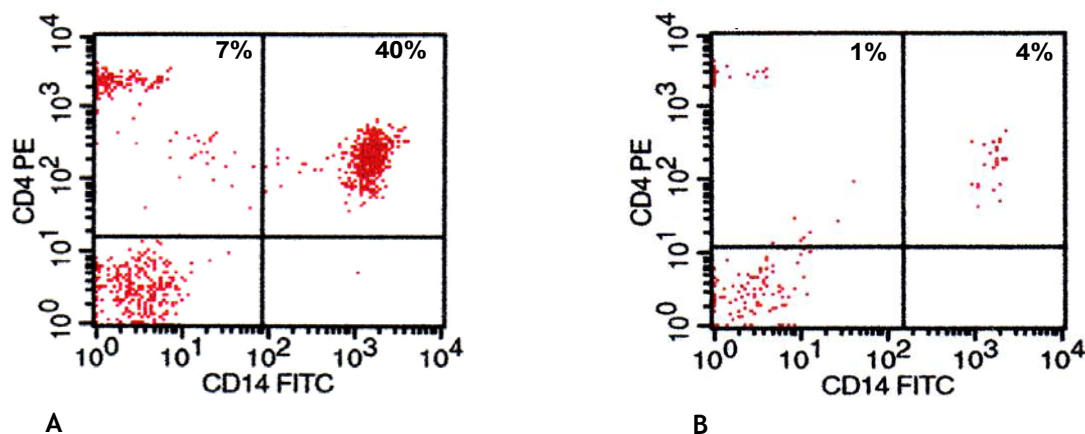


Abbildung 7: FACS-Analyse der Zellmigration vor und nach *ex vivo* Mitoxantrongabe. Vor Mitoxantrongabe migrierten 7 % der CD4⁺ T-Lymphozyten und 40 % der CD14⁺ Monozyten (A), nach der Mitoxantrongabe (B) nahm die Migration von T-Lymphozyten um 6 % und die Migration der Monozyten um 36 % ab.

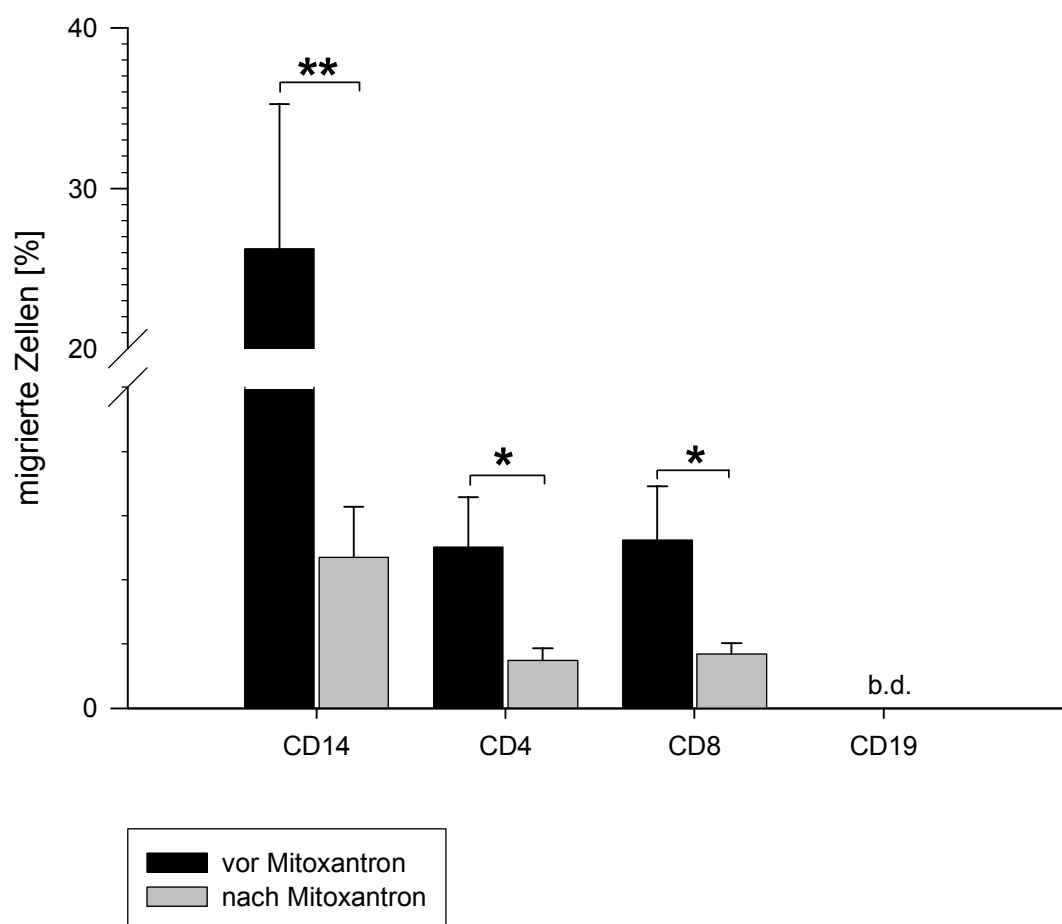


Abbildung 8: Migrationsverhalten verschiedener Zellpopulationen vor und nach *ex vivo* Mitoxantron-gabe. CD14⁺ Monozyten migrierten nach der Mitoxantrongabe deutlich schlechter (**p<0,005) als CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten (*p<0,05). Die Zahl der migrierten CD19⁺ B-Lymphozyten war zu niedrig (nicht detektierbar - n.d.)

4.2 *In vitro* Effekt von Mitoxantron

Nachdem der inhibitorische Effekt von Mitoxantron auf Migration von PBMCs *ex vivo* bewiesen worden war, wurde zunächst untersucht, ob die *in vitro* Mitoxantrongabe auch die gleiche Wirkung auf das Migrationsverhalten der Zellen ausüben konnte. Demnach konnte gezeigt werden, dass die Migration von PBMCs aus dem venösen Blut aller fünf untersuchten gesunden Probanden zu einer deutlichen Verminderung nach der *in vitro* Applikation von Mitoxantron unterlag (*Abb. 9*).

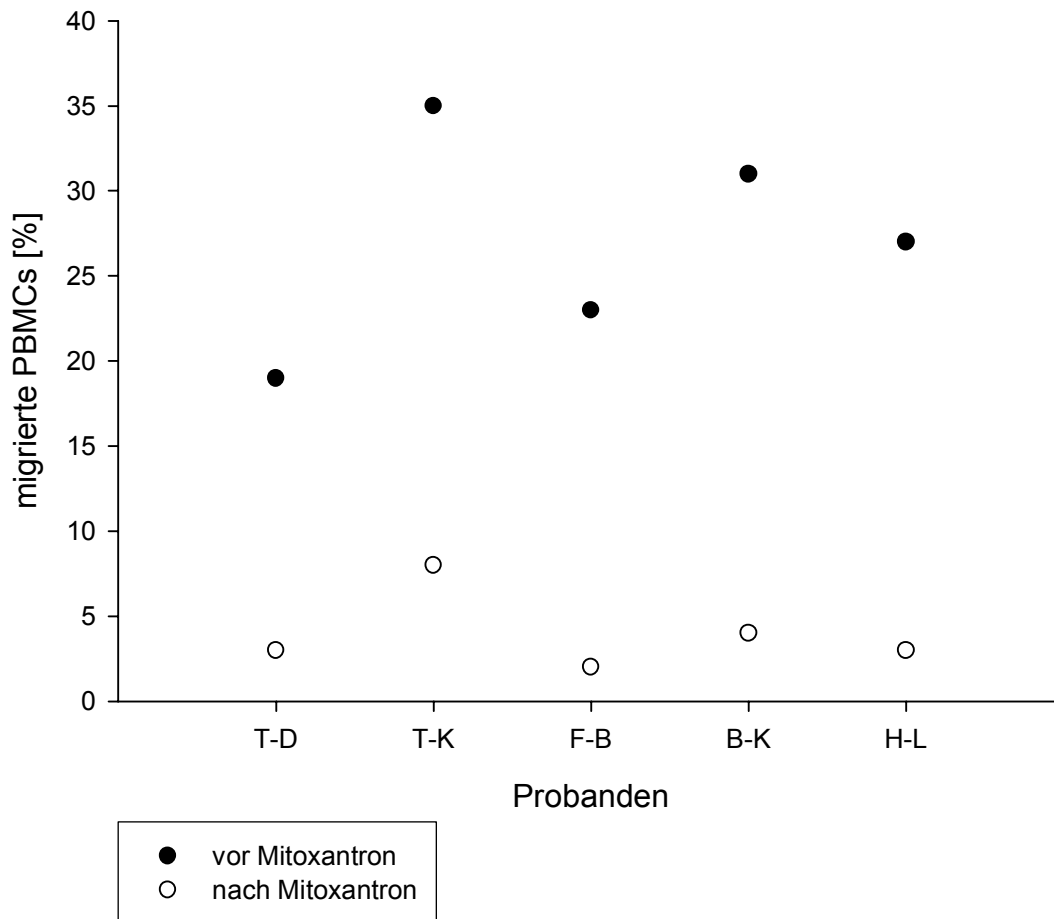


Abbildung 9: Migrierte PBMCs [%] vor und nach *in vitro* Mitoxantrongabe

Die Mitoxantrongabe bewirkte, dass gegenüber unbehandelten Zellen der Prozentsatz der Zellmigration von im Mittel 27 % auf 4 % zurückging (*Abb. 10*).

