

Charakterisierung neuartiger immunmodulierender Wirkstoffkandidaten

Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie (FB14)
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Leonard Christoph Blum
aus
Aschaffenburg

Frankfurt am Main (2019)

(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Gutachter: Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz
PD Dr. Susanne Schiffmann

Datum der Disputation: 14.05.2020

Inhaltsangabe

1	Einleitung.....	1
1.1	Potential des Naturstoffs Phytol für die Therapie der Multiplen Sklerose.....	1
1.1.1	Multiple Sklerose.....	1
1.1.1.1	Merkmale, Verlauf und Ätiologie.....	1
1.1.1.2	Therapieoptionen.....	5
1.1.1.3	Pathomechanismus der Multiplen Sklerose.....	8
1.1.1.4	Der Einfluss von T-Zellen & deren Zytokine.....	10
1.1.2	Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis.....	12
1.1.3	Der Naturstoff Phytol.....	14
1.1.4	NADPH-Oxidasen und ROS.....	15
1.1.5	Die NADPH-Oxidase 2.....	16
1.1.6	Der Einfluss von Phytol auf das EAE-Model und NOX2.....	18
1.2	Potential der humanen Immunmodulation durch antimikrobielle Substanzen.....	19
1.2.1	Die Rolle der Makrophagen bei der humanen Immunantwort.....	20
1.2.2	Die Rolle der Dendritischen Zellen bei der humanen Immunantwort.....	22
1.2.3	Immunmodulierende Wirkstoffe.....	23
1.2.3.1	Der Naturstoff Silvestrol.....	24
1.2.3.2	Die Steroid Substanz 1o.....	26
2	Zielsetzung.....	27
3	Material und Methoden.....	28
3.1	Tiermodell.....	28
3.2	Genotypisierung.....	28
3.3	EAE-Induktion & Scoring.....	29
3.4	Knochenmarkstransplantation.....	30
3.5	RNA-Isolation aus Zellen: „RNAqueous-Micro Procedure“ Kit.....	31
3.6	RNA-Isolation aus Gewebe: Phenol-Chloroform-Extraktion.....	31
3.7	cDNA-Synthese.....	32
3.8	Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR).....	33
3.9	Durchflusszytometrie.....	33
3.9.1	Zellverteilung von murinen Immunzellen.....	34
3.9.2	Murine T-Zell-Subpopulationen.....	36
3.9.3	Zelltypverteilung von humanen PBMCs.....	37
3.9.4	Charakterisierung von Oberflächenmarkern humaner Makrophagen.....	37
3.9.5	Charakterisierung von Oberflächenmarkern humaner Dendritischer Zellen.....	39
3.10	Isolation & Stimulierung muriner T-Zellen.....	40
3.11	Proliferations-Assay muriner T-Zellen.....	42
3.12	Zytometrischer Bead-Array & ELISA.....	43
3.12.1	Murine Proben.....	43
3.12.2	Humane Proben.....	43
3.13	Immunhistochemie.....	45
3.13.1	Gewebeschnitte.....	45
3.13.2	Immunhistochemische Färbungen.....	45
3.13.2.1	Fluoromyelin-Färbung.....	46
3.13.2.2	8-OHG Färbung.....	47
3.13.3	Mikroskopie.....	47
3.14	Isolation CD14 ⁺ -Zellen aus humanem Blut.....	48

3.15	Bestimmung der Zellviabilität mittels Orangu™-Assay	49
3.16	Differenzierung humaner Makrophagen	50
3.17	Polarisierung humaner Makrophagen	51
3.18	Differenzierung humaner Dendritischer Zellen	51
3.19	Aktivierung humaner Dendritischer Zellen.....	52
3.20	Energiestoffwechsel-Charakterisierung von humanen Immunzellen.....	52
3.21	Graphische Darstellung und Statistik	53
4	Ergebnisse	54
4.1	Charakterisierung des Naturstoffs Phytol	54
4.1.1	Verringerte Demyelinisierung durch Phytol.....	54
4.1.2	Phytol reduziert die Anzahl der murinen Immunzellen	55
4.1.3	Einfluss von Phytol auf murine T-Zell-Transkriptionsfaktoren und Zytokine	56
4.1.4	Phytansäure reduziert die Proliferationsfähigkeit von murinen T-Zellen.....	58
4.1.5	Regulation der murinen T-Zell-Subtypen durch Phytan- und Pristansäure	59
4.1.6	Reduzierte NOX2 mRNA-Expression im RML von NOX2-Chimären	61
4.1.7	Reduktion der ROS-vermittelten DNA-Schäden im RML durch Phytol	62
4.1.8	Lokalisation der ROS-vermittelten DNA-Schäden	63
4.1.9	Verlust des anti-proliferativen Effekts von Phytol in NOX2KO-Splenozyten.....	64
4.1.10	Phytan- und Pristansäure reduzieren die NOX2KO-T-Zell-Proliferation.....	65
4.1.11	Regulation der NOX2KO-T-Zell-Subtypen durch Phytan- und Pristansäure	66
4.1.12	Einfluss von Phytol auf klinische EAE-Scores von NOX2KO-Tieren.....	69
4.2	Immunmodulation durch den Naturstoff Silvestrol	71
4.2.1	Silvestrol reduziert die Zellviabilität humaner Immunzellen.....	71
4.2.2	Silvestrol beeinflusst die Differenzierung humaner Makrophagen.....	72
4.2.3	Silvestrol reguliert die Polarisierung humaner Makrophagen	74
4.2.4	Silvestrol reduziert die Differenzierung humaner Dendritischer Zellen.....	77
4.2.5	Silvestrol beeinflusst die Aktivierung humaner Dendritischer Zellen	80
4.2.6	Silvestrol verringert den zellulären Energiestoffwechsel	83
4.3	Immunmodulation durch Steroid Substanz 1o.....	85
4.3.1	Auswirkungen von Steroid Substanz 1o auf die Zellviabilität	85
4.3.2	Steroid Substanz 1o beeinflusst den zellulären Energiestoffwechsel.....	87
4.3.3	Steroid Substanz 1o beeinflusst die Differenzierung humaner Makrophagen ..	89
4.3.4	Steroid Substanz 1o verstärkt die pro-inflammatorischen Aspekte polarisierter humaner Makrophagen	91
4.3.5	Steroid Substanz 1o reduziert die Differenzierung humaner Dendritischer Zellen	95
4.3.6	Steroid Substanz 1o hemmt die Aktivierung humaner Dendritischer Zellen.....	97
5	Diskussion	100
5.1	Auswirkungen von Phytol im murinen EAE-Modell.....	100
5.1.1	Immunmodulatorische Effekt von Phytol durch ROS-Interaktionen.....	100
5.1.2	Zeitliche Verzögerung der Phytol-Effekte	102
5.1.3	Die Rolle der Metaboliten Phytan- und Pristansäure	103
5.1.4	Die Beteiligung von NOX2 an den Effekten von Phytol.....	105
5.1.5	Therapeutische Anwendungsmöglichkeiten von Phytol / NOX2	108
5.2	Immunmodulation durch den Naturstoff Silvestrol	109
5.3	Immunmodulation durch die Steroid Substanz 1o	115
6	Zusammenfassung	121

7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	123
7.1	Abbildungsverzeichnis	123
7.2	Tabellenverzeichnis	125
8	Abkürzungsverzeichnis	125
9	Literaturverzeichnis	130
10	Anhang	145
10.1	Chemikalien & Verbrauchsgegenstände	145
10.2	Geräte	147
10.3	Antikörper	148
10.4	Oligonukleotide zur Quantifizierung muriner Gene	149
10.5	Kits	149
10.6	Lösungen, Puffer & Medien	150
10.7	Software	150
11	Eidesstattliche Erklärung	151

1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit werden 3 unterschiedliche neuartige Wirkstoffkandidaten in Bezug auf ihre direkte oder indirekte Wirkungsweise untersucht. Dabei liegt der Fokus der Untersuchungen vor allem auf den immunrelevanten Wirkungen der Testsubstanzen.

Im 1. Teil der Arbeit wird der Naturstoff Phytol für die Therapie der Multiplen Sklerose (MS) im murinen Modell erprobt. Dabei sollen die Wirkung sowie der Mechanismus untersucht werden. Der Fokus liegt dabei speziell auf der Immunregulation sowie der Rolle der NADPH-Oxidase 2 (NOX2). In diesem Teil der Arbeit spielt das direkte Potential für die mögliche Therapie der MS eine entscheidende Rolle. Aus diesem Grund werden in der folgenden Einleitung die Charakteristika der MS im Detail dargelegt.

Im 2. Teil der Arbeit werden die allgemeinen Möglichkeiten der Immunmodulation durch 2 weitere neuartige Wirkstoffkandidaten analysiert. Der Naturstoff Silvestrol zeigt eine antivirale Wirkungsweise und ist für die Therapie zahlreicher viraler Infekte in der Entwicklung. Die Steroid Substanz 1o wird für die Therapie von Malaria erprobt und verfügt über eine anti-parasitäre Wirkung. Unabhängig vom direkten Anwendungsgebiet der Wirkstoffe soll untersucht werden, welchen Einfluss die Wirkstoffe auf humane Makrophagen und Dendritische Zellen während der Differenzierung und Aktivierung haben. Da die direkten Anwendungsgebiete im 2. Teil der Arbeit von untergeordneter Rolle sind, werden diese nur kurz behandelt und dafür die allgemeinen Aspekte der Immunmodulation fokussiert.

1.1 Potential des Naturstoffs Phytol für die Therapie der Multiplen Sklerose

1.1.1 Multiple Sklerose

1.1.1.1 Merkmale, Verlauf und Ätiologie

MS gehört zu der Gruppe der neurodegenerativen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) und ist durch einen chronisch-entzündlichen Verlauf charakterisiert. Weltweit leiden mit steigender Tendenz ca. 2,5 Millionen Menschen an MS. In Deutschland sind ca. 122.000 Menschen betroffen (Compston and Coles, 2008). Besonders das für neurodegenerative Erkrankungen junge Alter der Patienten bei einem Krankheitsbeginn von 20 bis 40 Jahren (Kamm et al., 2014) stellt eine große Belastung für die Betroffenen sowie für das Gesundheitssystem dar. Da Frauen etwa 3- bis 4-fach häufiger betroffen sind als Männer kann MS zur Gruppe der Erkrankungen mit Gynäkotropie gezählt werden (Voskuhl, 2011, Cruz-Orengo et al., 2014).

Kernelemente der Erkrankung sind die Demyelinisierung, der Axonverlust und die neuronale Degeneration welche durch die Inflammation im ZNS hervorgerufen werden. Die Inflammation wird wiederum durch autoreaktive T-Zellen hervorgerufen, welche aus der Peripherie über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) in das ZNS einwandern und dort zur Bildung von Entzündungsherden beitragen (Frischer et al., 2009, Dendrou et al., 2015). Die Lokalisation der Entzündung und die damit einhergehende Neurodegeneration innerhalb des ZNS beeinflusst die von den Patienten entwickelten Symptome und sorgen für ein breites Spektrum an klinischen Merkmalen. Typisch sind kognitive Störungen, Lähmungen, Taubheit, Krämpfe, Erblindung, Harndrang oder -retention sowie starke psychische Belastung bis hin zur Depression (Milo and Kahana, 2010, Thompson et al., 2010). Die Ausbildung dieser sehr heterogenen Symptome ist neben den individuellen Bedingungen abhängig von der jeweiligen Verlaufsform der Erkrankung. Man unterscheidet zwischen dem klinisch isolierten Syndrom („clinically isolated syndrom“, CIS), einer schubförmig remittierenden („relapse remitting“, RRMS), einer primär progredienten (PPMS) und einer sekundär progredienten (SPMS) Verlaufsform der MS. Beim CIS zeigen sich erstmalig Anzeichen der Krankheit, ohne dass vorher Hinweise auf eine Demyelinisierung vorliegen. Die korrekte Interpretation dieses CIS ist besonders wichtig für eine frühzeitige Diagnose und einen zeitnahen Therapiebeginn. Die am häufigsten vorkommende Form der MS ist die der RRMS. Diese ist durch Krankheitsschübe charakterisiert, die zum schlagartigen Auftreten klinischer Symptome führen. Diese Symptome klingen nach dem Schub, welcher einige Tage bis wenige Wochen andauern kann, wieder ab und es kommt zu einer sogenannten Remission. Die Stärke der Schübe sowie die Vollständigkeit der Remission unterscheidet sich dabei bei jedem Patienten und ist abhängig von dem Status der Inflammation im ZNS. Diese Form der MS wird bei ca. 85 % der Patienten diagnostiziert. Beim Fortschreiten der Erkrankung kommt es bei 50 % der Patienten nach 10 Jahren bzw. 90 % der Patienten nach 25 Jahren zu einem Übergang in die Verlaufsform der SPMS. Diese ist durch eine unvollständige Remissionsphase gekennzeichnet. Folglich kommt es zu einer zunehmenden Ausprägung der Behinderungen bei gleichzeitig abnehmendem Hirnvolumen und voranschreitender Schädigung der Axone. Eine deutlich seltenere Verlaufsform stellt die PPMS da. Diese betrifft etwa 10-15 % aller Patienten und ist durch das Ausbleiben von Schub- und Remissionsphasen gekennzeichnet. Hierbei kommt es zu einem stetigen Voranschreiten der Erkrankung und einer kontinuierlichen Verschlechterung der Symptome (Lublin et al., 2014, Milo and Miller, 2014, Przybek et al., 2015).

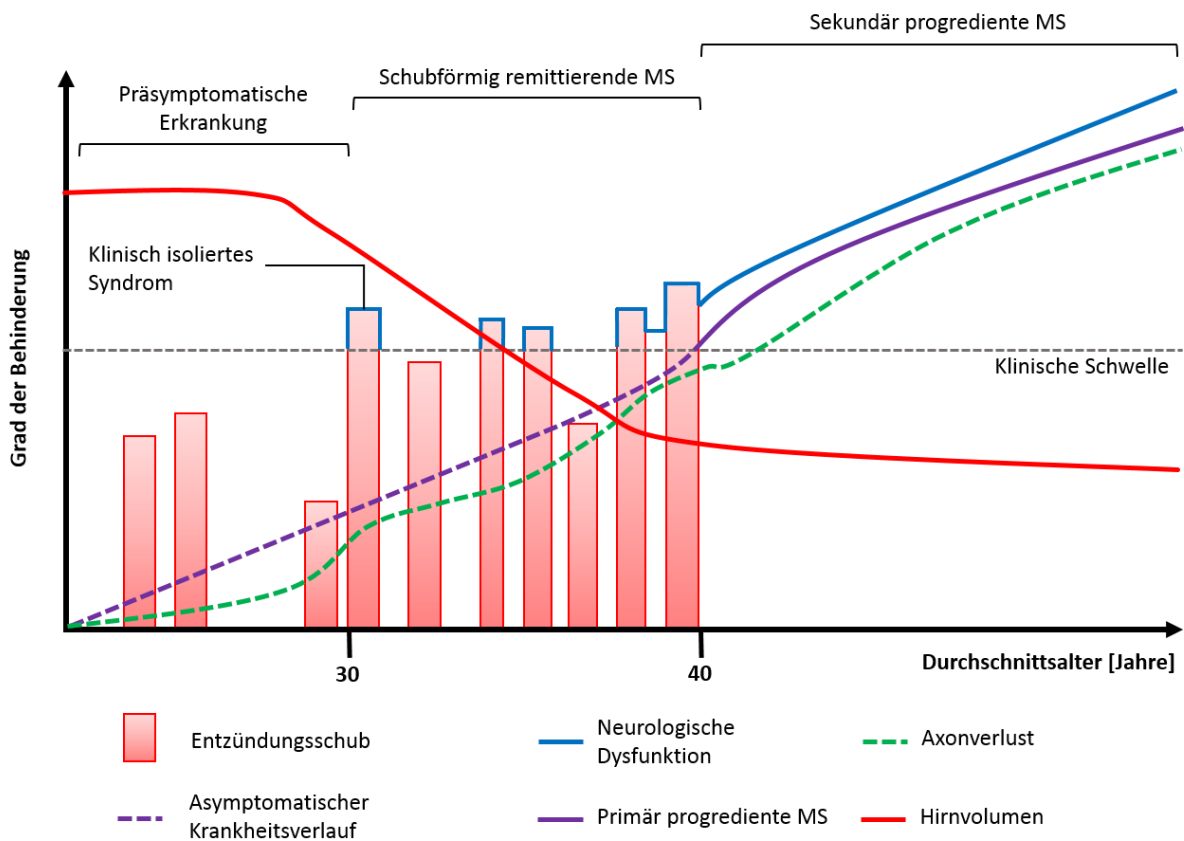


Abbildung 1: Verlaufsformen der Multiplen Sklerose. Zu unterscheiden sind die Formen der schubförmig remittierenden MS (RRMS), der sekundär progredienten MS (SPMS) und der primär progredienten MS (PPMS). Abbildung modifiziert nach (Dendrou et al., 2015).

Die Ursachen für die Entstehung der MS sind vielschichtig, zum Teil kontrovers diskutiert und noch nicht vollständig geklärt. Jedoch scheint das Zusammenspiel aus genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Krankheit zu spielen. Bei MS handelt es sich nicht um eine klassische Erbkrankheit (Patsopoulos, 2018), dennoch ist das Risiko zu erkranken für Verwandte ersten Grades um den Faktor 10 bis 12 sowie bei Verwandten 2. Grades um den Faktor 3 erhöht (Carton et al., 1997). Bis zu 100 verschiedene Genloci werden mit der MS in Zusammenhang gebracht, jedoch scheint speziell die Region des, für das Immunsystem äußerst wichtige, Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) eine entscheidende Rolle zu spielen. So wurde ein 3-fach erhöhtes Krankheitsrisiko für Personen mit Mutationen im humanen Leukozyten-Antigen-DRB1 (HLA-DRB1) Allel beschrieben (Gregersen et al., 2006, Hauser et al., 2013, Lill, 2014). Doch auch weitere, mit dem Immunsystem assoziierte, Genmutationen sind mit einem erhöhten Krankheitsrisiko verbunden, wie zum Beispiel Gene der α -Kette von Rezeptoren für Interleukin (IL)-2 sowie IL-7. Neben klassischen Genmutationen werden auch epigenetische Faktoren wie DNA-Methylierungsmuster, Histon-Modifikation sowie posttranskriptionelle Wirkmechanismen im Kontext der MS untersucht (Zhou et al., 2014).

Des Weiteren spielen Umweltfaktoren eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Manifestation der Erkrankung. Auffällig ist ein um 20-fach erhöhtes Krankheitsrisiko in den Industrienationen im Vergleich zu Entwicklungsländern (Milo and Miller, 2014). Bei der Risikobestimmung scheint das Alter eine entscheidende Rolle zu spielen: Bei einer Migration in ein anderes Land wird das dortige Risiko angenommen solange der Wechsel vor dem Ende der Pubertät stattfindet. Bei einem späteren Wechsel bleibt das Risiko des Ursprungslands bestehen (Elian et al., 1990, Kamm et al., 2014). Abseits des Wohlstands in einem Land scheint die geographische Lage eine weitere Rolle zu spielen. Mit steigender Entfernung vom Äquator scheint auch das Risiko der MS-Erkrankung anzusteigen. Dies ist durch eine reduzierte Sonnenlichteinstrahlung und mit einem damit einhergehenden Mangel an Vitamin-D₃ begründbar. Für die Bildung von Vitamin-D₃ in der Haut ist eine ausreichende Sonnenlichtexposition essentiell und ein Mangel an Vitamin-D₃ wird in Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko gebracht. Dafür spricht, dass nördliche Länder wie Kanada, Schweden, Norwegen und Finnland eine stark erhöhte MS-Prävalenz aufweisen (Ascherio and Munger, 2016, Grytten et al., 2016). Des Weiteren gibt es Hinweise auf einen positiven Einfluss von Vitamin-D₃ reicher Ernährung auf den Verlauf der MS (Hoglund and Maghazachi, 2014). Generell reduzieren auch klassische Faktoren wie ausreichende sportliche Betätigung und eine ausgewogene Ernährung das Risiko einer Erkrankung (Milo and Kahana, 2010).

Im Kontext mit Autoimmunerkrankungen werden häufig auch virale Infektionen als Kofaktoren diskutiert. Beispielsweise korreliert ein hoher Titer an Epstein-Bar-Virus (EBV)-spezifischen Antikörpern mit einem erhöhten MS-Risiko (Belbasis et al., 2015). Dieser Befund wird durch die Hypothese gestützt, dass es im Zuge einer EBV-Infektion zu einer fehlgeleiteten Aktivierung von B-Zellen, welche zuvor in Kontakt mit dem EBV waren, innerhalb des ZNS kommen kann. Dadurch sollen die B-Zellen virale Proteine exprimieren, welche wiederum von effektorischen T-Zellen als Pathogen erkannt werden und zu einer Aktivierung dieser führt (Dendrou et al., 2015). Dazu kommt, dass Proteine des EBV einige Ähnlichkeiten mit Bestandteilen der Myelinschicht aufweisen und somit die Wahrscheinlichkeit einer fälschlichen Autoimmunität erhöht wird (Mameli et al., 2014). Der mögliche Zusammenhang aus viralen Infektionen und Ausbruch der MS wird als Infektionshypothese bezeichnet. Da es sich bisher hierbei um eine nicht ausreichend gestützte Hypothese handelt und es für eine Etablierung der Erkrankung multipler Faktoren bedarf, wird die Möglichkeit eine Ansteckung mit MS dennoch nicht in Betracht gezogen (Marrodan et al., 2019).

1.1.1.2 Therapieoptionen

Bisher besteht keine Möglichkeit für eine tatsächliche Heilung der Erkrankung, dennoch existieren zahlreiche Medikamente zur Behandlung der MS. Ziel der Therapie ist es die Lebensqualität der betroffenen Patienten bestmöglich zu erhalten. Dafür soll die Progression der Krankheit verlangsamt und die individuell auftretenden Symptome spezifisch behandelt werden. Die Art der Behandlung wird dabei in 3 unterschiedliche Formen untergliedert: Die Basistherapie zur Modulation des Immunsystems, die Behandlung bei akuten Schüben sowie maßgeschneiderte symptomatische Therapien (Murray, 2006, Rubin, 2013).

Ziel der Basistherapie ist die Reduktion der Schubfrequenz sowie die Bewahrung der ZNS-Funktionalität. Inzwischen stehen dafür zahlreiche Präparate zur Verfügung. Die individuell gewählte Behandlung ist dabei abhängig von der Verlaufsform, dem Schweregrad der gezeigten klinischen Symptome sowie möglichen Kontraindikationen. Folgende Präparate stehen üblicherweise zur Auswahl:

- Beta-Interferone (IFN- β 1a, IFN- β 1b – bei moderater RRMS bzw. IFN- β 1a bei PPMS mit Schüben)

Diese Wirkstoffe gehören zu den ältesten und am besten beschriebenen Wirkstoffen für die Behandlung der MS. Beta-Interferone sind Teil des angeborenen Immunsystems und dienen dort als körpereigene Botenstoffe. Bei der Verwendung als Therapeutikum werden diese üblicherweise unter die Haut oder in den Muskel appliziert. Dadurch wird die Infiltration des ZNS durch autoreaktive T-Zellen verringert und es kommt zu einer abgeschwächten Inflammation innerhalb dessen. Typische Nebenwirkungen sind allerdings Grippe-ähnliche Symptome, Entzündungen an den Injektionsstellen sowie mögliche Leberschäden. Des Weiteren kann es zur Bildung von neutralisierenden Antikörpern kommen welche den Therapieerfolg verschlechtern (Murdoch and Lyseng-Williamson, 2005, Sanford and Lyseng-Williamson, 2011).

- Ocrelizumab (aktive RRMS, frühe PPMS)

Dieser humanisierte Antikörper richtet sich gegen das CD20-Epitop auf B-Zellen. Die Bindung von Ocrelizumab an CD20 führt über 3 bekannte Mechanismen zur B-Zell-Depletion: Zum einen durch die Induktion von Apoptose, durch Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität sowie durch komplementabhängige Zytolyse. Die daraus resultierende immunsuppressive Wirkung sorgt für eine Reduktion der klinischen Symptome sowie der Schubfrequenz (Sorensen and Blinkenberg, 2016). In Phase-III Studien konnte Ocrelizumab eine bessere Effektivität als Interferone zeigen

(Hauser et al., 2017). Dabei kann es zu klassischen Nebenwirkungen der Immunsuppression kommen: Grippe-ähnliche Symptome, geschwächte Pathogenabwehr sowie Übelkeit und ein zum Teil erhöhtes Brustkrebsrisiko. In der Europäischen Union (EU) ist Ocrelizumab seit 2018 für die Behandlung der PPMS im Frühstadium sowie der aktiven RRMS zugelassen.

- Glatirameracetat (moderate RRMS)

Das synthetisch hergestellte Polypeptid Glatirameracetat wird aufgrund seiner immunmodulatorischen Wirkung für die Behandlung der RRMS verwendet. Es ist zusammengesetzt aus den Aminosäuren L-Alanin, L-Glutamin, L-Lysin und L-Tyrosin und ähnelt in seinem Aufbau dem menschlichen Myelin. Der Wirkstoff wird in der Regel unter die Haut appliziert und zeigt erst nach ca. 3 Monaten Effekte. Der zugrundeliegende Mechanismus ist bisher nicht ausreichend geklärt, jedoch wird davon ausgegangen, dass durch die strukturelle Ähnlichkeit zum Myelinprotein das Glatirameracetat die Immunantwort auf sich zieht und so das ZNS weniger stark von der Autoimmunität betroffen ist. Des Weiteren kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen T-Helfer-Zellen (T_H) 1- und T_H 2-Zellen zugunsten der anti-inflammatorischen T_H 2-Zellen und somit zu einer verringerten Inflammation. Nebenwirkungen beinhalten Hautausschlag sowie Schmerzen an der Applikationsstelle sowie Angst, Depression und Schwächegefühl (Perumal et al., 2006, Racke and Lovett-Racke, 2011).

- Dimethylfumarat (DMF, moderate RRMS)

Das ursprünglich für die Psoriasis zugelassene Medikament wird seit 2014 auch für die Therapie der MS verwendet. Ein großer Vorteil dabei ist die Möglichkeit der oralen Darreichungsform. DMF aktiviert den Transkriptionsfaktor „Nuclear Factor-Related Factor 2“ (Nrf2), welcher wiederum zu einer verstärkten Transkription anti-inflammatorischer sowie anti-oxidativer Gene führt (Gopal et al., 2017). Somit wird ein zelleigener Mechanismus gegen oxidativen Stress aktiviert und verbessert die Symptomatik der MS-Erkrankung. DMF ist bisher das einzige Medikament für die MS welches über die Aktivierung des Nrf2-Signalwegs wirkt. Als Nebenwirkungen können Hautrötungen, Hitzegefühl sowie Verdauungsstörungen auftreten (Wakkee and Thio, 2007, Moharreggh-Khiabani et al., 2009, Papadopoulou et al., 2010).

- Fingolimod (aktive RRMS)

Der erste oral verfügbare Wirkstoff war Fingolimod, der seit 2011 für die RRMS zugelassen ist. Dabei handelt es sich um eine Nachbildung des Naturstoffs Myriocin aus dem Pilz *Isaria sinclairii*. Dieser wirkt am Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor und hält dadurch die Lymphozyten in den peripheren Lymphknoten zurück. Somit wird die Anzahl der T-Zellen im Blut und die damit einhergehende Migration in das ZNS reduziert und dadurch eine immunsuppressive Wirkung erzielt. Dadurch steigt jedoch auch das Risiko für Infektionskrankheiten (Brinkmann, 2009, Brinkmann et al., 2010, Horga et al., 2010).

- Natalizumab (aktive RRMS)

Dieser humanisierte monoklonale Immunglobulin G4 (IgG4) -Antikörper zielt auf die α 4-Untereinheit des „Very Late Antigen-4“ (VLA-4) Integrin ab welches von T-Zellen exprimiert wird. Das Adhäsionsmolekül VLA-4 ermöglicht u.a. die Überwindung der BHS. Durch die Gabe von Natalizumab wird die Infiltration von T-Zellen in das ZNS verringert und die dortige Inflammation somit reduziert. Natalizumab wird als Langzeitmedikament eingesetzt, wenn β -Interferone und Glatirameracetat keine ausreichende Wirkung zeigen und darf nicht nach einer oder gleichzeitig mit einer anderen immunsuppressiv wirkenden Substanzen gegeben werden. Durch die Gabe von Natalizumab kann es zu einem erhöhten Risiko von Infektionserkrankungen sowie zu Übelkeit, Erbrechen und Kopfschmerzen kommen (Ransohoff, 2007, Horga and Tintore, 2011, Pucci et al., 2011).

- Alemtuzumab (aktive RRMS)

Dieser monoklonalen Antikörper ist das Oberflächenmolekül CD52 gerichtet, welches primär auf B- und T-Zellen exprimiert wird. Alemtuzumab ist für die Indikation der RRMS in der EU und der USA zugelassen. Klinische Studien legten eine bessere Wirkungsweise im Vergleich zu β -Interferonen nahe (Investigators et al., 2008). Dennoch muss die Verabreichung von Alemtuzumab kritisch gesehen werden, da es zu schweren Nebenwirkungen kommen kann. Neben leichten bis mittelschweren Nebenwirkungen sind Fälle von Panzytopenie, idiopathische thrombozytopenische Purpura sowie Autoimmunreaktionen gegen die Schilddrüse nach Gabe von Alemtuzumab bekannt (Coles et al., 1999, Hartung et al., 2015).

- Teriflunomid (moderate RRMS)

Durch die Gabe von Teriflunomid werden sich schnell teilende Zellen, wie Lymphozyten, durch die Hemmung der Pyrimidin-Synthese in den Mitochondrien im Wachstum gehindert. Durch die reduzierte Anzahl an Immunzellen kommt es zu einer Verringerung der Schubfrequenz und einer Verbesserung der Symptomatik. Neben der Dihydroorotat-Dehydrogenase kommt es zusätzlich zur Hemmung des Transkriptionsfaktors „Nuclear factor ‘kappa-light-chain-enhancer’ of activated B cells“ (NF-κB) sowie von Tyrosinkinase. Teriflunomid ist oral verfügbar und ist für die Therapie der RRMS zugelassen. Durch die Gabe kann es zu erhöhten Leberenzymwerten, Grippe, Durchfall und Haarausfall kommen (Gold and Wolinsky, 2011, Claussen and Korn, 2012).

Abseits der schubmodifizierenden Therapie gibt es verschiedene Behandlungsmöglichkeiten bei akuten MS-Schüben mit dem Ziel der bestmöglichen Eindämmung der akuten Inflammation. Eine anti-inflammatorische, immunsuppressive und anti-ödematöse Wirkung wird durch die Gabe von Glucocorticoiden (Methylprednisolon, Triamcinolon) in hochdosierter Form, oral oder intravenös, erreicht (Miller et al., 2000). Des Weiteren besteht die Möglichkeit einer Plasmapherese bei schlechtem Ansprechen auf die Glucocorticoidtherapie. Bei dieser Methode werden Immunglobuline, welche gegen Bestandteile des ZNS gerichtet sind, aus dem Blut der Patienten gefiltert um die Autoimmunität während akuten Schüben zu verringern.

Neben den direkt krankheitsmodifizierenden Therapieoptionen werden auch Symptome individuell behandelt um die Lebensqualität der Betroffenen bestmöglich zu verbessern. Die dabei eingesetzten Maßnahmen sind genauso vielfältig wie die von den Patienten gezeigten Symptome und schließen u.a. Physiotherapie, Schmerztherapie sowie psychologische Behandlungen mit ein.

1.1.1.3 Pathomechanismus der Multiplen Sklerose

Der exakte Mechanismus der MS ist noch ungeklärt, dennoch ist eine essenzielle Beteiligung des Immunsystems am Verlauf der Erkrankung gesichert. Die ausgelösten Entzündungsprozesse, die Demyelinisierung und die damit einhergehende axonale Schädigung sind Schlüsselbestandteile der Erkrankung und verantwortlich für die auftretenden klinischen Symptome (Noseworthy et al., 2000, Hemmer et al., 2002, Kieseier et al., 2005).

Als initialer Schritt des Pathomechanismus gilt die Aktivierung von T-Zellen durch Antigen-präsentierende Zellen (APZ), wie Dendritische Zellen (DC), Makrophagen oder B-Zellen, in der Peripherie (de Vos et al., 2002). Die aktivierten T-Zellen wandern anschließend über

Lymphknoten und Lunge in das ZNS. Die aktivierten T-Zellen können die BHS überwinden, in das ZNS vordringen und dort Selbstantigene, wie das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), welche durch Mikrogliazellen präsentiert werden, erkennen (Noseworthy et al., 2000). Durch die Interaktion mit den Mikrogliazellen kommt es zu einer weiteren Aktivierung der T-Zellen und zur erhöhten Ausschüttung von Zytokinen, wie Interferon- γ (IFN- γ), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder IL-2, sowie Metalloproteasen (Frohman et al., 2006, Neuhaus et al., 2006). Dies führt zur Schädigung der BHS und geht mit einer zunehmenden Integration von Immunzellen in das ZNS einher. Letztlich treibt all dies die Inflammation weiter voran. Im Zuge der Entzündungsreaktion kommt es zur Aktivierung von ZNS-ansässigen Zellen wie Mikrogliazellen und Astrozyten, welche gemeinsam mit den aus der Peripherie rekrutierten Immunzellen, wie B-Zellen, Monozyten bzw. Makrophagen sowie Neutrophilen, an der zunehmenden Schädigung der myelinhaltigen Markscheide sowie dem Verlust der Oligodendrozyten innerhalb des Gehirns und des Rückenmarks beteiligt sind. Die lokalen Entzündungsherde und die daraus folgende behinderte Signalweiterleitung an den Axonen sorgt für die von den Patienten gezeigten klinischen Symptome (Neuhaus et al., 2003). Gleichzeitig werden jedoch auch gegenläufige Mechanismen ausgelöst, welche die überschießende Immunantwort reduzieren und die Entzündung wieder auflösen. Dieser anti-inflammatorische Prozess wird in der Regel zeitversetzt aktiviert und sorgt für eine Abschwächung der Inflammation nach deren Höhepunkt. Die Bildung von anti-inflammatorischen Immunzellen, wie M2-Makrophagen, regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) und T_H2 -Zellen, wird durch Zytokine wie IL-10, IL-4 sowie „transforming growth factor- β “ (TGF- β) gefördert. Die Entzündungsauflösung kann vor allem in den frühen Krankheitsstadien eine stückweise Remyelinisierung der Axone auslösen und so die klinischen Symptome in der Remissionsphase wieder reduzieren (Moalem et al., 1999, Dendrou et al., 2015).

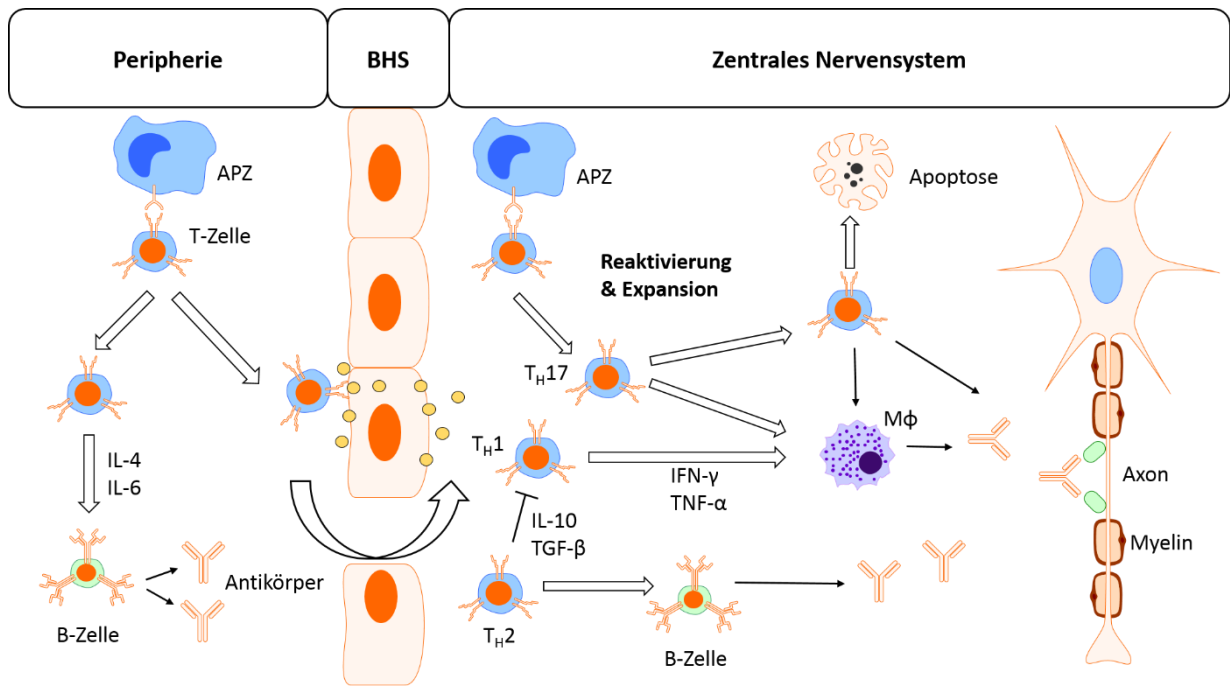


Abbildung 2: Pathomechanismus der Multiplen Sklerose. Autoreaktive T-Zellen überwinden nach der Interaktion mit Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) in der Peripherie die Blut-Hirn-Schranke (BHS) und infiltrieren das zentrale Nervensystem (ZNS). Dort kommt es erneut zur Interaktion mit APZ, welche Bestandteile der Myelinschicht präsentieren. Durch die Reaktivierung der T-Zellen kommt es zur Rekrutierung und Aktivierung von weiteren Immunzellen (Mikroglia, Makrophagen (Mφ), Astrozyten, B-Zellen, Neutrophile). Die Inflammation wird verstärkt, die Oligodendrozyten sterben ab, die Myelinschicht wird geschädigt und die Signalweiterleitung entlang der Axone eingeschränkt. Die reduzierte Signalweiterleitung geht einher mit neuronalen Fehlfunktionen und dem Auftreten von klinischen Symptomen. Abbildung modifiziert nach (Hartung et al., 2014).

1.1.1.4 Der Einfluss von T-Zellen & deren Zytokine

In der Entstehung und dem Voranschreiten der MS spielen vor allem die T-Zellen eine übergeordnete Rolle. Dabei muss genauestens zwischen den unterschiedlichen T-Zell-Subtypen unterschieden werden da sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Subtypen existieren. Während pro-inflammatorische T-Zellen die Entstehung der Entzündungsreaktion und die daraus resultierende Neurodegeneration vorantreiben, sind die anti-inflammatorischen T-Zellen an der Auflösung der Inflammation beteiligt. Die Einteilung der T-Zell-Subtypen erfolgt anhand der spezifischen Oberflächenmarkern sowie durch die primär sezernierten Zytokine. Die Differenzierung zu den unterschiedlichen Subtypen nimmt eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese zahlreicher Krankheiten, u.a. MS, ein. Deshalb ist es wichtig die unterschiedlichen Subtypen zu charakterisieren und gezielt zu beeinflussen.

Die Familie der T-Zellen wird zunächst anhand der Oberflächenmarker CD4 sowie CD8 unterschieden. Dabei stellt die Gruppe der CD8⁺-T-Zellen die Untergruppe der zytotoxischen T-Zellen, welche neben B-Zellen für die humorale Immunabwehr des adaptiven Immunsystems zuständig sind, dar. T-Helfer-Zellen sind dagegen CD4⁺ und sind für die

Regulation der adaptiven Immunität zuständig. Diese werden weitergehend unter anderem in T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} und T_{reg} untergliedert. T_{H1} -Zellen sezernieren primär pro-inflammatorische Zytokine wie IFN- γ und TNF- α . Die Regulation von T_{H1} -Zellen erfolgt über den Transkriptionsfaktor „T-box expressed in T cells“ (T-Bet) welcher die Bildung von IFN- γ kontrolliert. Bei akuten Schüben dominieren T_{H1} -Zellen und verschieben das Gleichgewicht der T-Zellen stark auf die pro-inflammatorische Seite. Es wird davon ausgegangen, dass vor allem T_{H1} -Zellen bei der Initialisierung der Entzündung im ZNS und bei der darauffolgenden Rekrutierung weiterer Immunzellen eine essenzielle Rolle spielen. Die Subgruppe der T_{H17} -Zellen sezerniert IL-17 und wird durch den Transkriptionsfaktor „RAR-related orphan receptor gamma-t“ (ROR- γ t) reguliert. IL-17 spielt eine wichtige Rolle bei der Initialisierung der Entzündung. Durch die Inhibierung von IL-17 durch neutralisierende Antikörper konnte eine verbesserte Symptomatik im murinen Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)-Modell erzielt werden (Langrish et al., 2005). IL-17 Knockout (KO) Mäuse zeigen zusätzlich ein stark verringertes Risiko im EAE-Modell zu erkranken (Nakae et al., 2003, Lees et al., 2008, O'Connor et al., 2008). T_{H2} -Zellen wirken dagegen überwiegend anti-inflammatorisch und produzieren entzündungsauflösende Zytokine wie IL-4, IL-10 sowie TGF- β . Die Regulation erfolgt hierbei über den Transkriptionsfaktor „GATA binding protein 3“ (GATA3). T_{reg} -Zellen sind sowohl $CD4^+$ als auch $CD25^+$ und werden über den Transkriptionsfaktor „forkhead-box-protein p3“ (Foxp3) reguliert. Weiterhin sind T_{reg} -Zellen bei der Immunhomöostase beteiligt (Fletcher et al., 2010) und sezernieren das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 (Zhang et al., 2002). Durch eine Aktivierung der T_{reg} -Zellen kann eine Unterdrückung der Inflammation bewirkt und die Symptomatik bei MS-Patienten verbessert werden. Dieser Wirkmechanismus wird u.a. durch das MS-Medikament Glatirameracetat ausgenutzt (Fletcher et al., 2010, Spadaro et al., 2017).