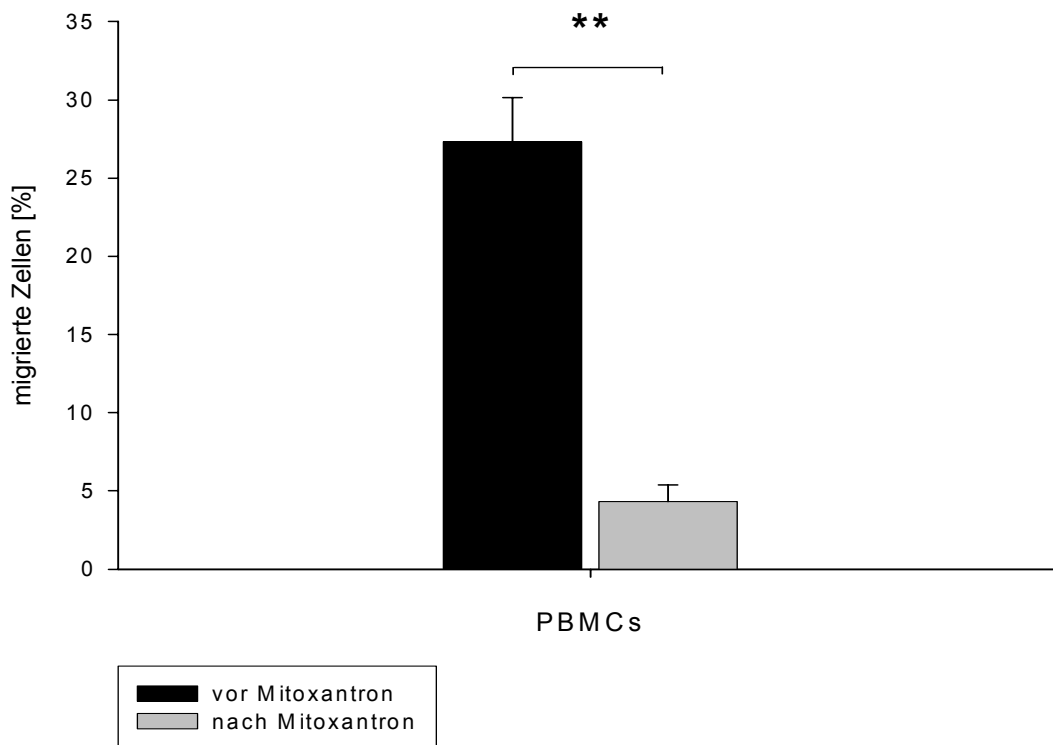


Abbildung 10: Migration von PBMCs vor und nach *in vitro* Mitoxantronbehandlung. Die Prozentzahl der migrierten PBMCs sank nach Mitoxantron von 27 % auf 4 % (** $p < 0,005$).

Der prominente Effekt von Mitoxantron auf CD14⁺ Monozyten ließ sich mittels FACS Analyse nachweisen (Abb. 11). Bei einer Wellenlänge von 635 bis 670 nm war die Autofluoreszenz von Mitoxantron zu sehen (Abb. 12) Diese Beobachtung gab uns die Möglichkeit zu beweisen, dass alle untersuchten Zellpopulationen Mitoxantron inkorporierten.

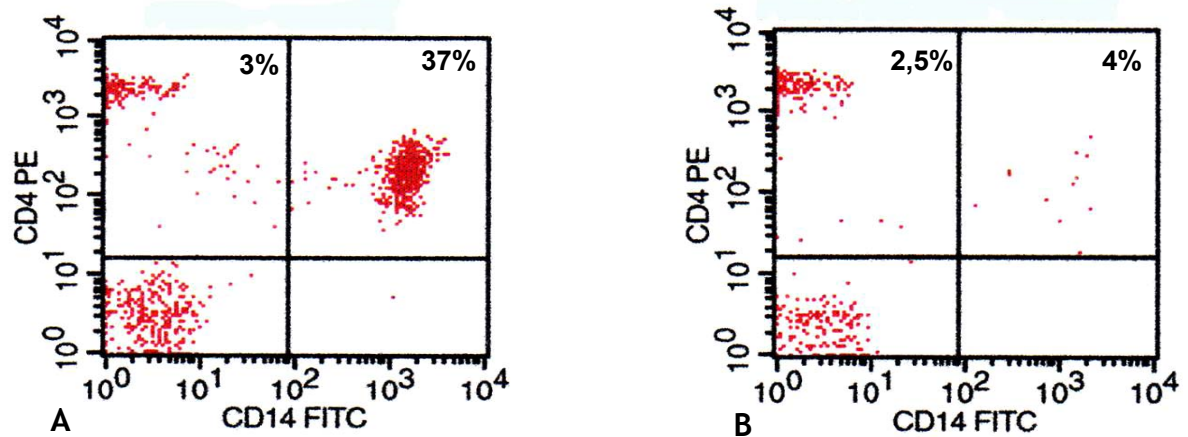


Abbildung 11: Migration von CD4⁺ T-Lymphozyten und CD14⁺ Monocyten vor und nach *in vitro* Mitoxantrongabe (Beispiel einer FACS-Analyse). Nach *in vitro* Gabe von Mitoxantron war die Migration von CD14⁺ Monocyten signifikant reduziert (von 37 % auf 4 %), im Gegensatz dazu unterlag die Migration von CD4⁺ T-Lymphozyten keiner deutlichen Verminderung (von 3% auf 2,5%).

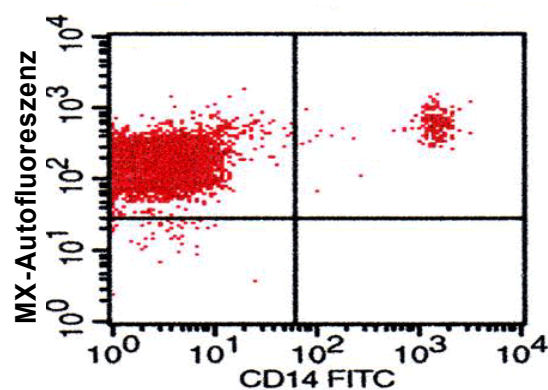


Abbildung 12: Autofluoreszenz von Mitoxantron nach *in vitro* Applikation

Die Migration von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten wies keine signifikante Minderung nach der *in vitro* Mitoxantrongabe auf. Die Zahl der migrierten B-Lymphozyten war sowohl vor als auch nach *in vitro* Mitoxantrongabe zu niedrig für die weitere Analyse (Abb. 13).

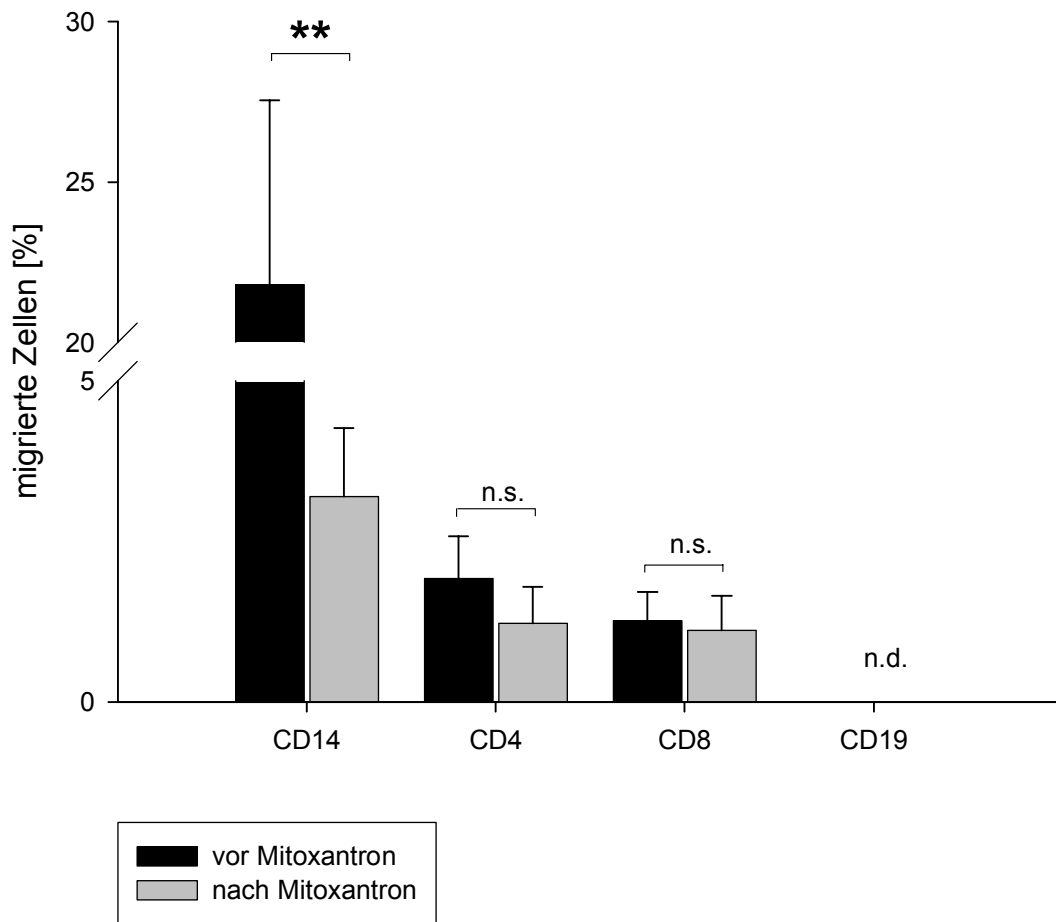


Abbildung 13: Migrationsverhalten unterschiedlicher Zellpopulationen vor und nach *in vitro* Mitoxantrongabe. Die Migration von CD14⁺ Monozyten wies nach der Mitoxantronbehandlung eine signifikante Minderung auf (**p<0,005). Die Reduktion der Migration von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten war nicht signifikant (n.s.). Die Zahl der migrierten CD19⁺ B-Lymphozyten war sowohl vor als auch nach der Mitoxantrongabe zu niedrig (n.d.).

4.3 Mitoxantron und MMP-Aktivität

Entsprechend dem heutigen Kenntnisstand spielen die MMPs aufgrund ihrer Bindegewebe- und Basalmembran-degradierenden Eigenschaften eine wichtige Rolle bei der Zellmigration. Das reduzierte Migrationsverhalten von PBMCs nach der Mitoxantrongabe erweckte die Frage nach dem Einfluss des Medikaments auf die MMP-Expression. Aus diesem Grund wurde die proteolytische

Aktivität von MMP-2 und MMP-9 in Zellüberständen der MS-Patienten und der gesunden Probanden mittels Gelatin-Zymographie vor und nach Mitoxantrongabe ermittelt.

Die erste Bande lag bei ca. 92 kD und entsprach dem MMP-9 Standard, die zweite lag bei ca. 72 kD und präsentierte MMP-2.

Es war offensichtlich, dass MMP-9 und MMP-2 in allen untersuchten Proben vor der Mitoxantrongabe gleichmäßig und konstant vorhanden waren. Aber im Gegensatz dazu, zeigte sich nach der *in vitro* bzw. *ex vivo* Applikation von Mitoxantron die deutliche Verminderung der proteolytischen Aktivität von MMP-9 in allen Zellüberständen. Die Reduktion der Aktivität von MMP-2 variierte dagegen in Vorkommen und Ausprägung in den Überständen von PBMCs nach der *ex vivo* bzw. *in vitro* Mitoxantrongabe (Abb. 14).

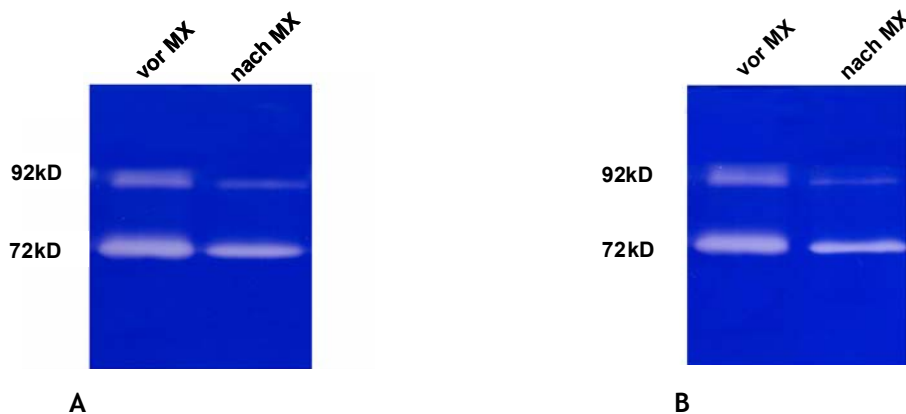


Abbildung 14: Proteolytische Aktivität von MMPs vor und nach *in vitro* (A) bzw. *ex vivo* (B) Mitoxantronbehandlung in dem Kulturüberständen von PBMCs. Die Proteolytische Aktivität von MMP-9 war deutlich vermindert nach der Mitoxantrongabe. Die Reduktion der Aktivität von MMP-2 (72 kD) variierte dagegen in Vorkommen und Ausprägung.

Aufgrund der in dieser Versuchsreihe erlangten Ergebnisse stellte sich heraus, dass das verminderte Migrationsverhalten von PBMCs nach der Applikation von Mitoxantron, tatsächlich, zu einer verminderten Expression von MMPs korrespondierte.

4.4 Mitoxantron und MMP-9 - Expression

Die ausgeprägte Reduktion der proteolytischen Aktivität von MMP-9 nach der Mitoxantrongabe hatte einen entscheidenden Einfluss auf die weiteren Experimente. Zunächst wurde der Effekt von Mitoxantron auf das Expressionsverhalten von MMP-9 auf mRNA Ebene untersucht. Wegen der niedrigen Zahl von PBMCs aus dem Patienten Blut, war es unmöglich bei allen elf Patienten das Expressionsmuster von MMP-9 prä und post Mitoxantronbehandlung zu bestimmen. Es wurden nur fünf Proben analysiert. Die niedrige Zahl der Proben beschränkt die Aussagekraft der statistischen Signifikanz. Die Expression von MMP-9 auf mRNA Ebene wurde auch vor und nach der *in vitro* Mitoxantrongabe in PBMCs untersucht (n=5).

Die RNA aus PBMCs vor und nach Mitoxantrongabe wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und in einer so genannten Q-PCR eingesetzt. Zum Ausgleich der Schwankungen zwischen den eingesetzten RNA-Mengen wurde zudem eine Q-PCR für die Referenzgene 18S durchgeführt, auf deren Wert die Expression anderer Gene normiert wurden, bevor ein Vergleich der einzelnen Proben (PBMCs vor und nach Mitoxantronbehandlung) untereinander stattfand.

Die Ergebnisse wiesen auf die deutliche Abnahme der MMP-9 Expression auf mRNA Ebene nach der Mitoxantronbehandlung hin. Außerdem zeigte sowohl *ex vivo* als auch *in vitro* Gabe von Mitoxantron den gleichen inhibitorischen Effekt auf MMP-9 Expression (Abb. 15).

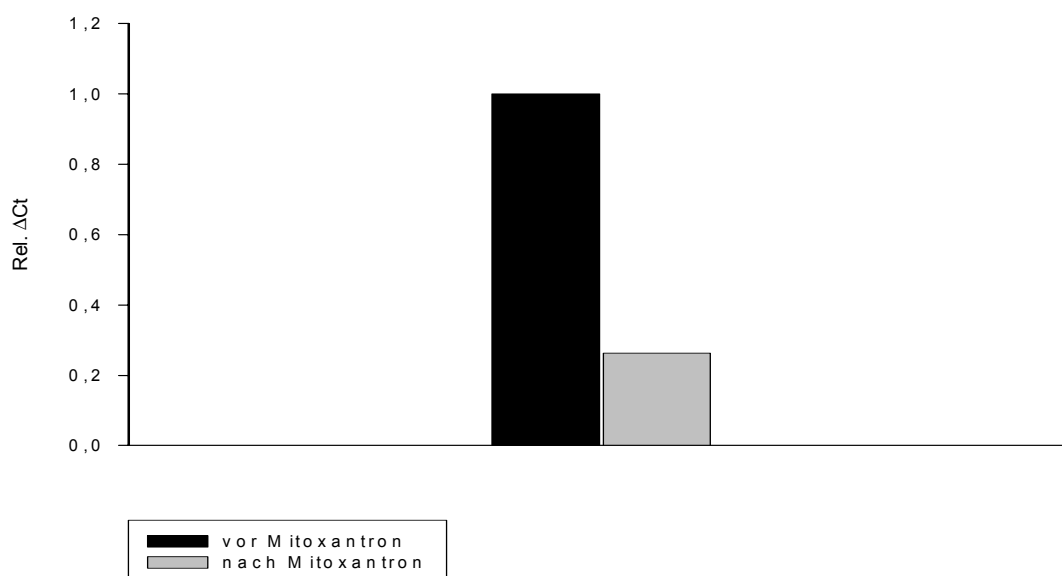


Abbildung 15: Abnahme der MMP-9 Expression auf mRNA Ebene nach Mitoxantrontherapie (qPCR). ΔC_t - Treshhold Cycle.