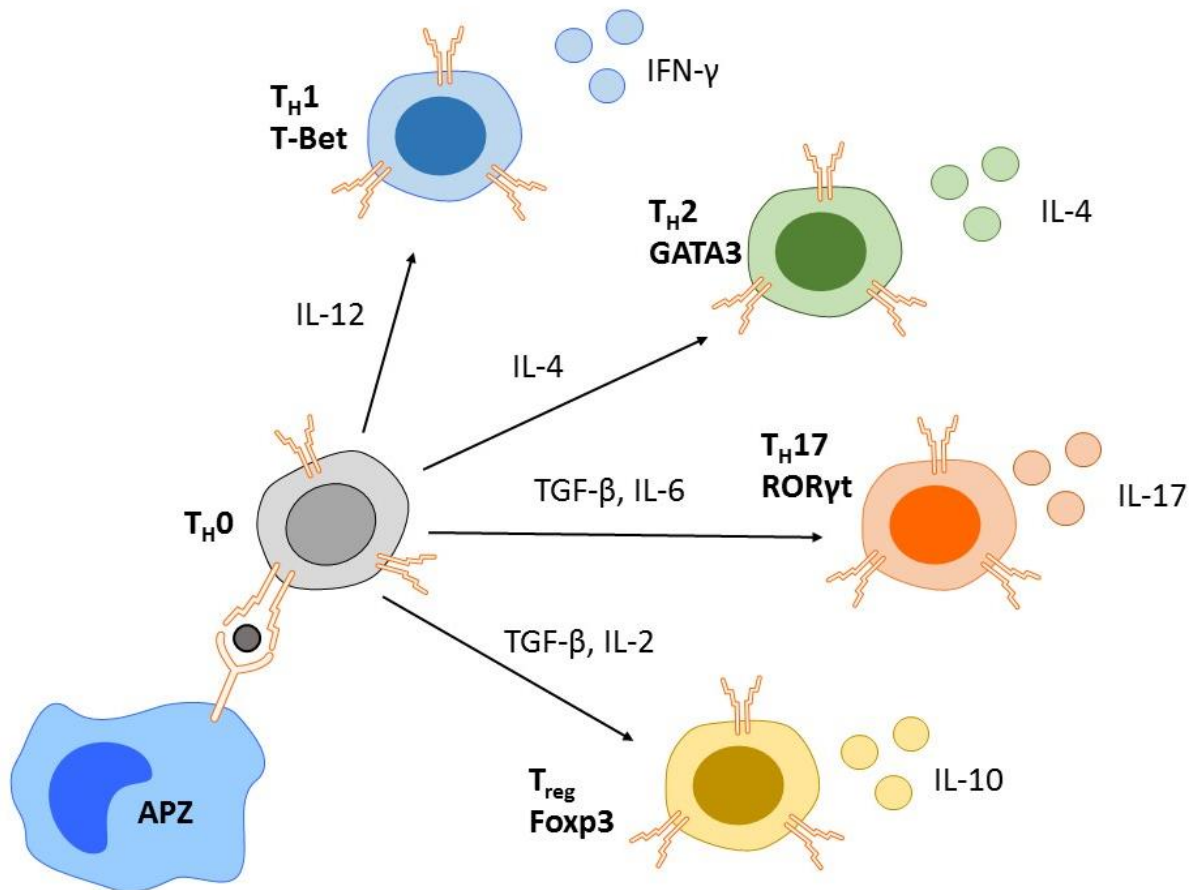


Abbildung 3: Regulation der TH-Zelldifferenzierung. TH0-Zellen können in Abhängigkeit von den, während des Primings anwesenden, Interleukinen (IL) und den Wechselwirkungen mit Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) in verschiedene Subtypen differenzieren. Diese sind durch spezifische Transkriptionsfaktoren (T-Bet, GATA-3, ROR-γt, Foxp3) charakterisiert und sezernieren pro- oder anti-inflammatorische Zytokine. Abbildung modifiziert nach (Russ et al., 2013).

1.1.2 Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Um die Pathogenese der MS genauer zu erforschen werden verschiedene Tiermodelle verwendet. Die Wahl des jeweiligen Modells ist dabei abhängig von den zu erforschenden Parametern und dem erhofften Erkenntnisgewinn. Der Prozess der Demyelinisierung kann unter anderem mit dem Modell der EAE abgebildet werden, welches das am häufigsten verwendete Modell darstellt (Raddatz et al., 2014) und in Mäusen, Ratten, Meerschweinchen oder nicht-humanen Primaten durchgeführt werden kann (Haanstra et al., 2013, Simmons et al., 2013). Üblicherweise werden spezifische Mauslinien verwendet um die Effekte von z.B. Gen-KOs auf den Krankheitsverlauf im EAE-Modell zu untersuchen. Die Autoimmunität wird in diesen Tieren durch die Injektion eines Gemischs mit folgenden Komponenten erreicht: Hauptbestandteil sind Fragmente eines Myelinproteins bzw. komplette Myelinproteine. Diese dienen als Antigenen und lösen die Autoimmunität aus (Robinson et al. 2014). Gelöst sind diese Proteine in kompletten Freund-Adjuvans (CFA), welches wiederum aus Paraffinöl,

hitzeinaktivierten Mykobakterien und Arlacel A besteht. Diese Komponenten dienen ebenfalls zur Aktivierung des Immunsystems. Zusätzlich wird den Tieren intraperitoneal (i.p.) Pertussis-Toxin (PTX) injiziert. Dieses schädigt die BHS, vereinfacht so die Migration der Immunzellen in das ZNS und beschleunigt damit den Krankheitsverlauf (Kugler et al., 2007). Innerhalb des EAE-Modells existieren verschiedene Subtypen, welche sich durch den Tierstamm und das verwendete Antigen unterscheiden. Um einen schubförmig-remittierenden Verlauf auszulösen werden vorrangig SJL-Mäuse und ein Peptid des Myelin-Proteolipid-Proteins (PLP) verwendet. Für einen chronisch-progredienten Verlauf werden üblicherweise C57BL/6-Mäuse mit dem Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG)₃₅₋₅₅ als Antigen genutzt (t Hart et al., 2011, Baker and Amor, 2015). Je nach verwendetem Versuchsaufbau kommt es ca. 2-3 Wochen nach Induktion zur Ausprägung von klinischen Symptomen (t Hart, Gran et al. 2011). Anhand der gezeigten Symptome können den Tieren klinische Scores zugeordnet werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Einteilung der klinischen EAE-Scores. Anhand der gezeigten Krankheitssymptome kann der Krankheitsverlauf quantifiziert werden.

Score 0	Keine Symptome
Score 0,5	Distale Paralyse des Schwanzes
Score 1	Komplette Paralyse des Schwanzes
Score 1,5	Schwanzparalyse und beginnende Parese der Hinterbeine
Score 2	Schwanzparalyse und deutlich Parese der Hinterbeine
Score 2,5	Schwanzparalyse und Paralyse eines Hinterbeins
Score 3	Schwanzparalyse und Paralyse beider Hinterbeine
Score 3,5	Schwanzparalyse, Paralyse beider Hinterbeine und Parese der Vorderbeine

Die im EAE-Modell ausgelöste demyelinisierende Erkrankung ähnelt der humanen MS in bestimmten Aspekten und einige Therapieansätze konnten erfolgreich vom Tiermodell in den Menschen übertragen werden. Dazu gehören die Medikamente Glatirameracetat, Mitoxantron, Fingolimod und Natalizumab (Steinman and Zamvil, 2006). Trotz dieser Erfolge existieren einige Unterschiede zwischen den beiden Erkrankungen und den zugrundeliegenden molekularen Prozessen (Lassmann and van Horssen, 2011). Einige im Tiermodell vielversprechende Substanzen konnten nicht erfolgreich in den Menschen übertragen werden. Dazu gehören TNF- α Blocker (Taoufik et al., 2008), Gamma-Interferone (Panitch et al., 1987) sowie die Blockade des T_H1/T_H17-Signalwegs (Segal et al., 2008). Grund für das Scheitern dieser Ansätze ist die unzureichende Möglichkeit einer vollständigen Darstellung der

hochkomplexen Erkrankung in einem einzigen Tiermodell. Die große Heterogenität der MS-Patienten ist nicht durch die Verwendung von definierten Mauslinien abzubilden. Des Weiteren entwickelt sich die Erkrankung im Menschen über mehrere Jahre und das Immunsystem steht dabei in ständiger Wechselwirkung mit der Umwelt. Zusätzlich bestehen einige grundlegende Unterschiede zwischen der Modellkrankheit und der humanen MS. Beispielsweise kommt es im EAE-Modell primär zur Demyelinisierung und Inflammation im Rückenmark, während diese Prozesse beim Menschen vorrangig im Gehirn stattfinden. Auch die Infiltration des ZNS durch die Immunzellen ist im EAE-Modell stärker ausgeprägt und erfolgt deutlich schneller als im humanen Krankheitsverlauf (Behan and Chaudhuri, 2014). Dennoch helfen die im EAE- oder anderen Tiermodellen erlangten Erkenntnisse die komplexe Erkrankung besser zu verstehen und ebnen den Weg für die Entwicklung neuer Therapieansätze (Baker and Amor, 2015).

1.1.3 Der Naturstoff Phytol

Bei der Suche nach neuen Wirkstoffen für die Therapie von entzündlichen Krankheiten werden u.a. verzweigte Fettsäuren und deren Metabolite untersucht. Dazu gehört auch der azyklische Diterpenalkohol Phytol, welcher in veresterter Form als Seitenkette des Chlorophyll-Moleküls in Pflanzen vorkommt (Santos et al., 2013). In dieser natürlich vorliegenden Form ist der menschliche Stoffwechsel jedoch nicht in der Lage Phytol vom Chlorophyll abzuspalten und zu verstoffwechseln (Hansen 1966). Jedoch kann Phytol über gewisse Nahrungsmittel (rotes Fleisch, Milchprodukte) aufgenommen werden. Bisher werden Phytol anti-inflammatorische und protektive Eigenschaften zugeschrieben, welche u.a. durch die Hemmung der Neutrophilenmigration und der Verstärkung der reaktiven Sauerstoff (ROS)-Produktion vermittelt werden können (Silva et al., 2014). Des Weiteren kommt es durch die prophylaktische sowie die therapeutische Gabe von Phytol im murinen Tiermodell der rheumatoiden Arthritis (RA) zur Verbesserung des Krankheitsverlaufs. Da es außerdem zu einer erhöhten ROS-Produktion kommt, wird vermutet, dass Phytol Vertreter der Nicotinamid-Adenine-Dinucleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidasen (NOX) Familie aktivieren kann und dadurch möglicherweise eine anti-inflammatorische Wirkung entfaltet (Olofsson et al., 2003, Hultqvist et al., 2006). Die positiven Effekte im Model der RA machen Phytol zu einer interessanten Zielstruktur für weitere entzündliche Erkrankungen wie MS (Silva et al., 2014). Bei der Verstoffwechslung von Phytol entstehen die beiden gesättigten Fettsäuren Phytan- ($C_{20}H_{40}O_2$) sowie Pristansäure ($C_{19}H_{38}O_2$). Phytansäure wird über den Weg der α -Oxidation zu Pristansäure umgewandelt, welche wiederum über die β -Oxidation weiter abgebaut wird. Defekte im Abbau der Fettsäuren führen zu einer Akkumulation dieser und zu schwerwiegenden Folgen. Beispielsweise konnte eine Beteiligung beider Säuren bei der α -Methylacyl-CoA-Racemase (AMACR) Defizienz festgestellt werden (Kruska and Reiser,

2011). Pristan, das Alkan der Pristansäure, wird des Weiteren zur Initialisierung der RA in verschiedenen Tiermodellen verwendet (Hultqvist et al., 2006).

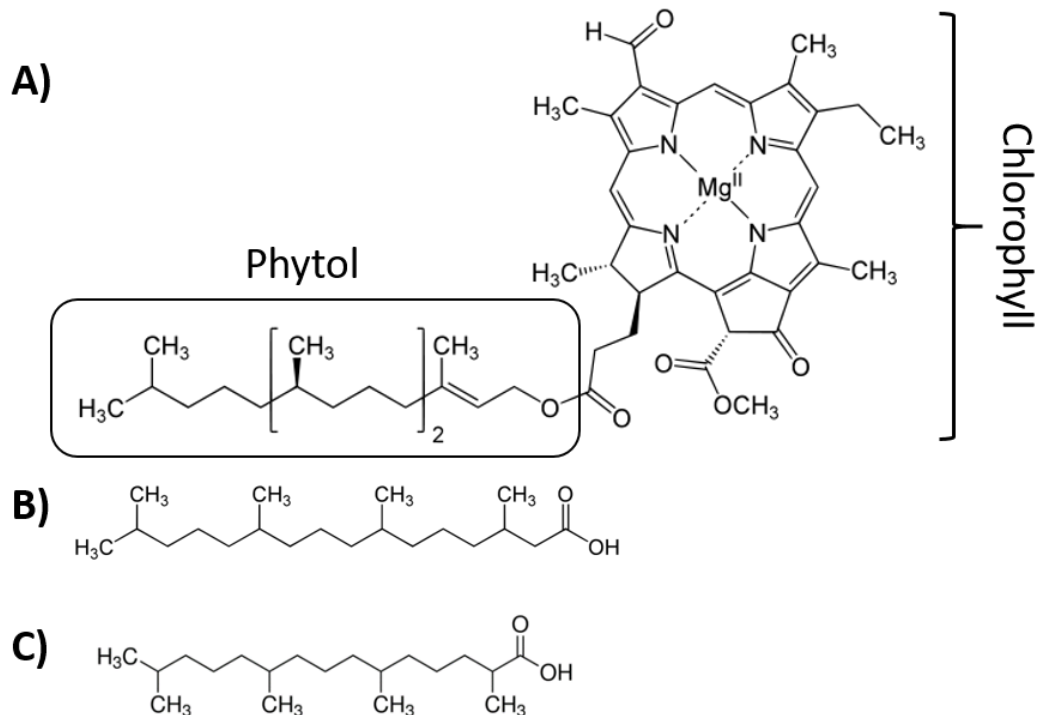


Abbildung 4: Der azyklische Diterpenalkohol Phytol und seine Metaboliten. A) Phytol kommt in natürlicher Form als veresterte Seitenkette des pflanzlichen Chlorophylls mit einer trans-konfigurierten Doppelbindung zwischen C_2 und C_3 vor. B/C) Die Metaboliten des Phytol sind Phytan- (B) sowie Pristansäure (C), welche über die Stoffwechselwege der α - sowie β -Oxidation abgebaut werden. Abbildung modifiziert nach (van den Brink and Wanders, 2006).

1.1.4 NADPH-Oxidasen und ROS

Die Familie der NADPH-Oxidasen umfasst in Säugetieren 7 Transmembranproteine, welche durch die Produktion von ROS gekennzeichnet sind. Dabei wird Sauerstoff zu Superoxid, unter der Verwendung von NADPH als Elektronendonator sowie Sauerstoff als Elektronenakzeptor, reduziert.

Die NOX-Familie beinhaltet die Mitglieder NOX1 bis NOX5 sowie „dual oxidase 1“ (DUOX1) und DUOX2 (Bedard and Krause, 2007). In den meisten Säugern konnten alle 7 Isoformen nachgewiesen werden. Die Expression der Familienmitglieder ist gewebespezifisch und auch deren Aktivierungsmechanismen sind unterschiedlich ausgeprägt. NOX1 bis NOX3 rekrutieren für die Aktivierung zytosolische Faktoren an den Proteinkomplex und aktivieren diesen dadurch. NOX4 ist durch eine konstante Aktivität charakterisiert und NOX5 sowie DUOX1 und DUOX2 sind vom intrazellulären Calcium-Level abhängig (Leto et al., 2009, Nayernia et al., 2014). Durch die Aktivierung der Enzyme der NOX-Familie kommt es zur Bildung von ROS. Das primäre Produkt ist dabei O_2^- , jedoch bilden einige Isoformen (NOX4, DUOX1, DUOX2)

vermehrt H_2O_2 , welches jedoch aus O_2^- gebildet werden kann (Nayernia et al., 2014). Die physiologische Rolle von ROS ist vielseitig und muss je nach Wirkungsort differenziert bewertet werden. Durch die Interaktion mit anderen Molekülen beliebiger Größe (von Stickstoffmonoxid (NO) bis hin zu DNA, Proteinen und Lipiden) können ROS zur Modifizierung dieser Strukturen führen. Dabei kommt es oft zu Schädigung und Beeinträchtigung der eigentlichen Funktionen. Die ursprüngliche Hypothese, dass ROS eine rein schädigende Wirkung besitzen, wurde dadurch bekräftigt, dass verschiedene ROS-Abwehrmechanismen entdeckt wurden. Es existieren Enzyme zum Abbau von ROS (Superoxiddismutase, Katalase) oder zum Abfangen freier ROS (Vitamin C und E). Dagegen spricht die Entdeckung, dass es im Menschen auch zur kontrollierten Bildung von ROS, z.B. durch Vertreter der NOX-Familie, kommt und die somit gebildeten ROS eine wichtige Rolle in zahlreichen physiologischen Prozessen einnehmen (Petry et al., 2010, Sies, 2017). Beispielsweise können ROS eine überschießende Immunantwort bei Autoimmunerkrankheiten durch die Inaktivierung von Makrophagen und T-Zellen reduzieren und so die Inflammation eindämmen (Holmdahl et al., 2013). Eine unkontrollierte Bildung von ROS wirkt jedoch oft pro-inflammatorisch und wird als oxidativer Stress bezeichnet. Dagegen wird die kontrollierte Bildung mit folgender Modulation verschiedener Signalwege und Zelltypen als Redox-Regulation betitelt (Nayernia et al., 2014). Die genaue Regulation des ROS-Vorkommens ist besonders im ZNS von übergeordneter Bedeutung. Grund dafür ist der hohe Sauerstoffverbrauch im Gehirn sowie die hohe Sensitivität von Oligodendrozyten und Neuronen gegenüber ROS (Lassmann and van Horssen, 2011, Nayernia et al., 2014).

1.1.5 Die NADPH-Oxidase 2

Erstmal 1976 identifiziert (Segal and Peters, 1976) nimmt NOX2 innerhalb der Familie der NADPH-Oxidasen eine besondere Rolle ein. NOX2 wird hauptsächlich in Phagozyten exprimiert und ist eine entscheidende Komponente bei dem Prozess des oxidativen Bursts, ein Vorgang durch welchen neutrophile Granulozyten sowie Makrophagen große Mengen an ROS produzieren und freisetzen um zuvor aufgenommene Pathogene zu eliminieren. Die Phagozytose stellt eine essenzielle Komponente des angeborenen Immunsystems dar. Folglich führt ein Funktionsverlust von NOX2 zu einer eingeschränkten Immunabwehr und zum Krankheitsbild der chronischen Granulomatose (CGD) (Holland, 2010, O'Neill et al., 2015). Durch den Funktionsverlust des oxidativen Bursts besitzen die Patienten eine stark eingeschränkte Immunabwehr. Dies zeigt sich in einer erhöhten Infektionsanfälligkeit gegenüber Bakterien und Pilzen und daraus resultierender Granulome an inneren Organen sowie der Haut (Kuhns et al., 2010). Des Weiteren zeigen CGD-Patienten leicht verringerte kognitive Fähigkeiten (Cole et al., 2013). Untersuchungen in Mäusen zeigten eine verringerte

Lernfähigkeit, verringerte Angst und gesteigerte Lokomotion durch einen NOX2KO (Walton et al., 2013). Die Ursache für den Funktionsverlust liegt in den meisten Fällen (ca. 70 %) an einer Mutation des gp91^{phox} Gens welches sich auf dem X-Chromosom befindet. Im Ruhezustand befinden sich die Komponenten der NOX2 hauptsächlich in intrazellulären Vesikeln im Zytoplasma. Bei Aktivierung kommt es zu einem Transfer der Vesikel hin zur Plasmamembran und der Phagosomen wo sich die membrangebundenen Komponenten der NOX2 befinden (Nayernia et al., 2014). Der Proteinkomplex setzt sich zusammen aus den im Zytosol lokalisierten regulatorischen Elementen „neutrophil cytosol factor 1“ (Ncf1) /p47^{phox}, Ncf2/p67^{phox}, Ncf4/p40^{phox}, den Rac-Proteinen und dem in der Zellmembran vorhandenen Flavozytochrom b558. Dieses ist wiederum aus den Untereinheiten NOX2/gp91^{phox} sowie Cyba/p22^{phox} zusammengesetzt (Hultqvist et al., 2015). Die Bindestelle für NADPH sowie die katalytische Einheit befinden sich an der gp91^{phox}-Untereinheit. P22^{phox} stabilisiert den Komplex und stellt die Verbindung zur regulatorischen Untereinheit Ncf1/p47^{phox} her.

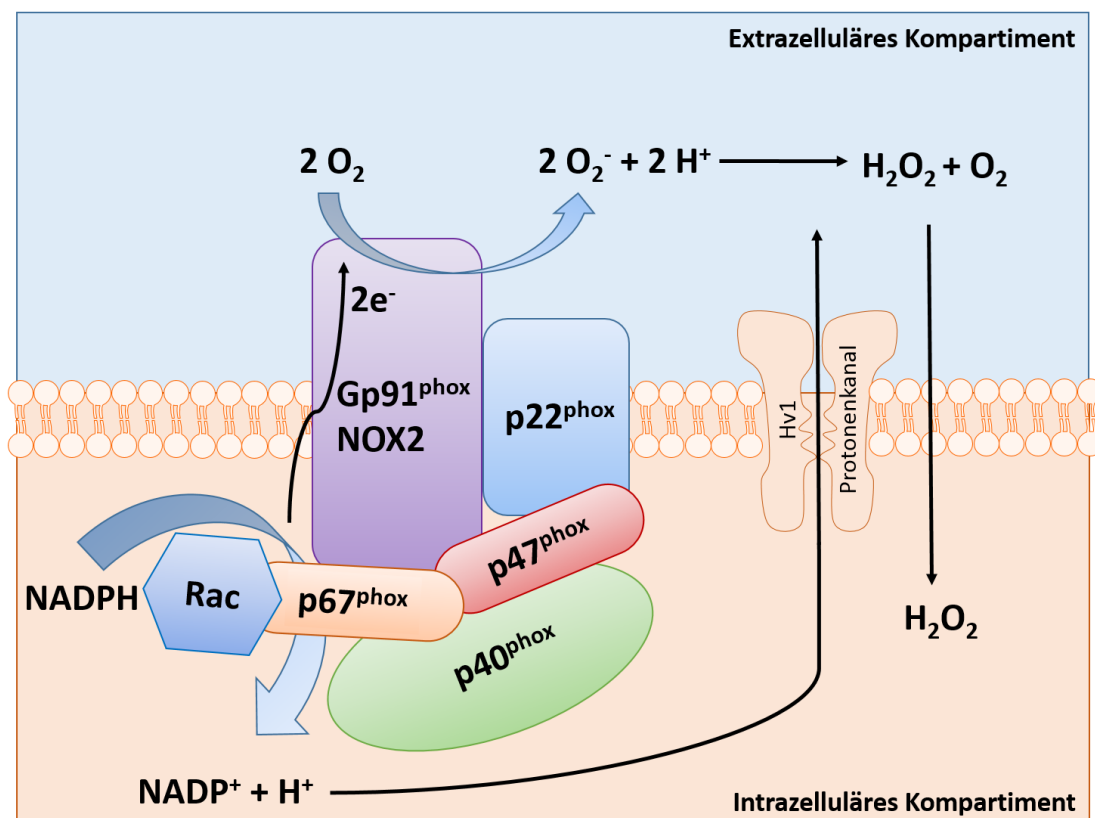


Abbildung 5: Schematischer Aufbau des NOX2-Komplexes. Im intrazellulären Kompartiment werden Elektronen von NADPH durch die katalytische Untereinheit gp91^{phox} auf den extrazellulär vorliegenden Sauerstoff transportiert. Dadurch kommt es zur Bildung von Superoxidanionen (O_2^-). Für die Verankerung des NOX2-Komplexes an der Membran ist die Untereinheit p22^{phox} zuständig. Die Regulation der Aktivität erfolgt durch die zytosolischen Faktoren p67^{phox}, p47^{phox} sowie Rac. Der Kanal Hv1 dient zum Ladungsausgleich durch den Protonentransport vom Zellinneren in das extrazelluläre Kompartiment. Abbildung angelehnt an (Cachat et al., 2015).

1.1.6 Der Einfluss von Phytol auf das EAE-Model und NOX2

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist es die Auswirkungen von Phytol im murinen EAE-Model sowie die Beteiligung von NOX2 weiter zu charakterisieren. Die durchgeführten Experimente bauen dabei auf den Arbeiten von Dr. Nadja Tafferner, Ilknur Spring sowie der vorangegangenen Masterarbeit auf.

In EAE-Versuchen zeigten C57BL/6N-Mäuse mit Phytol-Futter signifikant weniger klinische Symptome als Mäuse mit Standard-Futter. Die Gabe von Phytol startete dabei ab dem Zeitpunkt der EAE-Induktion. In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die prophylaktische Gabe von Phytol eine Woche vor EAE-Induktion sowie die therapeutische Gabe ab dem ersten Auftreten von Symptomen ebenfalls die klinischen Symptome verringerte (Tafferner, 2016, Blum et al., 2018b).

Des Weiteren reduzierte Phytol die Proliferationsfähigkeit von isolierten Splenozyten aus EAE-Tieren im Vergleich zu EAE-Tieren mit Standard-Fütterung nach 48 h Restimulation (Blum et al., 2018b).

Untersuchungen eines möglichen Wirkmechanismus von Phytol durch Hultqvist et al. zeigten eine mögliche anti-inflammatorische Wirkung von Phytol über eine verstärkte Aktivierung von NOX2 in Modellen der RA (Hultqvist et al., 2006). Im murinen EAE-Model konnte eine 3-fach gesteigerte mRNA-Expression von NOX2 in den inguinalen Lymphknoten (LK) nachgewiesen werden. Im lumbalen Rückenmark (RML) reduzierte die Gabe von Phytol wiederum die NOX2 mRNA-Expression um den Faktor 20 (Blum et al., 2018b). In immunhistologischen Untersuchungen konnte NOX2 in CD4⁺-Zellen (T-Zellen), nicht jedoch in CD20⁺-Zellen (B-Zellen) nachgewiesen werden (Blum et al., 2018b).

1.2 Potential der humanen Immunmodulation durch antimikrobielle Substanzen

Im 2. Teil der vorliegenden Arbeit wird das Potential einer humanen Immunmodulation von 2 neuartigen antimikrobielle Wirkstoffen untersucht, da die steigende Anzahl an multiresistenten Erregern gegen etablierte Therapeutika ein wachsendes Problem für die weltweite Gesundheitsversorgung darstellt.

Um diesem Problem zu begegnen, werden nicht nur neue Wirkstoffe mit vielversprechenden direkten Wirkmechanismen benötigt, sondern auch alternative Therapieansätze benötigt. Die Möglichkeit das humane Immunsystem gezielt zu modulieren stellt einen vielversprechenden Ansatz für zukünftige Therapien dar (Parnham, 2011). Durch eine gezielte Aktivierung des Immunsystems (Immunstimulation) können die direkten anti-pathogenen Wirkungen weiter verstärkt werden, während durch eine gezielte Hemmung des Immunsystems (Immunsuppression) chronische Entzündungen eingedämmt und Gewebeschäden minimiert werden können. Es konnte bereits gezeigt werden, dass einige Antibiotika diverse immunmodulierende Eigenschaften besitzen (siehe 1.2.3) (Parnham, 2005). Dadurch kann die Abwehr der Pathogene durch das aktivierte Immunsystem verstärkt werden, auch wenn die Pathogene Resistenzen gegenüber dem direkten Wirkungsmechanismus der Antibiotika aufweisen (Handel et al., 2009).

Um die immunmodulatorischen Eigenschaften neuer Wirkstoffe gezielt nutzen zu können, müssen diese in der Entwicklung untersucht und charakterisiert werden. Dadurch können frühzeitige Erkenntnisse zum Risiko der Resistenzentwicklung gewonnen und Aussagen zur Verträglichkeit, Verfügbarkeit und Effektivität getroffen werden. Das Potential der Immunmodulation kann das Spektrum der möglichen Indikationen von Therapeutika als pro- oder anti-inflammatorischer Modulator erweitern (Parnham, 2005). Um die möglichen immunmodulatorischen Eigenschaften neuer Wirkstoffe bewerten zu können, müssen die komplexen Prozesse der Entzündungsreaktionen untersucht werden. Diese begleiten die Mehrheit der infektiösen Erkrankungen, unabhängig ob diese durch Bakterien, Viren oder Parasiten ausgelöst werden (Godkin and Smith, 2017). Der Entzündungsprozess beinhaltet die Akkumulation unterschiedlicher Immunzellen, wie Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen sowie Granulozyten, am Ort der Entzündung. In einem Zusammenspiel mit den ansässigen Zellen aus dem Gewebe setzen die eingewanderten Immunzellen eine Vielzahl unterschiedlicher Enzyme, Zytokine, Chemokine und Lipidmediatoren frei. Dies führt zur Abwehr der infiltrierenden Pathogene aber auch zur Schädigung des umliegenden Gewebes. Um diese Gewebeschädigungen auf einem minimalen Niveau zu halten, ist ein exaktes Timing der Entzündungsauflösung notwendig (Robb et al., 2016, Abdulkhaleq et al., 2018).

1.2.1 Die Rolle der Makrophagen bei der humanen Immunantwort

Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle sowohl bei der Initiation als auch bei der Auflösung der Entzündungsreaktion und stellen ein Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität dar (Mosser and Edwards, 2008, Gilroy and De Maeyer, 2015). In den frühen Phasen der immunologischen Abwehr der Pathogen wandern Makrophagen zum Ort der Inflammation und verstärken diese lokal. Des Weiteren sezernieren Makrophagen Zytokine wie IL-1 β , IFN- γ , IL-23, TNF- α sowie Chemokine wie „CC-chemokine ligand 2“ (CCL2), „C-X-C motif chemokine 10“ (CXCL10) und IL-8, welches auch CXCL8 genannt wird (Atri et al., 2018). Dadurch werden weitere Makrophagen sowie Lymphozyten aktiviert. Im Zuge dieser Aktivierung werden Integrine wie beispielsweise der Oberflächenmarker CD54 hochreguliert, welches zu einer verstärkten Bindung der Immunzellen an das Endothel und damit zu einer gesteigerten Infiltration in das entzündete Gewebe führt. Makrophagen sowie Dendritische Zellen exprimieren Rezeptoren wie CD206 und CD209 um spezifische Zielstrukturen, wie beispielsweise Kohlenhydrate, auf eingewanderten Pathogenen zu erkennen und diese mittels Phagozytose aufzunehmen (Gazi and Martinez-Pomares, 2009, Mason and Tarr, 2015). Im Zuge der Phagozytose präsentieren Makrophagen Peptide der aufgenommenen Pathogene mit Hilfe des Oberflächenrezeptors „human leukocyte antigen – DR isotype“ (HLA-DR). Dadurch werden T-Zellen aktiviert und die adaptive Immunantwort initiiert. Bestimmte Subtypen der Makrophagen (M2-Makrophagen) sind auch bei der Entzündungsauflösung beteiligt. Dabei sezernieren diese Wachstumsfaktoren und Zytokine wie IL-10 und IL-4, welche den Prozess der Gewebeheilung und der Remodellierung unterstützen (Savill, 2000). Weiterhin werden Chemokine wie CCL17 und CCL18 sezerniert, welche anti-inflammatorische T_H2- und T_{reg}-Zellen rekrutieren (Solarì and Pease, 2015, Atri et al., 2018, Chenivesse and Tscopoulos, 2018).

Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der Makrophagen werden diese in der Regel in 2 Subtypen unterteilt: Die überwiegend pro-inflammatorischen M1-Makrophagen sowie die überwiegend anti-inflammatorischen bzw. resolutionsfördernden M2-Makrophagen, welche sich weiter in M2a, M2b sowie M2c-Makrophagen einteilen lassen (Gordon, 2007). Die Einteilung erfolgt dabei anhand spezifischer Oberflächenmarker sowie sezernierter Zytokine (siehe Tabelle 2) (Martinez and Gordon, 2014, Murray et al., 2014, Zizzo and Cohen, 2015, Spiller et al., 2016). Die Subtypen M2a sowie M2c sind dabei besser untersucht als der Subtyp M2b.

Tabelle 2: Einteilung humaner Makrophagen-Subtypen. Die Einteilung erfolgt anhand der Aktivierung, der spezifischen Oberflächenmarker, der sezernierten Zytokine sowie der ausgeübten Funktionen. Tabelle modifiziert nach (Duluc et al., 2007, Heusinkveld and van der Burg, 2011, Arango Duque and Descoteaux, 2014, Roszer, 2015). GM-CSF = Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor, IC = „immune complex“, LPS = Lipopolysaccharide, Ra = Rezeptorantagonist, TLR = „toll-like receptor“

	M1-Makrophagen	M2-Makrophagen		
		M2a	M2b	M2c
Aktivierung	IFN- γ TNF- α LPS GM-CSF	IL-4 IL-13	LPS ICs IL-1Ra	IL-10 TGF- β
Oberflächenmarker	CD80, CD86, HLA-DR	CD163	CD86	CD163, TLR1, TLR8
Zytokine	TNF, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23	IL-10, TGF- β , IL-1Ra	TNF, IL-1 β , IL-6, IL10	IL-10, TGF- β
Chemokine	CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL9, CCL10, CCL11	CCL17, CCL22, CCL24	CCL1	
Funktionen	Phagozytose von Pathogenen Induzieren T _H 1- Immunantwort Tumorsuppression	Immunregulation und -suppression Aufnahme apoptotischer Zellen und Zelltrümmer Gewebeheilung und Remodellierung		

Einige Studien betrachten die M1- sowie M2-Subtypen der Makrophagen als phänotypisch getrennte Subpopulation (Auffray et al., 2007, Nahrendorf et al., 2007, Yang et al., 2014), während andere Untersuchungen zeigten, dass Makrophagen ihren Phänotyp in Abhängigkeit der Stimulation aus der Umgebung wechseln können (Gratchev et al., 2006, Mylonas et al., 2009, Jaguin et al., 2013, Crane et al., 2014, Italiani et al., 2014, Tedesco et al., 2015). Die Hypothese dieser M1-M2-Transition ist heute weitestgehend anerkannt auch wenn der Mechanismus, welcher die Regulation der Phänotypen kontrolliert, noch nicht vollständig untersucht ist.

Eine Dysregulation zwischen den Makrophagen-Subtypen ist bei einigen chronischen Entzündungen sowie entzündungsbasierten Erkrankungen wie der RA (Laria et al., 2016), der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (Punturieri et al., 2000, Frankenberger et al., 2011) sowie Sepsis (Cavaillon et al., 2005, Watanabe et al., 2016) ausschlaggebend (Murray and Wynn, 2011). Weiterhin beeinflussen einige Pathogene gezielt das Verhältnis von M1- und M2-Makrophagen zugunsten der anti-inflammatorischen bzw. resolutionsfördernden M2-Makrophagen um dem Immunsystem zu entgehen (Ren et al., 2017).

1.2.2 Die Rolle der Dendritischen Zellen bei der humanen Immunantwort

Neben Makrophagen spielen Dendritische Zellen eine entscheidende Rolle im Entzündungsprozess. Diese im Knochenmark gebildeten Zellen sind im Blutkreislauf, im Gewebe sowie in den lymphoiden Organen (z.B. Milz und Lymphknoten) zu finden. Dabei ist die Anzahl der Dendritischen Zellen in Geweben mit einer hohen Antigendichte, wie beispielsweise der Haut, erhöht. Dort werden Dendritische Zellen auch als Langerhans-Zellen bezeichnet (Banchereau and Steinman, 1998). Im peripheren Blut liegt der Anteil der Dendritischen Zellen innerhalb der mononukleären Zellen („peripheral blood mononuclear cell“, PBMC) bei 0,1 bis 1 % (Reid, 1997).

Durch ihre Funktionen werden Dendritische Zellen, ähnlich wie Makrophagen, als ein Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität angesehen, da sie Funktionen in beiden Bereichen des humanen Immunsystems innehaben. Kernaufgabe der Dendritischen Zellen ist die Prozessierung sowie die Präsentation von aufgenommenen Antigenen (Banchereau and Steinman, 1998). Damit unterscheiden sich Dendritische Zellen von Makrophagen, deren Hauptaufgabe die Phagozytose von Pathogenen ist. Dendritische Zellen nehmen durch Phagozytose und Pinozytose Vesikel sowie Antigene aus der Umgebung auf und prozessieren diese innerhalb von lysosomalen Kompartimenten. Anschließend werden die Peptidfragmente auf der Oberfläche der Dendritischen Zellen über MHC-Klasse-I- sowie MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiert (Sato and Fujita, 2007). Dadurch aktivieren Dendritische Zellen vor allem T-Zellen und initiieren somit die adaptive Immunantwort.

Im unreifen Zellstadium exprimieren Dendritische Zellen wenige solcher MHC-Moleküle. Erst nach Aktivierung bzw. Reifung, durch exogene oder endogene Stimuli (z.B. über spezifische Oberflächenstrukturen auf Pathogenen) (Reis e Sousa, 2004), inflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-6, IL-1 β), Chemokine und entzündlicher Mediatoren (Prostaglandin E2 (PGE2)), wird die Expression von MHC- sowie weiterer Kostimulatorischer-Moleküle (z.B. CD86, CD80, CD40, CD4, CD1a, CD11c, HLA-DR) gesteigert (Stockwin et al., 2000, Schmidt et al., 2012). Des Weiteren wird durch die Aktivierung die Sezernierung zahlreicher Chemo- und Zytokine durch die Dendritischen Zellen erhöht (z.B. IL-23, IL-10, IL-8, IL-6, IL-1 β) (Stockwin et al., 2000,

Blanco et al., 2008). Dadurch haben Dendritische Zellen einen Einfluss auf das Verhältnis von pro- sowie anti-inflammatorischen Zytokinen am Ort der Entzündung. Durch die Regulation der Antigenpräsentation beeinflussen Dendritische Zellen maßgeblich die Intensität der antigen-spezifischen T-Zell-Reaktionen und damit auch die Intensität der dadurch vermittelten Entzündungsreaktion.

Die Klassifizierung von humanen Dendritischen Zellen erfolgt anhand von spezifischen Oberflächenmarkern sowie der Expression von Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise „Interferon regulatory factor 4“ (IRF4) oder IRF8 (Collin and Bigley, 2018): Bei der Unterteilung der humanen Dendritischen Zellen werden plasmazytoide Dendritische Zellen (pDC), welche von lymphoiden Vorläuferzellen abstammen, sowie konventionelle myeloide Dendritischen Zellen (MoDC) unterschieden (Sato and Fujita, 2007). MoDC bilden sich aus Monozyten und weisen den Oberflächenmarker CD11c auf während pDC diesen Marker nicht besitzen (Collin et al., 2013). MoDC verfügen über ein breites Spektrum an Funktionen wie unter anderem die Aktivierung von Lymphozyten sowie die Sezernierung von Zytokinen wie IL-6, TNF- α , IL-12, IL-23 und IL-1 (Collin and Bigley, 2018).

MoDC können *in vitro* durch die Kultivierung von CD14⁺-Monozyten mit dem Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (GM-CSF) sowie IL-4 differenziert werden (Inaba et al., 1992, Sallusto and Lanzavecchia, 1994, Auffray et al., 2009).

1.2.3 Immunmodulierende Wirkstoffe

Zahlreiche etablierte Therapeutika verfügen über unterschiedliche immunmodulierende Eigenschaften, welche zur Optimierung der Therapie genutzt werden können. Das zugelassene Antibiotika Azithromycin gehört zur Gruppe der Makrolide und weist verschiedene immunmodulierende Eigenschaften auf. Zunächst steigert Azithromycin kurzfristig die Zytokin- und ROS-Produktion von Leukozyten. Dieser Effekt bleibt jedoch nur bis zu ca. 24 h nach Gabe erhalten. Dadurch wird die Immunantwort zunächst verstärkt, was zu einer verbesserten Elimination der Pathogene führt. Etwa 2-3 Tagen nach der Gabe führt Azithromycin zu einer verstärkten Bildung von M2-Makrophagen sowie regulatorischen Dendritischen Zellen. Weiterhin kommt es nach mehreren Wochen zu einer verstärkten Makrophagen Phagozytose und einer verbesserten Auflösung der Entzündung. Dadurch wird das Risiko einer chronischen Inflammation gesenkt und die Gewebeschäden werden minimiert. Folglich kann die zeitlich passende Gabe von Azithromycin zunächst die Entzündungsreaktion verstärken und anschließend wieder reduzieren (Parnham et al., 2014, Parnham and Erakovic Haber, 2016, Blum et al., 2018a). Auch die Gruppe der Chinolon-Antibiotika verfügt über immunmodulatorische Eigenschaften, welche gezielt eingesetzt werden können. Die Chinolone weisen hierbei eine biphasische Wirkung auf. Zunächst kommt

es zur verstärkten Sezernierung von pro-inflammatorischen Zytokinen, einer gesteigerten Phagozytose und einem verstärkten oxidativen Burst (Labro, 2000). Anschließend wird die Zytokin-Produktion wieder gestoppt (Hall et al., 2003). Dadurch kann die initiale Pathogen-Abwehr zunächst unterstützt werden, ohne dass es durch die anhaltende Entzündung zur verstärkten Gewebeschädigung kommt (Riesbeck, 2002). Die Balance zwischen den pro- und anti-inflammatorischen Aspekten der Immunantwort ist ein komplexer Prozess, welcher auf einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen basiert. Die gezielte Modulation der Immunantwort durch Therapeutika erfordert daher intensive Untersuchungen und ein optimiertes Timing. In der vorliegenden Arbeit werden die immunmodulatorischen Eigenschaften der 2 vielversprechenden neuen Wirkstoffkandidaten Silvestrol sowie Steroid Substanz 10 untersucht.

1.2.3.1 Der Naturstoff Silvestrol

Der Naturstoff Silvestrol kann aus dem asiatischen Mahagonigewächs *Aglaia* und verwandten Arten isoliert werden (Kim et al., 2007) und wurde ursprünglich für den Einsatz in der Onkologie erprobt. Dabei zeigte Silvestrol eine potente Wirkung gegenüber verschiedenen Tumoren *in vitro* als auch *in vivo* (Lucas et al., 2009, Kogure et al., 2013, Chen et al., 2016). Die Wirkung von Silvestrol geht auf die spezifische Hemmung der Familie der Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen DEAD-box Helikasen „eukaryotischer Initiationsfaktor 4a“ (eIF4A) zurück (Bordeleau et al., 2008, Sadlish et al., 2013). Zu dieser Familie gehörten eIF4A1, eIF4A2 und eIF4A3. Diese Helikasen gehören zu den Initiationsfaktoren und sind für die Translation der mRNA zu Proteinen notwendig. Durch die Hydrolyse von ATP wird die mRNA entwunden damit sich die 40S-Untereinheiten der Ribosomen dort anlagern können. Dabei benötigen die eIF4a Helikasen eine 5'-Cap-Struktur für die Bildung des Initiationskomplexes (Rogers et al., 2002). Die Inhibierung der eIF4A kann des Weiteren als anti-virale Therapie genutzt werden, da der Replikationsmechanismus zahlreicher Viren auf diesem Wirtsfaktor beruht. Der Ansatz, Wirtsfaktoren als pharmakologische Zielstruktur anzugehen, bietet den Vorteil, dass die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung von Resistenzmechanismen durch die Viren minimiert wird (Muller et al., 2012). Jedoch muss hierbei besonders auf unerwünschte Nebenwirkungen geachtet werden (Gerold and Pietschmann, 2013). Die Verfolgung dieses Ansatzes zeigte, dass Silvestrol zahlreiche anti-virale Eigenschaften innehat. Durch den Einsatz von Silvestrol konnte die Replikation des Ebolavirus (Biedenkopf et al., 2017), des Zikavirus (Elgner et al., 2018), des Coronavirus, unterschiedlicher Subtypen des Picornavirus (Muller et al., 2018) sowie des Chikungunyavirus (Henss et al., 2018) inhibiert werden. Des Weiteren konnte die Freisetzung viraler Partikel des Hepatitis-E-Virus reduziert werden (Glitscher et al., 2018).