4.5 Migration von PBMCs nach MMP-Inaktivierung

Zur Verifikation der Ergebnisse über Korrelation zwischen der reduzierten Migrationfähigkeit der Zellen und der verminderten Expression von MMPs, wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt. Um die extrazellulären MMPs zu inaktivieren, wurde der unspezifische MMP-Inhibitor EDTA eingesetzt.

EDTA ist ein Chelatbildner mit Metallionen und entzieht auf diese Weise die für Aktivität von MMPs notwendigen Metallionen und hemmt das aktive Zentrum.

Die aus dem venösen Blut der gesunden Probanden isolierten PBMCs wurden mit EDTA behandelt und deren Migrationsverhalten vor und nach der Gabe des MMP-Inhibitors in einem *in vitro* Migrationsassay erfasst.

Auch hier konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen dem Migrationsverhalten von PBMCs und der MMP-Aktivität bestand. Bereits nach der EDTA-Gabe ging die Zellmigration deutlich zurück. Die prozentzahl der unbehandelt migrierten PBMCs betrug 7 %. Im Gegensatz dazu die unspezifische Inaktivierung von MMPs verursachte die Verminderung der migrierten Zellzahl bis zum 2 % (Abb. 16).

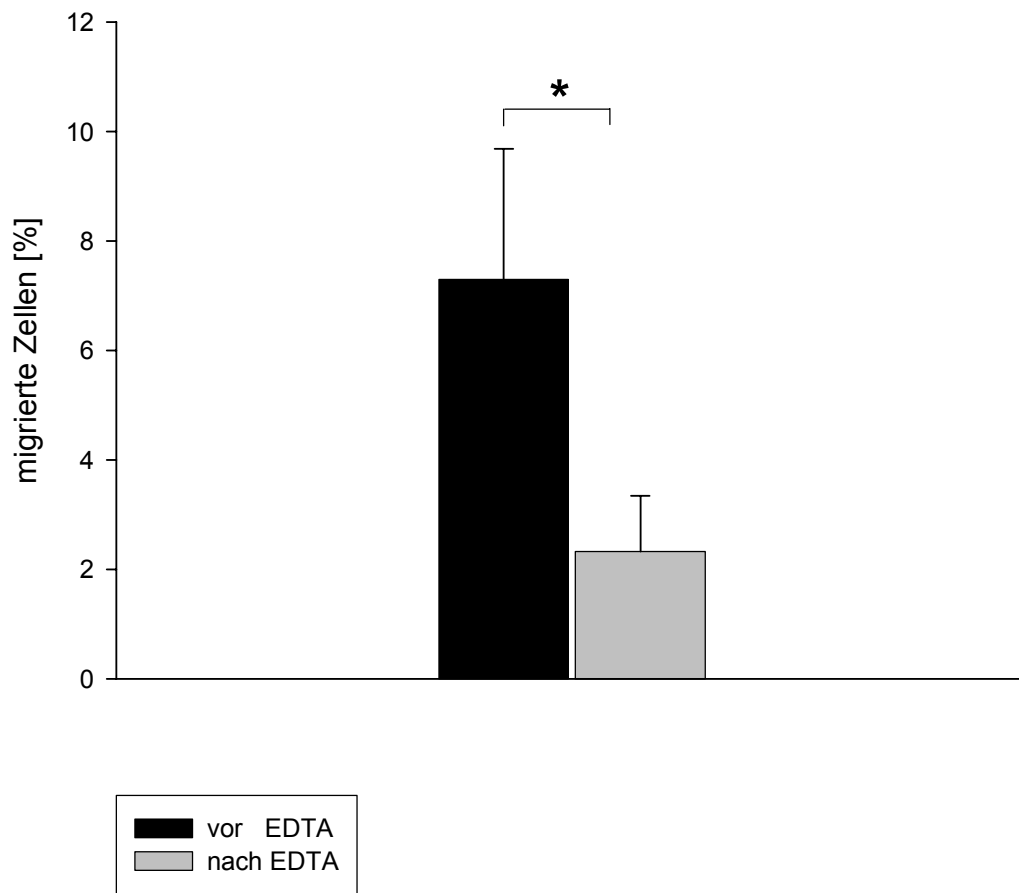


Abbildung 16: Migration von PBMCs vor und nach EDTA-Gabe *in vitro*. Die Migration von 3MCs sank nach der EDTA-Gabe von 7 % auf 2 % (* $p < 0,05$).

5 Diskussion

Die pathogenetischen Konzepte sowie die therapeutischen Möglichkeiten der MS befinden sich seit einigen Jahren in grundlegendem Wandel. Der rasante Zuwachs der Therapiemöglichkeiten wird unterstützt durch die neuen Erkenntnisse über die Pathomechanismen der demyelinisierenden Erkrankung. Trotz dieser Fortschritte ist die MS bis heute nicht heilbar und das Ziel einer nebenwirkungsarmen und hocheffizienten Therapie bislang nicht erreicht.

Traditionell ist also für die meisten der angewandten Therapiestrategien die entzündliche Natur der MS-Läsionen der rationale Hintergrund. Bei den pathogenetischen Hypothesen und Konzepten haben inzwischen jedoch verschiedene Paradigmenwechsel stattgefunden (Kieseier et al., 2005).

Nach dem heutigen Erkenntnisstand stellt die Einwanderung immunkompetenter Zellen aus dem Gefäßsystem über die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirnparenchym hinein einen immunpathogenetisch relevanten Mechanismus dar. Aus diesem Grunde zeichnet sich jedes Medikament, das die Eigenschaften besitzt, diesen wichtigen Prozess zu modulieren, durch die klinische Effektivität in der Therapie der Erkrankung aus. Ein gutes Beispiel dafür ist die Substanz – Natalizumab, die durch die Inhibition des Adhäsionsmoleküls VLA-4 die Transmigration der entzündlichen Leukozyten über BHS verhindert. Aufgrund der guten Ergebnisse verschiedenen Studien (Miller et al., 2004) besitzt dieses Medikament ein hohes Potenzial ein festes Element in der Basistherapie der MS zu werden.

Mitoxantron ist seit etwa drei Jahren zur Behandlung schwer verlaufender Formen der schubförmigen MS zugelassen und hat zunehmend Bedeutung auch in der Therapie der sekundär chronisch progredient verlaufenden MS. Die Zulassung beruht auf dem Wirksamkeitsnachweis von Mitoxantron in der so genannten MIMS-Studie (Hartung et al., 2002). Nach dem immunmodulatorischen Stufenschema der deutsch-österreichisch-schweizerischen Multiple Sklerose Therapie konsensus Gruppe (MSTKG) wird Mitoxantron gegenwärtig in der Therapieeskalation eingesetzt, d.h wenn die Medikamente der ersten Wahl, die drei Interferon-beta Präparate sowie Glatirameracetat, keine ausreichende Wirkung zeigen.

Mitoxantron wird unter Berücksichtigung der Kontraindikationen wie z.B. kardiale Vorerkrankungen im Allgemeinen gut vertragen. Von den möglichen Nebenwirkungen muss man besonders auf dosisabhängige Kardiotoxizität achten: Hierunter versteht man die schon früher in der

Krebsbehandlung mit Mitoxantron beobachtete Herzschädigung, die jenseits einer kumulativen Dosis von etwa 160 mg/m² Körperoberfläche deutlich häufiger auftrat als unterhalb diese Dosis. Aus diesem Grund wurde zu Sicherheit die Lebensgesamtdosis bei MS zunächst auf 140mg/m² Körperoberfläche begrenzt, wobei diese Dosis vor wenigen Monaten aus formalen Gründen auf 100mg/m² Körperoberfläche weiter reduziert wurde (DMSG). Kardiologische Nebenwirkungen können bei Mitoxantron allerdings auch bei niedrigen Dosen auftreten und wurden auch mehrere Jahre nach Beendigung einer Mitoxantron-Behandlung beobachtet. Neben dieser möglichen Nebenwirkung muss noch Therapie-Induzierte Leukämie, Infertilität, erhöhtes Infektionsrisiko erwähnt werden (Spindler et al., 2003).

Da Mitoxantron schon seit einigen Jahrzehnten in der Krebsbehandlung im Einsatz ist, liegen bereits Kenntnisse über den Wirkmechanismus vor. Mitoxantron ist eine starke immunsuppressiv wirkende Substanz, die in der Lage ist sowohl Zellapoptose als auch Zellnekrose zu induzieren (Bellosillo et al., 1998). Dieses Medikament interkaliert in die DNA und bewirkt über eine Interaktion mit der Topoisomerase-2 Einzel- und Doppelstrangbrüche (Smith, 1983). Außer immunsuppressive Wirkung werden auch immunmodulatorische Effekte dieses Medikaments diskutiert wie z.B. inhibitorischer Effekt auf die Sekretion der proinflammatorischen Marker wie z. B. IFN- γ , TNF- α und IL-2 (Chan et al., 2005).

Trotz großer wissenschaftlicher Forschungsaktivitäten ist der letztlich therapierelevante Effekt des Medikaments bei der MS noch offen.

Es ist von großer Wichtigkeit, den Wirkmechanismus von Mitoxantron zu verstehen. Hintergrund ist das Ziel, Nachfolgepräparate zu entwickeln, die mit geringeren Nebenwirkungen eine gleiche oder bessere Wirkung erreichen. Auch können Erkenntnisse über sinnvolle und nicht sinnvolle Kombination mit Mitoxantron gewonnen werden. Idealerweise kann durch die Kenntnis des Wirkmechanismus der Einsatz von Mitoxantron bei MS denjenigen Patienten „angepasst“ werden, die am meisten von Mitoxantron profitieren.

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die Wirkung von Mitoxantron auf die Migrationsfähigkeit immunkompetenter Zellen in einem *in vitro* Migrationsassay. PBMCs von MS-Patienten, sowie von gesunden Probanden wurden von und nach *ex vivo* bzw. *in vitro*

Mitoxantronegabe über mit Fibronectin beschichtete Filter zur Migration gebracht. Die früheren Erfahrungen zeigten, dass Fibronectin einen starken Stimulator der Zellmigration in einem *in vitro* Migrationassay darstellt und aus diesem Grund für *in vitro* Experimente erfolgreich eingesetzt werden kann (Stuve et al., 1997). Aufgrund dieser Ergebnisse haben wir uns für oben genanntes Modell entschieden.

Unsere Experimente ergaben, dass der FCS Gradient und die folgenden Chemokine - CCL5 (Rantes) bzw. CCL2 (MCP-1) die Zellmigration im gleichen Maß beeinflussten, deshalb verwendeten wir letztendlich den Konzentrationsunterschied von FCS in oberer und unterer Migrationskammer als chemotaktischer Gradient. Damit versuchten wir die physiologischeren Bedingungen für die Zellen wiederherzustellen.

Mitoxantron hemmte Migrationsfähigkeiten aller untersuchten immunkompetenter Zellen. Die *ex vivo* Mitoxantronegabe reduzierte die Zahl der migrierten Zellen, den unbehandelten Zellen gegenüber, von 20% auf 2%. Nach der *in vitro* Mitoxantronegabe wurde jedoch die Prozentzahl der Migration von 27% auf 4% gesenkt. Interessanterweise konnten wir die Autofluoreszenz von Mitoxantron bei FACS Analyse detektieren. Aus dieser Betrachtung zogen wir eine Schlussfolgerung, dass alle untersuchten Zellen das Medikament inkorporierten.

Durchflußzytometrie gab uns die Möglichkeit den Effekt des Medikaments auf verschiedene Zellpopulationen zu analysieren. CD14⁺ Monozyten waren empfindlicher bezüglich der hemmenden Wirkung von Mitoxantron. Die Reduktion ihrer Migrationsfähigkeit war am meisten ausgeprägt.

Es ließ sich zeigen, dass Mitoxantron die Migration von T Lymphozyten auch signifikant unterdrückte. Aber es gab kein Unterschied zwischen den inhibierten Migrationsfähigkeiten von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten, als Hinweis dafür, dass das Medikament auf beide Subpopulationen die gleiche Wirkung ausübte.

In unserem Experiment konnte nicht gezeigt werden, welche Wirkung Mitoxantron auf die Migrationsfähigkeiten von B-Lymphozyten hat. Die Zahl der migrierten CD19⁺ B-Lymphozyten war sowohl vor als auch nach *ex vivo* bzw. *in vitro* Mitoxantronegabe so niedrig, dass keine weitere Analyse erlaubte. Da das Medium keine zur Attraktion dieser Zellen benötigten Chemokine wie z.B. CXCL12 (SDF-1) oder CXCL13 (BCL-1) enthielt, höchstwahrscheinlich, war der chemotaktische

Gradient nicht stark genug um ihre Migration zu initiieren. Weitere Untersuchungen sind erforderlich um diese Frage zu klären.

Aufgrund im ersten Abschnitt dieser Arbeit durchgeführter Experimente können wir die folgende Schlussfolgerung ziehen: Mitoxantron inhibiert die allgemeinen Migrationsfähigkeiten der immunkompetenten Zellen über die Fibronectin Filter in einem *in vitro* Migrationsassay aber hat keinen spezifischen Effekt auf die verschiedenen Zellpopulationen. Die inhibitorische Wirkung des Medikaments *ex vivo* ist nach der *in vitro* Applikation des Medikaments auch reproduzierbar. Dazu muss man erwähnen, dass die Reduktion der Migration der CD4⁺ und CD8⁺ T- Lymphozyten aus den gesunden Probanden nach der *in vitro* Mitoxantrongabe statistisch nicht signifikant war ($p=0,07$). Aber unserer Meinung nach, hier spielte die niedrigere Zahl ($n=5$) der *in vitro* Experimenten eine Rolle.

Die von uns untersuchten Patienten hatten unterschiedliche Krankheitsdaten. Aber interessanterweise die inhibitorische Wirkung von Mitoxantron korrelierte weder mit der Krankheitsdauer noch mit der Schwere der MS-Erkrankung. Sogar bei der unterschiedlichen kumulativen Dosis von Mitoxantron hatte das Medikament einen ausgeprägten Einfluss auf die Zellmigration.

In der Literatur sind Hinweise zu finden, dass MMPs wichtige Mediatoren in der Pathogenese entzündlich-demyelinisierender Erkrankungen darstellen. Ihnen kommt entscheidende Bedeutung bei den Mechanismen der Zellmigration, Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke, Demyelinisierung und Zytokinaktivierung zu (Hartung and Kieseier, 2000). So zeigt sich in Tiermodellen, dass MMPs verschiedene Schlüsselrollen in den zur Demyelinisierung führenden Effektorcaskaden einnehmen, insbesondere jedoch über eine Schädigung der Blut-Hirn-Schranke wirken. Experimentelle Daten bei der EAE wiesen erhöhte mRNA Expressionen von einigen MMPs bzw. MMP-9 nach, die mit der Krankheitsaktivität korrelierten und somit die pathogenetischen Relevanz dieser Proteasen nahe legen (Clements et al., 1997; Kieseier et al., 1998). Aus der Vielzahl bekannter MMPs wurde insbesondere der MMP9 und MMP2 eine Rolle bei der Migration von T-Zellen durch die Basalmembran zugesprochen (Leppert et al., 1995). Deshalb untersuchten wir die Expression dieser zwei Gelatinasen vor und nach *ex vivo* bzw. *in vitro* Mitoxantrongabe. Die Ergebnisse zeigten eine unwesentliche Verminderung der proteolytischen Aktivität von MMP-2 und eine deutliche Aktivitätsreduktion von MMP-9. Außerdem war die MMP-9 Expression auf mRNA-Ebene nach der Mitoxantrongabe

vermindert. Die Verifikationsversuche mit dem unspezifischen MMP Inhibitor EDTA, haben gezeigt, dass das reduzierte Migrationsverhalten von PBMCs, tatsächlich, mit der verminderten Expression von MMPs korrelierte. Aufgrund dieser Datenlage ist es wahrscheinlich, dass der inhibitorische Effekt von Mitoxantron auf die Migrationsfähigkeit der immunkompetenten Zellen, teilweise, mit seiner inhibitorischen Wirkung auf MMP-Aktivität korespondiert.

Arbeiten der letzten Jahre zeigen, dass durch selektive Inhibition bestimmter MMPs möglich ist, die Inflammation und die demyelinisierung im EAE-Modell zu verringern und sogar zu verhindern. Mittlerweile ist ein breites Spektrum von MMP-Inhibitoren entwickelt worden und in verschiedenen In-vivo-Modellen und Knock-out Mäusen mit positiven Ergebnissen getestet worden (Kieseier et al., 1999b).

Durch ihre chelatbindenden Eigenschaften können z.B. Tetrazykline und chemisch modifizierte Tetrazykline die Aktivität von MMPs blockieren. Eine Behandlung mit Monocyclin bei der EAE zeigte eine deutliche positive Beeinflussung des Krankheitsverlaufs und der Inflammation (Popovic et al., 2002).

Kernbeobachtung unserer Arbeit lautet: Mitoxantron inhibiert die Migration der entzündlicher Zellen und dieses reduzierte Migrationsverhalten korrespondiert zu einer verminderten Expression von Matrixmetalloproteinasen, insbesondere von MMP-9. Damit stimmen unsere Ergebnisse mit den oben erwähnten Hypothesen, in denen MMPs als möglichen therapeutischen Ansatzpunkt für die MS darstellen, überein.