1.2.3.2 Die Steroid Substanz 1o

Die sich in der Entwicklung befindende Steroid Substanz 1o zeichnet sich durch ein vielversprechendes Aktivitätsprofil für mögliche Therapien der Malaria sowie Schistosomiasis aus. Diese Erkrankungen, welche durch die Parasiten *Plasmodium* (Malaria) oder *Schistosoma* (Schistosomiasis) hervorgerufen werden, stellen ein schwerwiegendes Problem der Gesundheitsversorgung dar. Im Jahr 2018 gab es laut World Health Organization (WHO) weltweit 219 Millionen Fälle von Malaria (WHO., 2018) sowie zwischen 200 und 250 Millionen Fälle von Schistosomiasis überwiegend in Entwicklungsländern (Steinmann et al., 2006, WHO., 2015). Die Therapie von Malaria basiert üblicherweise auf dem Einsatz von Artemisinin-Kombinationstherapien. Neue Wirkstoffe sind dringend notwendig, um der Gefahr von aufkommenden Resistenzmechanismen der Parasiten gegenüber Artemisinin zu begegnen (Sinha et al., 2014, Wells et al., 2015). Für die Behandlung der Schistosomiasis wird überwiegend das Anthelminthikum Praziquantel eingesetzt (Utzinger and Keiser, 2004). Der Wirkmechanismus von Praziquantel beruht dabei auf einer Öffnung der Calciumkanäle. Dies führt zur Lähmung und dem Tod der Parasiten (Liu et al., 2011). Durch den häufigen Einsatz steigt jedoch das Risiko von resistenten Erregern auch bei diesem Wirkstoff (Botros and Bennett, 2007, Mader et al., 2018). Folglich werden neue Therapeutika gegen parasitäre Erkrankungen benötigt, welche nicht nur einen direkten, sondern auch einen immunmodulierenden, Effekt innehaben. Die Steroid Substanz 1o besteht aus einer Steroid- sowie aus einer 2-Hydroxyarylmethylamino-Gruppe (Krieg et al., 2017). Durch Oxidation der 2-Hydroxyarylmethylamino-Gruppe können Chinonmethid-Intermediate entstehen. Chinonmethide stellen die funktionale Gruppe der Chinone dar, welche über immunmodulatorische Eigenschaften verfügen (siehe 1.2.3). Aus diesem Grund soll in der vorliegenden Arbeit geprüft werden, ob Steroid Substanz 1o, abseits der direkten anti-parasitären Wirkung, zusätzliche immunmodulierende Effekte innehat und inwiefern diese genutzt werden können.

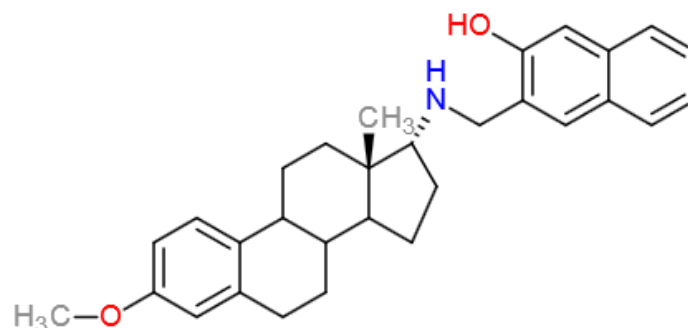


Abbildung 7: Strukturformel von Steroid Substanz 1o. Der neuartige Wirkstoffkandidat aus der Gruppe der Arylmethylaminosteroide zeigt ein vielversprechendes Aktivitätsprofil gegen die Parasiten *Plasmodium* und *Schistosoma* (Krieg et al., 2017).

2 Zielsetzung

Die vorliegende Dissertation gliedert sich in 2 Teile mit folgenden Zielsetzungen:

Ziel des 1. Teils ist es, die Auswirkungen des Naturstoffs Phytol und seiner Metaboliten auf den Krankheitsverlauf des murinen EAE-Modells genauer zu charakterisieren, die Rolle von NOX2 bei den Phytol-vermittelten Effekten zu analysieren und den Einsatz von Phytol als potenziellen neuen Wirkstoff für die Therapie der MS abzuwägen. Dabei sollen folgende Fragestellungen abgedeckt werden:

1. Besteht ein direkter Einfluss der Phytol-Gabe auf die Demyelinisierung im lumbalen Rückenmark?
2. Wird die Verteilung der Immunzellen im lumbalen Rückenmark und in den inguinalen Lymphknoten durch Phytol verändert?
3. Besteht ein Einfluss von Phytol auf das Verhältnis der T-Zell-Subtypen?
4. Beeinflussen die Metaboliten von Phytol T-Zellen in unterschiedlicher Weise?
5. Wird die Bildung von ROS im lumbalen Rückenmark reguliert?
6. Welche Zellen im lumbalen Rückenmark exprimieren NOX2?
7. Welchen Einfluss hat die Deletion von NOX2 auf die zuvor untersuchten Effekte von Phytol sowie dessen Metaboliten?

Im 2. Teil der Dissertation sollen die immunmodulatorischen Eigenschaften der 2 Wirkstoffkandidaten Silvestrol sowie Steroid Substanz 1o untersucht werden. Um die Einsatzmöglichkeiten sowie die möglichen Nebenwirkungen frühzeitig abzuschätzen, sollen folgende Aspekte an primären humanen Immunzellen untersucht werden:

1. Beeinflussen die Wirkstoffkandidaten die Viabilität humaner Immunzellen?
2. Wird der zelluläre Energiestoffwechsel von Immunzellen durch die Testsubstanzen moduliert?
3. Wird die Differenzierung und die Polarisierung von Makrophagen beeinflusst?
4. Besteht ein Einfluss auf die Differenzierung und Aktivierung von Dendritischen Zellen?

Der Fokus dieser Untersuchungen liegt dabei auf den exprimierten Oberflächenmarkern der Immunzellen sowie auf den sezernierten Zyto- und Chemokinen im Überstand, welche als Marker zur Bestimmung des pro- bzw. anti-inflammatorischen Charakters der Immunzellen dienen.

3 Material und Methoden

Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Verbrauchsgegenstände, Geräte, Chemikalien, Antikörper, Kits sowie Software befindet sich im Anhang (10.2 bis 10.7).

3.1 Tiermodell

Bei allen Experimenten wurden die Richtlinien für die Arbeiten mit lebenden Organismen eingehalten und vom Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt (Genehmigungsnummer F152/1004). Die verwendete NOX2KO-Linie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Brandes zur Verfügung gestellt. Dem Tierstamm, welcher auf C57BL/6N-Mäusen basiert, fehlt die katalytische Untereinheit Cytochrom B-245 beta-Kette (CYBB; Synonyme: gp91^{phox} oder NOX2) des NOX2-Komplex, welche auf dem X-Chromosom lokalisiert ist. Für die Versuche wurden 8- bis 12-wöchige weibliche Geschwisterpaare (NOX2-Wildtyp (NOX2WT) oder NOX2KO) verwendet. Die Versuchstiere wurden in Gruppen von 2 bis 6 Mäusen pro Käfig gehalten und verfügten über ausreichend Nistmaterial und Rückzugsmöglichkeiten. Die Tierhaltungsräume in der Zentralen Forschungseinrichtung des Universitätsklinikums Frankfurt waren frei von spezifischen Pathogenen. Die Versuchstiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser sowie einen 12 h Tag/Nacht-Zyklus bei $24 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

3.2 Genotypisierung

Zur Bestimmung des Genotyps der NOX2KO-Mäuse wurde die DNA aus Schwanzspitzen oder Ohrstanzen von 3 Wochen alten Tieren isoliert und auf Anwesenheit einer vollständigen gp91^{phox}-Untereinheit kontrolliert. Dazu wurden die Gewebeprobe in 500 µl Lysepuffer sowie 5 µl Proteinkinase K auf einem Thermomixer inkubiert (550 rpm, 55°C). Am folgenden Tag wurden die Proben zentrifugiert (17949 g, 10 min, RT) um Gewebereste von der gelösten DNA zu trennen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch die Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt. Nach einer Zentrifugation (17949 g, 10 min, RT) wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation (17949 g, 5 min, RT) wurde der Überstand vollständig abgenommen und das DNA-Pellet für 15 min unter dem Abzug getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 100 µl Millipore H₂O gelöst.

Die gp91^{phox}-Untereinheit wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert (siehe Tabelle 3). Die für die Amplifizierung verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt (siehe 10.4). Die PCR-Produkte wurden anschließend in einem 2,5 % Agarose-Gel, welches mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Roti-Safe GelStrain® (5 µl/100 ml) versetzt war, bei 100 V für 60 min aufgetrennt. Mit Hilfe des ChemiDoc und der Software ImageLab wurden die Banden

im Agarose Gel aufgenommen und die Wildtyp (WT) oder Knockout (KO) Banden identifiziert. Das WT-Fragment hat eine Größe von 240 bp während das KO-Fragment eine Größe von 195 bp aufweist. Als Größenstandard wurde der DNA Ladder Mix 100-10000 bp von Peqlab verwendet.

Tabelle 3: Genotypisierung von C57BL/6N-gp91phox Mäusen. Einfacher PCR-Ansatz sowie durchgeführtes PCR-Programm.

Primer gp91 ^{phox} -1019	1,5 µl	Zeit	Temperatur	Zyklen
Primer gp91 ^{phox} -1020	1,5 µl	5 min	94°C	1 x
Primer gp91 ^{phox} -1021	1,5 µl	30 s	94°C	30 x
RNA freies Wasser	1,5 µl	30 s	64°C	
Taq 2x Master Mix Red	10 µl	40 s	72°C	
Gelöste DNA	5 µl	30 s	94°C	30 x
		30 s	58°C	
		40 s	72°C	
		7 min	72°C	1 x

3.3 EAE-Induktion & Scoring

Für die Induktion der EAE wurde das EAE-Kit „EK-2110“ nach Angaben des Herstellers verwendet. Bei den Versuchstieren handelte es sich ausschließlich um Weibchen im Alter von 10 bis 12 Wochen. Während der Induktion waren die Versuchstiere mittels Isofluran betäubt. Es wurden 200 µg MOG₃₅₋₅₅ Peptid sowie 400 µg des *Mycobacterium tuberculosis* gelöst in 400 µl CFA subkutan in die Nackenfalte (100 µl) sowie die linke und rechte Schwanzbasis (jeweils 50 µl) appliziert. Des Weiteren wurden 100 µl PTX i.p. in den Bauchbereich injiziert. Die PTX-Injektion wurde am darauf folgenden Tag wiederholt. An den folgenden Tagen wurden die Tiere täglich auf auftretende Krankheitssymptome untersucht und entsprechend den jeweiligen EAE-Scores zugewiesen (Tabelle 1). Sobald Krankheitssymptome auftraten, oder die Tiere den 9. Tag nach Induktion erreichten, wurde zusätzlich täglich das Gewicht der Tiere bestimmt. Zur Einhaltung der Tierschutzrichtlinien wurden Tiere die den Score 3 überschritten getötet und fortan mit Score 4 gewertet. Nach der Tötung erfolgte eine Perfusion mit 1x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) und die Organentnahme des lumbalen Rückenmarks (RML), der inguinalen Lymphknoten (LK), des Blutes und der Milz für anschließende Untersuchungen. Bei Tieren mit Phytol-Diät wurde das Standard-Futter ab dem Zeitpunkt der EAE-Induktion durch Phytol-Futter (5 g/kg) ausgetauscht.

3.4 Knochenmarkstransplantation

Als Spender für das zu transplantierende Knochenmark wurden weibliche NOX2KO-Mäuse im Alter zwischen 12 und 18 Wochen verwendet. Dabei wurden die Oberschenkelknochen der Tiere isoliert und die Knochenmarkszellen mit PBS auf dem Knocheninneren herausgespült. Die Zellen wurden mit einem 70 µm Nylonfilter gereinigt und zentrifugiert (405 g, 4 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 µl Erylysepuffer aufgenommen. Nach der Inkubation (5 min, Raumtemperatur (RT)) wurden 5 ml PBS hinzugegeben und die Knochenmarkszellen nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (405 g, 4 min, 4°C) in 1 ml PBS aufgenommen. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf mindestens $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml eingestellt.

Zeitgleich zur Isolation der Knochenmarkszellen erfolgte die Bestrahlung der Empfänger-C57BL6/N-Wildtyp-Tiere in Gruppen zu 6 Tieren bei einer Gesamtstrahlendosis von 9 Gy. Zum Zeitpunkt der Bestrahlung waren die Empfänger-Tiere 10 Wochen alt. Nach der Bestrahlung wurden die Empfänger-Tiere gewogen und erhielten 200 µl Zellsuspension, welche mindestens $3 \cdot 10^6$ Knochenmarkszellen enthielt, intravenös in die obere Schwanzvene appliziert.

In den darauffolgenden 30 Tagen wurde täglich das Gewicht der Empfänger-Tiere erfasst und die Tiere bei einem Gewichtsverlust von über 20 % im Vergleich zum Gewicht direkt nach Bestrahlung aus tierethischen Gründen getötet. Der periphere Genotyp der Mäuse wurde 21 Tage nach Bestrahlung kontrolliert. Dafür wurde DNA aus Blut mittels des „Extract-N-Amp Blood PCR“ Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt und gp91^{phox} amplifiziert (Methode siehe 3.2). Nach der Auftrennung auf einem 2,5 % Agarose Gel konnte der periphere Genotyp kontrolliert werden. Die EAE-Induktion erfolgte 28 Tage nach der Knochenmarkstransplantation (Methode siehe 3.3).

3.5 RNA-Isolation aus Zellen: „RNAqueous-Micro Procedure“ Kit

Zur Isolation von RNA aus Zellen wurden das „RNAqueous-Micro Procedure“ Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Zellen wurden dazu in 100 µl Lyse-Puffer aufgenommen und gut durchmischt. Anschließend wurden 50 µl 100 % Ethanol dazugegeben und erneut gemischt. Die lysierten Zellen wurden auf Mikrofilterröhrchen gegeben und zentrifugiert (20238 g, 10 s, RT). Die im Filter zurückgehaltene RNA wurde in 3 Waschschrritten mit den ethanolhaltigen Waschlösungen 1-3 gereinigt. Der Durchfluss wurde verworfen und die RNA mittels 12 µl Elutionslösung in neuen Reaktionsgefäßen ausgewaschen. Vor Verwendung der Elutionslösung wurde diese auf 75°C erhitzt und auf der Säule inkubiert (1 min, RT). Zur Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA wurde ein TECAN-Reader SpectraFluor Plus verwendet. Zur Reinheitskontrolle wurde das Verhältnis aus der optischen Dichte (OD) 260/280 nm gebildet, welches sich zwischen 1,8 und 2,0 befinden sollte. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.6 RNA-Isolation aus Gewebe: Phenol-Chloroform-Extraktion

Für die Isolation der Gesamt-RNA aus den zu untersuchenden Organen (inguinale Lymphknote und lumbales Rückenmark) wurde die Methode der Phenol-Chloroform-Extraktion verwendet. Hierzu wurden 500 µl Tri-Reagenz zu den Gewebeproben gegeben und diese mit einem Eppi-Pistill Potter homogenisiert. Nach Zugabe von weiteren 500 µl Tri-Reagenz wurden die Proben gevortext (30 s) und inkubiert (10 min, RT). Nach einer Zentrifugation (12000 g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Gewebereste verworfen. Der Überstand wurde mit 200 µl Chloroform versetzt und inkubiert (5 min, RT). Es folgte eine weitere Zentrifugation (12000 g, 15 min, 4°C). Bei der auftretenden Phasentrennung befand sich die RNA in der oberen wässrigen Phase während sich DNA und Proteine in der unteren Phenol-Chloroform-Phase befand. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt. Nach einer Inkubation (10 min, RT) wurden die Proben zentrifugiert (12000 g, 15 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 750 µl 75 % Ethanol gewaschen und zentrifugiert (7500 g, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet (5 min, RT). Das RNA-Pellet wurde anschließend in 30 µl Nuklease-freiem Wasser aufgenommen und die RNA-Konzentration mit Hilfe eines TECAN-Readers SpectraFluor Plus bestimmt (Methode siehe 3.5). Bei unzureichender Qualität wurde die Phenol-Chloroform-Extraktion wiederholt. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.7 cDNA-Synthese

Um isolierte Gesamt-RNA in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben wurde das „First Stand cDNA Synthese“ Kit nach Angaben des Herstellers verwendet (siehe Tabelle 4). Nach der PCR wurde die cDNA mit Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 30 ng/µl eingestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Tabelle 4: cDNA Synthese. Einfacher Reaktionsansatz sowie PCR Programm mittels des „First Stand cDNA Synthese“ Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). dNTP = Nukleosidtriphosphate

5x Reaktions-Puffer	4 µl	Zeit	Temperatur
10 mM dNTP Mix	2 µl	5 min	25°C
M-MuIV Reverse Transkriptase	2 µl	60 min	37°C
Ribolock RNase Inhibitor	1 µl	5 min	70°C
Random Hexamer	1 µl		
RNA-Template	600-1600 ng		
Nuklease-freies-Wasser	Auffüllen auf 20 µl		

3.8 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Zur Bestimmung der Expressionslevel unterschiedlicher Gene in den inguinalen Lymphknoten und dem lumbalen Rückenmark wurde die Methode der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) verwendet. Die dabei verwendeten Primer sowie die untersuchten Gene sind im Anhang aufgeführt. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze sowie das PCR-Programm sind in Tabelle 5 dargestellt. Für die qPCR-Messungen wurde der, in doppelsträngige cDNA interkalierende, EvaGreen® Farbstoff verwendet. Während des PCR-Programms wurden die zu untersuchenden Gen-Abschnitte mit Hilfe von spezifischen Primern amplifiziert und die Fluoreszenz des interkalierenden EvaGreen® Farbstoffs mit Hilfe des CFX96™ Real-Time-Systems (Bio-Rad, München) detektiert. Die dabei gemessene Fluoreszenz wurde graphisch als Funktion der durchgeführten Zyklen dargestellt. Bei der Analyse wurde die relative Quantifizierung mittels der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ („cycle threshold“) Methode nach Normalisierung auf das „housekeeping gen“ Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA) ermittelt. Die dabei ermittelten Ct-Werte wurden ins Verhältnis zu Ct-Werten von Kontrolltieren gesetzt um die relative Expression zu berechnen.

Tabelle 5: Quantitative Echtzeit-PCR. Einfacher Reaktionsansatz sowie PCR-Programm.

5x EvaGreen® qPCR Mix (Rox)	2 µl	Zeit	Temperatur	Zyklen
Forward Primer (10 µM)	1 µl	15 min	95°C	1 x
Reverse Primer (10 µM)	1 µl	15 s	95°C	45 x
cDNA (30 ng/µl)	0,5 µl	60 s	60°C	
Nuklease-freies Wasser	5,5 µl			

3.9 Durchflusszytometrie

Die Messungen am Durchflusszytometer wurden an einem MACSQuant® Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) durchgeführt. Die Emissionsspektren der dabei verwendeten Antikörper wurden vor den Versuchen am Durchflusszytometer kompensiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software FlowJo (Version 10, Treestar, Ashland, OR, USA). Die Bestimmung der jeweiligen Zellpopulationen erfolgte anhand von ungefärbten Kontrollen.

3.9.1 Zellverteilung von murinen Immunzellen

Um die verschiedenen Zelltypen in den zu untersuchenden Organen (inguinale Lymphknoten und lumbales Rückenmark) zu unterscheiden und zu quantifizieren, wurden durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt. Dafür wurden die relevanten Organe nach der Entnahme aus den Versuchstieren gewogen und in Reaktionsgefäße mit 200 µl eiskaltem PBS überführt. Durch die Aufarbeitung der Organe wurden Einzelzellsuspensionen gewonnen. Die inguinalen Lymphknoten wurden mechanisch zerkleinert und über einen 70 µM Nylonfilter filtriert. Der Filter wurde anschließend mit PBS gespült und das Filtrat zentrifugiert (1962 g, 3 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 300 µl 0,2 % Rinderalbumin (BSA)/PBS aufgenommen. Die Proben des lumbalen Rückenmarks wurden hingegen in 500 µl Lysis-Puffer, bestehend aus 50 % „Hanks‘ Balanced Salt Solution“ (HBSS), 50 % Accutase sowie 30 mg/ml Collagenase A, aufgenommen und mechanisch zerkleinert. Anschließend wurden die Proben auf einem Thermoschüttler inkubiert (400 rpm, 30 min, 37°C). Nach abgeschlossener Inkubation wurden die Proben zentrifugiert (200 g, 2 min, RT). Es folgten 2 Waschschriffe mit jeweils 500 µl PBS. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und über einen 70 µM Nylonfilter gegeben. Der Filter wurde mit PBS gespült und das Filtrat zentrifugiert (1962 g, 3 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 300 µl 0,2 % BSA/PBS aufgenommen. Die Zellkonzentration wurde am Durchflusszytometer bestimmt und jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Probe des lumbalen Rückenmarks bzw. $1 \cdot 10^5$ Zellen pro Proben der inguinalen Lymphknoten in eine 96-Well FACS-Platte überführt. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte der Zellfärbung wurden auf Eis durchgeführt. Die Proben wurden zunächst mit 2 µl Fc-Rezeptor (FcR) Blocking Reagenz inkubiert (15 min, 4°C, Dunkelheit). Dies diente zur Blockierung von unspezifischen Bindestellen. Für die Färbung der Immunzellen wurde ein Gemisch aus primär konjugierten Antikörpern verwendet (siehe Tabelle 6). Dabei wurden die Proben aus den inguinalen Lymphknoten mit 9 µl und die Proben aus dem lumbalen Rückenmark mit 18 µl der Antikörpermischung inkubiert (15 min, 4°C, Dunkelheit). Nach abgeschlossener Inkubation wurden die Proben mit 500 µl PBS gewaschen und zentrifugiert (650 g, 6 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 100 µl PBS aufgenommen. Dadurch wurden ungebundene Antikörper entfernt. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung. Bei der Auswertung konnten die Immunzellen anhand der folgenden Oberflächenmarker charakterisiert werden: Immunzellen (CD45⁺), Mikroglia (CD45⁻), Monozyten (CD45⁺, Ly6G⁻, CD11c⁻, CD11b⁺), Makrophagen (CD45⁺, Ly6G⁻, CD11c⁻, CD11b⁺, F4/80⁺), neutrophile Granulozyten (CD45⁺, CD11b⁺, Ly6G⁺), dendritische Zellen (CD45⁺, Ly6G⁻, CD11b⁻, CD11c⁺), B-Zellen (CD45⁺, CD19⁺), CD4⁺-T-Zellen (CD45⁺, CD3⁺, CD4⁺) sowie CD8⁺-T-Zellen (CD45⁺, CD3⁺, CD8⁺).

Das Gating erfolgte anhand von ungefärbten Proben. Ein beispielhaftes Gating der murinen Immunzellsubpopulationen ist in Abbildung 8 dargestellt. Da definierte Zellzahlen gemessen und die Organe gewogen wurden, konnte die Anzahl an Zellen/mg Organ berechnet werden.

Tabelle 6: Charakterisierung von murinen Immunzellen. Die aus den inguinalen Lymphknoten und dem lumbalen Rückenmark isolierten Zellen wurden anhand von 8 Oberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Dabei wurden 2 µl von jedem Antikörper pro Probe eingesetzt. F4/80 = „EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1“, Ly6G = „lymphocyte antigen 6 complex locus G6D.“

Ursprung	Oberflächenmarker	Fluoreszenzfarbstoff
Ratte	CD45	VioBlue
Ratte	CD11b	VioGreen
Hamster	CD11c	FITC
Hamster	CD3e	PE-CF594
Ratte	CD8a	PE-Cy5
Ratte	F4/80	PE-Cy7
Ratte	CD4	APC
Ratte	Ly6G	APC-Cy7

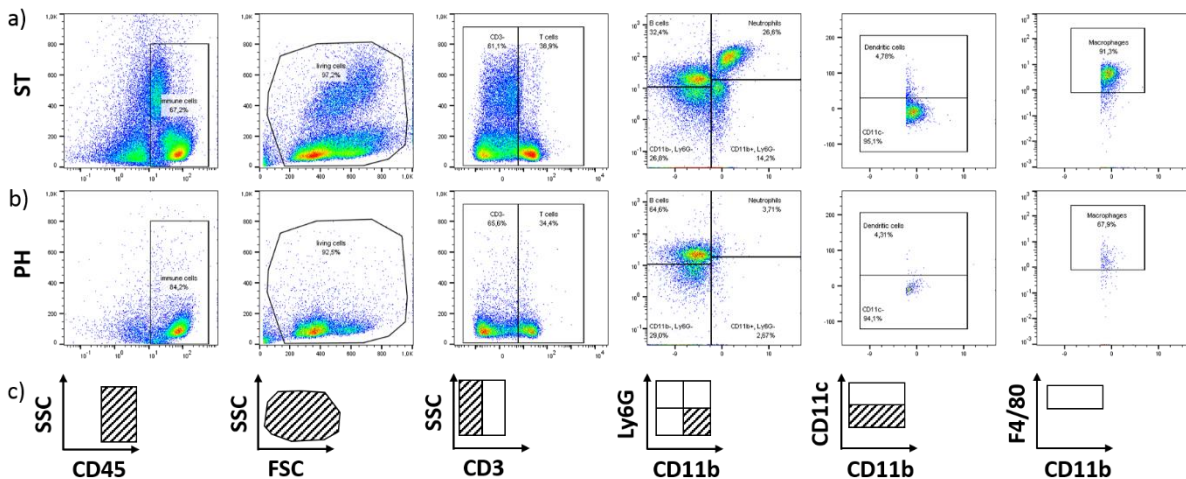


Abbildung 8: Beispielhafte Gating-Strategie muriner Immunzellen. Dargestellt sind isolierte Zellen aus den inguinalen Lymphknoten von Mäusen mit Standard- (ST, a) oder Phytol- (PH, b) Diät 16 Tage nach EAE-Induktion. Ausgefüllte Gates zeigen an, welche Subpopulationen für den nächsten Schritt verwendet wurden (c). Die Gates wurden anhand von ungefärbten Kontrollen festgelegt. Zunächst wurden die Immunzellen (CD45⁺) von den übrigen Zellen getrennt. Anschließend wurden mittels FSC/SSC tote Zellen und Zelltrümmer ausgeschlossen. T-Zellen wurde anhand von CD3⁺ definiert. Innerhalb der CD3⁺-Zellen wurden die B-Zellen (CD11b⁻, Ly6G⁺) und die Neutrophilen (CD11b⁺, Ly6G⁺) definiert. Im nächsten Schritt wurden die CD11b⁺- und Ly6G⁻-Zellen verwendet und davon die Dendritischen Zellen (CD11b⁺, CD11c⁻) definiert. Innerhalb der CD11b⁺/CD11c⁻-Zellen wurden die Makrophagen anhand der Expression von F4/80⁺ festgelegt.

3.9.2 Murine T-Zell-Subpopulationen

Die Auswirkung von Phytan- bzw. Pristansäure auf die aus der murinen Milz isolierten T-Zell-Subpopulationen wurden durchflusszytometrisch analysiert. Dazu wurden die isolierten T-Zellen mit CD3/CD28-Beads, IL-2 (30 U/ml) und Phytan- bzw. Pristansäure (50 µM) für 72 h stimuliert (Methode siehe 3.10). Nach der Stimulation wurden die Proben zentrifugiert (300 g, 10 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 µl PBS aufgenommen. Es folgte die Blockierung der unspezifischen Antikörper-Bindestellen durch Inkubation (15 min, 4°C, Dunkelheit) mit 2 µl FcR Blocking Reagenz. Anschließend wurden die Zellen mit jeweils 0,5 µl von jedem verwendeten Antikörper (siehe Tabelle 7) inkubiert (15 min, RT, Dunkelheit). Danach wurde 500 µl FACS Wasch-Puffer zu den Proben gegeben und diese zentrifugiert (650 g, 6 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 200 µl PBS aufgenommen. Es erfolgte die Messung am Durchflusszytometer (Methode siehe 3.9.1). Bei der Auswertung wurden nur CD3⁺-Zellen berücksichtigt. Diese wurden anhand der folgenden Marker den T-Zell-Subtypen zugeordnet: T_H1 (CD4⁺, CXCR3⁺), T_H2 (CD4⁺, CXCR3⁻, CCR4⁺, CCR6⁻), T_H17 (CD4⁺, CCR4⁺, CCR6⁺), T_{reg} (CD4⁺, CD25⁺, CD127⁻).

Tabelle 7: Verwendete Antikörper zur Analyse der murinen T-Zell-Subtypen.

Oberflächenmarker	Zelltyp	Fluoreszenzfarbstoff
CD3	T-Zellen	PerCP-Vio700
CD4	CD4 ⁺ -T-Zellen	VioGreen
CD8a	CD8 ⁺ -T-Zellen	VioBlue
CD25	T _{reg}	VioBright FITC
CD127	T _H 1	APC-Cy7
CXCR3 (CD183)	T _H 17	APC
CCR6 (CD196)	T _H 2	PE-Vio770
CCR4 (CD194)	T _H 2, T _H 17	PE

3.9.3 Zelltypverteilung von humanen PBMCs

Zur Kontrolle der CD14⁺-Aufreinigung von humanen Blutproben (Methode siehe 3.14) wurde die Populationen von CD14⁺-Zellen, T-Zellen, B-Zellen und Dendritischen Zellen in den Proben vor und nach der „magnetic activated cell sorting“ (MACS) Aufreinigung am Durchflusszytometer bestimmt. Dafür wurden 2*10⁵ Zellen/Probe in 100 µl PBS aufgenommen und mit 2 µl FcR-Blocking Reagenz inkubiert (15 min, 4°C, Dunkelheit). Nach abgeschlossener Inkubation wurde jeweils 1 µl der verwendeten Antikörper (siehe Tabelle 8) hinzugegeben und die Proben inkubiert (15 min, 4°C, Dunkelheit). Anschließend wurden die Proben am Durchflusszytometer gemessen und der Anteil der unterschiedlichen Zelltypen bezogen auf die Gesamtzellzahl der lebenden Zellen bestimmt.

Tabelle 8: Verwendete Antikörper zur Analyse von PBMCs. Die Verteilung der Zelltypen wurde vor und nach der CD14⁺-Aufreinigung von humanen PBMCs mit Hilfe des MACS-Systems durchgeführt (Methode siehe 3.14).

Oberflächenmarker	Zelltyp	Fluoreszenzfarbstoff
CD3	T-Zellen	VioBlue
CD11c	Dendritische Zellen	PE-Vio770
CD14	Monozyten	VioGreen
CD19	B-Zellen	FITC

3.9.4 Charakterisierung von Oberflächenmarkern humaner Makrophagen

Nach der Differenzierung (Methode siehe 3.16) bzw. Polarisierung (Methode siehe 3.17) von humanen Makrophagen wurden die spezifischen Oberflächenmarker der Makrophagen am Durchflusszytometer bestimmt. Dafür wurden 2*10⁵ Zellen in 100 µl PBS aufgenommen und mit 2 µl FcR-Blocking Reagenz inkubiert (15 min, 4°C, Dunkelheit). Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (300 g, 10 min, 4°C) und das Zellpellet in 93 µl Zombie-Dye-Mastermix (Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit, 1:500 in PBS) aufgenommen und inkubiert (15 min, RT, Dunkelheit). Nach abgeschlossener Inkubation wurde jeweils 1 µl der verwendeten Antikörper (siehe Tabelle 9) dazugegeben und die Proben inkubiert (15 min, 4°C, Dunkelheit). Zur Neutralisation der ungebundenen Antikörper wurden die Proben mit 500 µl PBS/10 % fetales Kälberserum (FKS) verdünnt und zentrifugiert (300 g, 5 min, 4°C). Das Zellpellet wurde anschließend in 100 µl PBS aufgenommen und am Durchflusszytometer gemessen.

Bei der Auswertung wurde das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensitäten der zu untersuchenden Marker von den lebenden Zellen bestimmt und die relative Expression im Verhältnis zu den mittels Vehikel behandelten Zellen ermittelt. Dabei wurden die Messwerte der Vehikel behandelten Zellen zusammengefasst da die unterschiedlichen Konzentrationen des Vehikels keinen Einfluss auf die Expression der Oberflächenmarker hatten. Der Marker CD14 wurde als Qualitätskontrolle der Differenzierung mitgeführt.

Tabelle 9: Charakterisierung humaner Makrophagen-Subtypen. Dargestellt sind die untersuchten Oberflächenmarker nach Differenzierung oder Polarisierung sowie die entsprechenden Antikörper.

Oberflächenmarker	Subtyp	Fluoreszenzfarbstoff
CD14	-	APC-Vio770
CD80	M1-Makrophagen	APC
CD86	M1-Makrophagen	FITC
CD163	M2c-Makrophagen	VioBlue
CD206	M2a-Makrophagen	PE-Vio770
HLA-DR	Makrophagen / APZ	PerCP
TREM2	M2a-Makrophagen	PE

3.9.5 Charakterisierung von Oberflächenmarkern humaner Dendritischer Zellen

Nach abgeschlossener Differenzierung (Methode siehe 3.18) oder Aktivierung (Methode siehe 3.19) von humanen Dendritischen Zellen wurden die spezifischen Oberflächenmarker per Durchflusszytometrie bestimmt. Die Färbung, Messung sowie Auswertung der Proben erfolgte wie unter 3.9.4 beschrieben unter Verwendung der in Tabelle 10 dargestellten Antikörper. Es wurden 2 unterschiedliche Zusammenstellungen an Antikörpern gewählt und die Proben getrennt mit beiden Zusammenstellungen gefärbt und analysiert. Der Marker CD11c wurde als Qualitätskontrolle der Differenzierung mitgeführt.

Tabelle 10: Charakterisierung humaner Dendritischer Zellen. Dargestellt sind die untersuchten Oberflächenmarker nach Differenzierung oder Aktivierung sowie die entsprechenden Antikörper. Aufgrund der Anzahl der Oberflächenmarker wurden 2 unterschiedliche Zusammenstellungen der Antikörper gewählt um eine Doppelbelegung der Kanäle zu vermeiden.

Oberflächenmarker	Zusammenstellung	Fluoreszenzfarbstoff
CD1a	„DC-Set-Up 1“	FITC
CD1c	„DC-Set-Up 1“	PE
CD11c	„DC-Set-Up 1 & 2“	PE-Vio770
CD40	„DC-Set-Up 1“	APC
CD54	„DC-Set-Up 1“	Pacific Blue
CD80	„DC-Set-Up 2“	APC
CD83	„DC-Set-Up 1“	APC-Vio770
CD86	„DC-Set-Up 2“	PE
CD141	„DC-Set-Up 2“	VioBlue
CD197	„DC-Set-Up 2“	FITC
CD206	„DC-Set-Up 2“	PerCP-Vio700
CD209	„DC-Set-Up 2“	APC-Vio770
HLA-DR	„DC-Set-Up 1“	PerCP

3.10 Isolation & Stimulierung muriner T-Zellen

Für einige Untersuchungen (T-Zell-Proliferations-Assay, mRNA-Isolation, zytometrischer Bead-Array, T-Zell-Subpopulationen) wurden isolierte murine T-Zellen aus gesunden C57BL/6N-Wildtyp- bzw. NOX2KO-Tieren verwendet. Dafür wurde die Milz der Tiere aseptisch entnommen und in PBS aufgenommen. Alle darauffolgenden Arbeitsschritte wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die Milz wurde mechanisch zerkleinert und durch einen 70 µm Nylonfilter gepresst. Der Filter wurde mit 10 ml PBS gespült und das Filtrat zentrifugiert (405 g, 3 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 500 µl Erylysepuffer versetzt. Nach einer Inkubation (10 min, RT) wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (405 g, 3 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 µl sterilem MACS-Puffer aufgenommen. Die Separation der T-Zellen von den übrigen Zellen erfolgte mit Hilfe des MACS®-System und magnetischen CD90.2-Beads nach Angaben des Herstellers. Dafür wurde die Zellsuspension mit 20 µl der CD90.2-Beads inkubiert (15 min, 4°C). Nach der Inkubation wurden die Proben mit 1 ml MACS-Puffer gemischt und zentrifugiert (300 g, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen. Die MS-Säulen wurden an dem dafür vorgesehenen Magneten angebracht und mit jeweils 500 µl MACS-Puffer äquilibriert. Die Zellsuspension wurde auf die Säulen gegeben und 3-fach mit 500 µl MACS-Puffer gewaschen. Der Durchfluss, welcher die unmarkierten Zellen enthielt, wurde dabei verworfen. Anschließend wurden die Säulen vom Magneten entfernt und die markierten T-Zellen mit 1 ml MACS-Puffer aus den Säulen in neue Reaktionsgefäße gedrückt. Diese wurden zentrifugiert (300 g, 10 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Zellkulturmedium aufgenommen, die Zellzahl am Durchflusszytometer bestimmt und auf $1 \cdot 10^6$ Zellen / ml Zellkulturmedium eingestellt. Von den somit aufgereinigten T-Zellen wurden jeweils 100 µl (entspricht $1 \cdot 10^5$ Zellen) in die Kavitäten einer 96-Well Platte gegeben und unter Zugabe von unterschiedlichen Stimulanzen (siehe Tabelle 11) stimuliert. Alle Proben wurden dabei im Mehrfachansatz angesetzt: 3-fach Ansatz für die mRNA-Bestimmung, den zytometrischen Bead Array sowie die Analyse der T-Zell-Subpopulationen, 5-fach Ansatz für den T-Zell-Proliferations-Assay. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂. Die Dauer der Kultivierung unterschied sich zwischen den Experimenten: Für die mRNA-Bestimmung sowie für den zytometrischen Bead-Array endete die Inkubation der Zellen nach 24 h, 48 h sowie 72 h. Für den T-Zell-Proliferations-Assay sowie die Bestimmung der T-Zell-Subtypen wurden die Zellen nach 72 h geerntet.

Tabelle 11: Stimulation isolierter muriner T-Zellen. Dargestellt sind die 4 unterschiedlichen Konditionen zur Stimulation vor der weiteren Verwendung.

	CD3/CD28-Beads	IL-2	Phytansäure	Pristansäure
Kondition 1 Unstimuliert	-	-	-	-
Kondition 2 Stimuliert	4 x 10 ⁷ Beads/ml	30 U/ml	-	-
Kondition 3 Stimuliert & Phytansäure	4 x 10 ⁷ Beads/ml	30 U/ml	50 µM	-
Kondition 4 Stimuliert & Pristansäure	4 x 10 ⁷ Beads/ml	30 U/ml	-	50 µM

Nach abgeschlossener Inkubation wurden die Zellen für die mRNA-Bestimmung sowie für den zytometrischen Bead-Array in Mikrozentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (300 g, 10 min, RT). Der Überstand wurde für den zytometrischen Bead-Array (Methode siehe 3.12) und das Zellpellet für die mRNA-Bestimmung (Methode siehe 3.5) verwendet. Die Zellen für die Bestimmung der T-Zell-Subtypen wurden geerntet, gefärbt und am Durchflusszytometer gemessen (Methode siehe 3.9.2). Die Zellen für den T-Zell-Proliferations-Assay wurden wie unter 3.11 beschrieben weiter behandelt.

3.11 Proliferations-Assay muriner T-Zellen

Nach abgeschlossener Stimulation (Methode siehe 3.10) wurden die Zellen mit dem „Bromdesoxyuridin (BrdU) Colorimetric Proliferation Assay“ Kit nach Angaben des Herstellers behandelt.

Dazu wurden zunächst 10 µl einer 10x BrdU-Lösung in jede Kavität der 96-Well Platte gegeben und die Zellen ü.N. inkubiert (37°C, 5 % CO₂). Am folgenden Tag wurde die Platte zentrifugiert (300 g, 10 min, RT) und der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden getrocknet (60 min, 60°C) und anschließend mit 200 µl FixDenat-Lösung inkubiert (30 min, RT). Anschließend wurde die FixDenat-Lösung abgenommen und 100 µl anti-BrdU-Peroxidase (POD)-Lösung auf die Zellen gegeben.

Nach einer Inkubation (90 min, RT) wurden die Zellen 3-fach mit 200 µl PBS gewaschen und mit 100 µl Tetramethylbenzidin-haltiger Substratlösung behandelt. Nach 5 bis 30 min bei RT trat der Farbumschlag durch die Aktivierung der POD auf und die Reaktion wurde durch die Zugabe von 25 µl Schwefelsäure (c = 1 M) gestoppt.

Die Quantifizierung des Farbumschlags erfolgte in 3-fach Bestimmung am EnSpire® 2300 Multimode Plate Reader (Perkin Elmer, Lübeck) bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm.

3.12 Zytometrischer Bead-Array & ELISA

3.12.1 Murine Proben

Zur Konzentrationsbestimmung von sezernierten Zytokinen im Überstand von stimulierten murinen T-Zellen (Methode siehe 3.10) wurde der „zytometrische Bead-Array“ (CBA) von BD Biosciences nach Vorgaben des Herstellers verwendet. Die Bestimmung der Konzentrationen von IL-4, IL-6, IL-10 IL-17A, TNF- α sowie IFN- γ wurde am MACSQuant® Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) durchgeführt. Dafür wurden 30 μ l der Proben bzw. des Standards mit 4 μ l der entsprechenden Capture-Beads für jedes der untersuchten Zytokine sowie 30 μ l T_H1/T_H2/T_H17 PE Detektions-Reagenz vermischt und inkubiert (2 h, 4°C, Dunkelheit). Anschließend wurden 500 μ l PBS dazugegeben und die Proben zentrifugiert (200 g, 5 min, RT). Die Überstände wurden verworfen und die Pellets in 300 μ l PBS aufgenommen. Die Ermittlung der Zytokin Konzentrationen erfolgte anhand einer Standardkurve. Zur Auswertung wurde die FCAP Array Software (Version 3.0, BD Biosciences, Heidelberg) verwendet.

3.12.2 Humane Proben

Für die Ermittlung der Zytokin- bzw. Prostaglandin-Konzentrationen im Überstand von differenzierten Makrophagen, differenzierten Dendritischen Zellen sowie polarisierten Makrophagen und aktivierten Dendritischen Zellen wurde der CBA von BD Biosciences verwendet. Dabei wurden je nach Zelltyp unterschiedliche Zytokine bestimmt (siehe Tabelle 12). Abweichend zur Herstellerangabe wurden für jeden Test 25 μ l Probenüberstand mit 25 μ l Capture-Beads gemischt und inkubiert (1 h, RT, Dunkelheit). Anschließend wurden 25 μ l PE Detektions-Reagenz hinzugegeben und die Proben weiter inkubiert (2 h, RT, Dunkelheit). Im Anschluss wurden die Proben mit 150 μ l Waschpuffer 3-fach gewaschen. Die Bestimmung der Zytokin Konzentrationen erfolgte am MACSQuant® Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) unter Verwendung einer Standardkurve nach Herstellerangabe. Zur Auswertung wurde die FCAP Array Software (Version 3.0, BD Biosciences, Heidelberg) verwendet. Da nicht für alle zu untersuchenden Zytokine der zytometrische Bead-Array verfügbar ist, wurden die Konzentration von CCL17, CCL18, IL-23 sowie PGE2 (siehe Tabelle 12) nach Herstellerangabe mittels ELISA bestimmt. Das Probengesamtvolumen betrug bei den ELISAs stets 100 μ l. Bei CCL17 sowie CCL18 wurden die Proben zuvor 1:1 vorverdünnt.

Bei allen Zytokin-Bestimmungen wurden zunächst die Auswirkungen der höchsten verwendeten Wirkstoff-Konzentrationen untersucht. Zeigte sich dabei eine signifikante Regulation, so wurden für diese Zytokine auch die Konzentrationen bei niedrigeren Wirkstoff-Konzentrationen bestimmt.

Tabelle 12: Quantifizierung von Zytokinen in humane Proben. Dargestellt sind die mittels zytometrischem Bead Array (CBA) sowie ELISA ermittelten Zytokine in den Überständen unterschiedlich behandelter humaner Immunzelltypen.

Zytokin	Bestimmt bei	Methode	Hersteller
IL-1 β	Polarisierte Makrophagen, Dendritische Zellen	CBA	BD Biosciences, Heidelberg
IL-6	Makrophagen Dendritische Zellen Aktivierte Dendritische Zellen	CBA	BD Biosciences, Heidelberg
IL-8	Polarisierte Makrophagen Dendritische Zellen Aktivierte Dendritische Zellen	CBA	BD Biosciences, Heidelberg
IL-10	Makropagen Polarisierte Makropagen Dendritische Zellen Aktivierte Dendritische Zellen	CBA	BD Biosciences, Heidelberg
IL-12p70	Dendritische Zellen Aktivierte Dendritische Zellen	CBA	BD Biosciences, Heidelberg
IL-23	Polarisierte Makrophagen Dendritische Zellen Aktivierte Dendritische Zellen	ELISA	ThermoFisher, Waltham, MA, USA
IFN- γ	Polarisierte Makrophagen	CBA	BD Biosciences, Heidelberg
CCL2	Polarisierte Makrophagen	CBA	BD Biosciences, Heidelberg
CCL17	Makrophagen	ELISA	BioLegend, Fell
CCL18	Makrophagen Polarisierte Makrophagen	ELISA	Boster Biological Technology, Pleasanton, CA, USA
CXCL10	Polarisierte Makrophagen	CBA	BD Biosciences, Heidelberg
PGE2	Polarisierte Makrophagen	ELISA	Enzo Life Science, Lörrach

3.13 Immunhistochemie

3.13.1 Gewebeschnitte

Zur Herstellung von Gewebeschnitten wurden das lumbale Rückenmark von EAE-Tieren mit Standard- oder Phytol-Diät entnommen und in 1,5 % Paraformaldehyd (PFA)/PBS inkubiert (2 h, RT). Zur Entwässerung der Gewebeproben wurden diese anschließend in 20 % Sucroslösung inkubiert (4°C, ü.N.). Am darauf folgenden Tag wurden die Proben in Cryomold®-Schälchen (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) mit Einbettmedium fixiert und bei -80°C eingefroren. Zur Herstellung von Gewebeschnitten wurde das Kryotom CM3050S Research Kryostats (Leica, Nussloch) bei -20°C verwendet. Die Schnittdicke betrug dabei 12 µm. Die Gewebeschnitte wurden für mindestens 60 min luftgetrocknet und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

3.13.2 Immunhistochemische Färbungen

Vor der Durchführung der spezifischen Färbeprotokolle wurden die verwendeten Gewebeproben aufgetaut (10 min, RT) und in PBS gewaschen (5 min). Bei allen Inkubationsschritten wurden die Proben in einer abgedunkelten Feuchtekammer M920-StainTray™ (Simport, Saint-Mathieu-de-Beloeil, Kanada) aufbewahrt und mit Parafilm® (Merck, Darmstadt) bedeckt um eine gleichmäßige Verteilung der Flüssigkeiten zu gewährleisten. Die Waschschrte erfolgten mit Hilfe des M900-EasyDip™ Systems (Simport, Saint-Mathieu-de-Beloeil, Kanada). Bei den Negativ-Kontrollen wurden die gleichen Arbeitsschritte durchgeführt jedoch ohne die Verwendung von Primär-Antikörpern. Die verwendeten Antikörper sind Tabelle 13 zu entnehmen. Bei allen Inkubationsschritten wurde ein Volumen von 200 µl pro Objektträger aufgetragen.

Tabelle 13: Verwendete immunhistologische Primär- und Sekundärantikörper. AF= Alexa Fluor, Iba1 = „ionized calcium-binding adapter molecule 1“, OHG = Hydroxyguanosin.

	Ziel	Hersteller	Stock-Konzentration	Verdünnung
Primär-antikörper	Rabbit Anti-Mouse Iba1	Wako, Neuss	0,5 mg/ml	1:500
	Rat Anti-Mouse CD45	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	0,5 mg/ml	1:100
	Fluoromyelin		300 x	1:300
	Mouse Anti 8-OHG*	Abcam, Cambridge, UK	0,1 mg/ml	1:1000
*Antikörper ist spezieunabhängig				
Sekundär-antikörper	AF-488 Goat Anti-Rat	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	2 mg/ml	1:800
	AF-488 Donkey Anti-Rabbit		2 mg/ml	1:800
	AF-555 Goat Anti-Mouse		2 mg/ml	1:800

3.13.2.1 Fluoromyelin-Färbung

Die Gewebeproben wurden in 1,5 % PFA/PBS nachfixiert (20 min, RT) und anschließend mit PBS gewaschen (3x 5 min). Die Permeabilisierung erfolgte durch die Inkubation mit PBS-T (20 min, RT). Für die Blockierung von unspezifischen Antikörperbindestellen wurden die Proben mit 5 % BSA/PBS-T inkubiert (20 min, RT). Der Fluoromyelin-Red Antikörper wurde in PBS-T verdünnt und auf den Gewebeschnitten inkubiert (20 min, RT). Anschließend wurden die Proben mit PBS gewaschen (3x 10 min). Zur Markierung der Zellkerne wurden die Proben in einer 4'6-Diamidin-Phenylindol (DAPI)-Lösung (c = 1 µg/ml) inkubiert (10 min, RT). Nach abgeschlossener Inkubation wurden die Schnitte erneut mit PBS gewaschen (2x 10 min). Abschließend wurden die Gewebeschnitte mit Fluoromount überschichtet und somit die Deckgläser auf den Objektträgern fixiert. Die Proben wurden luftgetrocknet (Dunkelheit, ü.N.) und anschließend bei 4°C gelagert.

3.13.2.2 8-OHG Färbung

Die Gewebeproben wurden zunächst in einer 0,03 % H₂O₂/Methanol-Lösung inkubiert (20 min, RT) und anschließend mit PBS gewaschen (2x 5 min). Die Blockierung der unspezifischen Antikörperbindestellen erfolgte wie unter 3.13.2.1 beschrieben. Der Antikörper gegen 8-OHG wurde in PBS-T verdünnt und mit den Gewebeschnitten inkubiert (4°C, ü.N.). Am darauf folgenden Tag wurden die Proben mit PBS-T gewaschen (2x 5 min) und mit dem sekundären Antikörper AF-555 Goat Anti-Mouse inkubiert (2 h, RT). Daraufhin wurden die Schnitte erneut mit PBS-T gewaschen (2x 10 min). Die DAPI-Färbung der Zellkerne und die darauf folgende Aufbewahrung der Proben erfolgte wie unter 3.13.2.1 beschrieben.

Bei der 8-OHG Kolokalisation wurden die Schnitte wie beschrieben mit einer 0,03 % H₂O₂/Methanol-Lösung behandelt, die unspezifischen Antikörperbindestellen blockiert und 8-OHG mit Primär- und Sekundärantikörper gefärbt. Nach abgeschlossener Inkubation mit dem AF-555 Goat Anti-Mouse Antikörper wurden die Schnitte mit PBS-T gewaschen (3x 5 min). Anschließend wurden die Proben mit den zelltypspezifischen Antikörpern (Iba1, CD45), verdünnt in 1 % BSA/PBS-T, inkubiert (4°C, ü.N.) Am folgenden Tag wurden die Proben mit PBS gewaschen (2x 5 min) und mit den entsprechenden sekundären Antikörpern (AF-488 Goat Anti-Rat oder AF-488 Donkey Anti-Rabbit) inkubiert (2 h, RT). Anschließend wurden die Zellen mit PBS-T gewaschen (2x 10 min), die Zellkerne mit DAPI gefärbt und die Schnitte mit Fluoromount überschichtet (Methode siehe 3.13.2.1).

3.13.3 Mikroskopie

Die Aufnahmen der Gewebeproben erfolgten mit dem DMI8 Fluoreszenzmikroskop (Leica, Nussloch). Dabei wurde die Belichtungszeit anhand der Negativkontrollen eingestellt und für die darauffolgenden Aufnahmen beibehalten. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mit Hilfe der Leica Application Suite X Software (Version 3.3, Leica, Nussloch). Kontrast und Sättigung wurde dabei für alle verwendeten Aufnahmen eines Versuchs einheitlich verwendet.

3.14 Isolation CD14⁺-Zellen aus humanem Blut

Humane CD14⁺-Zellen wurden aus frischen Vollblutproben mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation und dem MACS-System isoliert. In Vorbereitung darauf wurden pro Blutprobe 3 SepMate®-50 Dichtegradientenzentrifugations-Röhrchen mit jeweils 15 ml Biocoll befüllt und zentrifugiert (300 g, 5 min, RT). Die Blutproben wurden 1:1 mit HBSS vermischt und gleichmäßig auf die SepMate® Röhrchen aufgeteilt. Es folgte eine Zentrifugation (1200 g, 10 min, RT). Durch die dabei auftretende Auftrennung der unterschiedlichen Zellschichten entlang des Dichtegradienten konnten die PBMCs von den übrigen Bestandteilen des Bluts getrennt werden („Buffy-Coat“).

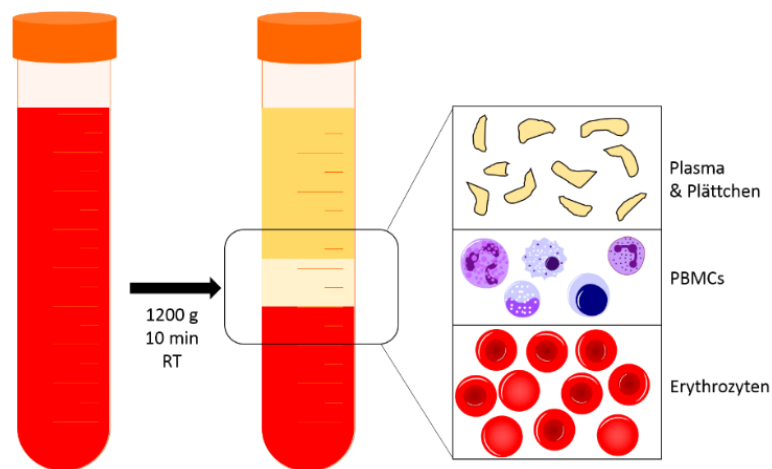


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Prinzips der Dichtegradientenzentrifugation. Frisches humanes Vollblut wurde in SepMate®-50 Tubes, gefüllt mit 15 ml Biocoll, überführt und zentrifugiert (1200 g, 10 min, RT). Das Blutplasma sowie die Blutplättchen sammelten sich dabei in der obersten Schicht während die Erythrozyten in der untersten Schicht akkumulierten. Zwischen diesen beiden Schichten befindet sich eine Schicht welche als „Buffy Coat“ bezeichnet wird. In dieser befinden sich die PBMCs welche für den weiteren Versuchsablauf weitergeführt wurden.

Die PBMCs wurden gewaschen (4x 47,5 ml 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)/PBS) und anschließend in MACS-Puffer aufgenommen. Die Zellkonzentration wurde mit Hilfe eines Durchflusszytometers bestimmt und auf eine Konzentration von $1,25 \cdot 10^8$ Zellen/ml eingestellt. Die Aufreinigung der CD14⁺-Zellen erfolgte mit Hilfe des MACS-Systems. Zur Markierung der CD14⁺-Zellen wurden 200 μ l CD14-MicroBeads pro $1 \cdot 10^8$ Zellen dazugegeben und inkubiert (15 min, 4°C). Anschließend wurden die Zellen mit 40 ml MACS-Puffer gewaschen und jeweils $2 \cdot 10^8$ Zellen in 500 μ l MACS-Puffer aufgenommen. Für die Isolation der markierten CD14⁺-Zellen wurden zunächst die verwendeten LS Säulen an einem Magneten befestigt und mit 3 ml MACS-Puffer gespült. Anschließend wurden die Proben auf die Säulen aufgetragen und diese mit MACS-Puffer gespült (5x 3 ml). Die mittels magnetischer Beads markierten CD14⁺-Zellen wurden in den LS Säulen zurück gehalten während die übrigen Zellen ausgewaschen wurden.

Abschließend wurden die LS Säulen vom Magneten entfernt und die CD14⁺-Zellen mit 5 ml MACS-Puffer ausgewaschen. Diese wurden anschließend für weitere Versuche verwendet nachdem die Zellzahl mit Hilfe eines Durchflusszytometers ermittelt wurde. Zur Kontrolle der CD14⁺-Zell-Aufreinigung wurden Proben vor und nach der Isolation entnommen und wie unter 3.9.3 beschrieben am Durchflusszytometer analysiert.

3.15 Bestimmung der Zellviabilität mittels OranguTM-Assay

Zur Ermittlung der Zellviabilität isolierter humaner Monozyten, Makrophagen sowie Dendritischer Zellen wurde der OranguTM Zellviabilitäts-Assay verwendet. Dieser beruht auf der Reduktion von WST-8, einem gelben, wasserlöslichen Tetrazoliumsalz, in das wasserunlösliche Formazan. Dabei kommt es zu einem Farbumschlag von gelb zu blauviolett, welcher an einem EnSpire® 2300 Multimode Plate Reader (Perkin Elmer, Lübeck) quantifiziert wurde. Die Menge des umgesetzten Farbstoffs ist dabei direkt proportional zu der Anzahl an viablen Zellen.

Die Durchführung des Assays erfolgte nach Angaben des Herstellers: Nach der Isolation der CD14⁺-Zellen (Methode siehe 3.14) wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen/Well in 96-Well Platten ausgesät und mit den unterschiedlichen Konzentrationen von Vehikel (DMSO) oder der jeweiligen Testsubstanz behandelt. Die DMSO-Konzentration lag dabei bei der maximal verwendeten Konzentration der Testsubstanz. Nach einer Inkubation (30 min, 37°C, 5 % CO₂) wurden die Differenzierungsfaktoren hinzugegeben (siehe Tabelle 14) und die Wells auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt. Die Dauer der darauffolgenden Inkubation (37°C, 5 % CO₂) war von den jeweiligen Zelltypen abhängig (siehe Tabelle 14). Nach abgeschlossener Inkubation wurden 10 µl OranguTM-Lösung pro Well hinzugegeben und die Zellen weiter inkubiert (120 min, 37°C, 5 % CO₂). Vor der Messung am EnSpire® 2300 Multimode Plate Reader (Perkin Elmer, Lübeck), bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Referenz von 650 nm, wurde die Platte auf einem Vortexschüttler MS3 Basic (IKA, Staufen) geschüttelt (5 min, 500 rpm). Bei der Auswertung wurden die Absorptionswerte von purem Zellkulturmedium bzw. Zellkulturmedium mit gleichartigen Wirkstoffkonzentrationen von den Werten der jeweilig gleichbehandelten Zellen subtrahiert und die korrigierten Werte der unterschiedlichen Behandlungen in ein Verhältnis zu unbehandelten Zellen gesetzt.

Tabelle 14: Konditionen der humanen Immunzellendifferenzierung. Dargestellt ist die Inkubationsdauer sowie die verwendeten Differenzierungsfaktoren für die Differenzierung humaner Monozyten, Makrophagen sowie Dendritischer Zellen. Das Zellkulturmedium der Makrophagen wurde nach 3 Tagen vollständig erneuert.

	Inkubationsdauer	Differenzierungsfaktoren
Monozyten	2 d	Keine
Makrophagen	7 d	hu_GM-CSF (10 ng/ml)
Dendritische Zellen	5 d	hu_GM-CSF (10 ng/ml) hu_IL-4 (10 ng/ml)

3.16 Differenzierung humaner Makrophagen

Zur Untersuchung verschiedener Testsubstanzen auf ihre Auswirkungen bezüglich der Differenzierung von humanen Makrophagen wurden zunächst CD14⁺-Zellen wie unter 3.14 beschrieben isoliert. Die Kultivierung erfolgte in 48-Well Platten mit einer Zellzahl von $5 \cdot 10^5$ Zellen in einem Endvolumen von 500 μ l pro Well. Dafür wurden die zuvor isolierten CD14⁺-Zellen in Zellkulturmedium aufgenommen und als Triplikate in die Wells gefüllt. Anschließend wurde die zu untersuchende Testsubstanz oder Vehikel (DMSO) in den entsprechenden Konzentrationen hinzugegeben und die Zellen in einem Brutschrank inkubiert (30 min, 37°C, 5 % CO₂). Die verwendeten Konzentrationen des Vehikels glichen dabei der niedrigsten sowie der höchsten verwendeten Konzentration der Testsubstanz. Nach abgeschlossener Inkubation wurde hu_GM-CSF (Endkonz. = 10 ng/ml) hinzugegeben und die Zellen für weitere 7 Tage inkubiert. Parallel dazu wurden $2 \times 2 \cdot 10^5$ Zellen für die Analyse am Durchflusszytometer (Methode siehe 3.9.4) verwendet um einen Grundwert für die jeweiligen Differenzierungsmarkern zu erhalten. Damit konnte durch den Vergleich mit den Proben am 7. Tag der Erfolg der Differenzierung überprüft werden. Am dritten Tag wurde das Zellkulturmedium abgenommen und durch frisches Zellkulturmedium mit hu_GM-CSF und den entsprechenden Testsubstanzen ersetzt. Nach der 7-tägigen Inkubation wurde das Zellkulturmedium abgenommen, zentrifugiert (500 g, 5 min, RT) und der Überstand bei -80°C gelagert. Dieser wurde zu einem späteren Zeitpunkt für die Bestimmung der Chemo- und Zytokine verwendet (Methode siehe 3.12.2). Die Zellen wurden mit 200 μ l PBS gewaschen und anschließend mit 100 μ l Accutase pro Well inkubiert (15 min, 37°C, 5 % CO₂). Nach abgeschlossener Inkubation wurde 400 μ l Zellkulturmedium hinzugegeben, die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der 48-Well Platte gelöst und in Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde die Zellzahl der Proben am Durchflusszytometer bestimmt und die Zellen wie unter 3.9.4 beschrieben gefärbt und analysiert.

3.17 Polarisierung humaner Makrophagen

Bei der Polarisierung der Makrophagen wurde zwischen M1-Polarisation sowie M2-Polarisation unterschieden. Die Unterschiede betrafen die Dauer der Inkubationszeiten sowie die verwendeten Stimulanzen. Die unterschiedlichen Polarisierungsprotokolle dienten zur jeweils verstärkten Ausprägung des M1- bzw. des M2-Makrophagenphänotyps.

Ähnlich wie bei der Differenzierung von Makrophagen (Methode siehe 3.16) wurden für die Polarisation CD14⁺-Zellen verwendet, welche zuvor aus humanen PBMCs isoliert wurden (Methode siehe 3.14). Diese wurden in einer definierten Zellzahl, welche abhängig von der Anzahl der zu untersuchenden Testsubstanzen bei der anschließenden Differenzierung war, in T75-Flaschen mit 22,5 ml Zellkulturmedium für 7 Tage inkubiert (37°C, 5 % CO₂). Das Zellkulturmedium wurde zusätzlich mit hu_GM-CSF (Endkonz. = 10 ng/ml, bei M1-Polarisierung) bzw. hu_M-CSF (Endkonz. = 50 ng/ml, bei M2-Polarisierung) versetzt. Nach abgeschlossener Inkubation wurde das Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 5 ml Accutase inkubiert (15 min, 37°C, 5 % CO₂). Anschließend wurden 15 ml Zellkulturmedium hinzugegeben, die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und die Zellzahl am Durchflusszytometer bestimmt. Die Differenzierung der zuvor polarisierten Zellen erfolgte wie unter 3.16 beschrieben, jedoch mit dem Unterschied, dass nach der ersten Inkubation für 30 min die Zellen nicht mit hu_GM-CSF stimuliert wurden sondern mit IFN- γ (Endkonz. = 20 ng/ml, bei vorheriger M1-Polarisation) bzw. hu_IL-4 (Endkonz. = 10 ng/ml, bei vorheriger M2-Polarisation). Die anschließenden Inkubationszeiten betragen bei zuvor M1-polarisierten Zellen 24 h und bei zuvor M2-polarisierten Zellen 48 h. Nach abgeschlossener Inkubation wurden die Zellen geerntet (Methode siehe 3.16) und am Durchflusszytometer analysiert (Methode siehe 3.9.4).

3.18 Differenzierung humaner Dendritischer Zellen

Für die Differenzierung humaner Dendritischer Zellen wurden zuvor isolierte CD14⁺-Zellen in 48-Well Platten mit einer Zellzahl von $9 \cdot 10^5$ Zellen in einem Endvolumen von 500 μ l pro Well in Triplikaten kultiviert. Nach Zugabe der Testsubstanzen in den jeweiligen Konzentrationen wurden die Zellen inkubiert (30 min, 37°C, 5 % CO₂). Anschließend wurde hu_GM-CSF (Endkonz. = 10 ng/ml) und hu_IL-4 (Endkonz. = 10 ng/ml) hinzugefügt und die Zellen für 5 Tage inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubation wurden die Zellen zentrifugiert (500 g, 5 min, RT), das Zellkulturmedium abgenommen und für weitere Analysen bei -80°C gelagert. Die Zellen wurden mit 200 μ l PBS pro Well gewaschen und erneut zentrifugiert (500 g, 5 min, RT). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen geerntet (Methode siehe 3.16) und am Durchflusszytometer analysiert (Methode siehe 3.9.5).

3.19 Aktivierung humaner Dendritischer Zellen

Für die Aktivierung Dendritischer Zellen wurden $1,5 \cdot 10^7$ isolierte CD14⁺-Zellen (Methode siehe 3.14) in 20 ml Zellkulturmedium mit hu_GM-CSF (Endkonz. = 50 ng/ml) sowie hu_IL-4 (Endkonz. = 50 ng/ml) aufgenommen und in T75-Zellkulturflaschen für 5 Tage kultiviert (37°C, 5 % CO₂). Nach abgeschlossener Inkubation wurde das Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml Accutase abgelöst (Methode siehe 3.16). Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden $9 \cdot 10^5$ Zellen pro Well in Triplikaten in 48-Well Platten ausgesät. Die Testsubstanzen wurden hinzugefügt und die Zellen inkubiert (30 min, 37°C, 5 % CO₂). Anschließend wurde hu_TNF- α , hu_IL-6, hu_IL1- β (Endkonz. = 5 ng/ml) sowie PGE2 (Endkonz. = 500 ng/ml) hinzugefügt. Die Zellen wurden für 24 h inkubiert (37°C, 5 % CO₂), anschließend geerntet (Methode siehe 3.16) und am Durchflusszytometer analysiert (Methode siehe 3.9.5).

3.20 Energiestoffwechsel-Charakterisierung von humanen Immunzellen

Um den Einfluss neuer Wirkstoffkandidaten auf den Energiestoffwechsel humaner Immunzellen zu untersuchen wurde der Sauerstoffverbrauch (OCR) sowie die extrazelluläre Azidifizierungsrate (ECAR) quantifiziert. Dabei wurde das Seahorse XFe96 FluxPak (Agilent, Waldbronn) verwendet. Zunächst wurden CD14⁺-Zellen isoliert (Methode siehe 3.14) und in XF96 Zellkulturplatten (Agilent, Waldbronn) in Anwesenheit von Differenzierungsfaktoren und den Wirkstoffkandidaten für unterschiedliche Zeiträume (siehe Tabelle 14 und 3.17) differenziert bzw. polarisiert (37°C, 5 % CO₂). Die mit Silvestrol behandelten Makrophagen wurden wie in Tabelle 14 beschrieben differenziert während abweichend dazu die mit Steroid Substanz 1 α behandelten Makrophagen für 7 Tage zu M1- bzw. M2-Makrophagen differenziert und anschließend polarisiert wurden (Methode siehe 3.17). Die Zellzahl pro Well betrug dabei $3 \cdot 10^4$ Zellen und alle Konditionen wurden in 7- bis 8-fach Bestimmung angelegt. Am Tag vor der Messung wurde die XFe96 Sensor Kartusche (Agilent, Waldbronn) mit 200 μ l Kalibrierungslösung ü.N. bei 37°C ohne CO₂ inkubiert.

Nach der abgeschlossenen Differenzierung wurde die XF96 Zellkulturplatte zentrifugiert (300 g, 5 min), der Überstand verworfen und die Wells mit 180 μ l Seahorse-Medium gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (300 g, 5 min) wurden die Zellen in 180 μ l Seahorse-Medium aufgenommen und für 60 min bei 37°C ohne CO₂ inkubiert. Zeitgleich wurde die XFe96 Sensor Kartusche mit unterschiedlichen Stimulationslösungen beladen (siehe Tabelle 15) und damit der Seahorse XFe96 Analyzer (Agilent, Waldbronn) kalibriert. Nach abgeschlossener Inkubation der XF96 Zellkulturplatte wurde diese in das Messgerät transferiert und die Messung begonnen. Dabei wurden OCR sowie ECAR über einen Zeitraum von 160 min in Intervallen von ca. 6 min gemessen.

Eine zusätzliche Stimulation der Monozyten, der Dendritischen Zellen sowie der mit Silvestrol behandelten Makrophagen erfolgte nach 30 min. Die mit Steroid Substanz 1 α polarisierten Makrophagen wurden nach 30 min nicht zusätzlich stimuliert, da die Stimulanzen bereits während der Polarisierung im Zellkulturmedium vorhanden waren. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Seahorse Wave Desktop Software (Agilent, Waldbronn).

Tabelle 15: Energiestoffwechsel-Stimulation von humanen Immunzellen.

Zelltyp	Stimulationslösung	Konzentration
Monozyten	LPS	100 ng/ml
	IFN- γ	20 ng/ml
Makrophagen	IFN- γ	20 ng/ml
	hu_IL-4	10 ng/ml
Polarisierte Makrophagen	Keine zusätzliche Stimulation	
Dendritische Zellen	TNF- α	5 ng/ml
	IL-6	5 ng/ml
	IL-1 β	5 ng/ml
	PGE2	500 ng/ml

3.21 Graphische Darstellung und Statistik

Die graphische Darstellung sowie die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe der Software Graph Pad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Die verwendeten statistischen Tests sowie die Signifikanzniveaus sind in den jeweiligen Abbildungsunterschriften angegeben. Für die Erstellung eigener Schemata wurden Elemente des Biomedical PPT-Toolkit (Motifolio, Ellicott City, MD, USA) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des Naturstoffs Phytol

4.1.1 Verringerte Demyelinisierung durch Phytol

Die Gabe von Phytol reduzierte die klinischen Symptome im murinen EAE-Modell im Vergleich zwischen Phytol- und Standard-Diät (Blum et al., 2018b). Aus diesem Grund wurde der damit zusammenhängende Vorgang der Demyelinisierung in diesen Tieren untersucht. In der akuten Phase des Krankheitsverlaufs (Tag 16) konnte durch immunhistologische Untersuchungen eine deutlich vorangeschrittene Demyelinisierung im lumbalen Rückenmark von Tieren mit Standard-Fütterung festgestellt werden (Abbildung 10). Zusätzlich konnte mittels DAPI-Färbung ein vermehrtes Auftreten von Zellen in den Randgebieten des lumbalen Rückenmarks beobachtet werden. In EAE-Tieren mit Phytol-Fütterung war die Demyelinisierung hingegen deutlich verringert und es konnte mittels DAPI-Färbung kein verstärktes Zellvorkommen im lumbalen Rückenmark detektiert werden. Die immunhistologischen Ergebnisse spiegeln die verringerten klinischen Symptome in der Gruppe der EAE-Tiere mit Phytol-Diät wieder und untermauern den postulierten positiven Einfluss von Phytol auf den Krankheitsverlauf (Blum et al., 2018b).

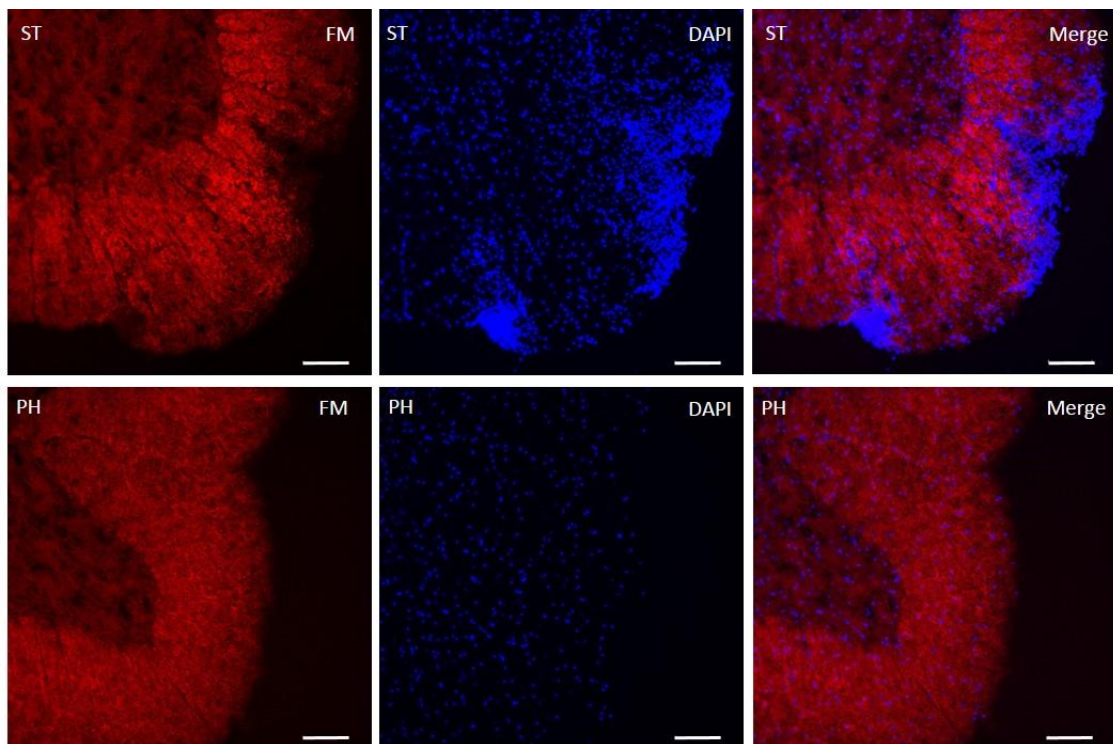


Abbildung 10: Färbung der Myelinschicht des murinen lumbalen Rückenmark. Die Gewebeschnitte stammen von EAE-Tieren mit Standard- (ST, obere Reihe) oder Phytol-Fütterungen (PH, untere Reihe) am Tag 16 nach EAE-Induktion. Abgebildet sind die Färbungen mit Fluoromyelin (FM, linke Spalte), DAPI (mittlere Spalte) sowie FM und DAPI (rechte Spalte). Gezeigt sind repräsentative Bilder. Messbalken = 100 μ m. Vergrößerung = 100x.

4.1.2 Phytol reduziert die Anzahl der murinen Immunzellen

Die Reduktion der gezeigten klinischen Scores (Blum et al., 2018b) sowie die immunhistologischen Untersuchungen (Abbildung 10) legten eine reduzierte Anzahl an Zellen im lumbalen Rückenmark von EAE-Tieren mit Phytol-Fütterung nahe. Die Infiltration von Immunzellen in das ZNS ist ein elementarer Bestandteil des Krankheitsverlaufs, da diese eine fortlaufende Inflammation, die Schädigung der Oligodendrozyten sowie die Degradation der Myelinschicht initiiert. Aus diesen Gründen wurde die Anzahl der Immunzellen im lumbalen Rückenmark sowie in den inguinalen Lymphknoten mittels durchflusszytometrischer Analyse genauer quantifiziert (Methode siehe 3.9.1). Die hier dargestellten Daten beruhen teilweise auf Vorarbeiten sowie gemeinsamen Arbeiten mit Dr. Nadja Tafferner (Blum et al., 2018b). Dabei wurde die Anzahl der relevanten Immunzellen (T-Zellen, Neutrophile sowie Makrophagen) im Verhältnis zum Organgewicht bestimmt (Abbildung 11). Im lumbalen Rückenmark zeigte sich eine signifikante Reduktion von T-Zellen, Neutrophilen und Makrophagen während der Initiationsphase der Erkrankung (Tag 12/14) bei Tieren mit Phytol-Fütterung. Zu diesem Zeitpunkt konnte die höchste Anzahl an Immunzellen in Tieren mit Standard-Fütterung detektiert werden. Während der akuten Phase der Erkrankung (Tag 16) war bereits in beiden Gruppen eine deutliche Reduktion der Immunzellen zu verzeichnen und die Unterschiede zwischen den beiden Diäten waren nicht signifikant. In den inguinalen Lymphknoten erreichte die Anzahl der detektierten Zellen dagegen erst während der akuten Phase (Tag 16) ihren Höhepunkt. Zu diesem Zeitpunkt reduzierte die Gabe von Phytol die Anzahl der T-Zellen, Neutrophilen und Makrophagen signifikant. Zu den früheren Zeitpunkten konnten weniger Immunzellen detektiert werden und keine signifikanten Unterschiede zwischen den Diäten ermittelt werden. Des Weiteren wurden die Immunzellen im Blut sowie in der Leber der EAE-Tiere untersucht. Dabei konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (Daten nicht dargestellt). Die Reduktion der Immunzellen durch die Phytol-Behandlung steht somit im Einklang mit den immunhistologischen Beobachtungen sowie dem klinischen Krankheitsverlauf.

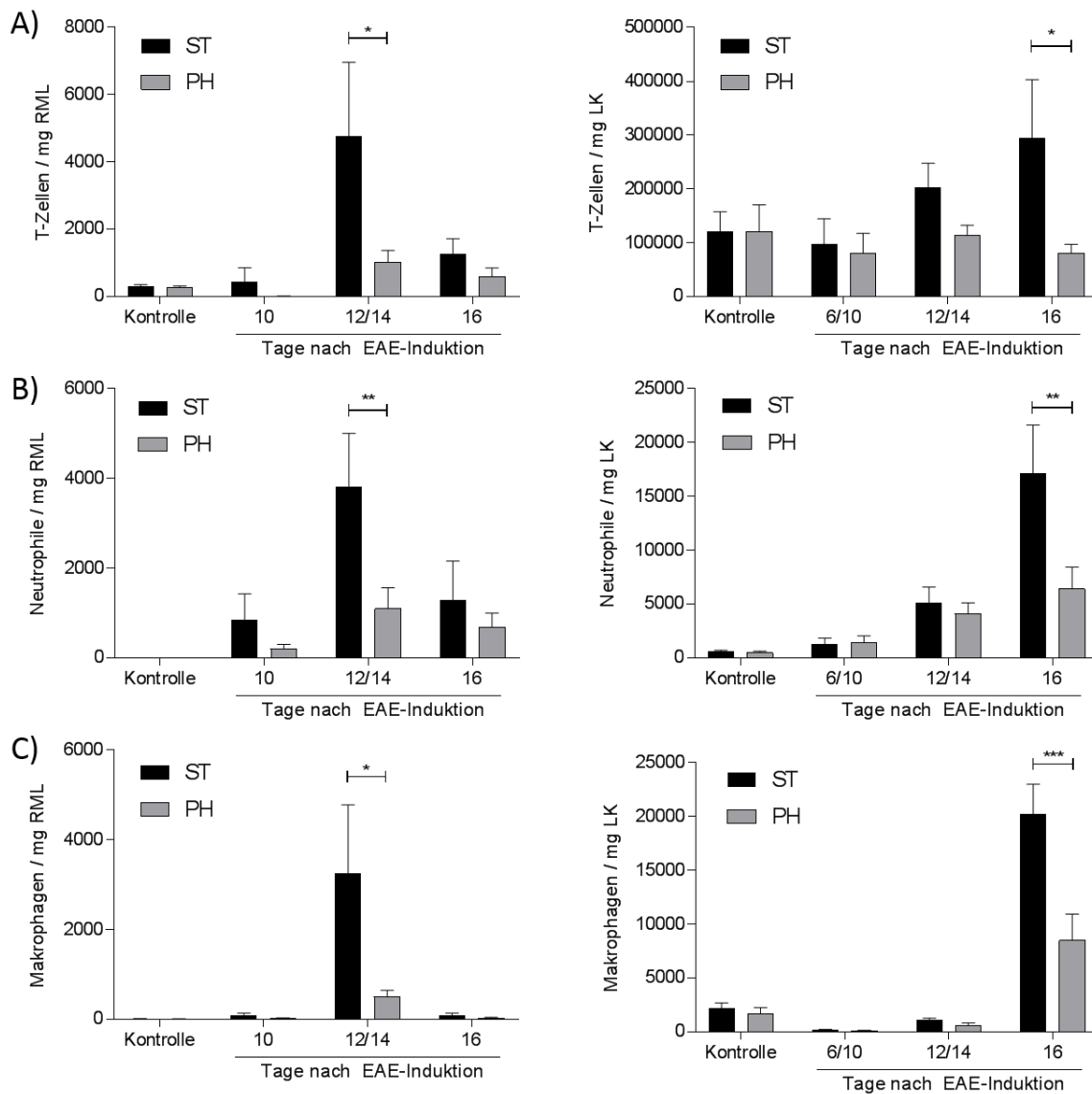


Abbildung 11: Einfluss von Phytol auf die murine Immunzellverteilung. Dargestellt ist die Anzahl an T-Zellen (A), Neutrophilen (B) und Makrophagen (C) im lumbalen Rückenmark (RML, linke Spalte) und in den inguinalen Lymphknoten (LK, rechte Spalte) von EAE-Tieren mit Standard (ST)- oder Phytol-Diät (PH) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der EAE-Induktion. Als Kontrollen wurden gesunde gleichaltrige Geschwistertiere verwendet. Die Zellzahl / mg Organgewicht wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten ($n(\text{Kontrolle})=6$, $n(6/10 \text{ Tage})=6$, $n(10 \text{ Tage})=3$, $n(12/14 \text{ Tage})=6$, $n(16 \text{ Tage})=3-6$). Signifikanzen ermittelt über 2-Way-ANOVA mit Hohn-Sidak post hoc Korrektur. * $p \leq 0,05$. ** $p \leq 0,01$. *** $p \leq 0,001$. Es wurden nur Vergleiche zwischen den unterschiedlichen Diäten zu denselben Zeitpunkten gezogen.

4.1.3 Einfluss von Phytol auf murine T-Zell-Transkriptionsfaktoren und Zytokine

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zeigten einen Einfluss von Phytol auf die Anzahl der Immunzellen, insbesondere der T-Zellen (Abbildung 11). Da T-Zellen für den Pathomechanismus von entscheidender Rolle sind, wurde der mögliche Einfluss von Phytol auf spezifischen T-Zell-Subtypen auf mRNA-Ebene im lumbalen Rückenmark sowie in den

inguinalen Lymphknoten während der Initiationsphase (Tag 14) sowie der akuten Phase (Tag 16) untersucht (Methoden siehe 3.6 - 3.8). Dafür wurde die mRNA-Expression von Transkriptionsfaktoren spezifisch für die Subtypen T_{reg} (Foxp3), T_H1 (T-Bet), T_H17 (ROR- γ t) und T_H2 (GATA3) sowie die entsprechend sezernierten Zytokine IL-10, IFN- γ , IL-17 sowie IL-4 detektiert (Abbildung 12). Die hier dargestellten Daten beruhen teilweise auf Vorarbeiten sowie gemeinsamen Arbeiten mit Dr. Nadja Tafferner (Blum et al., 2018b). In den inguinalen Lymphknoten war der Transkriptionsfaktor T-Bet signifikant reduziert. Die Expression von IL-17 war hingegen durch die Phytol-Diät signifikant gesteigert. Diese beiden Unterschiede in den Expressionsleveln konnten nur an Tag 14 detektiert werden. Während der akuten Phase (Tag 16) war das anti-inflammatorische Zytokine IL-4 signifikant erhöht und IL-10 reduziert. Im lumbalen Rückenmark zeigte der Vergleich zwischen Standard- und Phytol-Diät eine signifikante Reduktion der Transkriptionsfaktoren Foxp3 sowie T-Bet zu beiden untersuchten Zeitpunkten. Interessanterweise war IFN- γ ebenfalls zu beiden Zeitpunkten signifikant durch die Gabe von Phytol reduziert.