Zahlreiche Studien deuten darauf hin, dass Interferon-beta transmigratorische Fähigkeiten von PBMCs effektiv moduliert und seine Wirkung durch die Hemmung entzündlicher Läsionen bei der MS vermittelt. Mittels MRT konnte gezeigt werden, dass diese Substanz die Störung der Blut-Hirn-Schranke signifikant verringert. Diese Hypothese über einen möglichen Wirkmechanismus von Interferon-beta wird durch Befunde unterstützt, denen zufolge dieses Zytokin die Produktion von MMPs in Lymphozyten im gleichen Ausmaß wie deren Migrationsfähigkeit vermindert; (Stuve et al., 1996; Hartung and Kieseier, 1996; Yong et al., 1998).

Wegen des unterschiedlichen Ablaufs der Untersuchungen kann man die Wirkung von Interferon-beta und Mitoxantron miteinander nicht vergleichen, aber aus oben genannten und von uns beobachteten

Ergebnisse lässt sich folgern, dass die Hemmung der MMP-Aktivität und darüber hinaus die Reduktion transmigratorischer Fähigkeiten immunkompetenter Zellen, ein Mechanismus zu sein scheint, über den die beiden Substanzen ein weiteres Voranschreiten der Erkrankung bei MS zu reduzieren vermögen.

6 Zusammenfassung

Bei der Multiplen Sklerose (MS) stellt die Einwanderung immunkompetenter Zellen aus dem Gefäßsystem über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) in das Gehirnparenchym hinein einen immunpathogenetisch relevanten Mechanismus dar. Mitoxantron wird zur Therapie der MS erfolgreich eingesetzt, die Wirkung dieses Präparates auf immunkompetente Zellen ist jedoch nur unvollständig geklärt. Wir untersuchten daher den Effekt von Mitoxantron auf die Migrationsfähigkeit mononukleärer Zellen aus dem peripher-venösen Blut (PBMCs) über eine artifizielle BHS. Dazu wurden PBMCs vor und nach Therapie mit Mitoxantron von 11 MS-Patienten isoliert, zur Migration über Fibronectin, einem Hauptbestandteil der Basalmembran zerebraler Endothelzellen, in einem *in vitro* Assay gebracht und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es zeigte sich, dass die allgemeine Migrationsfähigkeit immunkompetenter Zellen nach Mitoxantrongabe vermindert ist, einzelne Zellpopulationen aber unterschiedlich betroffen sind. $CD14^+$ Monozyten migrierten deutlich schlechter als $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten. Die *in vitro* Behandlung von PBMCs gesunder Kontrollpersonen ergab gleiche Ergebnisse und zeigte, dass auch die migrierende Restzellpopulation Mitoxantron inkorporierte. Das verminderte Migrationsverhalten korrespondierte zu einer verminderten Expression von Matrix Metalloproteinasen in den Zellüberständen.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Mitoxantron die Migrationsfähigkeit immunkompetenter Zellen zu beeinflussen vermag. Dieser Wirkmechanismus ist möglicherweise bei der klinischen Effektivität dieser Substanz von Bedeutung.

7 Literatur

Babbe, H. et al. 2000, Babbe, H. et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction.

Bar-Or, A. et al. 2003, Bar-Or, A. et al. Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis.

Barnett, M. H., and J. W. Prineas, 2004, Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion: *Ann.Neurol.*, v. 55, no. 4, p. 458-468.

Bellosillo, B., D. Colomer, G. Pons, and J. Gil, 1998, Mitoxantrone, a topoisomerase II inhibitor, induces apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia cells: *Br.J.Haematol.*, v. 100, no. 1, p. 142-146.

Birkedal-Hansen, H., 1995, Proteolytic remodeling of extracellular matrix: *Curr.Opin.Cell Biol.*, v. 7, no. 5, p. 728-735.

Bitsch, A., J. Schuchardt, S. Bunkowski, T. Kuhlmann, and W. Bruck, 2000, Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation: *Brain*, v. 123, p. 1174-1183.

Brundula, V., N. B. Rewcastle, L. M. Metz, C. C. Bernard, and V. W. Yong, 2002, Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis: *Brain*, v. 125, p. 1297-1308.

Busiek, D. F., V. Baragi, L. C. Nehring, W. C. Parks, and H. G. Welgus, 1995, Matrilysin expression by human mononuclear phagocytes and its regulation by cytokines and hormones: *J.Immunol.*, v. 154, no. 12, p. 6484-6491.

Cannella, B., and C. S. Raine, 1995, The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions: *Ann.Neurol.*, v. 37, no. 4, p. 424-435.

Chan, A., F. X. Weilbach, K. V. Toyka, and R. Gold, 2005, Mitoxantrone induces cell death in peripheral blood leucocytes of multiple sclerosis patients: *Clin.Exp.Immunol.*, v. 139, no. 1, p. 152-158.

Chandler, S., K. M. Miller, J. M. Clements et al., 1997, Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview: *J.Neuroimmunol.*, v. 72, no. 2, p. 155-161.

Clark Ian M., 2001, Clark Ian M. Matrix Metalloüroteinase Protocols: Totowa, New Jersey, Humana Press.

Clements, J. M., J. A. Cossins, G. M. Wells et al., 1997, Matrix metalloproteinase expression during experimental autoimmune encephalomyelitis and effects of a combined matrix metalloproteinase and tumour necrosis factor-alpha inhibitor: *J.Neuroimmunol.*, v. 74, no. 1-2, p. 85-94.

Compston, A., 1999, The genetic epidemiology of multiple sclerosis: *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.*, v. 354, no. 1390, p. 1623-1634.

Compston, A., and A. Coles, 2002, Multiple sclerosis: *Lancet*, v. 359, no. 9313, p. 1221-1231.

Cuzner, M. L., D. Gveric, C. Strand et al., 1996, The expression of tissue-type plasminogen activator, matrix metalloproteases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis: comparison of stages in lesion evolution: *J.Neuropathol.Exp.Neurol.*, v. 55, no. 12, p. 1194-1204.

Dollery, C., 1991, Mitoxantrone, Therapeutic rugs: Edinburgh, Churchill Liistone, p. 218-222.

Edan, G., D. Miller, M. Clanet et al., 1997, Therapeutic effect of mitoxantrone combined with methylprednisolone in multiple sclerosis: a randomised multicentre study of active disease using MRI and clinical criteria: *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry*, v. 62, no. 2, p. 112-118.

Edwards, D. R., G. Murphy, J. J. Reynolds et al., 1987, Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor: *EMBO J.*, v. 6, no. 7, p. 1899-1904.

Engelhardt, B., 2003, Development of the blood-brain barrier: *Cell Tissue Res.*, v. 314, no. 1, p. 119-129.

Faulds, D., J. A. Balfour, P. Chrisp, and H. D. Langtry, 1991, Mitoxantrone. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in the chemotherapy of cancer: *Drugs*, v. 41, no. 3, p. 400-449.

Fidler, J. M., S. Q. DeJoy, and J. J. Gibbons, Jr., 1986a, Selective immunomodulation by the antineoplastic agent mitoxantrone. I. Suppression of B lymphocyte function: *J.Immunol.*, v. 137, no. 2, p. 727-732.

Fidler, J. M., S. Q. DeJoy, F. R. Smith, III, and J. J. Gibbons, Jr., 1986b, Selective immunomodulation by the antineoplastic agent mitoxantrone. II. Nonspecific adherent suppressor cells derived from mitoxantrone-treated mice: *J.Immunol.*, v. 136, no. 8, p. 2747-2754.

Flachenecker, P., U. K. Zettl, U. Gotze et al., 2005, [MS registry in Germany--design and first results of the pilot phase]: *Nervenarzt*, v. 76, no. 8, p. 967-975.

Gbadamosi, J., C. Buhmann, W. Tessmer et al., 2003, Effects of mitoxantrone on multiple sclerosis patients' lymphocyte subpopulations and production of immunoglobulin, TNF-alpha and IL-10: *Eur.Neurol.*, v. 49, no. 3, p. 137-141.

Giannelli, G., J. Falk-Marzillier, O. Schiraldi, W. G. Stetler-Stevenson, and V. Quaranta, 1997, Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5: *Science*, v. 277, no. 5323, p. 225-228.

Gijbels, K., S. Masure, H. Carton, and G. Opdenakker, 1992, Gelatinase in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological disorders: *J.Neuroimmunol.*, v. 41, no. 1, p. 29-34.

Gonsette, R. E., A. Defalque, and L. Demonty, 1987, Effects of immunosuppressive agents and particularly of cyclophosphamide on lymphocytes subsets in treated multiple sclerosis patients: Riv.Neurol., v. 57, no. 3, p. 181-184.

Grauer, O., M. Offenhausser, J. Schmidt, K. V. Toyka, and R. Gold, 2001, [Glucocorticosteroid therapy in optic neuritis and multiple sclerosis. Evidence from clinical studies and practical recommendations]: Nervenarzt, v. 72, no. 8, p. 577-589.

Hartung, H. P., J. J. Archelos, J. Zielasek et al., 1995, Circulating adhesion molecules and inflammatory mediators in demyelination: a review: Neurology, v. 45, no. 6 Suppl 6, p. S22-S32.