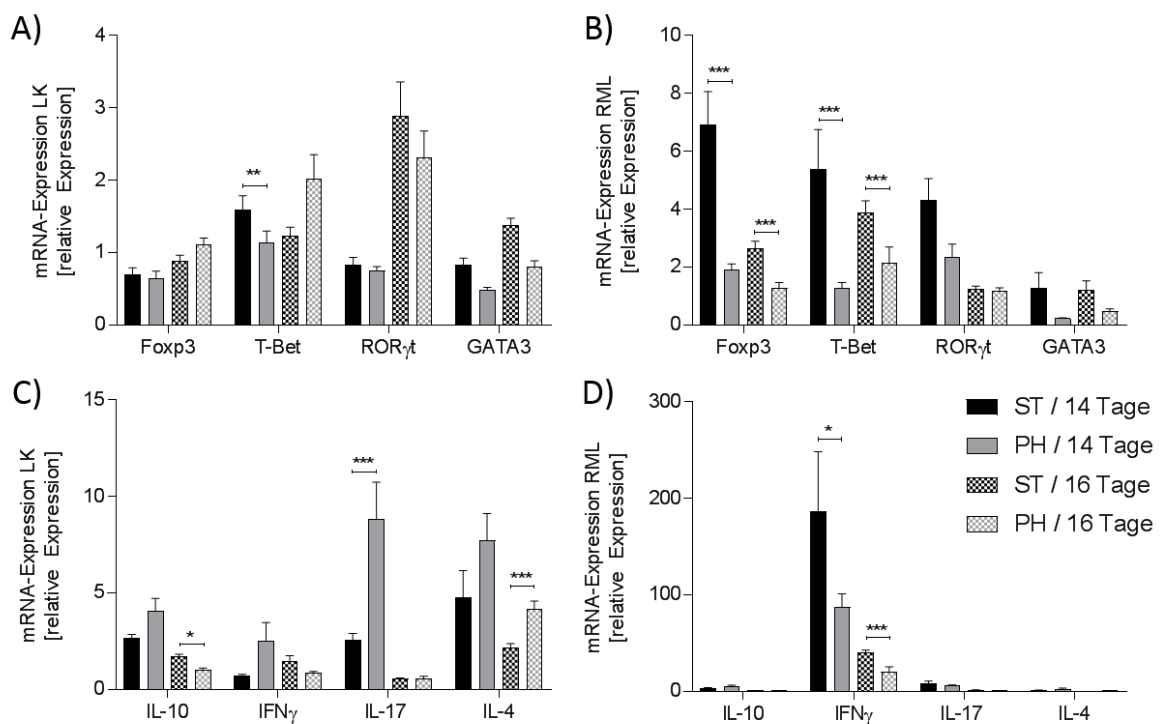


Abbildung 12: Einfluss von Phytol auf die Expression muriner Transkriptionsfaktoren und Zytokine. Abgebildet sind die relativen mRNA-Expressionen von spezifischen Transkriptionsfaktoren (A/B) sowie deren Zytokine (C/D) in den inguinalen Lymphknoten (LK, A/C) und im lumbalen Rückenmark (RML, B/D) von EAE-Tieren mit Standard- (ST) oder Phytol-Diät (PH) am Tag 14 und 16 nach EAE-Induktion. Die mRNA-Level wurden auf das „housekeeping gen“ PPIA normalisiert und auf die Expressionslevel von gesunden Kontrolltieren des selben Alters bezogen (n(Kontrolltiere ST)=7-11, n(Kontrolltiere PH)=5). mRNA-Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Anzahl der EAE-Tiere pro Gruppe betrug 3-9. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen wurden mittels multiplem t-Test mit Holm-Sidak post hoc Test ermittelt. Dargestellt sind die signifikanten Unterschiede zwischen ST- und PH-Diät zu denselben Zeitpunkten. * $p \leq 0,05$. ** $p \leq 0,01$. *** $p \leq 0,001$.

4.1.4 Phytansäure reduziert die Proliferationsfähigkeit von murinen T-Zellen

Da eine reduzierte Anzahl an T-Zellen sowohl in den inguinalen Lymphknoten als auch im lumbalen Rückenmark detektiert wurde (Abbildung 11) und eine reduzierte Proliferationsfähigkeit von isolierten Splenozyten aus EAE-Tieren mit Phytol-Diät beschrieben ist (Blum et al., 2018b), folgte die Untersuchung der Proliferationsfähigkeit von isolierten T-Zellen *ex vivo* mit Behandlung der beiden Metaboliten von Phytol (Phytan- und Pristansäure), um zu ermitteln auf welchen der beiden Metaboliten der Effekt zurückzuführen ist. Dafür wurden T-Zellen aus der Milz isoliert, restimuliert und ihre Proliferationsfähigkeit mit einem BrdU-Assay quantifiziert (Methoden siehe 3.10 & 3.11). Phytansäure reduzierte die Proliferationsfähigkeit der stimulierten T-Zellen signifikant während Pristansäure keinen signifikanten Unterschied zur stimulierten Kontrolle zeigte (Abbildung 13). Die hier dargestellten Daten beruhen teilweise auf Vorarbeiten sowie gemeinsamen Arbeiten mit Dr. Nadja Tafferner (Blum et al., 2018b).

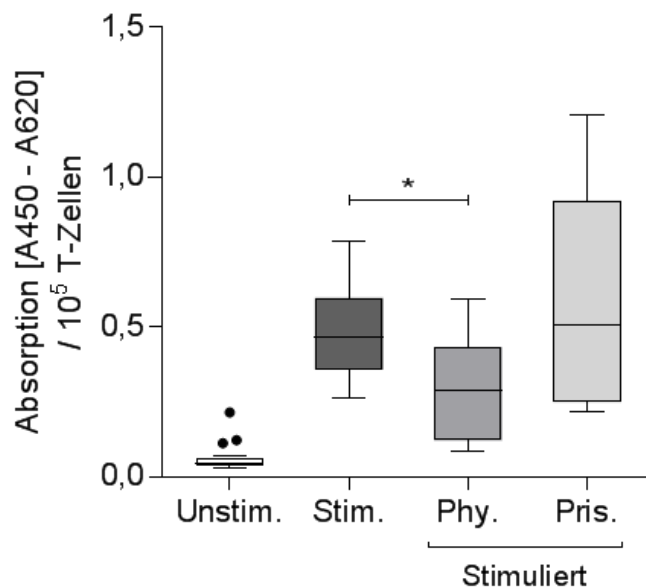


Abbildung 13: Proliferationsfähigkeit stimulierter T-Zellen *ex vivo*. Untersucht wurde der Einfluss von Phytan- (Phy.) sowie Pristansäure (Pris.) auf die T-Zellen von gesunden Wildtyp-Tieren (n=4/Gruppe). Diese wurden aus der Milz isoliert und für 72 h mit CD3/CD28-Beads (4×10^7 Beads/ml) sowie 6 ng/ml IL-2 ohne weitere Stimulation (Stim.) oder zusätzlich in der Anwesenheit von Phytan- oder Pristansäure (jeweils 50 μ M) inkubiert. Unstimulierte T-Zellen (Unstim.) wurden ohne zusätzliche Stimulanzen in Zellkulturmedium inkubiert (siehe Tabelle 11). Die Proliferationsrate wurde mittels des „BrdU Colorimetric Proliferation Assays“ in 5-fach Bestimmung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen zwischen Stimulation und Phytan- bzw. Pristansäure ermittelt über 1-Way-ANOVA mit Holm-Sidak post hoc Test. * $p \leq 0,05$.

4.1.5 Regulation der murinen T-Zell-Subtypen durch Phytan- und Pristansäure

Um zu untersuchen, ob Phytan- bzw. Pristansäure des Weiteren einen Einfluss auf die T-Zell-Subtypen haben, wurden T-Zellen gesunder WT-Tiere isoliert, *ex vivo* mit CD3/CD28-Beads sowie IL-2 in An- und Abwesenheit von Phytan- bzw. Pristansäure stimuliert und mittels Durchflusszytometrie anhand der Oberflächenmarker charakterisiert (Methode siehe 3.9.2). Phytansäure und Pristansäure reduzierten beide die Anzahl der T_H1-Zellen signifikant. Die Anzahl der T_H2-Zellen wurde nur durch Pristansäure signifikant gesteigert. Die Zellzahl von T_{reg}- und T_H17-Zellen wurde nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 14).

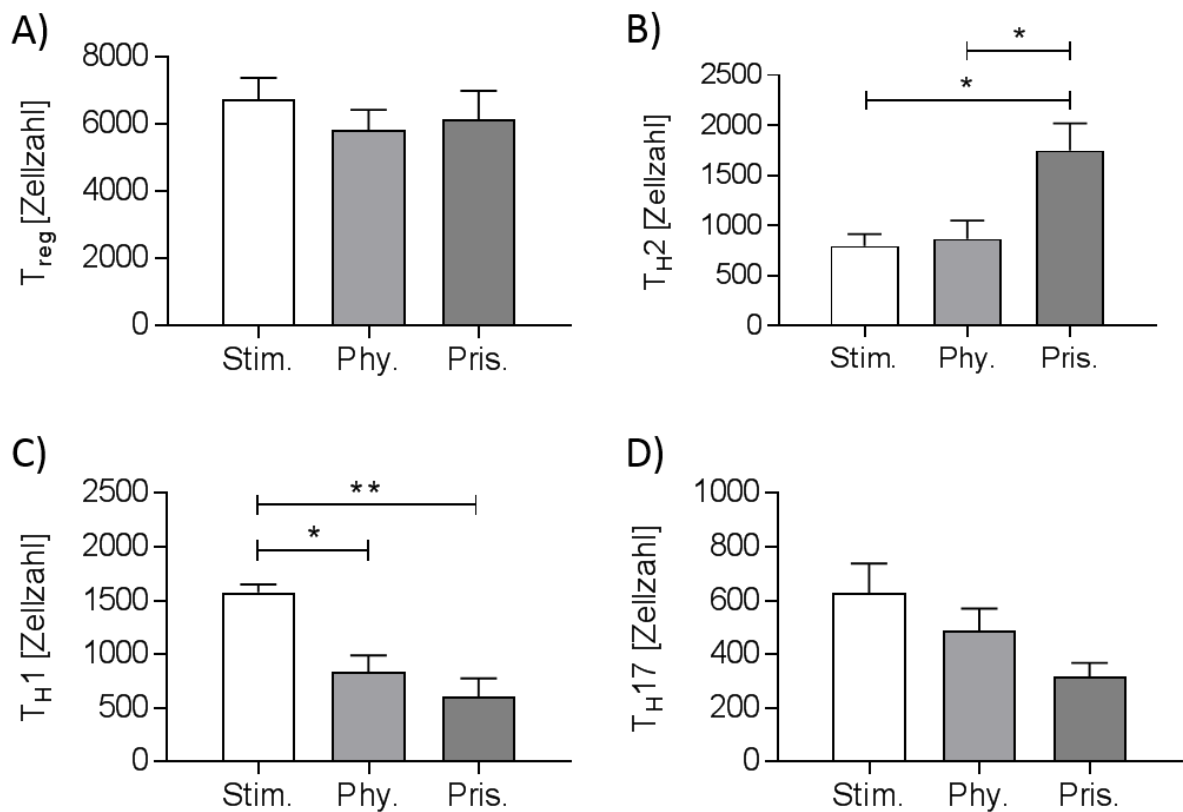


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse von murinen T-Zell-Subtypen. Dargestellt sind die ermittelten Populationen von T_{reg}-, T_H2-, T_H1- sowie T_H17-Zellen von gesunde Wildtyp-Tiere nach 72 h Stimulation mit CD3/CD28-Beads (4×10^7 Beads/ml) sowie 6 ng/ml IL-2 (Stim.) oder zusätzlich in der Anwesenheit von Phytan- (Phy.) oder Pristansäure (Pris.) (jeweils 50 μ M). Messungen erfolgten in 6-facher Ausführung (n=4/Gruppe). T-Zell-Subtypen wurden anhand folgender Marker kategorisiert: T_{reg} (CD3⁺, CD4⁺, IL-10⁺), T_H2 (CD3⁺, CD4⁺, IL-4⁺), T_H1 (CD3⁺, CD4⁺, IFN- γ ⁺), T_H17 (CD3⁺, CD4⁺, IL-17A⁺). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen zwischen stimulierten Zellen (Stim.) und stimulierten Zellen mit zusätzlicher Koinkubation mit Phytan- bzw. Pristansäure ermittelt über ungepaarten t-Test mit Holm Sidak post hoc Test. *p \leq 0,05. **p \leq 0,01.

Zusätzlich wurde der Einfluss von Phytansäure auf die von den unterschiedlichen T-Zell-Subtypen sezernierten Zytokine mittels eines Bead-Arrays untersucht (Methode siehe 3.12). Der Einfluss der Pristansäure wurde nicht weiter untersucht da dies bereits in einer vorherigen Arbeit durchgeführt wurde (Tafferner, 2016). Die Daten der 72 h Stimulation beruhen auf Vorarbeiten sowie gemeinsamen Arbeiten mit Dr. Nadja Tafferner (Blum et al., 2018b). Die Stimulation mit Phytansäure führte zu einer signifikanten Reduktion von IFN- γ nach 48 h (Abbildung 15). Da IFN- γ vorwiegend von T_H1-Zellen sezerniert wird passen die Ergebnisse der Analyse der T-Zell-Subtypen (Reduktion von T_H1-Zellen, Abbildung 14) sowie die Ergebnisse des Bead Arrays zusammen. Bei den übrigen Zytokinen (TNF- α , IL-17A, IL-4, IL-6 sowie IL-10) konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

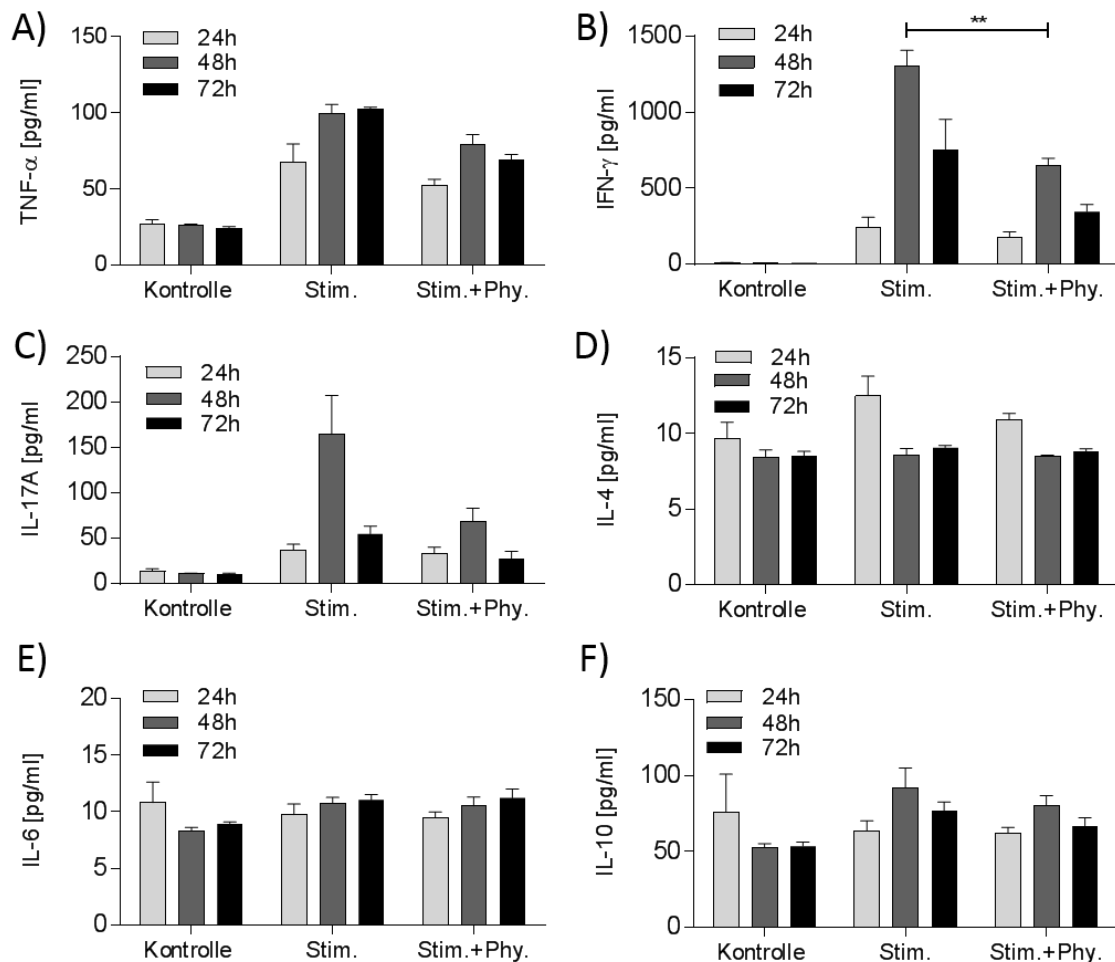


Abbildung 15: Sezernierte Zytokine von murinen Wildtyp-T-Zellen. Quantifiziert wurden die Konzentrationen von TNF- α , IFN- γ , IL-17A, IL-4, IL-6 sowie IL-10 nach 24, 48 oder 72 h Stimulation mit CD3/CD28-Beads (4×10^7 Beads/ml) sowie 6 ng/ml IL-2 (Stim.) oder zusätzlich 50 μ M Phytansäure (Stim. + Phy.). Zytokine wurden im Überstand mit Hilfe des „Zytokin Bead Array Kits“ (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) am Durchflusszytometer detektiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=4/Gruppe und Zeitpunkt). Signifikanzen zwischen den unterschiedlichen Stimulationen zu den gleichen Zeitpunkten ermittelt über 2-Way-ANOVA mit Tukey post hoc Test. **p \leq 0,01.

4.1.6 Reduzierte NOX2 mRNA-Expression im RML von NOX2-Chimären

Die bisherigen Ergebnisse zeigten einen deutlichen Einfluss von Phytol auf den Prozess der Demyelinisierung sowie auf die Verteilung und Funktionalität der murinen Immunzellen. In der Literatur ist eine mögliche Interaktion von Phytol mit dem Membranproteinkomplex NOX2 beschrieben (Sareila et al., 2011). Im Verlauf des murinen EAE-Modells wird die Expression von NOX2 gesteigert. Die Gabe von Phytol reduziert jedoch die gesteigerte mRNA-Expression von NOX2 im lumbalen Rückenmark (Blum et al., 2018b). Aus diesem Grund wurden im Folgenden die möglichen Interaktionen von Phytol mit NOX2 geprüft.

Zunächst wurde analysiert welche Zellen im lumbalen Rückenmark für die Hochregulation von NOX2 auf mRNA-Ebene verantwortlich sind (Blum et al., 2018b). Dafür wurden NOX2-Chimären (NOX2WT-Chimäre sowie NOX2KO-Chimäre) mit Hilfe des Knochenmarkstransplantationsmodells generiert (Methode siehe 3.4).

Die Untersuchung der NOX2 mRNA-Expression im lumbalen Rückenmark bei diesen Tieren während der akuten Phase der Erkrankung zeigte, dass eine ausgeprägte Hochregulation von NOX2 nur in NOX2WT-Chimären stattfand (Abbildung 16). Dies belegt, dass die in der Literatur beschriebene Hochregulation von NOX2 durch die eingewanderten und nicht durch die im ZNS ansässigen Zellen ausgelöst wird.

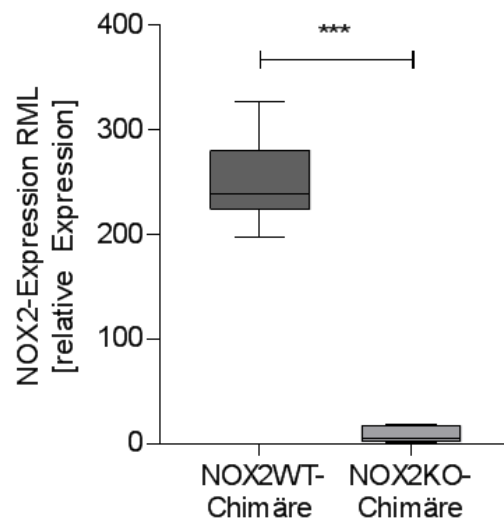


Abbildung 16: Regulation der relativen NOX2 mRNA-Expression in NOX2-Chimären. Die Untersuchungen erfolgten im isolierten lumbalen Rückenmark (RML) von NOX2-Chimären mit Standard-Fütterung während der akuten Phase der EAE. Die NOX2-Chimären wurden durch Röntgen-Bestrahlung und anschließender Knochenmarkstransplantation erzeugt (Methode siehe 3.4). Beim Überschreiten des EAE-Scores 3,0 wurden die Tiere getötet und die mRNA aus dem lumbalen Rückenmark isoliert. Die relative NOX2 mRNA-Expression wurde mittels qPCR in Triplikaten ermittelt und auf das „housekeeping gen“ PPIA normalisiert. Die relative Expression wurde durch den Vergleich mit gesunden WT Tieren berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen ermittelt über ungepaarten t-Test. n(NOX2WT-Chimäre)=5, n(NOX2KO-Chimäre)=3. ***p \leq 0,001.

4.1.7 Reduktion der ROS-vermittelten DNA-Schäden im RML durch Phytol

Nachdem ermittelt wurde welche Zellen primär für die Hochregulation von NOX2 im lumbalen Rückenmark verantwortlich sind, wurden die Folgen der NOX2-Regulation in EAE-Tieren mit Standard- oder Phytol-Diät analysiert. Der Proteinkomplex NOX2 produziert primäre ROS, welche in der nahen Umgebung u.a. zu spezifischen DNA-Schäden führen (siehe 1.1.4). Diese können mit Hilfe des Markers 8-OHG detektiert werden (Methode siehe 3.13.2.2). Um zu überprüfen, ob die beschriebene Reduktion der NOX2 mRNA-Expression durch Phytol (Blum et al., 2018b) zu einer verringerten DNA-Schädigung durch ROS führt, wurde 8-OHG im lumbalen Rückenmark von EAE-Tieren mit Standard- oder Phytol-Diät während der akuten Phase der Erkrankung (Tag 16) immunhistologisch untersucht (Abbildung 17). In Tieren mit Standard-Diät zeigte sich eine deutliche Färbung von 8-OHG sowie ein konzentriertes Auftreten von Zellen im lumbalen Rückenmark, während in Tieren mit Phytol-Diät keine Färbung von 8-OHG detektierbar war. Auch die Verteilung der mittels DAPI angefärbten Zellen innerhalb des lumbalen Rückenmarks zeigte bei Phytol-Diät keine Anhäufungen wie bei der Standard-Diät. Demnach scheint die Gabe von Phytol die ROS vermittelten DNA-Schäden bzw. die Bildung der ROS deutlich zu reduzieren.

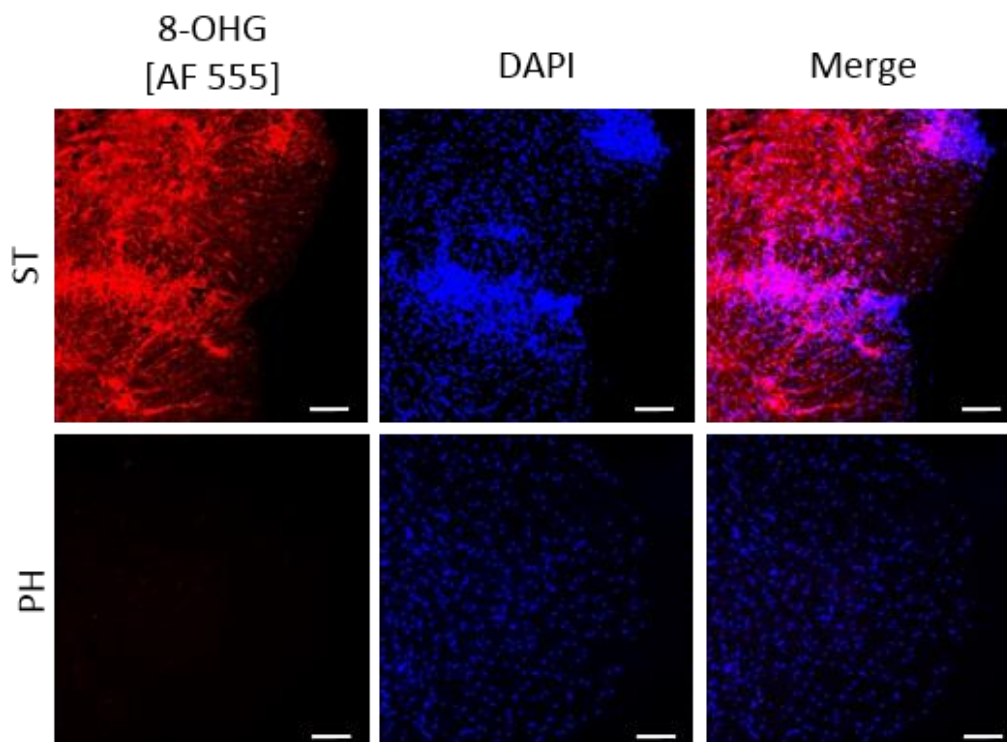


Abbildung 17: Immunhistologische Analyse der ROS-vermittelten DNA-Schäden. Dargestellt sind die Färbungen von 8-OHG (linke Spalte), DAPI (mittlere Spalte, zellkernhaltige Zellen) sowie 8-OHG und DAPI (rechte Spalte) im lumbalen Rückenmark von EAE-Tieren mit Standard- (ST, obere Reihe) oder Phytol-Diät (PH, untere Reihe) 16 Tage nach EAE-Induktion. Gezeigt sind repräsentative Bilder. Messbalken = 100 µm. Vergrößerung = 100x.

4.1.8 Lokalisation der ROS-vermittelten DNA-Schäden

Um genauer zu analysieren, in welchen Zellen die mittels 8-OHG detektierten DNA-Schäden auftreten, wurde eine Färbung von 8-OHG sowie CD45 als Marker für Immunzellen im lumbalen Rückenmark von EAE-Tieren mit Standard-Diät am Tag 16 durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Schäden vor allem innerhalb der Läsionen auftraten (Abbildung 18).

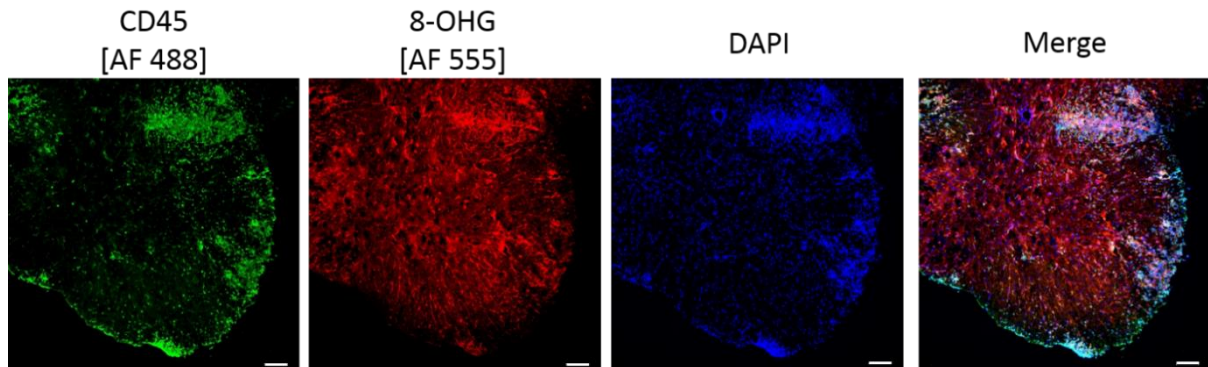


Abbildung 18: Lokalisation der ROS-vermittelten DNA-Schäden. Eingewanderte Immunzellen im lumbalen Rückenmark von EAE-Tieren mit Standard-Diät 16 Tage nach EAE-Induktion wurden anhand des Oberflächenmarkers CD45 markiert während die ROS-vermittelten DNA-Schäden mittels 8-OHG detektiert wurden. Zellkernhaltige Zellen wurden mittels DAPI gefärbt. Gezeigt sind repräsentative Bilder. Messbalken = 100 μ m. Vergrößerung = 100x.

Bei der Untersuchung der genauen Lokalisation von 8-OHG zeigte sich primär eine Kolokalisation mit Iba1⁺-Zellen (Mikroglia) im lumbalen Rückenmark (Abbildung 19). Eine Kolokalisation mit CD45⁺-Immunzellen trat dagegen nur vereinzelt auf. Daraus lässt sich mutmaßen, dass die Mikroglia innerhalb des ZNS sensitiver gegenüber ROS reagieren als die eingewanderten CD45⁺-Immunzellen.

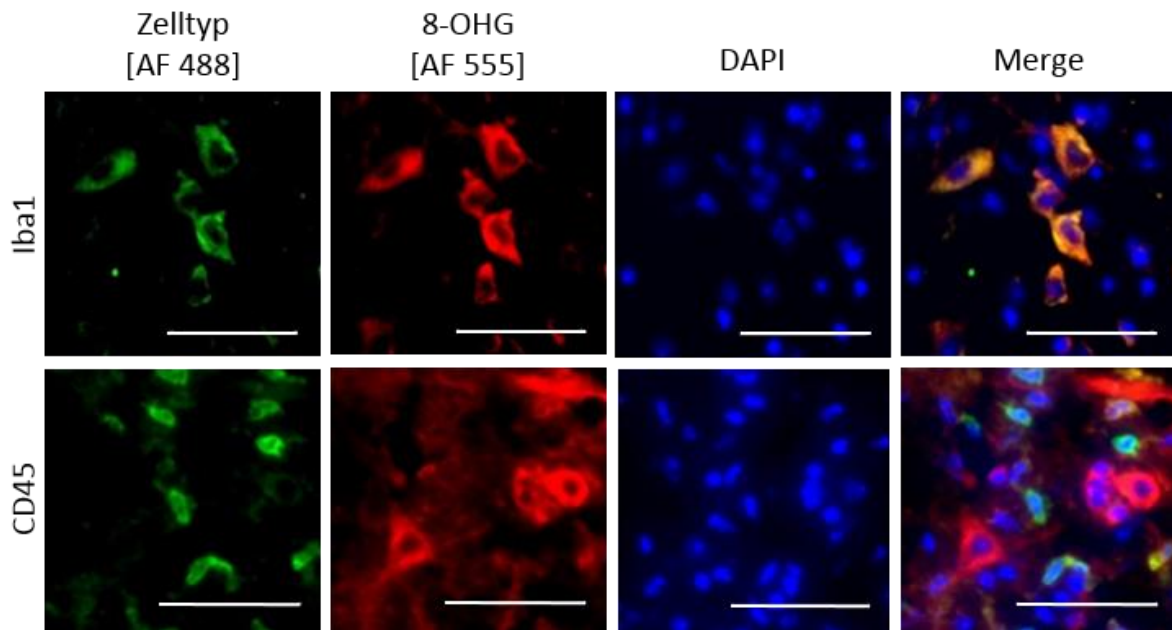


Abbildung 19: Kolokalisation der ROS-vermittelten DNA-Schäden. Immunhistologische Untersuchung von Zelltypmarkern (Iba1 (Mikroglia, obere Reihe), CD45 (Immunezellen, untere Reihe)) sowie 8-OHG und DAPI im lumbalen Rückenmark von EAE-Tieren mit Standard-Diät 16 Tage nach EAE-Induktion. Gezeigt sind repräsentative Bilder. Messbalken = 50 µm. Vergrößerung = 200x.

4.1.9 Verlust des anti-proliferativen Effekts von Phytol in NOX2KO-Splenozyten

Als nächstes wurde untersucht, ob der beschriebene Einfluss von Phytol auf die Proliferationsfähigkeit von isolierten Splenozyten von Wildtyp-Mäusen mit Phytol-Diät (Blum et al., 2018b) über NOX2 vermittelt wird.

Dazu wurden Splenozyten von NOX2KO-Tieren mit Standard- und Phytol-Fütterung isoliert, stimuliert und mittels eines Proliferations-Assays charakterisiert (Methoden siehe 3.10 & 3.11). Dabei zeigte sich eine signifikant erhöhte Proliferation bei beiden erkrankten Versuchsgruppen im Vergleich zur gesunden Kontrolle (Abbildung 20). Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Diäten konnten jedoch nicht festgestellt werden. Diese Daten weisen darauf hin, dass die zuvor beobachtete reduzierte Proliferationsfähigkeit von Splenozyten bei einer Phytol-Diät über NOX2 vermittelt wird, da Phytol in NOX2KO-Tieren die Proliferationsfähigkeit nicht reduzierte.

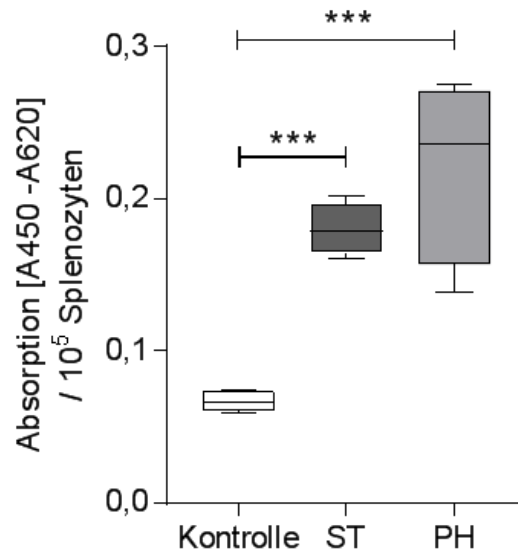


Abbildung 20: Proliferationsfähigkeit von isolierten NOX2KO-Splenocyten. Untersucht wurde der Einfluss von Phytol auf isolierte Splenocyten von gesunden NOX2KO-Tiere (Kontrolle) oder NOX2KO-EAE-Tiere mit Standard- (ST) bzw. Phytol-Diät (PH) während der EAE-Initiationsphase. Die Splenocyten wurden nach Isolation mit 50 µg/ml MOG und 6 ng/ml IL-2 für 72 h restimuliert. Die Bestimmung der Proliferationsrate erfolgte mit Hilfe des „BrdU Colorimetric Proliferation Assays“ (Methoden siehe 3.10 & 3.11) in 6-fach Bestimmung. n(Kontrolle)=7, n(ST)=4, n(PH)=4. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. Signifikanzen ermittelt über ungepaarten t-Test. ***p ≤ 0,001.

4.1.10 Phytan- und Pristansäure reduzieren die NOX2KO-T-Zell-Proliferation

In isolierten T-Zellen von NOX2WT-Tieren konnte zuvor eine Reduktion der Proliferationsfähigkeit durch den Phytol-Metaboliten Phytansäure festgestellt werden (Abbildung 13). Um den Wirkmechanismus von Phytol sowie der beiden Metaboliten weiter zu charakterisieren, wurden die Proliferations-Assays mit isolierten T-Zellen aus NOX2KO-Tieren wiederholt (Abbildung 21). Dabei zeigte sich eine signifikant reduzierte Proliferation der T-Zellen nach Stimulation mit Phytan- und Pristansäure im Vergleich zur Stimulation ohne einen der beiden Metaboliten. Phytansäure zeigte dabei eine stärkere Reduktion der Proliferationsfähigkeit als Pristansäure.

Im Gegensatz zur veränderten Proliferation der Splenocyten in NOX2KO-Tieren im Vergleich zu NOX2WT-Tieren, welche eine Abhängigkeit von NOX2 vermuten ließ (Abbildung 20), sind die Einflüsse von Phytan- sowie Pristansäure auf die isolierten T-Zellen von NOX2WT- und NOX2KO-Tiere gleichartig (Vergleiche Abbildung 13 und Abbildung 21). Dieser Befund spricht demnach gegen einen Einfluss von NOX2 auf die Effekte von Phytol bzw. dessen Metaboliten.

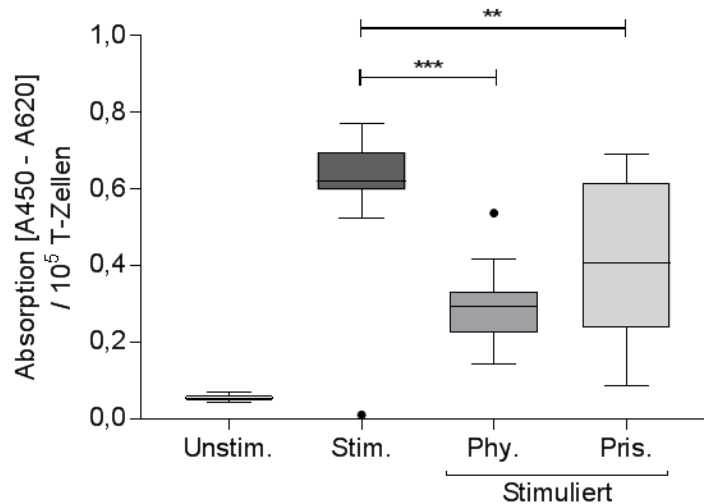


Abbildung 21: Proliferationsfähigkeit von isolierten NOX2KO-T-Zellen. Untersucht wurde der Einfluss von Phytan (Phy.)- sowie Pristansäure (Pris.) auf die Proliferation von T-Zellen gesunder NOX2KO-Tieren (n=4/Gruppe). T-Zellen wurden isoliert und für 72 h mit CD3/CD28-Beads (4×10^7 Beads/ml) sowie 6 ng/ml IL-2 ohne weitere Stimulation (Stim.) oder zusätzlich in der Anwesenheit von Phy. oder Pris. (jeweils 50 μ M) *ex vivo* inkubiert. Unstimulierte T-Zellen (Unstim.) wurden ohne zusätzliche Stimulanzien in Zellkulturmedium inkubiert (siehe Tabelle 11). Die Proliferationsrate wurde mit Hilfe des „BrdU Colorimetric Proliferation Assays“ in 5-fach Bestimmung detektiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen zwischen Stimulation und Phytan- bzw. Pristansäure ermittelt über ungepaarten t-Test. ** $p \leq 0,01$. *** $p \leq 0,001$.

4.1.11 Regulation der NOX2KO-T-Zell-Subtypen durch Phytan- und Pristansäure

Um weiter zu analysieren, welche Rolle NOX2 bei den zuvor in Wildtyp-Tieren beobachteten Effekten einnimmt, wurde der Einfluss von Phytan- sowie Pristansäure auf die T-Zell-Subtypen in NOX2KO-Tieren untersucht.

Dazu wurden T-Zellen aus gesunden NOX2KO-Tieren isoliert und nach Stimulation *ex vivo* untersucht (Abbildung 22). Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion der T_H1 -Zellen sowohl durch die Stimulation mit Phytan- als auch mit Pristansäure. Des Weiteren wurde die Anzahl der T_H2 -Zellen durch Pristansäure signifikant erhöhte sowie die Anzahl der T_H17 -Zellen signifikant reduziert. Die Anzahl der T_{reg} -Zellen wurde weder durch Phytan- noch durch Pristansäure signifikant beeinflusst.

Bei dem Vergleich der Ergebnisse von NOX2WT (Abbildung 14) und NOX2KO (Abbildung 22) in diesem Versuchsaufbau zeigten Phytan- und Pristansäure demnach gleichartige Effekte auf T_H1 -Zellen. Die Effekte von Pristansäure auf T_H2 -Zellen waren ebenfalls vergleichbar. Lediglich die Reduktion der T_H17 -Zellen durch Pristansäure war nur in isolierten T-Zellen von NOX2KO-Tieren signifikant. Die T_{reg} -Zellen wurden in beiden untersuchten Mausstämmen weder durch Phytan- noch durch Pristansäure signifikant beeinflusst.

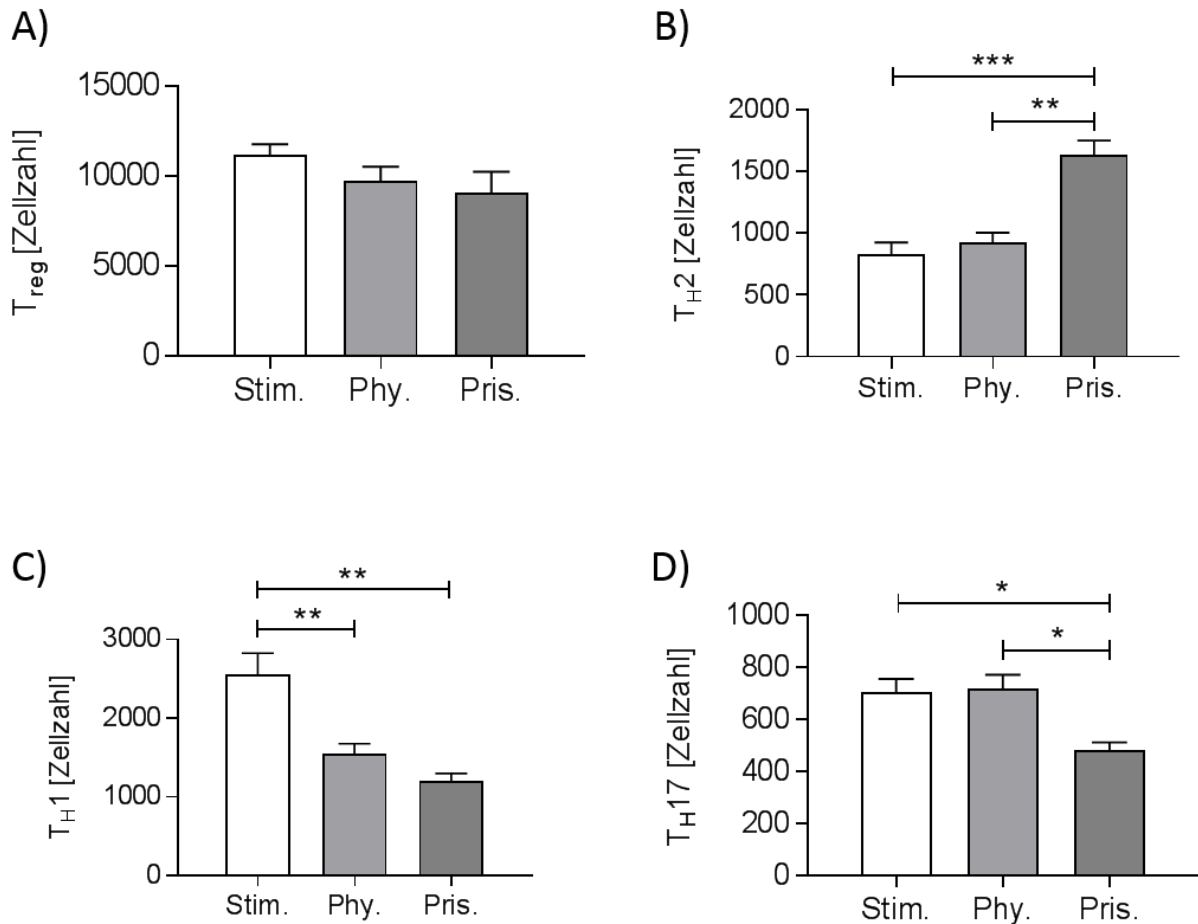


Abbildung 22: Einfluss von Phytan- sowie Pristansäure auf die T-Zell-Subtypen von NOX2KO-Tieren. Die Anzahl der T-Zell-Subtypen gesunder NOX2KO-Tiere wurden mittels Durchflusszytometrie nach 72 h Stimulation mit CD3/CD28-Beads (4×10^7 Beads/ml) sowie 6 ng/ml IL-2 (Stim.) oder zusätzlich in der Anwesenheit von Phytan- (Phy.) oder Pristansäure (Pris.) (jeweils 50 μ M) quantifiziert. Messungen erfolgten in 6-fach Ausführung (n=4/Gruppe). T-Zell-Subtypen wurden anhand folgender Marker kategorisiert: T_{reg} (CD3⁺, CD4⁺, IL-10⁺), T_{H2} (CD3⁺, CD4⁺, IL-4⁺), T_{H1} (CD3⁺, CD4⁺, IFN- γ ⁺), T_{H17} (CD3⁺, CD4⁺, IL-17A⁺). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen zwischen einfach stimulierten Zellen (Stim.) und Phytan- bzw. Pristansäure behandelten Zellen ermittelt über ungepaarten t-Test mit Holm Sidak post hoc Test. *p \leq 0,05. **p \leq 0,01. ***p \leq 0,001.

Zusätzlich wurde der Einfluss von Phytansäure auf die von den unterschiedlichen NOX2KO-T-Zell-Subtypen sezernierten Zytokine mittels eines Bead-Arrays untersucht (Methode siehe 3.12). Genauso wie bei den Untersuchungen des Wildtyps (Abbildung 15) wurde Pristansäure hierbei nicht untersucht. Die Stimulation mit Phytansäure führte zu einer signifikanten Reduktion von IFN- γ sowie IL-6 nach 48 h (Abbildung 23).

Diese Daten weisen darauf hin, dass Phytansäure einen anti-inflammatorischen Effekt besitzt, da zum einen die Bildung von T_{H1}-Zellen reduziert und zum anderen die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und IFN- γ gesenkt wird. Die Reduktion von IFN- γ konnte sowohl im NOX2WT als auch im NOX2KO festgestellt werden.

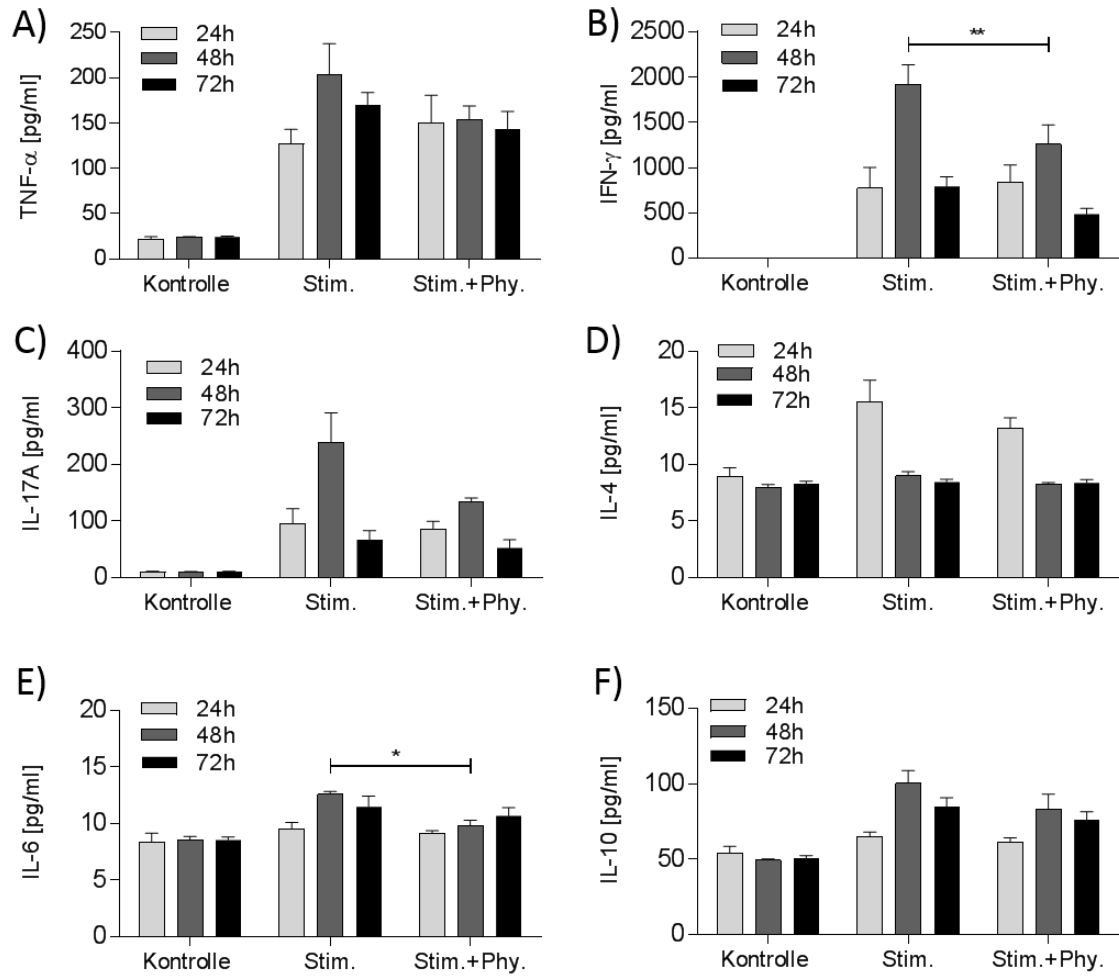


Abbildung 23: Sezernierte Zytokine von NOX2KO-T-Zellen. Quantifiziert wurden die Konzentrationen von TNF- α , IFN- γ , IL-17A, IL-4, IL-6 sowie IL-10 nach 24, 48 oder 72 h Stimulation mit CD3/CD28-Beads (4×10^7 Beads/ml) sowie 6 ng/ml IL-2 (Stim.) oder zusätzlich 50 μ M Phytansäure (Stim. + Phy.). Zytokine wurden im Überstand mit Hilfe des „Zytokin Bead Array Kits“ (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) am Durchflusszytometer detektiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=4$ /Gruppe und Zeitpunkt). Signifikanzen zwischen den unterschiedlichen Stimulationen zu den gleichen Zeitpunkten ermittelt über 2-Way-ANOVA mit Tukey post hoc Test. * $p \leq 0,05$. ** $p \leq 0,01$.

4.1.12 Einfluss von Phytol auf klinische EAE-Scores von NOX2KO-Tieren

Um zu untersuchen, ob die zuvor beobachteten positiven Effekte der Phytol-Diät im murinen EAE-Modell (Blum et al., 2018b) über NOX2 vermittelt werden, wurden EAE-Versuche mit C57BL/6N NOX2WT- und NOX2KO-Tiere mit Standard- und Phytol-Diät durchgeführt (Methode siehe 3.3). Die unterschiedlichen Diäten wurden innerhalb desselben Genotyps durch die Berechnung der „area under the curve“ (AUC) verglichen.

Bei den NOX2WT-Tieren zeigte sich eine signifikante Reduktion der AUC durch die Phytol-Diät im Vergleich zur Standard-Diät (Abbildung 24). Innerhalb der NOX2KO-Tiere reduzierte die Gabe von Phytol die AUC ebenfalls signifikant. Unabhängig von der Diät zeigten die NOX2WT-Tiere stärker ausgeprägte klinische Scores als die NOX2KO-Tiere.

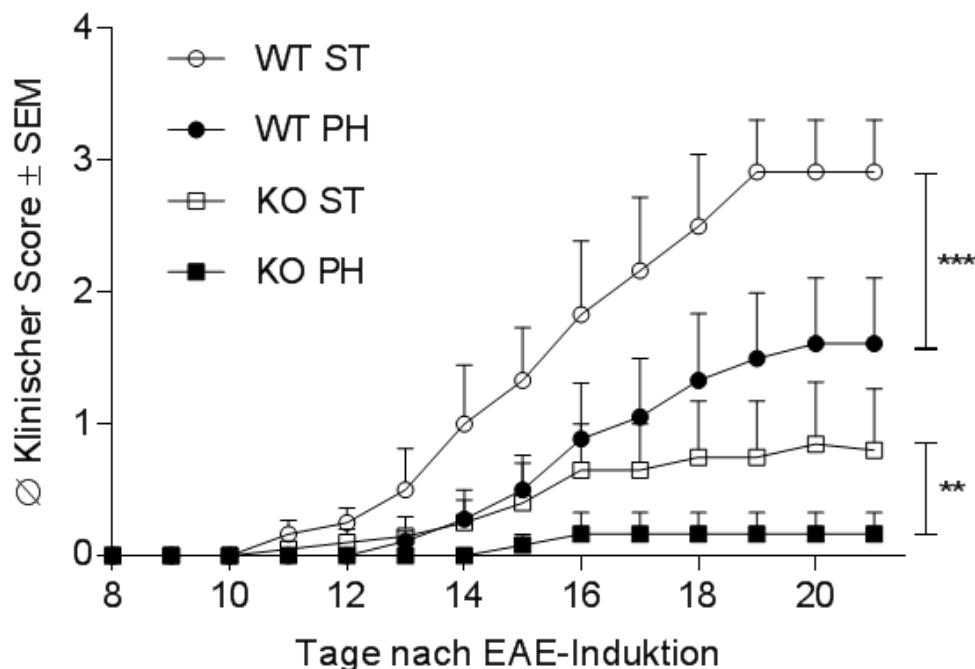


Abbildung 24: Einfluss von Phytol auf den EAE-Verlauf von NOX2WT- und -KO-Tieren. Dargestellt sind die klinischen Scores von C57BL/6N NOXWT- (WT) und NOX2KO- (KO) Mäusen mit Standard- (ST) oder Phytol- (PH) Diät. Zugabe von Phytol-Futter ab dem Tag der EAE-Induktion. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen zwischen den Diäten bei gleichem Genotyp ermittelt über die „area under the curve“ (AUC). Unterschiede in der AUC verglichen über ungepaarten t-Test ($n(\text{WT ST})=6$, $n(\text{WT PH})=9$, $n(\text{KO ST})=10$, $n(\text{KO PH})=6$). ** $p \leq 0,01$. *** $p \leq 0,001$.

Die EAE-Versuche mit NOX2KO-Tieren legen einen NOX2-unabhängigen Wirkmechanismus von Phytol nahe während die *ex vivo* Daten teilweise für eine Beteiligung von NOX2 sprechen. Um die Rolle von NOX2 genauer zu charakterisieren wurden EAE-Versuche mit NOX2KO-Chimären, welche durch eine Knochenmarkstransplantation erzeugt wurden (Methode siehe 3.4), durchgeführt. Diese Tiere verfügten über einen NOX2KO in den peripheren Blutzellen während NOX2 im ZNS weiterhin vorhanden war.

Interessanterweise zeigten die Tiere mit Phytol-Fütterung in diesen Versuchen tendenziell höhere klinische Scores als Tiere mit Standard-Fütterung (Abbildung 25). Bei dem Vergleich der berechneten AUC konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Diäten festgestellt werden.

Der zuvor festgestellte positive Einfluss der Phytol-Diät konnte in den NOX2-Chimären nicht nachgewiesen werden.

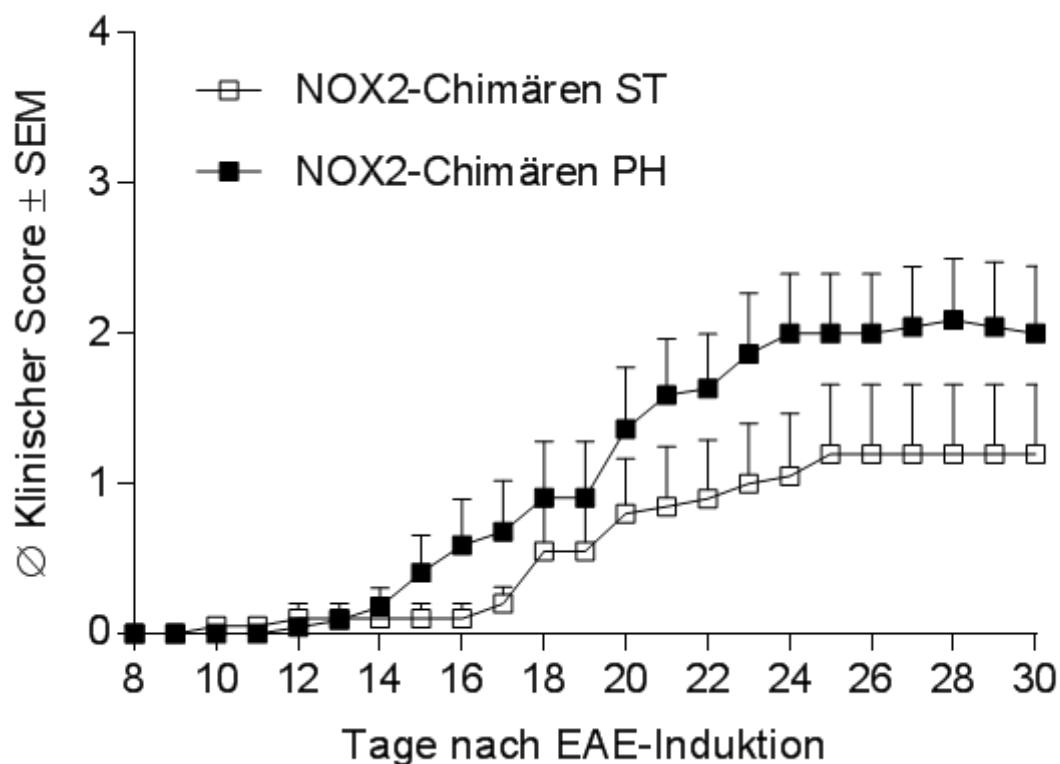


Abbildung 25: Einfluss von Phytol auf den EAE-Verlauf von NOX2-Chimären. Dargestellt sind die klinischen EAE-Scores von chimären NOX2KO-C57BL/6N-Mäusen nach Knochenmarkstransplantation (Methode siehe 3.4) mit Standard- (ST) oder Phytol- (PH) Diät. Die NOX2-Chimären zeichnen sich durch eine Deletion von NOX2 in der Peripherie aus, während NOX2 im Gewebe weiterhin vorhanden ist. Zugabe von Phytol ab dem Zeitpunkt der EAE-Induktion (n(ST)=10, n(PH)=11). Bei dem Vergleich der „area under the curve“ (AUC) mittels ungepaartem t-Test war kein signifikanter Unterschied zwischen den Diäten festzustellen.

4.2 Immunmodulation durch den Naturstoff Silvestrol

Im Zuge der Untersuchungen einer möglichen Modulation des humanen Immunsystems durch neuartige Wirkstoffkandidaten im 2. Teil der Dissertation wurde der Einfluss des Naturstoffs Silvestrol auf isolierte humane Immunzellen untersucht. Dafür wurde zunächst überprüft, ob Silvestrol einen Einfluss auf die Zellviabilität besitzt. Um die immunmodulatorischen Eigenschaften genauer zu charakterisieren wurde im Anschluss die Regulation der spezifischen Oberflächenmarker und der freigesetzten Zytokinen bei Makrophagen und Dendritischen Zellen während der Differenzierung sowie Polarisierung/Aktivierung untersucht. Weiterhin wurden die Auswirkungen von Silvestrol auf den zellulären Energiestoffwechsel analysiert.

4.2.1 Silvestrol reduziert die Zellviabilität humaner Immunzellen

Zunächst wurde untersucht, ob Silvestrol einen Einfluss auf die Viabilität der isolierten humane Immunzellen hat. Dafür wurden die isolierten CD14⁺-Zellen in Anwesenheit unterschiedlicher Silvestrol-Konzentrationen oder Vehikel differenziert und die Viabilität mittels Orangu-Assay quantifiziert (Methode siehe 3.15). Die Absorptionswerte der unterschiedlichen Behandlungen wurden dabei auf unbehandelte Kontrollzellen bezogen.

Bei Monozyten zeigte Silvestrol eine signifikante Reduktion der Viabilität auf 67 % ab einer Konzentration von 25 nM (Abbildung 26). Bei differenzierten Makrophagen konnte eine signifikante Reduktion auf 88 % bereits ab 5 nM Silvestrol festgestellt werden. Mit steigender Silvestrol-Konzentration sank die Viabilität weiter. Bei 10 nM Silvestrol lag die Viabilität der Makrophagen bei 75 % und bei 25 nM bei 51 %. Gleichartige Effekte konnten auch bei differenzierten Dendritischen Zellen beobachtet werden. Hierbei sank die Viabilität bei 5 nM Silvestrol auf 81 %, bei 10 nM auf 65 % und bei 25 nM auf 37 %.

Für die darauffolgenden Versuche wurde eine maximale Silvestrol-Konzentration von 5 nM verwendet, da höhere Konzentrationen mit einer zu geringen Viabilität verbunden waren.

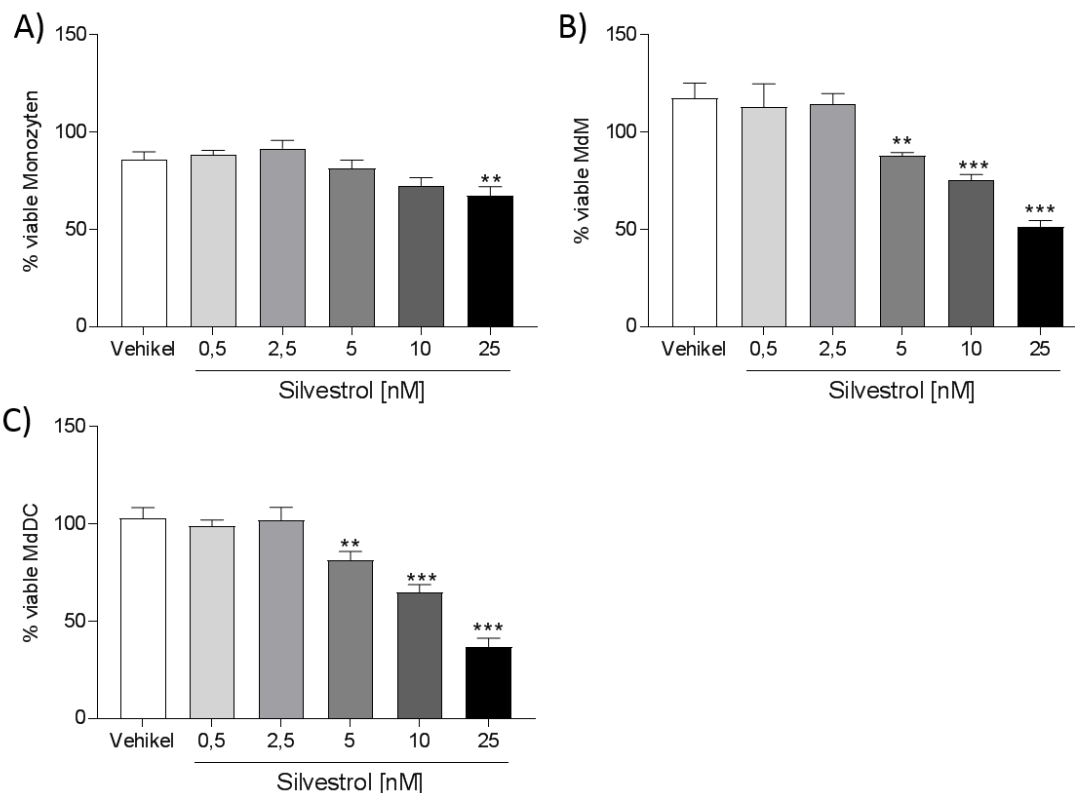


Abbildung 26: Einfluss von Silvestrol auf die Zellviabilität. Anteil an viable Monozyten (A), Makrophagen (B) und Dendritischen Zellen (C) nach der Inkubation mit unterschiedlichen Silvestrol-Konzentrationen (0,5/ 2,5/ 5/ 10/ 25 nM) oder Vehikel (Dimethylsulfoxid (DMSO)) bezogen auf unbehandelte Zellen (n=4). Die Viabilität wurde mittels Orangu-Assay in 3-fach Bestimmung ermittelt. Humane Monozyten wurden aus Buffy-Coats isoliert, stimuliert und für 48 h (Monozyten), 5 Tage (Dendritische Zellen) oder 7 Tage (Makrophagen) inkubiert (37°C, 5 % CO₂). Das Zellkulturmedium der Makrophagen wurde nach 3 Tagen vollständig erneuert. Monozyten wurden ohne weiter Stimulation inkubiert, während Makrophagen und Dendritische Zellen mit hu_GM-CSF (c = 10 ng/ml) stimuliert wurden. Dendritische Zellen wurden zusätzlich mit hu_IL-4 (c = 10 ng/ml) stimuliert. Signifikanzen wurden mittels 1-Way-ANOVA mit Dunnett's post hoc Test bezogen auf die Vehikel-Gruppe ermittelt. *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001.

4.2.2 Silvestrol beeinflusst die Differenzierung humaner Makrophagen

Nachdem die Untersuchungen zum Einfluss von Silvestrol auf die Zellviabilität zeigten, dass eine Konzentration von bis zu 5 nM Silvestrol von den Immunzellen toleriert wird (Abbildung 26), wurde der Einfluss von Silvestrol auf die Differenzierung von isolierten humanen CD14⁺-Zellen (Methode siehe 3.14) zu Makrophagen untersucht (Methode siehe 3.16).

Bei der Untersuchung der Oberflächenmarker der Makrophagen (Methode siehe 3.9.4) zeigte sich eine signifikante Steigerung der relativen Expression von CD163 bei 5 nM Silvestrol sowie eine signifikante Reduktion von CD206 bei 2,5 und 5 nM Silvestrol (Abbildung 27 A). Der Marker „triggering receptor expressed on myeloid cells 2“ (TREM2) wies ebenso eine leicht signifikante Reduktion bei 5 nM Silvestrol auf. Die Oberflächenmarker CD80, CD86 und HLA-DR zeigten keine signifikanten Veränderungen. Somit wurden 3 anti-inflammatorische bzw. resolutionsfördernde Marker in ihrer Expression beeinflusst, jedoch ist kein klarer Trend

erkennbar, da 2 Marker runterreguliert und ein Marker hochreguliert wurde. Bei der Untersuchung der Zytokine (Methode siehe 3.12.2) wurden zunächst nur die Zytokine bei der höchsten verwendeten Silvestrol-Konzentration quantifiziert. Wenn sich bei 5 nM Silvestrol eine Regulation zeigte wurden auch niedrigere Silvestrol-Konzentrationen untersucht. Gleichermaßen wurde in allen folgenden Zytokin-Bestimmungen verfahren. Im Überstand der differenzierten Makrophagen zeigte alle untersuchten Zytokine (CCL18, CCL17, IL-10, IL-6) eine signifikante Reduktion schon ab 0,5 nM Silvestrol (Abbildung 27 B). Mit steigender Silvestrol-Konzentration sanken die Zytokin-Konzentrationen weiter. Somit scheinen vor allem die Konzentrationen der sezernierten Zytokine durch die Gabe von Silvestrol stark verringert zu werden.

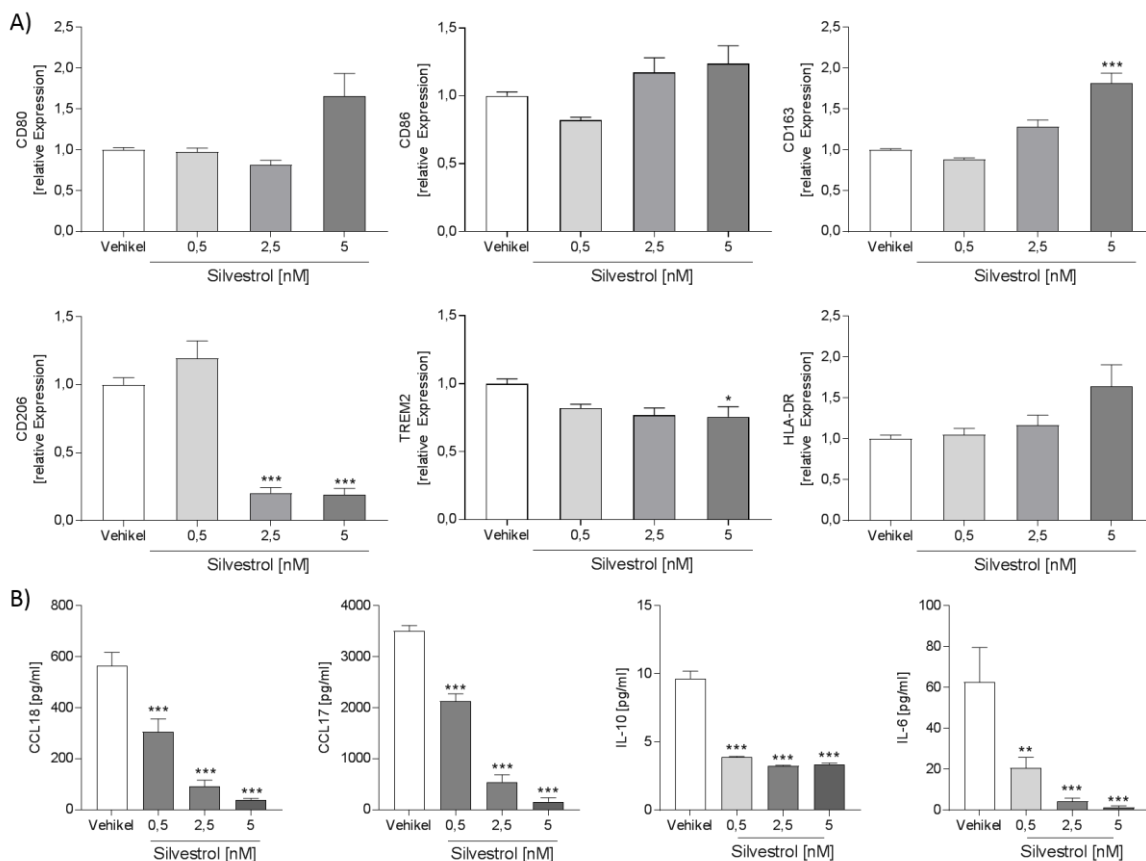


Abbildung 27: Einfluss von Silvestrol auf die Differenzierung humaner Makrophagen. Aus Buffy-Coats isolierte humane Monozyten wurden mit unterschiedlichen Silvestrol-Konzentrationen (0,5/ 2,5/ 5 nM) oder Vehikel (DMSO) für 7 Tage in Anwesenheit von hu_GM-CSF ($c = 10 \text{ ng/ml}$) differenziert (37°C , $5\% \text{ CO}_2$). Nach 3 Tagen wurde das Zellkulturmedium vollständig erneuert. A) Nach abgeschlossener Makrophagen-Differenzierung wurden die Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie in Triplikaten bestimmt. Die relative Expression der spezifischen Oberflächenmarker wurde durch Bezug auf die Vehikel behandelten Kontrollen ermittelt ($n=10$). B) Die sezernierten Zytokine im Überstand der mit 5 nM Silvestrol oder Vehikel behandelten Makrophagen wurden mittels zytometrischem Bead Array (IL-10, IL-6) oder ELISA (CCL18, CCL17) detektiert. Die Messungen erfolgten in Triplikaten ($n=6$). Signifikanzen wurden mittels 1-Way-ANOVA mit Dunnett's post hoc Test bezogen auf die Vehikel-Gruppe ermittelt. * $p < 0,05$. *** $p < 0,001$.

4.2.3 Silvestrol reguliert die Polarisierung humaner Makrophagen

Um zu untersuchen, welchen Einfluss Silvestrol auf bereits differenzierte Makrophagen während deren Polarisierung hat, wurden Monozyten zunächst ohne die Zugabe von Silvestrol zu Makrophagen differenziert und anschließend entweder zu M1- oder zu M2-Makrophagen in Anwesenheit von unterschiedlichen Silvestrol-Konzentrationen oder Vehikel polarisiert (Methode siehe 3.17).

Bei M1-polarisierten Makrophagen zeigte sich bei den Oberflächenmarkern TREM2 sowie HLA-DR eine leichte, jedoch signifikante, Reduktion durch 0,5 und 2,5 nM Silvestrol (Abbildung 28). TREM2 wies ebenso eine signifikante Reduktion bei 5 nM Silvestrol auf.

Die Oberflächenmarker CD80, CD86, CD163 sowie CD206 zeigten keine signifikanten Veränderungen. Somit reduzierte Silvestrol nur 1 resolutionsfördernden Oberflächenmarker (TREM2) bei einer Konzentration von 5 nM bei M1-polarisierten Makrophagen.

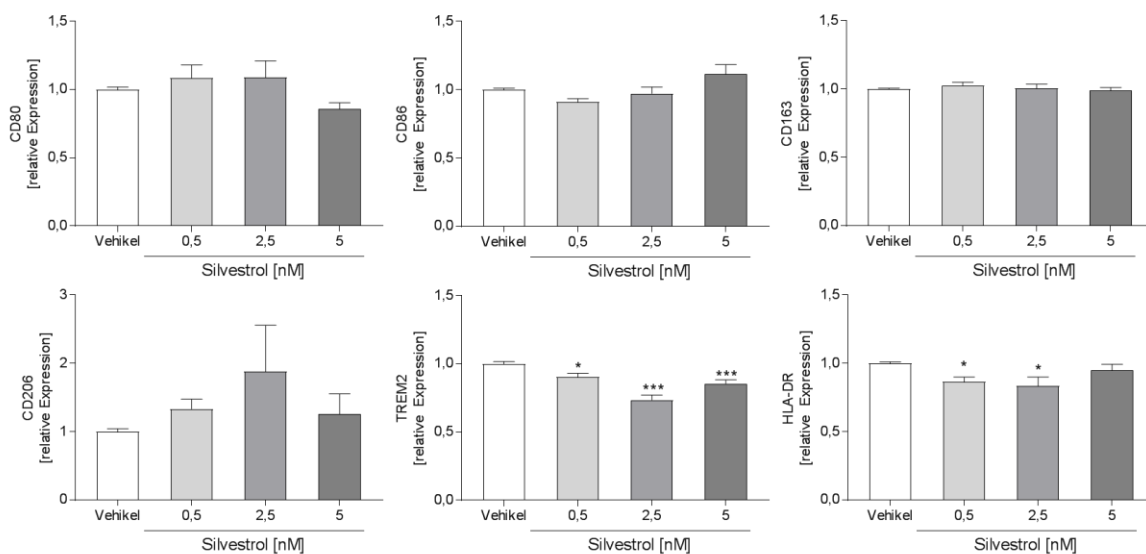


Abbildung 28: Einfluss von Silvestrol auf die Oberflächenmarker M1-polarisierter Makrophagen. Aus Buffy-Coats isolierte humane Monozyten wurden für 7 Tage mit hu_GM-CSF ($c = 10$ ng/ml) differenziert (37°C , 5 % CO_2). Anschließend erfolgte die M1-Polarisierung mit $\text{IFN-}\gamma$ ($c = 20$ ng/ml) in Anwesenheit unterschiedlicher Silvestrol-Konzentrationen (0,5/ 2,5/ 5 nM) oder Vehikel (DMSO) für 48 h. Nach abgeschlossener M1-Polarisierung wurden die Oberflächenmarker der M1-Makrophagen mittels Durchflusszytometrie in Triplikaten analysiert. Die relative Expression der spezifischen Oberflächenmarker wurde durch Bezug auf die Vehikel behandelten Kontrollen bestimmt ($n=10$). Signifikanzen wurden mittels 1-Way-ANOVA mit Dunnett's post hoc Test bezogen auf die Vehikel-Gruppe ermittelt. * $p < 0,05$. *** $p < 0,001$.

Bei den sezernierten Zytokinen der M1-polarisierten Makrophagen war eine signifikante Reduktion von IL-10, IL-8 sowie CCL2 zu detektieren (Abbildung 29). Die Konzentrationen von IL-10 bei 0,5 und 2,5 nM Silvestrol waren unter dem Detektionsminimum und konnten nicht bestimmt werden (nicht detektierbar, n.d.). IL-8 und CCL2 waren bereits ab 0,5 nM Silvestrol signifikant reduziert. Bei TNF- α zeigte sich eine signifikante Steigerung der Konzentration im Überstand ab 5 nM Silvestrol während IL-23 sowie CXCL10 nicht signifikant durch 5 nM Silvestrol beeinflusst wurden.

Somit wurden 2 pro-inflammatorische Zytokine und 1 anti-inflammatorisches Zytokin reduziert, während 1 pro-inflammatorisches Zytokin verstärkt sezerniert wurde. Ein klarer Einfluss von Silvestrol auf M1-Makrophagen ist somit nicht erkennbar, da sich die pro- und anti-inflammatorischen Effekte aufheben könnten.

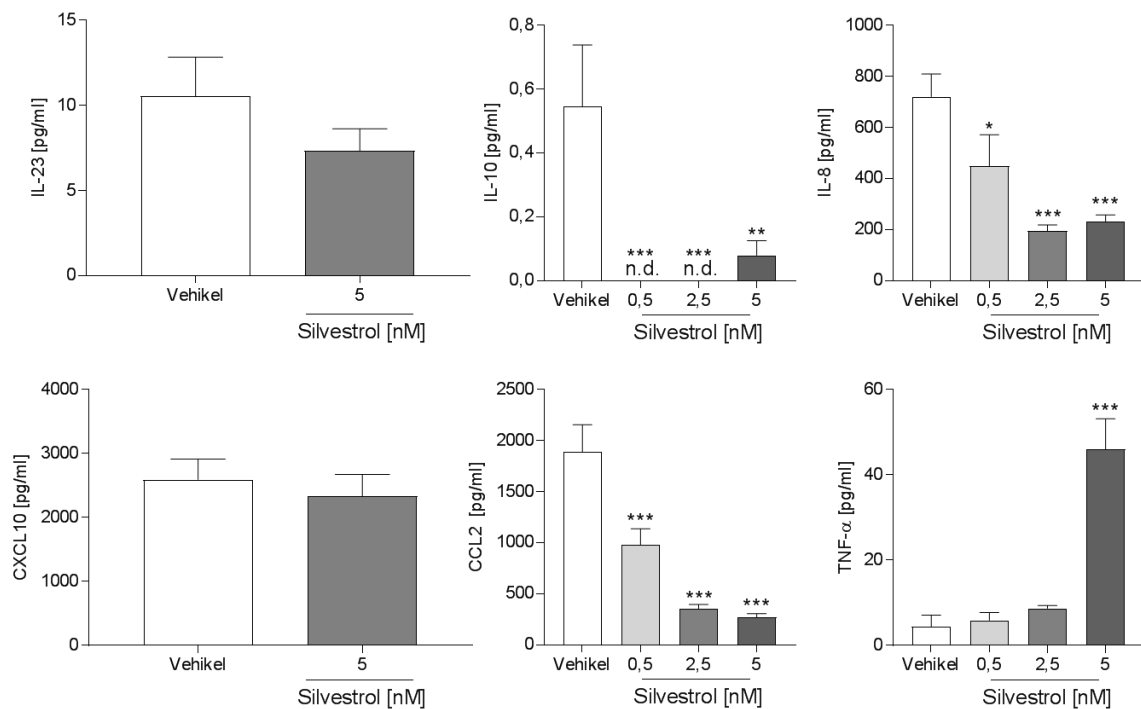


Abbildung 29: Einfluss von Silvestrol auf die sezernierten Zytokine M1-polarisierter Makrophagen. Aus Buffy-Coats isolierte humane Monozyten wurden für 7 Tage mit hu_GM-CSF (c = 10 ng/ml) differenziert (37°C, 5 % CO₂). Anschließend erfolgte die M1-Polarisierung mit IFN- γ (c = 20 ng/ml) in Anwesenheit von 5 nM Silvestrol oder Vehikel (DMSO) für 48 h. Nach abgeschlossener M1-Polarisierung wurden die Konzentrationen der sezernierten Zytokine im Überstand der M1-Makrophagen mittels zytometrischem Bead Array (IL-10, IL-8, CXCL10, CCL2, TNF- α) oder ELISA (IL-23) in Triplikaten bestimmt (n=6). Signifikanzen wurden mittels 1-Way-ANOVA mit Dunnett's post hoc Test bezogen auf die Vehikel-Gruppe (IL-10, IL-8, CCL2, TNF- α) oder ungepaartem t-Test (IL-23, CXCL10) ermittelt. *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001.

Bei M2-polarisierten Makrophagen zeigten die Oberflächenmarker CD206 sowie TREM2 bei einer Silvestrol-Konzentration von 5 nM jeweils eine signifikante Zunahme der relativen Expression (Abbildung 30). Die Oberflächenmarker CD80, CD86, CD163 sowie HLA-DR zeigten keine Veränderung durch die Inkubation mit Silvestrol. Somit steigerte Silvestrol bei den M2-polarisierten Makrophagen die Expression von 2 resolutionsfördernden Oberflächenmarkern während die pro-inflammatorischen Marker unbeeinflusst blieben.

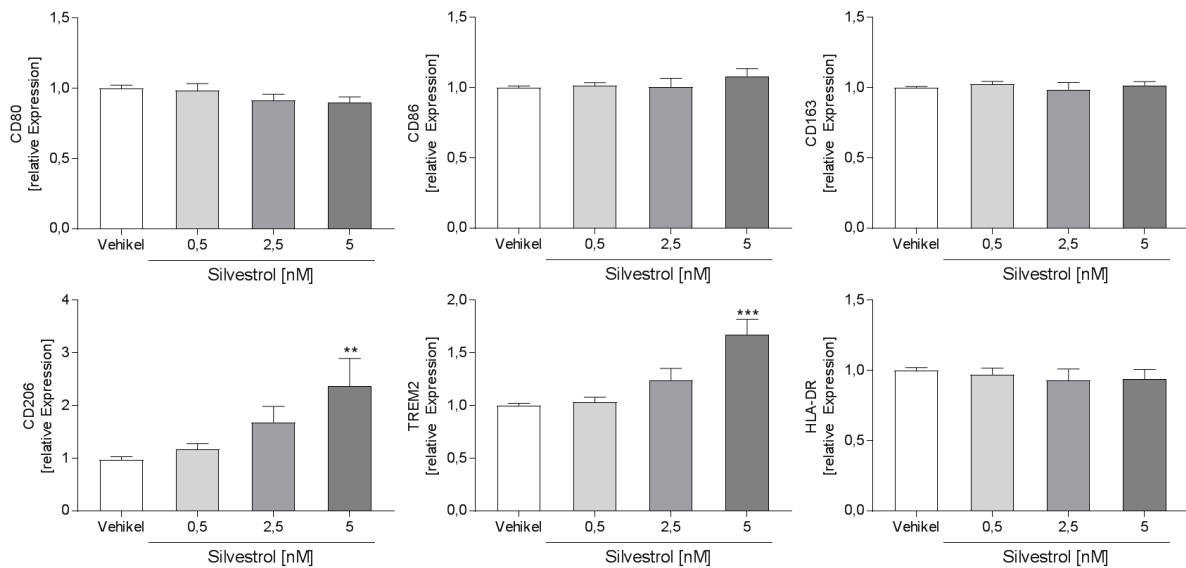


Abbildung 30: Einfluss von Silvestrol auf die Oberflächenmarker M2-polarisierter Makrophagen. Aus Buffy-Coats isolierte humane Monozyten wurden für 7 Tage mit hu_M-CSF (c = 50 ng/ml) differenziert (37°C, 5 % CO₂). Anschließend erfolgte die M2-Polarisierung mit hu_IL-4 (c = 10 ng/ml) in Anwesenheit unterschiedlicher Silvestrol-Konzentrationen (0,5/ 2,5/ 5 nM) oder Vehikel (DMSO) für 24 h. Nach abgeschlossener M2-Polarisierung wurden die Oberflächenmarker der M2-Makrophagen mittels Durchflusszytometrie in Triplikaten analysiert. Die relative Expression der spezifischen Oberflächenmarker wurde durch Bezug auf die Vehikel behandelten Kontrollen bestimmt (n=10). Signifikanzen wurden mittels 1-Way-ANOVA mit Dunnett's post hoc Test bezogen auf die Vehikel-Gruppe ermittelt. **p<0,01. ***p<0,001.

Bei den sezernierten Zytokinen der M2-polarisierten Makrophagen reduzierte 5 nM Silvestrol die Konzentrationen von IL-8 und CCL2 im Überstand signifikant (Abbildung 31), während die Zytokine IL-23, IL-10, CXCL10 sowie TNF- α keine Veränderung durch die Polarisierung mit 5 nM Silvestrol zeigten. IL-8 wurde bereits ab 0,5 nM Silvestrol signifikant reduziert.

Durch die Hochregulation von 2 resolutionsfördernden Oberflächenmarkern bei einer gleichzeitigen Reduktion von 2 pro-inflammatorischen Chemokinen scheint Silvestrol die M2-Makrophagen in ihrem resolutionsfördernden Phänotyp weiter zu verstärken.