Hartung, H. P., R. Gonsette, N. Konig et al., 2002, Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial: Lancet, v. 360, no. 9350, p. 2018-2025.

Hartung, H. P., and B. C. Kieseier, 2000, The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system: J.Neuroimmunol., v. 107, no. 2, p. 140-147.

Hartung, H. P., and B. C. Kieseier, 1996, Targets for the therapeutic action of interferon-beta in multiple sclerosis: Ann.Neurol., v. 40, no. 6, p. 825-826.

Hein, T., and W. Hopfenmuller, 2000, [Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany]: Nervenarzt, v. 71, no. 4, p. 288-294.

Hemmer, B., B. Kieseier, S. Cepok, and H. P. Hartung, 2003, New immunopathologic insights into multiple sclerosis: Curr.Neurol.Neurosci.Rep., v. 3, no. 3, p. 246-255.

Hiraoka, N., E. Allen, I. J. Apel, M. R. Gyetko, and S. J. Weiss, 1998, Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins: Cell, v. 95, no. 3, p. 365-377.

Hohlfeld, R., 1997, Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis. Principles, problems and perspectives: Brain, v. 120, p. 865-916.

Jeffery, D. R., and R. Herndon, 2004, Review of mitoxantrone in the treatment of multiple sclerosis: *Neurology*, v. 63, no. 12 Suppl 6, p. S19-S24.

Jung, K., C. Laube, M. Lein et al., 1998, Kind of sample as preanalytical determinant of matrix metalloproteinase 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 in blood: *Clin.Chem.*, v. 44, no. 5, p. 1060-1062.

Jurewicz, A., W. E. Biddison, and J. P. Antel, 1998, MHC class I-restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide-specific CD8 T lymphocytes: *J.Immunol.*, v. 160, no. 6, p. 3056-3059.

Kieseier, B. C., B. Hemmer, and H. P. Hartung, 2005, Multiple sclerosis--novel insights and new therapeutic strategies: *Curr.Opin.Neurol.*, v. 18, no. 3, p. 211-220.

Kieseier, B. C., R. Kiefer, J. M. Clements et al., 1998, Matrix metalloproteinase-9 and -7 are regulated in experimental autoimmune encephalomyelitis: *Brain*, v. 121, p. 159-166.

Kieseier, B. C., R. Paul, U. Koedel et al., 1999a, Differential expression of matrix metalloproteinases in bacterial meningitis: *Brain*, v. 122, p. 1579-1587.

Kieseier, B. C., T. Seifert, G. Giovannoni, and H. P. Hartung, 1999b, Matrix metalloproteinases in inflammatory demyelination: targets for treatment: *Neurology*, v. 53, no. 1, p. 20-25.

Kieseier, B. C., T. Seifert, and H. P. Hartung, 1999c, [Matrix metalloproteinases. Potential targets for new treatments in inflammatory demyelinating diseases of the nervous system]: *Nervenarzt*, v. 70, no. 6, p. 509-516.

Kuhlmann, T., G. Lingfeld, A. Bitsch, J. Schuchardt, and W. Bruck, 2002, Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time: *Brain*, v. 125, p. 2202-2212.

Kurtzke, J. F., 2000, Epidemiology of multiple sclerosis. Does this really point toward an etiology? *Lectio Doctoralis: Neurol.Sci.*, v. 21, no. 6, p. 383-403.

Lassmann, H., M. Reindl, H. Rauschka et al., 2003, A new paraclinical CSF marker for hypoxia-like tissue damage in multiple sclerosis lesions: *Brain*, v. 126, p. 1347-1357.

Lenk, H., U. Muller, and S. Tanneberger, 1987, Mitoxantrone: mechanism of action, antitumor activity, pharmacokinetics, efficacy in the treatment of solid tumors and lymphomas, and toxicity: *Anticancer Res.*, v. 7, no. 6, p. 1257-1264.

Leppert, D., E. Waubant, M. R. Burk, J. R. Oksenberg, and S. L. Hauser, 1996, Interferon beta-1b inhibits gelatinase secretion and in vitro migration of human T cells: a possible mechanism for treatment efficacy in multiple sclerosis: *Ann.Neurol.*, v. 40, no. 6, p. 846-852.

Leppert, D., E. Waubant, R. Galardy, N. W. Bunnett, and S. L. Hauser, 1995, T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro: *J.Immunol.*, v. 154, no. 9, p. 4379-4389.

Levine, S., and A. Saltzman, 1986, Regional suppression, therapy after onset and prevention of relapses in experimental allergic encephalomyelitis by mitoxantrone: *J.Neuroimmunol.*, v. 13, no. 2, p. 175-181.

Lindberg, R. L., C. J. De Groot, L. Montagne et al., 2001, The expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in lesions and normal appearing white matter of multiple sclerosis: *Brain*, v. 124, p. 1743-1753.

Link, H., 1998, The cytokine storm in multiple sclerosis: *Mult.Scler.*, v. 4, no. 1, p. 12-15.

Lublin, F. D., M. Lavasa, C. Viti, and R. L. Knobler, 1987, Suppression of acute and relapsing experimental allergic encephalomyelitis with mitoxantrone: *Clin.Immunol.Immunopathol.*, v. 45, no. 1, p. 122-128.

Lucchinetti, C., W. Bruck, J. Parisi et al., 2000, Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination: *Ann.Neurol.*, v. 47, no. 6, p. 707-717.

Lyons, J. G., B. Birkedal-Hansen, M. C. Pierson, J. M. Whitelock, and H. Birkedal-Hansen, 1993, Interleukin-1 beta and transforming growth factor-alpha/epidermal growth factor induce expression of

M(r) 95,000 type IV collagenase/gelatinase and interstitial fibroblast-type collagenase by rat mucosal keratinocytes: *J.Biol.Chem.*, v. 268, no. 25, p. 19143-19151.

Maeda, A., and R. A. Sobel, 1996, Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions: *J.Neuropathol.Exp.Neurol.*, v. 55, no. 3, p. 300-309.

Medana, I., M. A. Martinic, H. Wekerle, and H. Neumann, 2001, Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes: *Am.J.Pathol.*, v. 159, no. 3, p. 809-815.

Millefiorini, E., C. Gasperini, C. Pozzilli et al., 1997, Randomized placebo-controlled trial of mitoxantrone in relapsing-remitting multiple sclerosis: 24-month clinical and MRI outcome: *J.Neurol.*, v. 244, no. 3, p. 153-159.

Miller, D. H., M. Filippi, F. Fazekas et al., 2004, Role of magnetic resonance imaging within diagnostic criteria for multiple sclerosis: *Ann.Neurol.*, v. 56, no. 2, p. 273-278.

Monson, N. L., H. P. Brezinschek, R. I. Brezinschek et al., 2005, Receptor revision and atypical mutational characteristics in clonally expanded B cells from the cerebrospinal fluid of recently diagnosed multiple sclerosis patients: *J.Neuroimmunol.*, v. 158, no. 1-2, p. 170-181.

Neuhaus, O., H. Wiendl, B. C. Kieseier et al., 2005, Multiple sclerosis: Mitoxantrone promotes differential effects on immunocompetent cells in vitro: *J.Neuroimmunol.*, v. 168, no. 1-2, p. 128-137.

Noseworthy, J. H., C. Lucchinetti, M. Rodriguez, and B. G. Weinshenker, 2000, Multiple sclerosis: *N.Engl.J.Med.*, v. 343, no. 13, p. 938-952.

Oksenberg, J. R., S. E. Baranzini, L. F. Barcellos, and S. L. Hauser, 2001, Multiple sclerosis: genomic rewards: *J.Neuroimmunol.*, v. 113, no. 2, p. 171-184.

Pagenstecher, A., A. K. Stalder, C. L. Kincaid, S. D. Shapiro, and I. L. Campbell, 1998, Differential expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase genes in the

mouse central nervous system in normal and inflammatory states: *Am.J.Pathol.*, v. 152, no. 3, p. 729-741.

Popovic, N., A. Schubart, B. D. Goetz et al., 2002, Inhibition of autoimmune encephalomyelitis by a tetracycline: *Ann.Neurol.*, v. 51, no. 2, p. 215-223.

Ridge, S. C., A. E. Sloboda, R. A. McReynolds et al., 1985, Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by mitoxantrone: *Clin.Immunol.Immunopathol.*, v. 35, no. 1, p. 35-42.

Rieckmann, P., and K. V. Toyka, 2002, [Immunomodulatory staged therapy of multiple sclerosis. New aspects and practical applications, March 2002]: *Nervenarzt*, v. 73, no. 6, p. 556-563.

Ries, C., and P. E. Petrides, 1995, Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease: *Biol.Chem.Hoppe Seyler*, v. 376, no. 6, p. 345-355.

Ritchie, A. M., D. H. Gilden, R. A. Williamson et al., 2004, Comparative analysis of the CD19+ and CD138+ cell antibody repertoires in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis: *J.Immunol.*, v. 173, no. 1, p. 649-656.

Rivera-Quinones, C., D. McGavern, J. D. Schmelzer et al., 1998, Absence of neurological deficits following extensive demyelination in a class I-deficient murine model of multiple sclerosis: *Nat.Med.*, v. 4, no. 2, p. 187-193.

Rosati, G., 2001, The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update: *Neurol.Sci.*, v. 22, no. 2, p. 117-139.

Rosenberg, G. A., J. E. Dencoff, N. Correa, Jr., M. Reiners, and C. C. Ford, 1996, Effect of steroids on CSF matrix metalloproteinases in multiple sclerosis: relation to blood-brain barrier injury: *Neurology*, v. 46, no. 6, p. 1626-1632.

Rosenberg, G. A., J. E. Dencoff, P. G. McGuire, L. A. Liotta, and W. G. Stetler-Stevenson, 1994, Injury-induced 92-kilodalton gelatinase and urokinase expression in rat brain: *Lab Invest*, v. 71, no. 3, p. 417-422.

Rosenberg, G. A., M. Kornfeld, E. Estrada et al., 1992, TIMP-2 reduces proteolytic opening of blood-brain barrier by type IV collagenase: *Brain Res.*, v. 576, no. 2, p. 203-207.

Ruggieri, M., A. Polizzi, L. Pavone, and L. M. Grimaldi, 1999, Multiple sclerosis in children under 6 years of age: *Neurology*, v. 53, no. 3, p. 478-484.

Schiffenbauer, J., J. Soos, and H. Johnson, 1998, The possible role of bacterial superantigens in the pathogenesis of autoimmune disorders: *Immunol.Today*, v. 19, no. 3, p. 117-120.

Schmidt R.M.Hoffmann F.A., 2006,Schmidt R.M.Hoffmann F.A. Multiple Sklerose: München, Urban&Fischer.

Shenkenberg, T. D., and D. D. Von Hoff, 1986, Mitoxantrone: a new anticancer drug with significant clinical activity: *Ann.Intern.Med.*, v. 105, no. 1, p. 67-81.

Smith, I. E., 1983, Mitoxantrone (novantrone): a review of experimental and early clinical studies: *Cancer Treat.Rev.*, v. 10, no. 2, p. 103-115.

Spindler, M., F. Weillbach, M. Beer et al., 2003, Non-invasive functional and biochemical assessment of mitoxantrone cardiotoxicity in patients with multiple sclerosis: *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, v. 42, no. 5, p. 680-687.

Stuve, O., S. Chabot, S. S. Jung, G. Williams, and V. W. Yong, 1997, Chemokine-enhanced migration of human peripheral blood mononuclear cells is antagonized by interferon beta-1b through an effect on matrix metalloproteinase-9: *J.Neuroimmunol.*, v. 80, no. 1-2, p. 38-46.

Stuve, O., N. P. Dooley, J. H. Uhm et al., 1996, Interferon beta-1b decreases the migration of T lymphocytes in vitro: effects on matrix metalloproteinase-9: *Ann.Neurol.*, v. 40, no. 6, p. 853-863.

Swanborg, R. H., 1995, Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease: *Clin.Immunol.Immunopathol.*, v. 77, no. 1, p. 4-13.

Taub, D. D., P. Proost, W. J. Murphy et al., 1995, Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes: *J.Clin.Invest*, v. 95, no. 3, p. 1370-1376.

Trapp, B. D., 2004, Pathogenesis of multiple sclerosis: the eyes only see what the mind is prepared to comprehend: *Ann.Neurol.*, v. 55, no. 4, p. 455-457.

Trapp, B. D., R. Ransohoff, and R. Rudick, 1999, Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability: *Curr.Opin.Neurol.*, v. 12, no. 3, p. 295-302.

Trebst, C., H. Wiendl, and M. Stangel, 2006, [Concepts of lesion development in multiple sclerosis Current discussion and implications for clinical practice and treatment.]: *Nervenarzt*, v. 77, no. 2, p. 158-164.

Unemori, E. N., M. S. Hibbs, and E. P. Amento, 1991, Constitutive expression of a 92-kD gelatinase (type V collagenase) by rheumatoid synovial fibroblasts and its induction in normal human fibroblasts by inflammatory cytokines: *J.Clin.Invest*, v. 88, no. 5, p. 1656-1662.

Visse, R., and H. Nagase, 2003, Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry: *Circ.Res.*, v. 92, no. 8, p. 827-839.

Wang, B. S., A. L. Lumanglas, V. M. Ruzala-Mallon, R. E. Wallace, and F. E. Durr, 1984, Induction of alloreactive immunosuppression by 1,4-bis [(2-aminoethyl)amino]-5,8-dihydroxy-9,10-anthracenedione dihydrochloride (CL 232,468): *Int.J.Immunopharmacol.*, v. 6, no. 5, p. 475-482.

Wekerle, H., 1993, Experimental autoimmune encephalomyelitis as a model of immune-mediated CNS disease: *Curr.Opin.Neurobiol.*, v. 3, no. 5, p. 779-784.

Wiendl, H., H. C. Lehmann, R. Hohlfeld, H. P. Hartung, and B. C. Kieseier, 2004, [Multiple sclerosis: potential therapeutic options and update of ongoing studies]: *Nervenarzt*, v. 75, no. 6, p. 536-552.

Wilson, C. L., K. J. Heppner, P. A. Labosky, B. L. Hogan, and L. M. Matrisian, 1997, Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 94, no. 4, p. 1402-1407.

Woessner, J. F., Jr., 1994, The family of matrix metalloproteinases: *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, v. 732, p. 11-21.

Wucherpfennig, K. W., and J. L. Strominger, 1995, Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein: *Cell*, v. 80, no. 5, p. 695-705.

Yong, V. W., 2005, Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS: *Nat.Rev.Neurosci.*, v. 6, no. 12, p. 931-944.

Yong, V. W., S. Chabot, O. Stuve, and G. Williams, 1998, Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: mechanisms of action: *Neurology*, v. 51, no. 3, p. 682-689.

Zeng, B., A. Prasan, K. C. Fung et al., 2005, Elevated circulating levels of matrix metalloproteinase-9 and -2 in patients with symptomatic coronary artery disease: *Intern.Med.J.*, v. 35, no. 6, p. 331-335.

8 Danksagung

Für den erfolgreichen Abschluss der vorliegenden Arbeit schulde ich vielen Menschen meinen herzlichen Dank.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H-P. Hartung für die Möglichkeit in der Neurologischen Klinik der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf meine Doktorarbeit durchführen zu können. Des Weiteren möchte ich mich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen, als auch für die gute Ausbildung während des gesamten Zeitrahmens bedanken.

Großen Dank schulde ich vor allem meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. B.C. Kieseier für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die exzellent fachliche Betreuung. Seine konstruktive Kritik, Anregungen, aufbauende Persönlichkeit und permanente Bereitschaft, die erzielten Ergebnisse zu diskutieren und folglich neue Ideen zu entwickeln, ermöglichten mir erst die Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Th. Dehmel möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen, weil er mich in jeder Phase der Arbeit sehr sachkundig und richtungweisend begleitete, mich stets ermunterte und viel Geduld zeigte.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. F. Bernal für seine Unterstützung bedanken.

Ebenfalls gilt mein Dank Frau V. Grummel und O. Kiehl für die unermüdliche Hilfe zur Lösung technischer Probleme.

Weiterhin danke ich der gesamten Arbeitsgruppe und allen Mitarbeitern des Neurochemischen Labors für das nette Arbeitsklima und die freundliche Zusammenarbeit.

9 Curriculum vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: georgisch
Geburtsdatum: 12. 03. 1977
Geburtsort: Sestafoni / Georgien

STUDIUM UND BERUFSAUSBILDUNG

Seit 08.06	Assistenzarzt in der Neurologie, Klinikum Bayreuth
09.04 – 07.06	wissenschaftliche Mitarbeiterin, Neurologie, Universitätsklinikum Düsseldorf
23.06.04	Drittes Staatsexamen, HHU-Düsseldorf
10.01 – 06.04	Medizinstudium an der HHU-Düsseldorf
06.01	Abschlussprüfung Arzt für Allgemeinmedizin, Tbilissi, Georgien
10.94 – 06.01	Studium der Humanmedizin, Tbilissi, Georgien

SCHULBILDUNG

09.83 – 06.94	Allgemeine Mittelschule, Abschluss mit Reifezeugnis Sestafoni, Georgien
---------------	--

SPRACHKENNTNISSE

Georgisch, Russisch, Deutsch, Englisch

PUBLIKATIONEN

„Mitoxantron inhibits in vitro migration of immunocompetent cells: A possible mechanism for therapeutic efficacy in the treatment of multiple sclerosis” – “Archives Of Neurology” Nov. 2006 .
“Treosulfan impedes the migration of immunocompetent cells” –“ Journal of Neurology“ – 2007, in press