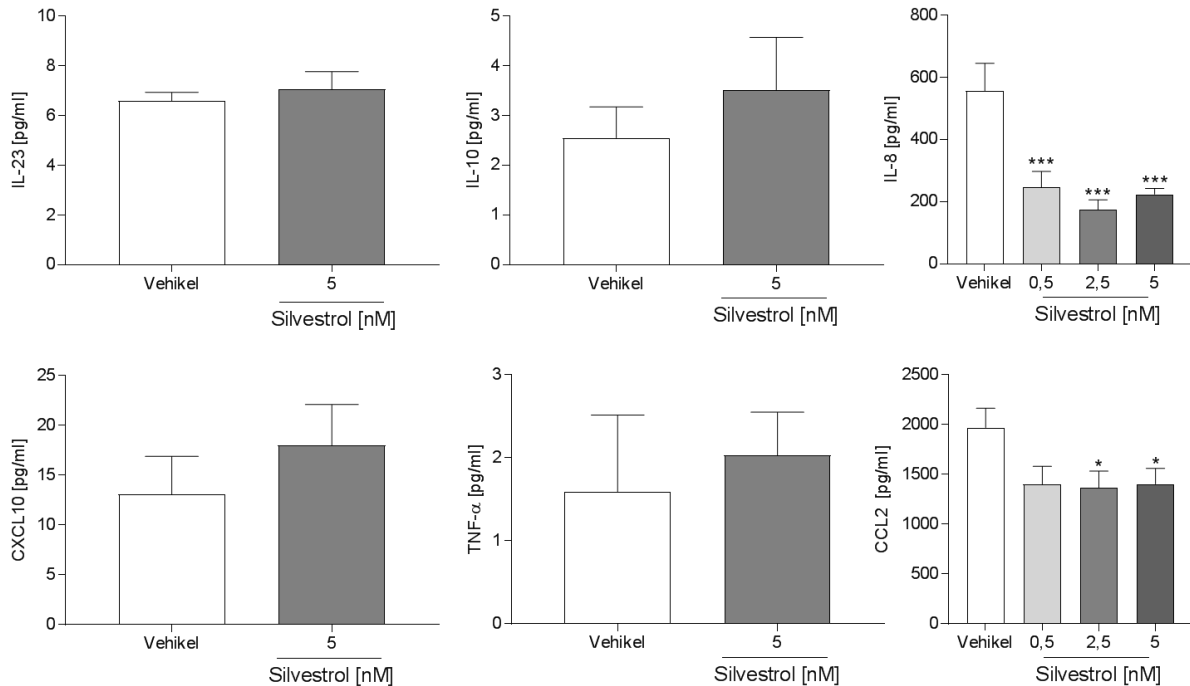


Abbildung 31: Einfluss von Silvestrol auf die sezernierten Zytokine M2-polarisierter Makrophagen. Aus Buffy-Coats isolierte humane Monozyten wurden für 7 Tage mit hu_M-CSF (c = 50 ng/ml) differenziert (37°C, 5 % CO₂). Anschließend erfolgte die M2-Polarisierung mit hu_IL-4 (c = 10 ng/ml) in Anwesenheit von 5 nM Silvestrol oder Vehikel (DMSO) für 24 h. Nach abgeschlossener M2-Polarisierung wurden die Konzentrationen der sezernierten Zytokine im Überstand der M2-Makrophagen mittels zytometrischem Bead Array (IL-10, IL-8, CXCL10, CCL2, TNF-α) oder ELISA (IL-23) in Triplikaten bestimmt (n=6). Signifikanzen wurden mittels 1-Way-ANOVA mit Dunnett's post hoc Test bezogen auf die Vehikel-Gruppe (IL-8, CCL2) oder ungepaartem t-Test (IL-23, IL-10, CXCL10, TNF-α) ermittelt. *p<0,05. ***p<0,001.

4.2.4 Silvestrol reduziert die Differenzierung humaner Dendritischer Zellen

Ähnlich wie bei den untersuchten Makrophagen (Ergebnis siehe 4.2.2) wurde der Einfluss von bis zu 5 nM Silvestrol auf die Differenzierung von isolierten humanen CD14⁺-Zellen zu Dendritischen Zellen untersucht (Methode siehe 3.18). Dabei wurde die relative Expression von 12 Oberflächenmarker und die Konzentration von 5 Zytokinen im Überstand ermittelt.

Bei den untersuchten Oberflächenmarkern zeigte sich eine signifikante Reduktion der relativen Expression von CD54, CD1a, CD1c, HLA-DR, CD83, CD206, CD209 sowie CD86 bei einer Silvestrol-Konzentration von 2,5 sowie 5 nM (Abbildung 32). Die Marker CD40 sowie CD141 zeigten eine signifikant gesteigerte Expression bei 5 nM Silvestrol während CD197 sowie CD80 keine signifikanten Änderungen aufwiesen. Somit zeigte sich bei der Mehrheit der untersuchten pro-inflammatorischen oder toleranzfördernden Oberflächenmarker eine Reduktion der relativen Expression.

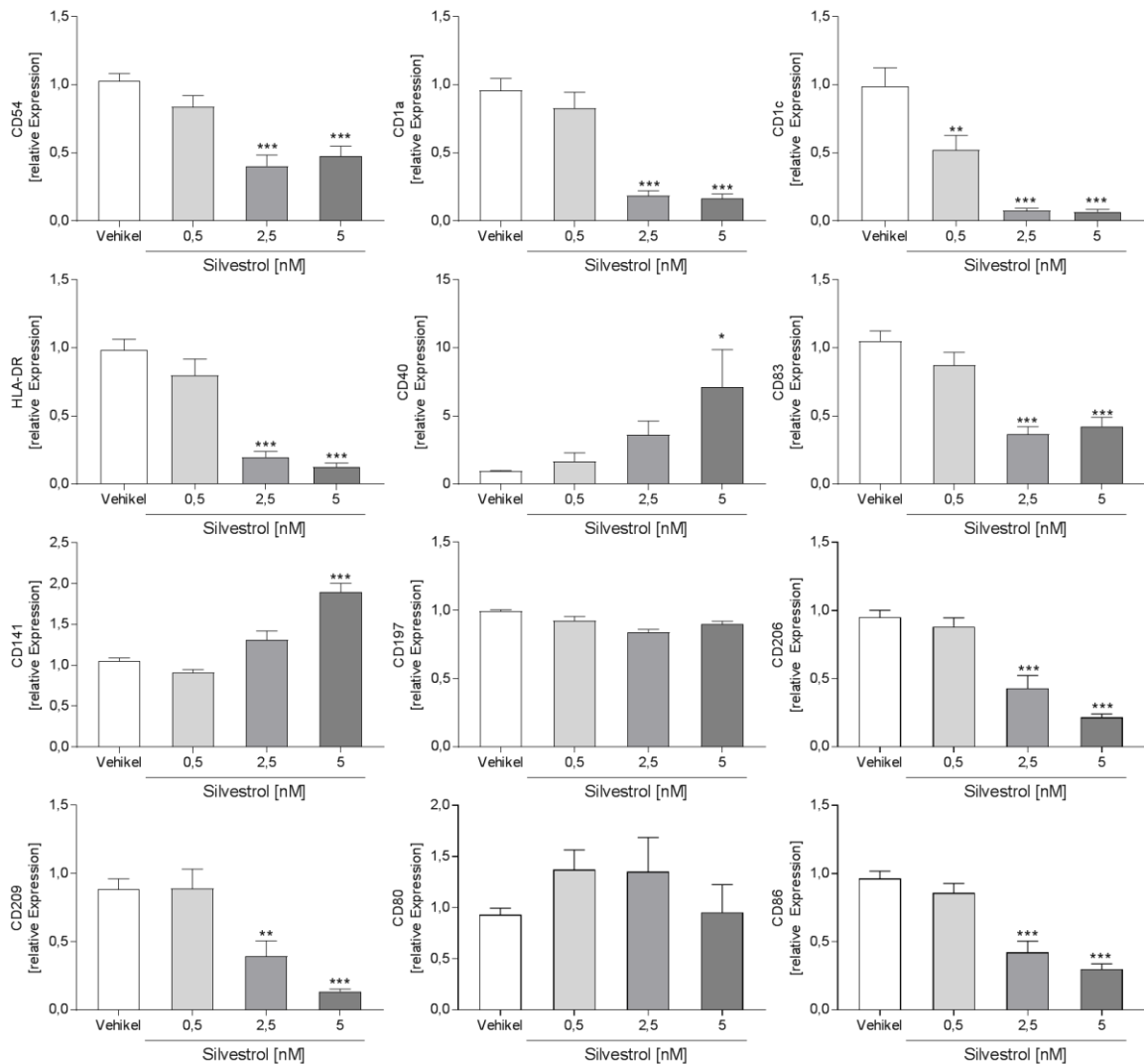


Abbildung 32: Einfluss von Silvestrol auf die Oberflächenmarker humaner Dendritischer Zellen während der Differenzierung. Aus Buffy-Coats isolierte humane Monozyten wurden mit unterschiedlichen Silvestrol-Konzentrationen (0,5/ 2,5/ 5 nM) oder Vehikel (DMSO) für 5 Tage mit hu_GM-CSF ($c = 10$ ng/ml) sowie hu_IL-4 ($c = 10$ ng/ml) zu Dendritischen Zellen differenziert. Nach abgeschlossener Differenzierung wurden die Oberflächenmarker der Dendritischen Zellen mittels Durchflusszytometrie in Triplikaten bestimmt. Die relative Expression der spezifischen Oberflächenmarker wurde durch Bezug auf die Vehikel behandelten Kontrollen ermittelt ($n=6$). Signifikanzen wurden mittels 1-Way-ANOVA mit Dunnett's post hoc Test bezogen auf die Vehikel-Gruppe ermittelt. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

Im Überstand der differenzierten Dendritischen Zellen konnte mittels zytometrischem Bead Array sowie ELISA eine signifikante Reduktion der Zytokine IL-10, IL-8 sowie IL-6 durch 2,5 und 5 nM Silvestrol detektiert werden (Abbildung 33). Die Konzentration von IL-1 β wurde durch die Gabe von 2,5 und 5 nM Silvestrol signifikant erhöht, während IL-23 nicht signifikant beeinflusst wurde.

Ähnlich wie bei den Oberflächenmarkern kam es bei den Zytokinen, bis auf IL-1 β und IL-23, zu einer Runterregulierung durch 2,5 und 5 nM Silvestrol. Dabei wurden die Sezernierung von sowohl pro- (IL-8, IL-6) als auch anti-inflammatorischen (IL-10) Zytokinen reduziert.

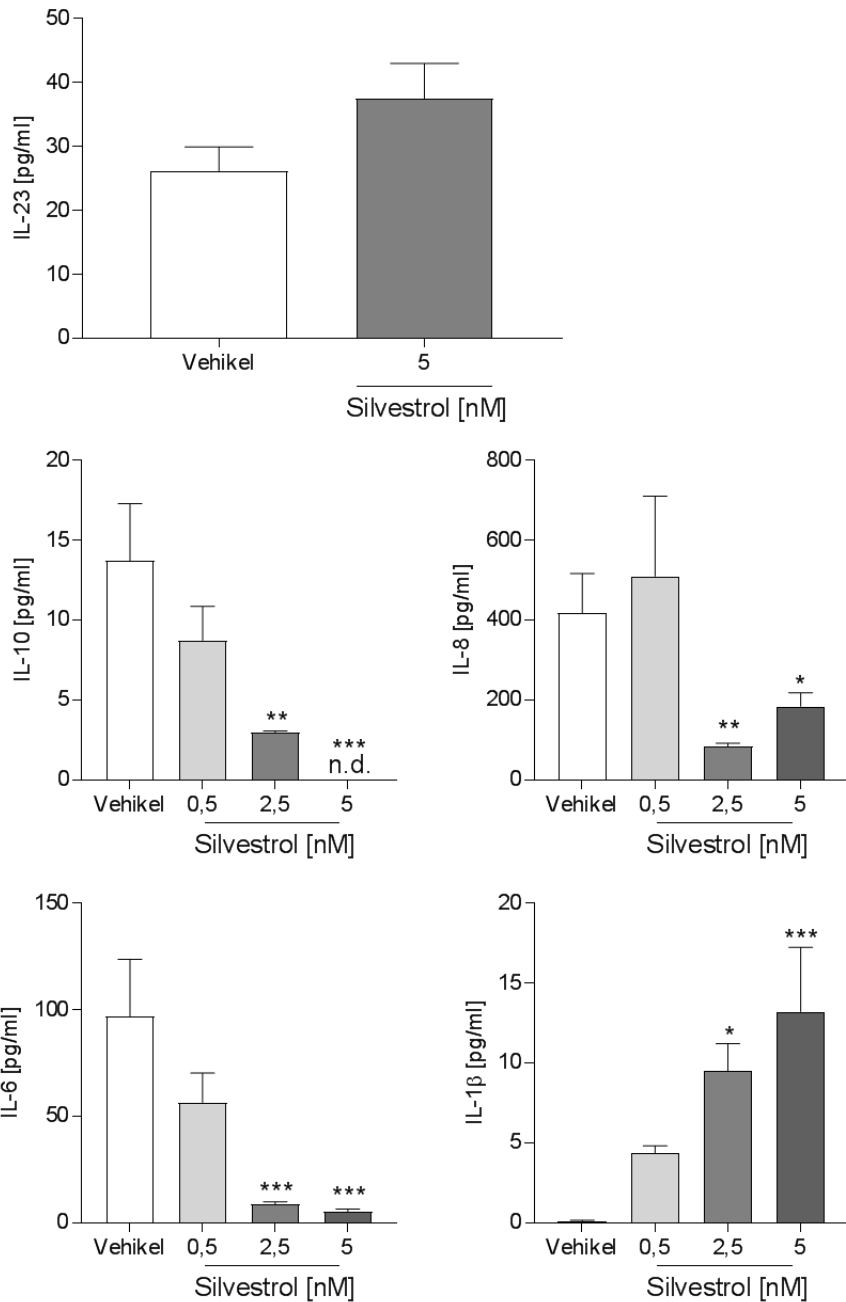


Abbildung 33: Einfluss von Silvestrol auf die sezernierten Zytokine humaner Dendritischer Zellen während der Differenzierung. Aus Buffy-Coats isolierte humane Monozyten wurden mit 5 nM Silvestrol oder Vehikel (DMSO) für 5 Tage mit hu_GM-CSF ($c = 10$ ng/ml) sowie hu_IL-4 ($c = 10$ ng/ml) zu Dendritischen Zellen differenziert. Nach abgeschlossener Differenzierung wurden die Zytokine der Dendritischen Zellen im Überstand mittels zytometrischem Bead Array (IL-10, IL-8, IL-6, IL-1 β) oder ELISA (IL-23) in Triplikaten bestimmt ($n=6$). Signifikanzen wurden mittels 1-Way-ANOVA mit Dunnett's post hoc Test bezogen auf die Vehikel-Gruppe (IL-10, IL-8, IL-6, IL-1 β) oder ungepaartem t-Test (IL-23) ermittelt. * $p<0,05$. ** $p<0,01$. *** $p<0,001$.

4.2.5 Silvestrol beeinflusst die Aktivierung humaner Dendritischer Zellen

Nachdem Silvestrol während der Differenzierung der Dendritischen Zellen zu einer Reduktion von zahlreichen Oberflächenmarker und einigen Zytokinen führte, wurde der Einfluss von Silvestrol auf die Aktivierung von zuvor differenzierten Dendritischen Zellen untersucht. Dafür wurden isolierte humane CD14⁺-Immunzellen ohne Zugabe von Silvestrol zu Dendritischen Zellen differenziert und anschließend in Anwesenheit unterschiedlicher Silvestrol-Konzentrationen für 24 h aktiviert (Methode siehe 3.19).

Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion der pro-inflammatorischen Oberflächenmarker CD209 sowie CD86 bei 5 nM Silvestrol (Abbildung 34). Dagegen wurde der pro-inflammatorische Oberflächenmarker CD54 bei 5 nM Silvestrol signifikant erhöht. Interessanterweise zeigte sich bei den beiden pro-inflammatorischen Oberflächenmarker CD1c sowie CD40 eine signifikante Reduktion der relativen Expression bei 2,5 nM Silvestrol, jedoch nicht bei 5 nM. Die Mehrheit der untersuchten Oberflächenmarker wurde während der Aktivierung nicht signifikant durch die Gabe von Silvestrol beeinflusst.

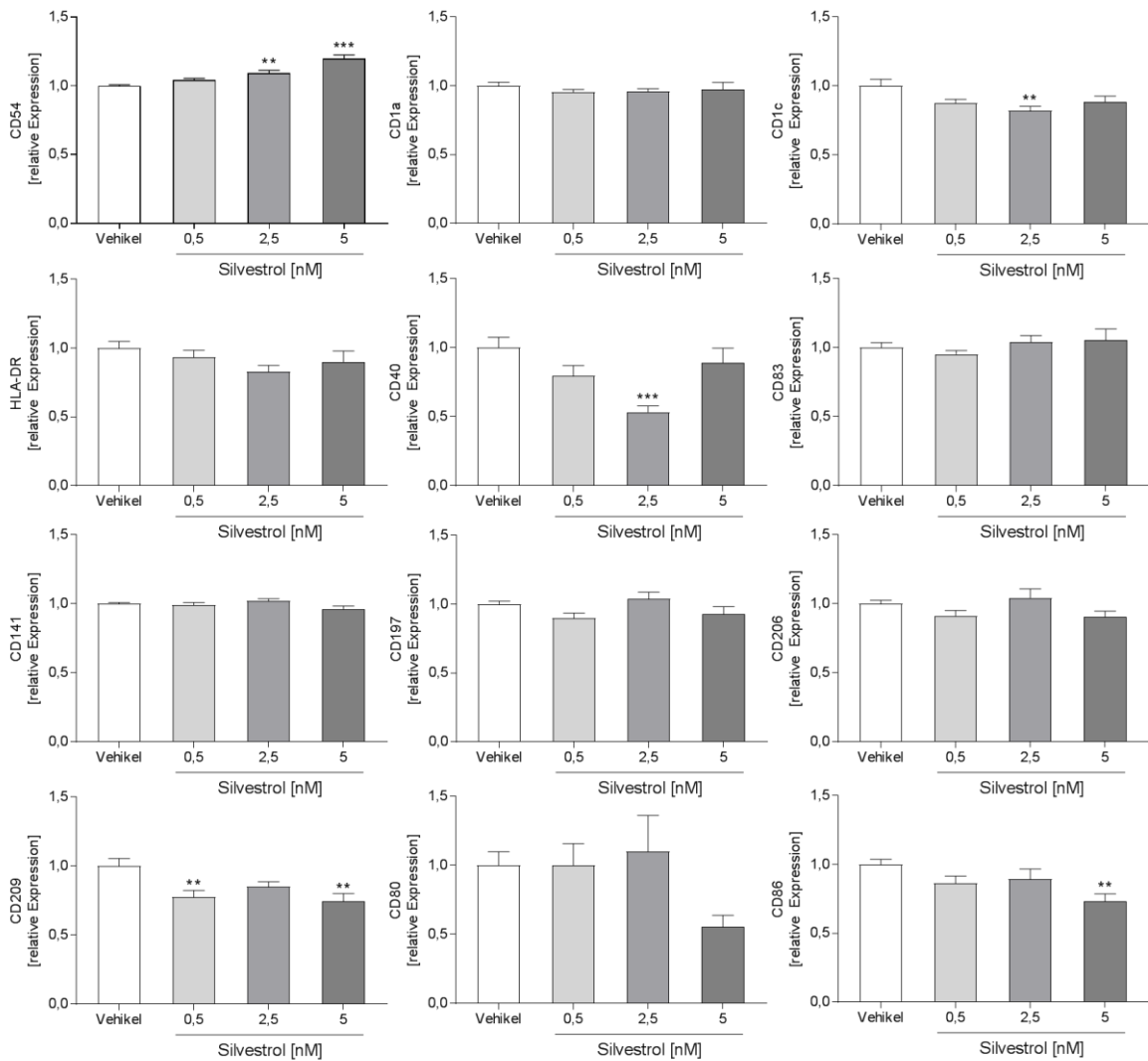


Abbildung 34: Einfluss von Silvestrol auf die Oberflächenmarker aktivierter humaner Dendritischer Zellen. Aus Buffy-Coats isolierte humane Monozyten wurden mit hu_GM-CSF ($c = 10 \text{ ng/ml}$) und hu_IL-4 ($c = 10 \text{ ng/ml}$) für 5 Tage zu Dendritischen Zellen differenziert. Anschließend wurden die Dendritischen Zellen durch die Zugabe eines Stimulations-Mix von TNF- α , IL-6, IL-1 β (c (TNF- α , IL-6, IL-1 β) = 5 ng/ml) und PGE2 ($c = 500 \text{ ng/ml}$) in Anwesenheit von unterschiedlichen Silvestrol-Konzentrationen (0,5/ 2,5/ 5 μM) oder Vehikel (DMSO) für 24 h aktiviert. Nach abgeschlossener Aktivierung wurden die Oberflächenmarker der aktivierten Dendritischen Zellen mittels Durchflusszytometrie in Triplikaten bestimmt. Die relative Expression der spezifischen Oberflächenmarker wurde durch Bezug auf die Vehikel behandelten Kontrollen ermittelt ($n=8$). Signifikanzen wurden mittels 1-Way-ANOVA mit Dunnett's post hoc Test bezogen auf die Vehikel-Gruppe ermittelt. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

Im Überstand der aktivierten Dendritischen Zellen wurden die Konzentrationen der sezernierten Zytokine mittels zytometrischem Bead Array oder ELISA quantifiziert. IL12-p70 wurde nicht signifikant durch 5 nM Silvestrol beeinflusst, während die Konzentrationen von IL-23 sowie IL-8 schon ab 2,5 nM Silvestrol signifikant reduziert wurden (Abbildung 35). IL-10 sowie IL-6 zeigten eine signifikant erhöhte Konzentrationen im Überstand der aktivierten Dendritischen Zellen ab einer Konzentration von 2,5 (IL-6) bzw. 5 nM (IL-10) Silvestrol.

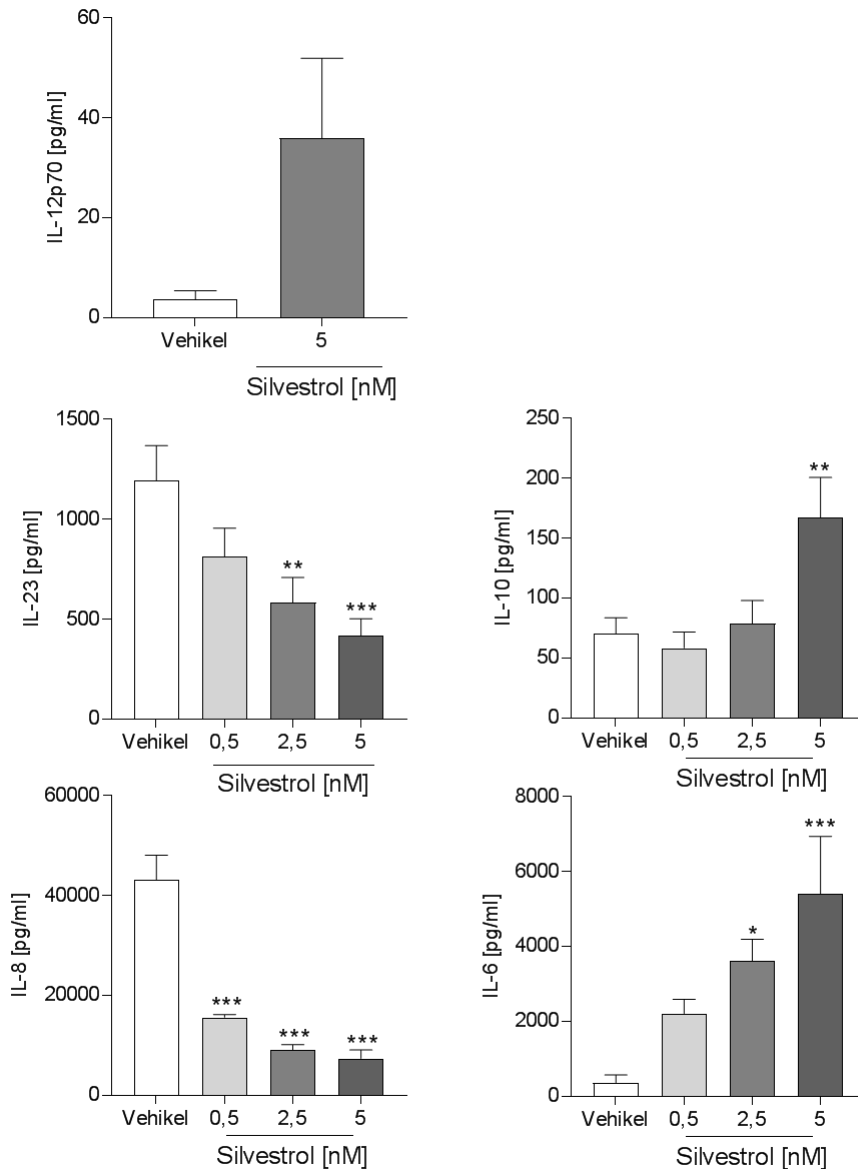


Abbildung 35: Einfluss von Silvestrol auf die sezernierten Zytokine aktivierter humaner Dendritischer Zellen. Aus Buffy-Coats isolierte humane Monozyten wurden mit hu_GM-CSF (c = 10 ng/ml) und hu_IL-4 (c = 10 ng/ml) für 5 Tage zu Dendritischen Zellen differenziert. Anschließend wurden die Dendritischen Zellen durch die Zugabe eines Stimulations-Mix von TNF- α , IL-6, IL-1 β (c (TNF- α , IL-6, IL-1 β) = 5 ng/ml) und PGE2 (c = 500 ng/ml) in Anwesenheit von 5 nM Silvestrol oder Vehikel (DMSO) für 24 h aktiviert. Nach abgeschlossener Aktivierung wurden die Zytokine der aktivierten Dendritischen Zellen im Überstand mittels zytometrischem Bead Array (IL-12p70, IL-10, IL-8, IL-6) oder ELISA (IL-23) in Triplikaten bestimmt (n=8). Signifikanzen wurden mittels 1-Way-ANOVA mit Dunnett's post hoc Test bezogen auf die Vehikel-Gruppe (IL-23, IL-10, IL-8, IL-6) oder ungepaartem t-Test (IL-12p70) ermittelt. *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001

4.2.6 Silvestrol verringert den zellulären Energiestoffwechsel

Um zu untersuchen, ob Silvestrol einen Einfluss auf den zellulären Energiestoffwechsel ausübt, wurden die Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) sowie die extrazelluläre Azidifizierungsrate (ECAR) von humane Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen mittels des Seahorse XFe96 Analyzer (Agilent, Waldbronn) bestimmt (Methode siehe 3.20).

Die Untersuchungen der mit Silvestrol behandelten Monozyten zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die OCR (siehe Abbildung 36). Die Stimulation mit LPS und IFN- γ steigerte die OCR unabhängig von der Vorbehandlung. Im Gegensatz dazu konnte durch Stimulation die ECAR von Silvestrol behandelten Monozyten nicht gesteigert werden, während die Vehikel behandelten Zellen einen deutlichen Anstieg aufwiesen. Somit konnte im Verlauf der Messung ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsformen detektiert werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass Silvestrol die Aktivierung der Glykolyse durch LPS verhindert.

Bei den untersuchten Makrophagen zeigte sich eine signifikante Reduktion der OCR und ECAR durch die Behandlung mit Silvestrol. Die Stimulation mit IFN- γ oder hu_IL-4 zeigte keinen Einfluss auf die Messungen. Bei den Dendritischen Zellen waren die Unterschiede zwischen Silvestrol und Vehikel ebenfalls signifikant unterschiedlich. Die Zugabe des Stimulations-Mix hatte keine Auswirkung auf die OCR. Im Gegensatz dazu wurde die ECAR der Vehikel behandelten Proben durch die Zugabe des Stimulations-Mix deutlich gesteigert, während die Silvestrol behandelten Zellen durch die Stimulation nicht eindeutig beeinflusst wurden. Nach der Stimulation lagen die Messwerte der Vehikel behandelten Proben signifikant höher als die der Silvestrol behandelten Proben. Vor der Stimulation waren die Unterschiede nicht signifikant, jedoch war auch hier die ECAR der Vehikel behandelten Proben tendenziell erhöht. Diese Daten deuten darauf hin, dass Silvestrol die Aktivierung der Glykolyse durch den Stimulations-Mix verhindert. Da eine Aktivierung der Glykolyse typisch für pro-inflammatorische Immunzellen ist, könnten die anti-inflammatorischen Effekte von Silvestrol zumindest teilweise durch die Hemmung der Glykolyse verursacht werden.

Zusammengenommen reduzierte Silvestrol die OCR sowie die ECAR der untersuchten Makrophagen sowie Dendritischen Zellen in allen Untersuchungen signifikant. Die hier gezeigte Reduktion der zellulären Energiestoffwechsel könnte möglicherweise einen zugrundeliegenden Mechanismus der immunmodulierenden Eigenschaften von Silvestrol darstellen.

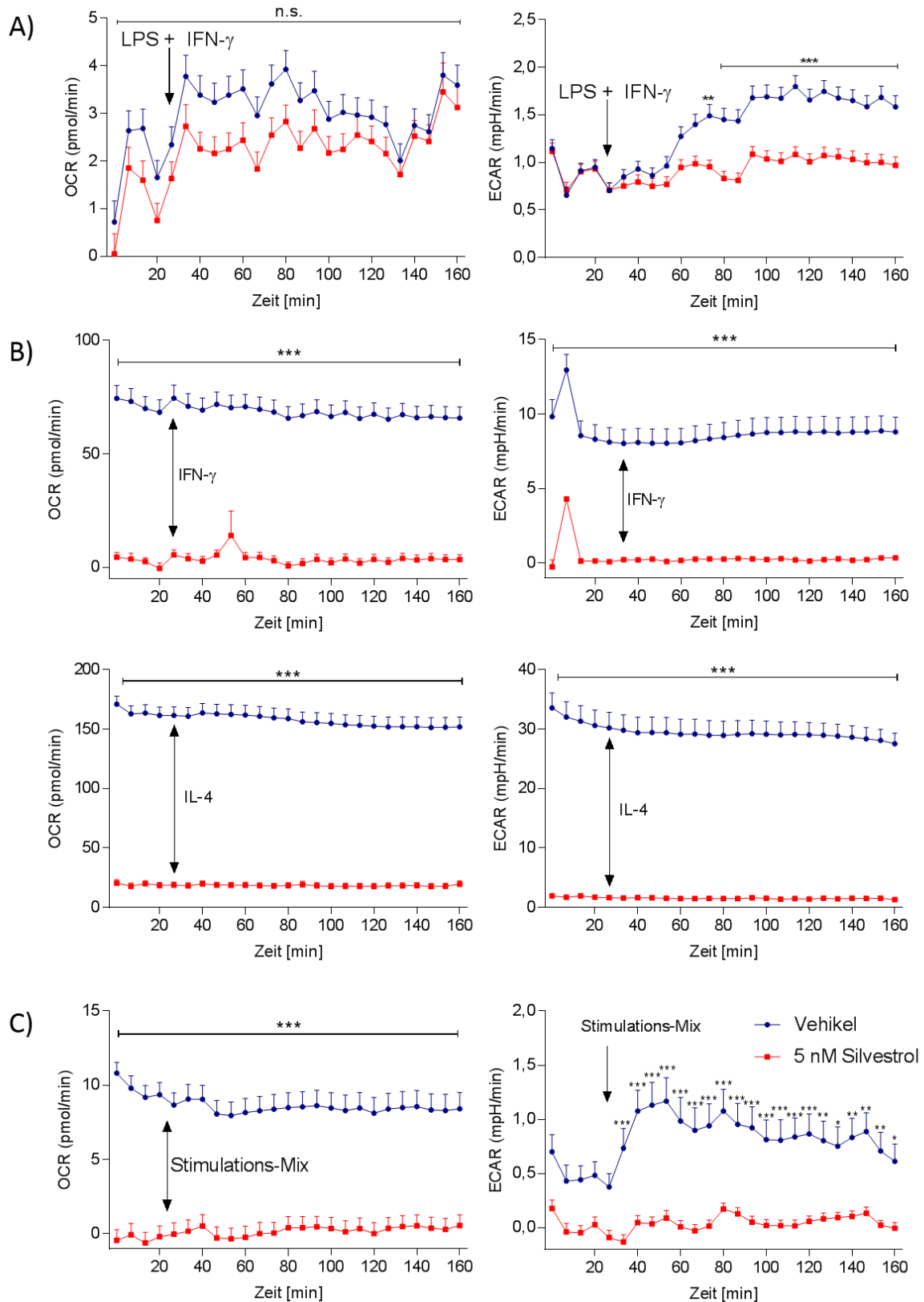


Abbildung 36: Einfluss von 5 nM Silvestrol auf den zellulären Energiestoffwechsel. Untersucht wurde humane Monozyten (A), Makrophagen (B) und Dendritischen Zellen (C). Humane Monozyten wurden aus Buffy-Coats isoliert, stimuliert und für 48 h (Monozyten), 5 Tage (Dendritische Zellen) oder 7 Tage (Makrophagen) inkubiert (37°C, 5 % CO₂). Das Zellkulturmedium der Makrophagen wurde nach 3 Tagen vollständig erneuert. Monozyten wurden ohne weiter Stimulation inkubiert während Makrophagen und Dendritische Zellen mit hu_GM-CSF (c = 10 ng/ml) stimuliert wurden. Dendritische Zellen wurden

zusätzlich mit hu_IL-4 (c = 10 ng/ml) stimuliert. Nach abgeschlossener Inkubation wurde die Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) sowie die extrazelluläre Azidifizierungsrate (ECAR) mittels des Seahorse XFe96 Analyzer (Agilent, Waldbronn) über einen Messzeitraum von 160 min bestimmt (n=3). Nach 30 min wurde die Zellen zusätzlich mit LPS + IFN- γ (A, c(LPS) = 100 ng/ml, c(IFN- γ) = 20 ng/ml), IFN- γ bzw. hu_IL-4 (B, c(IFN- γ) = 20 ng/ml, c(hu_IL-4) = 10 ng/ml) oder einem Stimulations-Mix, bestehend aus TNF- α , IL-6, IL-1 β sowie PGE2 (C, c(TNF- α , IL-6, IL-1 β) = 5 ng/ml, c(PGE2) = 500 ng/ml) stimuliert. Signifikanzen zwischen Vehikel und Steroid Substanz 1o behandelten Zellen wurden mittels 2-Way-ANOVA mit Bonferroini's post hoc Test ermittelt. *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001.

4.3 Immunmodulation durch Steroid Substanz 1o

4.3.1 Auswirkungen von Steroid Substanz 1o auf die Zellviabilität

Eine Grundvoraussetzung für ein Antiinfektiva ist, dass es keine Toxizität gegenüber Immunzellen aufweist. Deshalb wurde zunächst der Einfluss von Steroid Substanz 1o auf die Viabilität von isolierten humanen Immunzellen untersucht. Dafür wurden die isolierten CD14⁺-Zellen in Anwesenheit unterschiedlicher Steroid Substanz 1o-Konzentrationen oder Vehikel differenziert und die Viabilität mittels Orangu-Assay quantifiziert (Methode siehe 3.15). Die Absorptionswerte der unterschiedlichen Behandlungen wurden dabei auf die unbehandelten Kontrollzellen bezogen.

Bei den untersuchten Monozyten zeigte sich zunächst eine transient gesteigerte Zellviabilität mit zunehmender Steroid Substanz 1o-Konzentration (siehe Abbildung 37). Diese Steigerung war lediglich bei 300 μ M nicht mehr signifikant. Die größte Steigerung war bei 50 μ M zu detektieren. Auffällig war, dass Steroid Substanz 1o ab einer Konzentration von 75 μ M zunehmen das Medium trübe und die Zellen sich in Clustern anordneten. Möglicherweise beginnt Steroid Substanz 1o bei dieser hohen Konzentration im Medium auszufallen. Bei 100 sowie 300 μ M waren diese Effekte noch stärker zu beobachten.

Bei den untersuchten Makrophagen stieg ebenfalls die gemessene Zellviabilität bis zu 50 μ M Steroid Substanz 1o. Anschließend sank diese wieder und bei 100 μ M war die Viabilität signifikant reduziert.

Bei den Dendritischen Zellen zeigte sich nur bei 0,5 und 5 μ M Steroid Substanz 1o eine gesteigerte Viabilität. Ab 75 μ M sank die Viabilität und war bei 100 sowie 300 μ M signifikant reduziert.

In den Folgeversuchen wurden anschließend Konzentrationen von bis zu maximal 50 μ M Steroid Substanz 1o verwendet, da alle untersuchten Immunzellen bei dieser Konzentration keine signifikant verringerte Zellviabilität aufwiesen und Steroid Substanz 1o nicht im Medium ausfiel.

Üblicherweise werden neue Wirkstoffe bis zu einer Konzentration von 50 μM getestet, da höhere Plasmakonzentrationen normalerweise nicht erreicht werden können. Zudem zeigten Tierversuche, dass Steroid Substanz 1o eine geringe Bioverfügbarkeit besitzt (Krieg et al., 2017). Aus diesen Gründen wurden keine höheren Steroid Substanz 1o-Konzentrationen in den Folgeversuchen untersucht. Des Weiteren stellte sich die Frage, ob Steroid Substanz 1o möglicherweise einen Einfluss auf den zellulären Energiestoffwechsel hat, da dies den teilweise detektierten Anstieg der Absorptionswerte im Orangu-Assay erklären könnte (Ergebnis siehe 4.3.2).

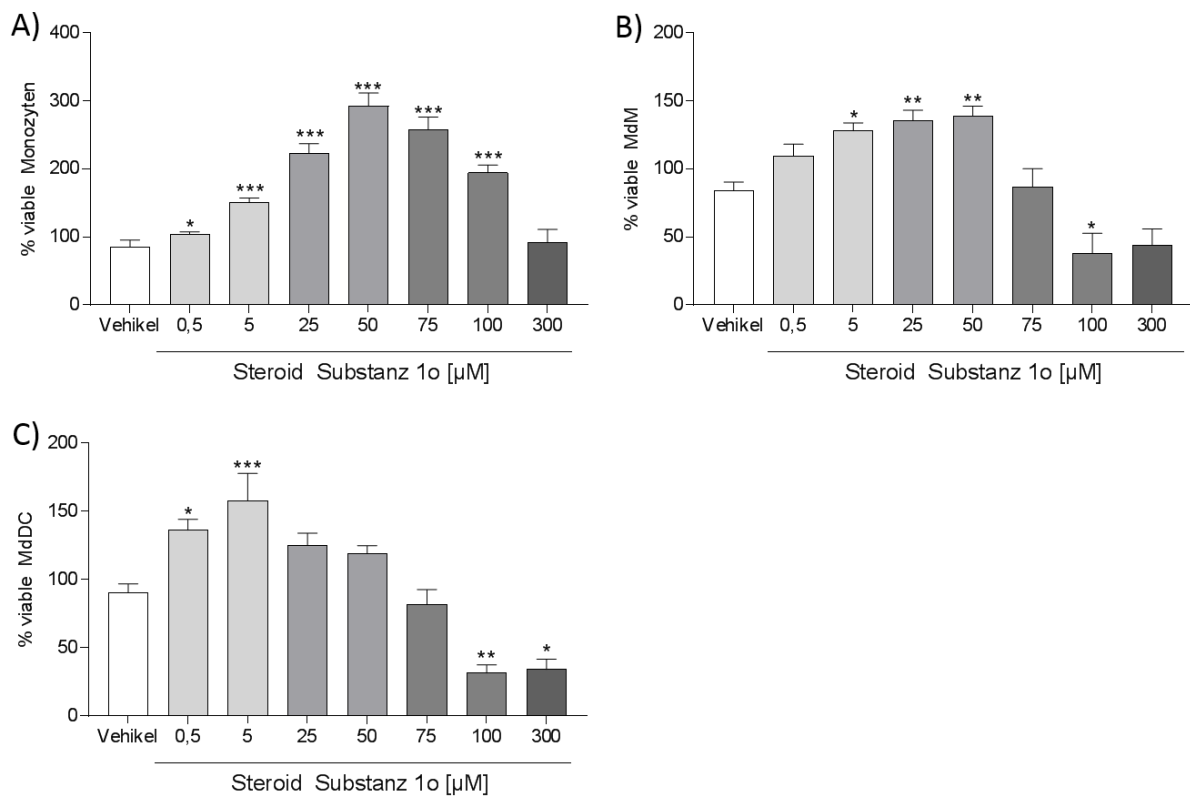


Abbildung 37: Einfluss von Steroid Substanz 1o auf die Zellviabilität. Anteil an viablen Monozyten (A), Makrophagen (B) und Dendritischen Zellen (C) nach der Inkubation mit unterschiedlichen Steroid Substanz 1o-Konzentrationen (0,5/ 5/ 25/ 50/ 75/ 100/ 300 μM) oder Vehikel (DMSO) bezogen auf unbehandelte Zellen (n=3-8). Die Viabilität wurde mittels Orangu-Assay bestimmt. Humane Monozyten wurden aus Buffy-Coats isoliert, stimuliert und für 48 h (Monozyten), 5 Tage (Dendritische Zellen) oder 7 Tage (Makrophagen) inkubiert (37°C, 5 % CO₂). Das Zellkulturmedium der Makrophagen wurde nach 3 Tagen vollständig erneuert. Monozyten wurden ohne weitere Stimulation inkubiert während Makrophagen und Dendritische Zellen mit hu_GM-CSF (c = 10 ng/ml) stimuliert wurden. Dendritische Zellen wurden zusätzlich mit hu_IL-4 (c = 10 ng/ml) stimuliert. Signifikanzen wurden mittels 1-Way-ANOVA mit Dunnett's post hoc Test bezogen auf die Vehikel-Gruppe ermittelt. *p<0,05. ***p<0,001.

4.3.2 Steroid Substanz 1o beeinflusst den zellulären Energiestoffwechsel

Bei den Untersuchungen des Einflusses der Steroid Substanz 1o auf die Zellviabilität (Abbildung 37) zeigte sich eine mögliche Beeinflussung des zellulären Energiestoffwechsels. Um dieser Hypothese auf den Grund zu gehen wurde der Energiestoffwechsel (OCR und ECAR) von humanen Monozyten, polarisierten Makrophagen und Dendritischen Zellen nach Differenzierung mit 50 µM Steroid Substanz 1o durch den Seahorse XFe96 Analyzer (Agilent, Waldbronn) charakterisiert (Methode siehe 3.20).

Bei den untersuchten Monozyten waren OCR und ECAR bei Steroid Substanz 1o behandelten Zellen im Vergleich zum Vehikel tendenziell erhöht, jedoch waren die Unterschiede nur vereinzelt signifikant (Abbildung 38). Die Stimulation mit LPS und IFN-γ steigerte die ECAR bei Steroid Substanz 1o behandelten, nicht jedoch von Vehikel behandelten Zellen. Die OCR wurde nicht eindeutig durch die Stimulation beeinflusst.

Bei den polarisierten M1-Makrophagen zeigte die Behandlung mit Steroid Substanz 1o eine signifikante Reduktion der OCR im Vergleich zum Vehikel. Die Messwerte der ECAR waren bei beiden Behandlungen nur bei den ersten sowie den letzten Messpunkten signifikant unterschiedlich. Bei polarisierten M2-Makrophagen war die OCR durch Steroid Substanz 1o signifikant verringert. Bei der ECAR waren die Messwerte der Steroid Substanz 1o behandelten Zellen dagegen signifikant erhöht. Die polarisierten Makrophagen wurden während der Messung nicht zusätzlich stimuliert.

Bei den untersuchten Dendritischen Zellen lag die OCR der mit Steroid Substanz 1o behandelten Zellen tendenziell über der Vehikel-Gruppe, jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant. Die Stimulation mit dem Stimulations-Mix beeinflusste die OCR nicht. Bei der ECAR waren die ersten beiden Messpunkte signifikant unterschiedlich, jedoch nicht die weiteren Messungen. Nach der Zugabe des Stimulations-Mix erreichten beide Gruppen ein gleichartiges Niveau.

Die Daten deuten darauf hin, dass Steroid Substanz 1o für den Stoffwechsel der Makrophagen auf eine pro-inflammatorische Weise beeinflusst, indem die für M1-Makrophagen charakteristische Glykolyse (ECAR) verstärkt und die für die M2-Makrophagen charakteristische oxidative Phosphorylierung (OCAR) inhibiert wird. Der Einfluss auf den Stoffwechsel der Monozyten sowie Dendritischen Zellen zeigte dagegen keine eindeutige Regulation.

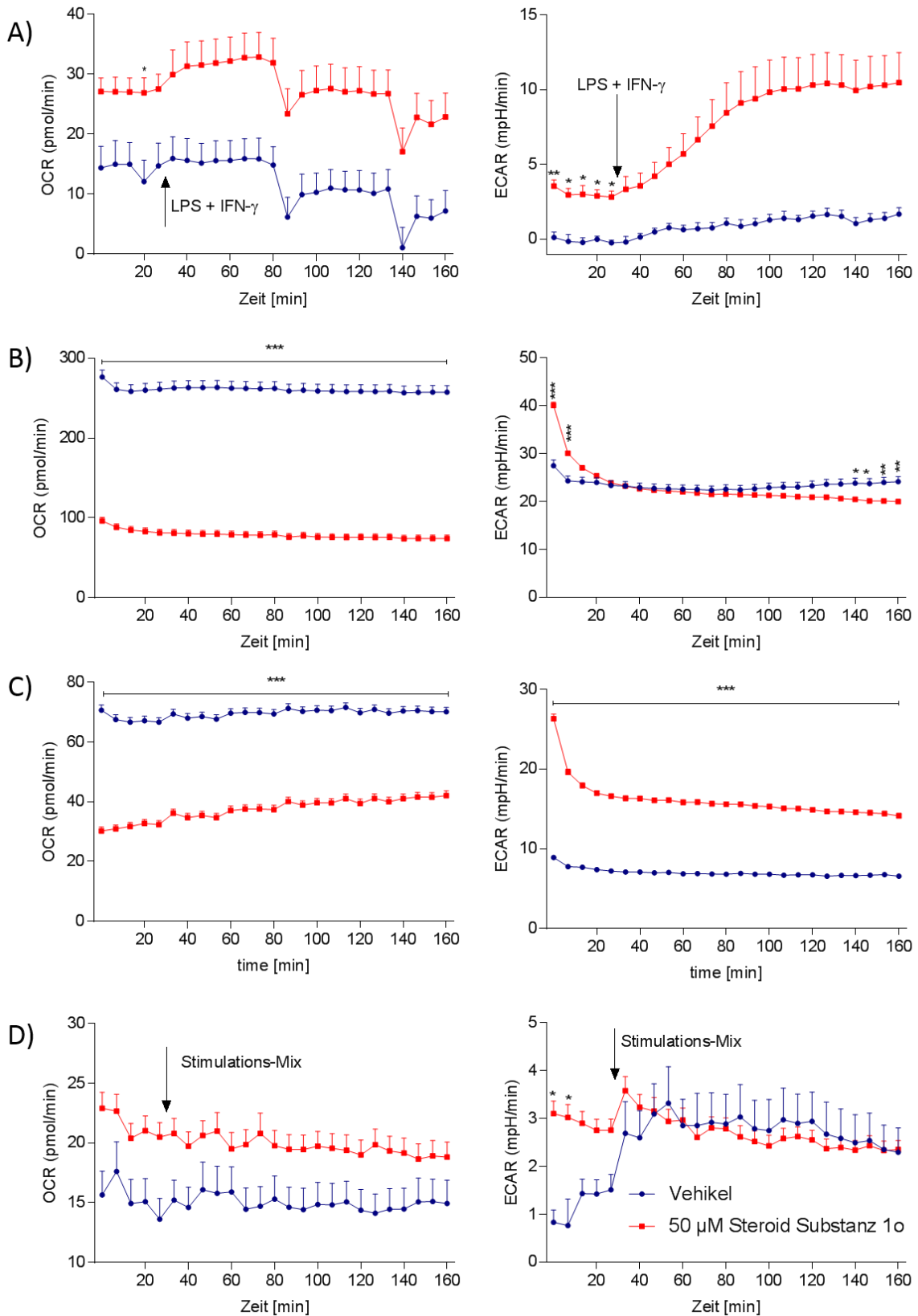


Abbildung 38: Einfluss von 50 μM Steroid Substanz 1o auf den zellulären Energiestoffwechsel von Immunzellen. Untersucht wurden humane Monozyten (A), polarisierten M1-Makrophagen (B), polarisierten M2-Makrophagen (C) und Dendritischen Zellen (D). Humane Monozyten wurden aus Buffy-Coats isoliert, stimuliert und für 48 h (Monozyten), 5 Tage (Dendritische Zellen) oder 8 bzw. 9 Tage (M2- sowie M1-Makrophagen) inkubiert (37°C , 5 % CO_2). Monozyten wurden ohne weitere Stimulation inkubiert während Makrophagen für 7 Tage mit hu_GM-CSF (M1-Makrophagen, c =

10 ng/ml) bzw. hu_M-CSF (M2-Makrophagen, c = 50 ng/ml) differenziert und anschließend für 24 h (M2-Makrophagen) bzw. 48 h (M1-Makrophagen) mit IFN- γ (M1-Makrophagen, c = 20 ng/ml) oder hu_IL-4 (M2-Makrophagen, c = 10 ng/ml) polarisiert wurden. Dendritische Zellen wurden mit hu_GM-CSF (c = 10 ng/ml) und hu_IL-4 (c = 10 ng/ml) stimuliert. Nach abgeschlossener Inkubation wurde die Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) sowie die extrazelluläre Azidifizierungsrate (ECAR) mittels des Seahorse XFe96 Analyzer (Agilent, Waldbronn) über einen Messzeitraum von 160 min bestimmt (n=3). Nach 30 min wurde die Zellen zusätzlich mit LPS + IFN- γ (A, c(LPS) = 100 ng/ml, c(IFN- γ) = 20 ng/ml) oder einem Stimulations-Mix (D), bestehend aus TNF- α , IL-6, IL-1 β sowie PGE2 (c(TNF- α , IL-6, IL-1 β) = 5 ng/ml, c(PGE2) = 500 ng/ml) stimuliert. Signifikanzen zwischen Vehikel und Steroid Substanz 1o behandelten Zellen wurden mittels 2-Way-ANOVA mit Bonferroini's post hoc Test ermittelt. *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001.

4.3.3 Steroid Substanz 1o beeinflusst die Differenzierung humaner Makrophagen

Wie bereits bei Silvestrol (Ergebnis siehe 4.2.2) wurde der Einfluss von Steroid Substanz 1o auf die Differenzierung von Makrophagen aus zuvor isolierten humanen CD14⁺-Immunzellen untersucht. Dabei wurde eine Konzentration von bis zu 50 μ M verwendet. Bei den untersuchten Oberflächenmarkern kam es zu einer signifikanten Steigerung der relativen Expression des resolutionsfördernden Markers CD206 bei 5, 10 sowie 50 μ M Steroid Substanz 1o (Abbildung 39 A). Der pro-inflammatorische Marker HLA-DR zeigte eine signifikante Reduktion bei 25 sowie 50 μ M Steroid Substanz 1o. Die weiteren Oberflächenmarker CD80, CD86, CD163 sowie TREM2 zeigten keine signifikanten Veränderungen in ihrer relativen Expression.

Bei der Untersuchung der Zytokine (Methode siehe 3.12.2) wurden zunächst nur die Zytokine bei der höchsten verwendeten Steroid Substanz 1o-Konzentration quantifiziert. Wenn sich bei 50 μ M Steroid Substanz 1o eine Regulation zeigte, wurden auch niedrigere Konzentrationen untersucht. Gleichermaßen wurde in allen folgenden Zytokin-Bestimmungen verfahren.

Dabei zeigte sich eine signifikante Steigerung von CCL18 und IL-6 in Abhängigkeit von der verwendeten Steroid Substanz 1o-Konzentration (Abbildung 39 B). Die Konzentrationen der Zytokine CCL17 und IL-10 sanken dagegen durch die Gabe von Steroid Substanz 1o. Eine direkte Abhängigkeit von der Menge des eingesetzten Wirkstoffs war in diesem Fall nicht erkennbar.

Somit wurden sowohl pro- als auch anti-inflammatorische bzw. resolutionsfördernde Oberflächenmarker sowie Zytokine reguliert und eine klare Tendenz der Regulation hinsichtlich des Verhältnisses von pro- und anti-Inflammation ist nicht erkennbar.

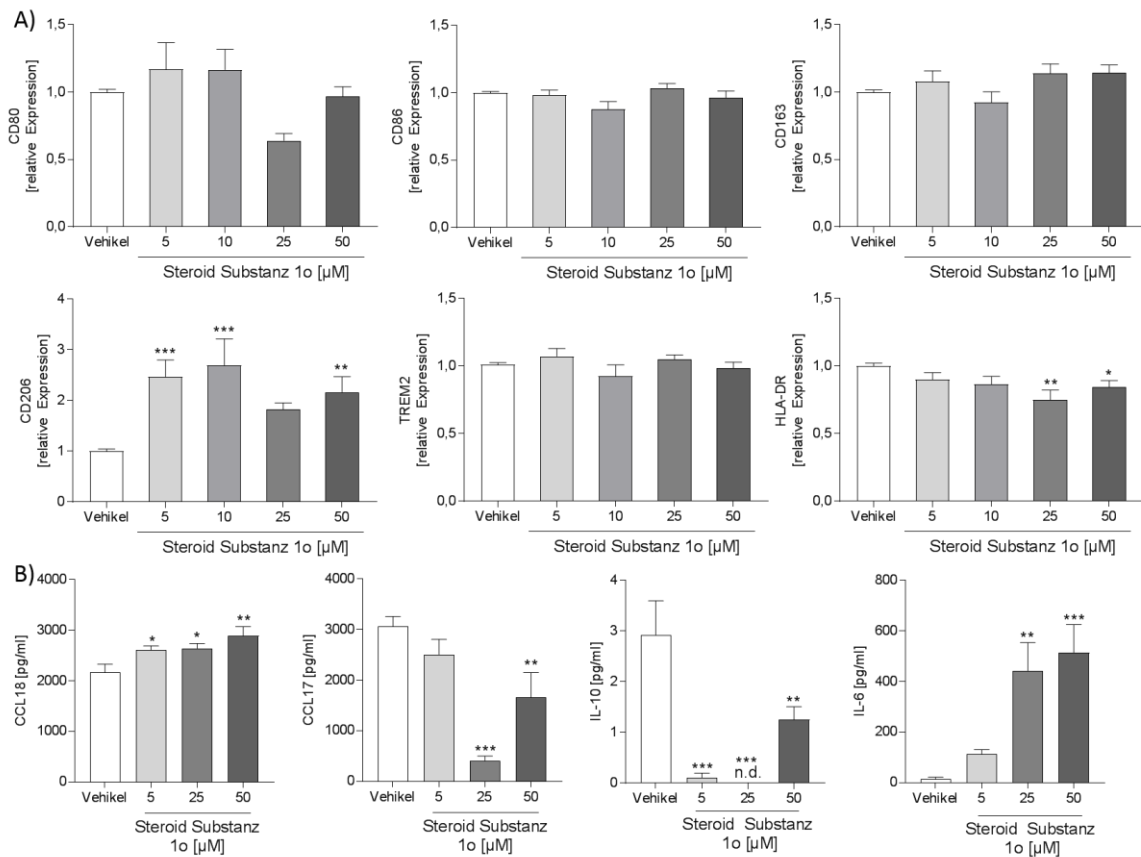


Abbildung 39: Einfluss von Steroid Substanz 1o auf die Differenzierung humaner Makrophagen. Aus Buffy-Coats isolierte humane Monozyten wurden mit unterschiedlichen Steroid Substanz 1o-Konzentrationen (5/ 10/ 25/ 50 µM) oder Vehikel (DMSO) für 7 Tage in Anwesenheit von hu_GM-CSF (c = 10 ng/ml) differenziert (37°C, 5 % CO₂). Nach 3 Tagen wurde das Zellkulturmedium vollständig erneuert. A) Nach abgeschlossener Differenzierung zu Makrophagen wurden die Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie in Triplikaten bestimmt. Die relative Expression der spezifischen Oberflächenmarker wurde durch Bezug auf die Vehikel behandelten Kontrollen ermittelt (n=6-14). B) Die sezernierten Zytokine im Überstand der mit 50 µM Steroid Substanz 1o oder Vehikel behandelten Makrophagen wurden mittels zytometrischem Bead Array (IL-10, IL-6) oder ELISA (CCL18, CCL17) detektiert. Die Messungen erfolgten in Triplikaten (n=4). Signifikanzen wurden mittels 1-Way-ANOVA mit Dunnett's post hoc Test bezogen auf die Vehikel-Gruppe ermittelt. *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001.

4.3.4 Steroid Substanz 1o verstärkt die pro-inflammatorischen Aspekte polarisierter humaner Makrophagen

Nach den Untersuchungen zum Einfluss der Steroid Substanz 1o während der Differenzierung, wurde der Einfluss auf die Polarisierung der Makrophagen analysiert. Dabei zeigte sich bei M1-polarisierten Makrophagen eine signifikante Reduktion der relativen Expression der resolutionsfördernden Oberflächenmarker CD163, CD206 sowie TREM2 (Abbildung 40). Die pro-inflammatorischen Oberflächenmarker CD80, CD86 sowie HLA-DR wurden nicht signifikant beeinflusst.

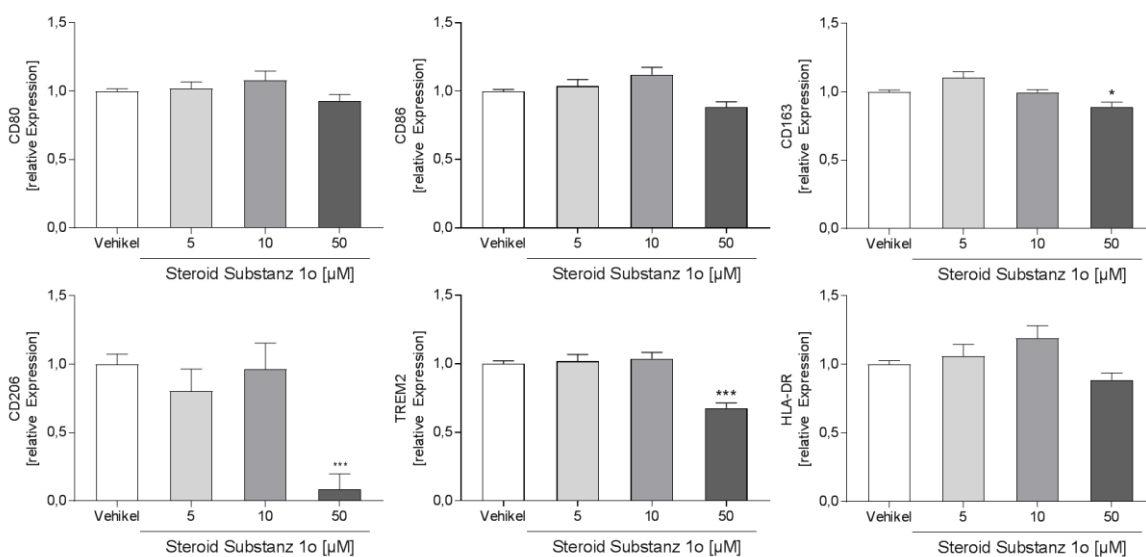


Abbildung 40: Einfluss von Steroid Substanz 1o auf die Oberflächenmarker M1-polarisierter Makrophagen. Aus Buffy-Coats isolierte humane Monozyten wurden für 7 Tage mit hu_GM-CSF (c = 10 ng/ml) differenziert (37°C, 5 % CO₂). Anschließend erfolgte die M1-Polarisierung mit IFN-γ (c = 20 ng/ml) in Anwesenheit unterschiedlicher Steroid Substanz 1o-Konzentrationen (5/ 10/ 50 µM) oder Vehikel (DMSO) für 48 h. Nach abgeschlossener M1-Polarisierung wurden die Oberflächenmarker der M1-Makrophagen mittels Durchflusszytometrie in Triplikaten analysiert. Die relative Expression der spezifischen Oberflächenmarker wurde durch Bezug auf die Vehikel behandelten Kontrollen bestimmt (n=6). Signifikanzen wurden mittels 1-Way-ANOVA mit Dunnett's post hoc Test bezogen auf die Vehikel-Gruppe ermittelt. *p<0,05. ***p<0,001.

Im Überstand der M1-polarisierten Makrophagen mit Steroid Substanz 1o wurden die Konzentrationen der sezernierten Zytokine mittels zytometrischem Bead Array bzw. ELISA quantifiziert. Dabei konnte ein signifikanter Anstieg der pro-inflammatorischen Zytokine IL-23, IL-8 sowie TNF-α detektiert werden (Abbildung 41). Weiterhin wurde das Prostaglandin PGE2 signifikant erhöht. Die Zytokine IL-10, IL-1β, IFN-γ, CCL-18, CXCL10 sowie CCL2 wurden nicht signifikant beeinflusst. Somit stiegen nur die Konzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokine bei einer Konzentration von 50 µM an.

Durch die Reduktion der relativen Expression von 3 anti-inflammatorischen bzw. resolutionsfördernden Oberflächenmarkern und der Steigerung von 3 pro-inflammatorischen Zytokinen sowie PGE2 im Überstand scheint Steroid Substanz 1o während der M1-Polarisierung deutliche pro-inflammatorische Effekte zu vermitteln und damit den M1-Phenotyp zu verstärken. Auffällig ist dabei, dass alle Effekte erst bei 50 μ M Steroid Substanz 1o auftreten.

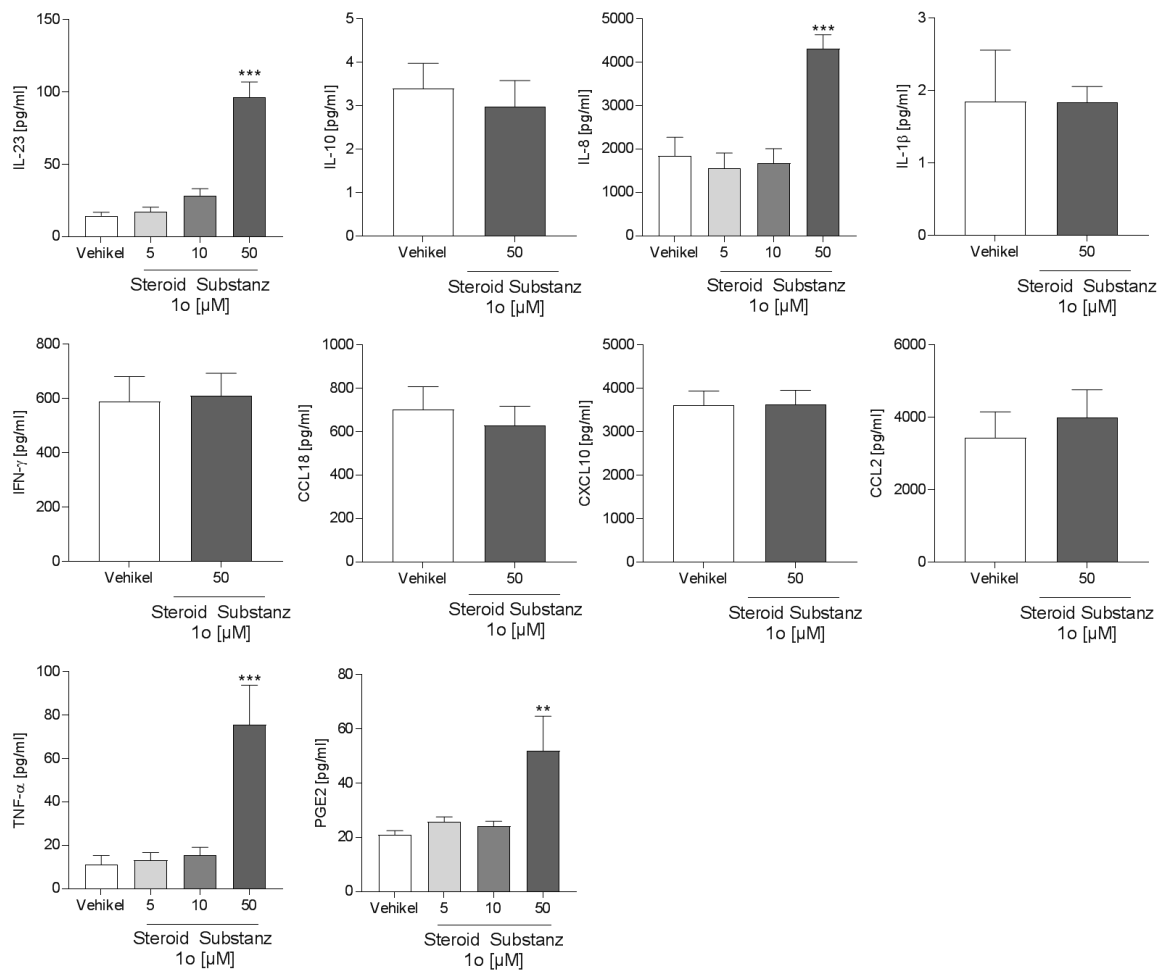


Abbildung 41: Einfluss von Steroid Substanz 1o auf die sezernierten Zytokine M1-polarisierter Makrophagen. Aus Buffy-Coats isolierte humane Monozyten wurden für 7 Tage mit hu_GM-CSF ($c = 10$ ng/ml) differenziert (37°C , 5% CO_2). Anschließend erfolgte die M1-Polarisierung mit IFN- γ ($c = 20$ ng/ml) in Anwesenheit von $50\ \mu\text{M}$ Steroid Substanz 1o oder Vehikel (DMSO) für 48 h. Nach abgeschlossener M1-Polarisierung wurden die Konzentrationen der sezernierten Zytokine sowie von PGE2 im Überstand der M1-Makrophagen mittels zytometrischem Bead Array (IL-10, IL-8, IL-1 β , IFN- γ , CCL18, CXCL10, CCL2, TNF- α) oder ELISA (IL-23, PGE2) in Triplikaten bestimmt ($n=6$). Signifikanzen wurden mittels 1-Way-ANOVA mit Dunnett's post hoc Test bezogen auf die Vehikel-Gruppe (IL-23, IL-8, TNF- α , PGE2) oder ungepaartem t-Test (IL-10, IL-1 β , IFN- γ , CCL18, CXCL10, CCL2) ermittelt. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

Bei der M2-Polarisation der Makrophagen zeigte sich eine signifikante Reduktion der relativen Expression des pro-inflammatorischen Oberflächenmarkers CD80 sowie des resolutionsfördernden Markers CD206 bei 50 μM Steroid Substanz 1o (Abbildung 42). Die Expression von CD206 war bereits ab 10 μM Steroid Substanz 1o signifikant verringert. Die Marker CD86, CD163, TREM2 sowie HLA-DR waren nicht signifikant verändert.

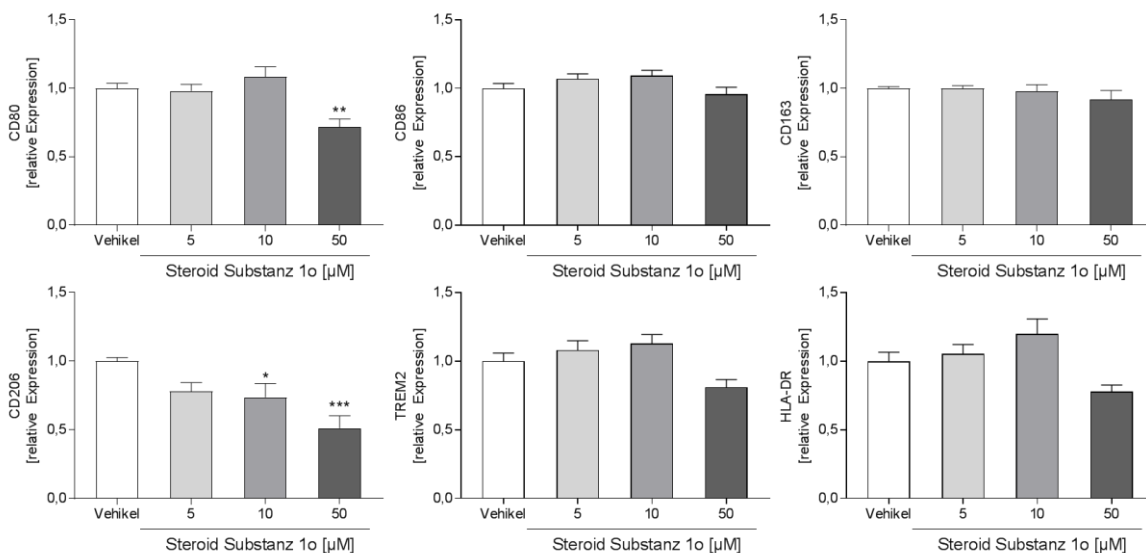


Abbildung 42: Einfluss von Steroid Substanz 1o auf die Oberflächenmarker M2-polarisierter Makrophagen. Aus Buffy-Coats isolierte humane Monozyten wurden für 7 Tage mit hu_M-CSF ($c = 50 \text{ ng/ml}$) differenziert (37°C , 5 % CO_2). Anschließend erfolgte die M2-Polarisierung mit hu_IL-4 ($c = 10 \text{ ng/ml}$) in Anwesenheit unterschiedlicher Steroid Substanz 1o-Konzentrationen (5/ 10/ 50 μM) oder Vehikel (DMSO) für 24 h. Nach abgeschlossener M2-Polarisierung wurden die Oberflächenmarker der M2-Makrophagen mittels Durchflusszytometrie in Triplikaten analysiert. Die relative Expression der spezifischen Oberflächenmarker wurde durch Bezug auf die Vehikel behandelten Kontrollen bestimmt ($n=6$). Signifikanzen wurden mittels 1-Way-ANOVA mit Dunnett's post hoc Test bezogen auf die Vehikel-Gruppe ermittelt. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

Bei den sezernierten Zytokinen im Überstand der M2-polarisierten Makrophagen führte die Gabe von 50 μM Steroid Substanz 1o zu einem signifikanten Anstieg der pro-inflammatorischen Zytokine IL-8, IL-1 β , CXCL10 sowie TNF- α (Abbildung 43). CCL2 wurde nur bei 10 μM Steroid Substanz 1o signifikant erhöht. Die Zytokine IL-23, IL-10, IFN- γ , CCL18 sowie PGE2 waren nicht signifikant beeinflusst.

Somit führte Steroid Substanz 1o bei M2-polarisierten Makrophagen zu keiner klaren Tendenz bei der relativen Expression der Oberflächenmarker, jedoch waren die pro-inflammatorischen Zytokine im Überstand von mit 50 μM Steroid Substanz 1o behandelten Makrophagen deutlich erhöht.

Zusammenfassend zeigte sich bei der M1- und M2-Polarisation eine Steigerung der pro-inflammatorischen Zytokine im Überstand der Makrophagen sowie eine Reduktion des resolutionsfördernden Oberflächenmarkers CD206. Dies deutet darauf hin, dass Steroid Substanz 1o primär die pro-inflammatorischen Aspekte der Immunantwort durch polarisierte Makrophagen verstärkt.

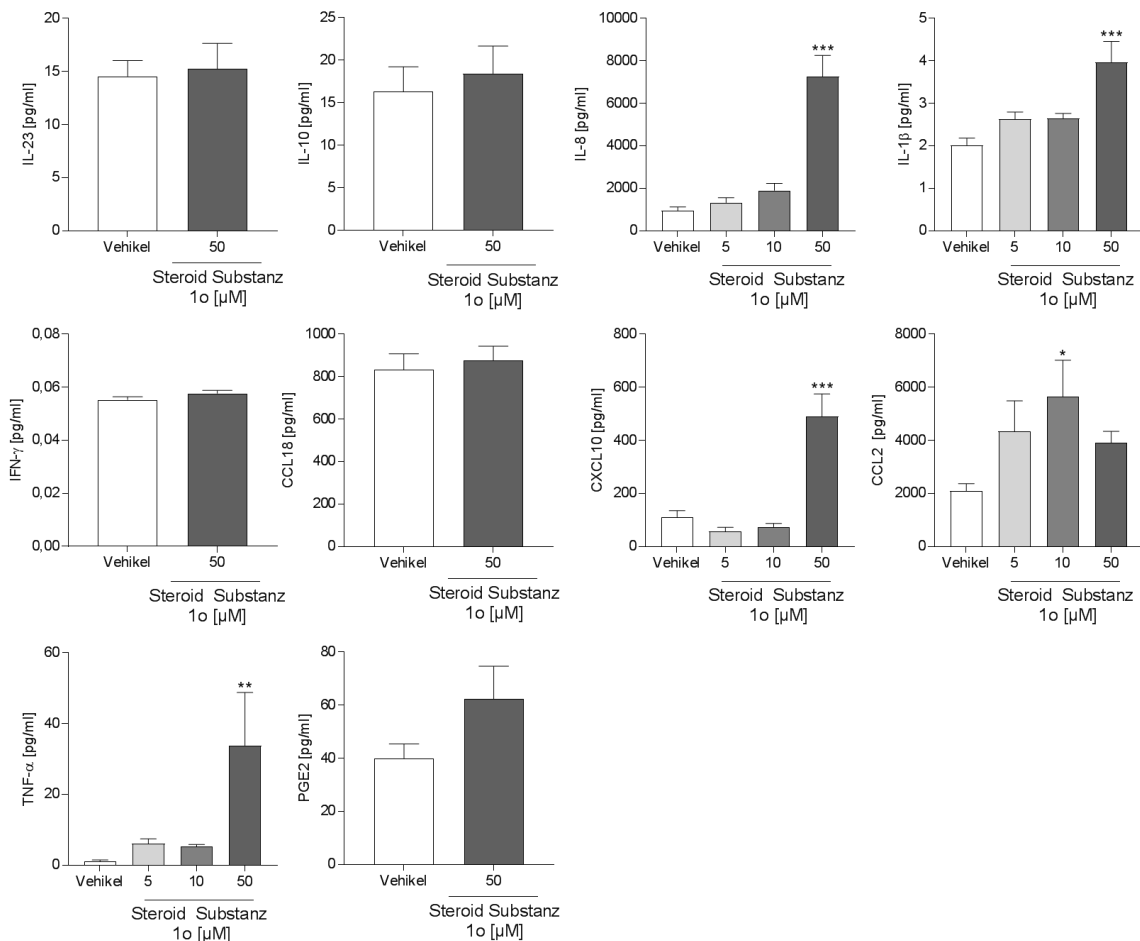


Abbildung 43: Einfluss von Steroid Substanz 1o auf die sezernierten Zytokine M2-polarisierter Makrophagen. Aus Buffy-Coats isolierte humane Monozyten wurden für 7 Tage mit hu_M-CSF (c = 50 ng/ml) differenziert (37°C, 5 % CO₂). Anschließend erfolgte die M2-Polarisierung mit hu_IL-4 (c = 10 ng/ml) in Anwesenheit von 50 μM Steroid Substanz 1o oder Vehikel (DMSO) für 24 h. Nach abgeschlossener M2-Polarisierung wurden die Konzentrationen der sezernierten Zytokine sowie PGE2 im Überstand der M2-Makrophagen mittels zytometrischem Bead Array (IL-10, IL-8, IL-1β, IFN-γ, CCL18, CXCL10, CCL2, TNF-α) oder ELISA (IL-23, PGE2) in Triplikaten bestimmt (n=6). Signifikanzen wurden mittels 1-Way-ANOVA mit Dunnett's post hoc Test bezogen auf die Vehikel-Gruppe (IL-8, IL-1β, CXCL10, CCL2, TNF-α) oder ungepaartem t-Test (IL-23, IL-10, IFN-γ, CCL18, PGE2) ermittelt. *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001.

4.3.5 Steroid Substanz 1o reduziert die Differenzierung humaner Dendritischer Zellen

Wie bereits zuvor bei den Makrophagen (Ergebnis siehe 4.2.2) wurde der Einfluss der Steroid Substanz 1o auf die Differenzierung von Dendritischen Zellen aus isolierten humanen CD14⁺-Immunzellen untersucht.

Dabei zeigte sich eine Reduktion der relativen Expression der pro-inflammatorischen Oberflächenmarker CD1a, CD1c, HLA-DR, CD209 sowie des anti-inflammatorischen bzw. toleranzfördernden Markers CD206 bei 25 und 50 μ M Steroid Substanz 1o (Abbildung 44). Die Expression von CD197 war bei 5 und 25 μ M reduziert. CD83 zeigte eine signifikante Reduktion bei 0,5 und 25 μ M Steroid Substanz 1o während der toleranzfördernde Marker CD141 und der pro-inflammatorische Marker CD80 bei 50 μ M signifikant erhöht waren. Die pro-inflammatorischen Oberflächenmarker CD54, CD40 sowie CD86 waren nicht signifikant verändert. Trotz der Reduktion von CD206 und der Verstärkung von CD80 sowie CD141 wurden überwiegend pro-inflammatorische Oberflächenmarker bei 50 μ M Steroid Substanz 1o reduziert.

Im Überstand der differenzierten Dendritischen Zellen wurden die Konzentrationen von IL-23, IL-10, IL-8 und IL-6 mittels zytometrischem Bead Array bzw. ELISA bestimmt (Abbildung 45). Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 bei allen untersuchten Konzentrationen von Steroid Substanz 1o. Die Konzentration von IL-6 war bei 50 μ M Steroid Substanz 1o signifikant erhöht. Die übrigen Zytokine zeigten keine signifikante Veränderung. Demnach regulierte Steroid Substanz 1o während der Differenzierung von Dendritischen Zellen überwiegend pro-inflammatorische aber auch einige anti-inflammatorische bzw. toleranzfördernde Oberflächenmarker und reduziert die Sezernierung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10. Das pro-inflammatorische Zytokin IL-6 zeigte eine signifikante Steigerung bei 50 μ M Steroid Substanz 1o. Eine eindeutige Tendenz ist demnach nicht erkennbar, jedoch scheint die Differenzierung insgesamt durch Steroid Substanz 1o gehemmt zu werden.

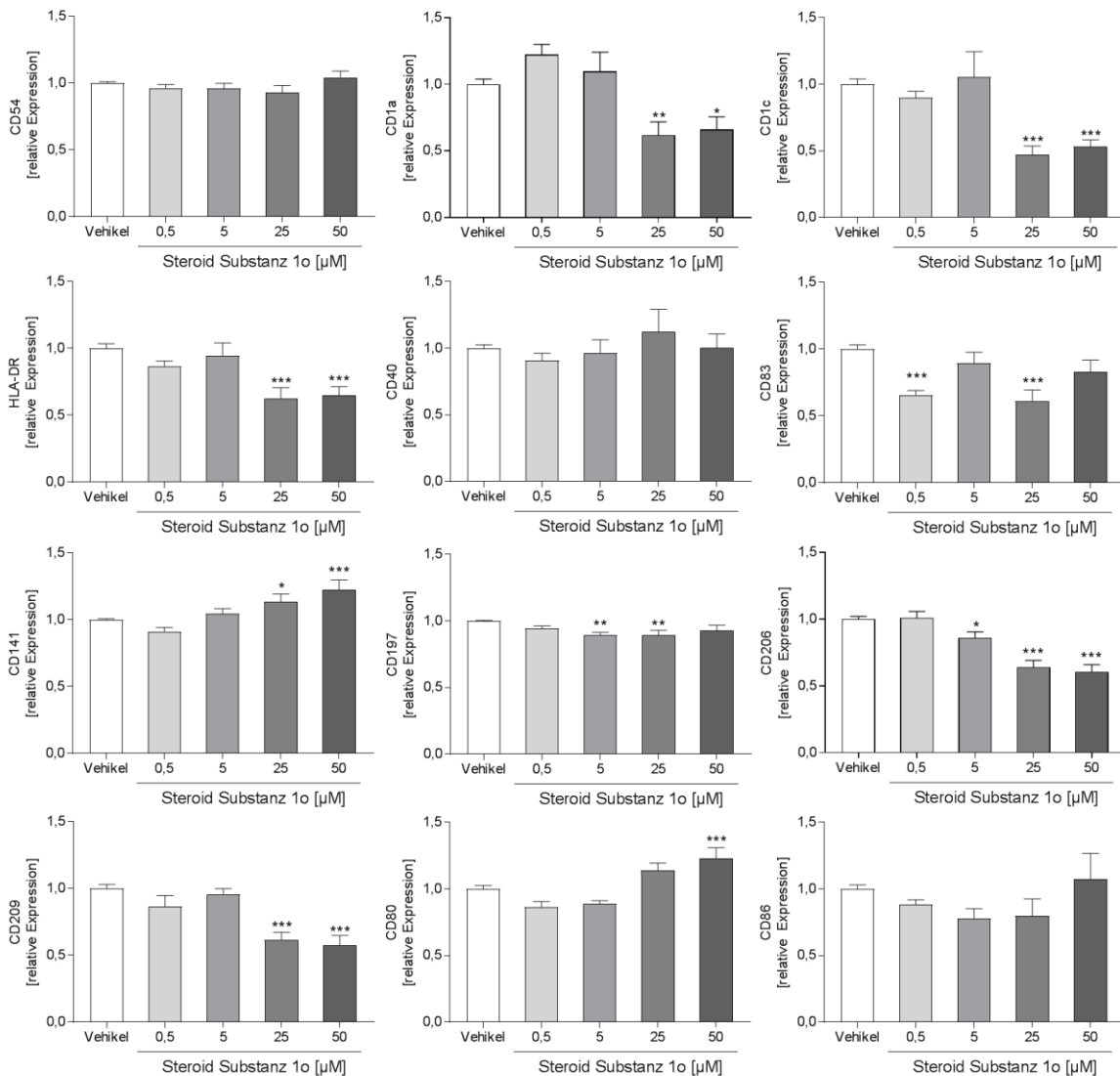


Abbildung 44: Einfluss von Steroid Substanz 1o auf die Oberflächenmarker humaner Dendritischer Zellen während der Differenzierung. Aus Buffy-Coats isolierte humane Monozyten wurden mit unterschiedlichen Steroid Substanz 1o-Konzentrationen (0,5/ 5/ 25/ 50 nM) oder Vehikel (DMSO) für 5 Tage mit hu_GM-CSF ($c = 10$ ng/ml) sowie hu_IL-4 ($c = 10$ ng/ml) zu Dendritischen Zellen differenziert. Nach abgeschlossener Differenzierung wurden die Oberflächenmarker der Dendritischen Zellen mittels Durchflusszytometrie in Triplikaten bestimmt. Die relative Expression der spezifischen Oberflächenmarker wurde durch Bezug auf die Vehikel behandelten Kontrollen ermittelt ($n=6-11$). Signifikanzen wurden mittels 1-Way-ANOVA mit Dunnett's post hoc Test bezogen auf die Vehikel-Gruppe ermittelt. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

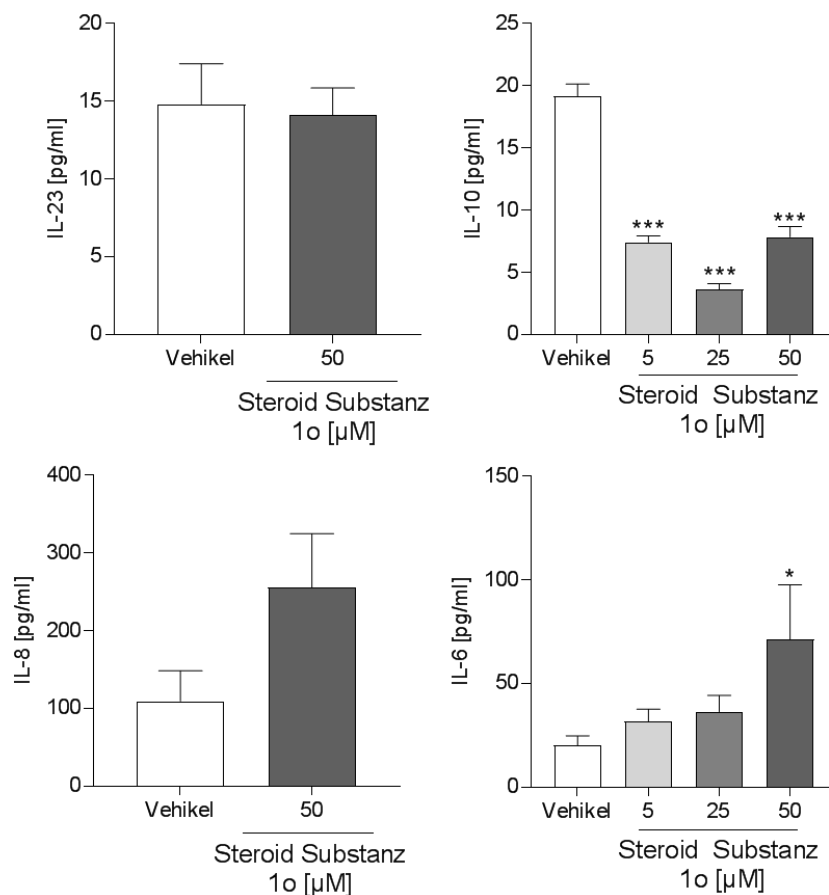


Abbildung 45: Einfluss von Steroid Substanz 1o auf die sezernierten Zytokine humaner Dendritischer Zellen während der Differenzierung. Aus Buffy-Coats isolierte humane Monozyten wurden mit 50 µM Steroid Substanz 1o oder Vehikel (DMSO) für 5 Tage mit hu_GM-CSF (c = 10 ng/ml) sowie hu_IL-4 (c = 10 ng/ml) zu Dendritischen Zellen differenziert. Nach abgeschlossener Differenzierung wurden die Zytokine der Dendritischen Zellen im Überstand mittels zytometrischem Bead Array (IL-10, IL-8, IL-6) oder ELISA (IL-23) in Triplikaten bestimmt (n=4). Signifikanzen wurden mittels 1-Way-ANOVA mit Dunnett's post hoc Test bezogen auf die Vehikel-Gruppe (IL-10, IL-6) oder ungepaartem t-Test (IL-23, IL-8) ermittelt. *p<0,05. ***p<0,001.

4.3.6 Steroid Substanz 1o hemmt die Aktivierung humaner Dendritischer Zellen

Während der Differenzierung der Dendritischen Zellen zeigte Steroid Substanz 1o eine vorwiegend inhibierende Wirkung durch die Reduktion einiger pro- sowie anti-inflammatorischer bzw. toleranzfördernder Oberflächenmarker sowie Zytokine. Um zu untersuchen, welcher Einfluss von Steroid Substanz 1o auf bereits zuvor differenzierte Dendritische Zellen besteht, wurden humane CD14⁺-Immunzellen zu Dendritischen Zellen differenziert und in Anwesenheit unterschiedlicher Steroid Substanz 1o-Konzentrationen für 24 h mit einem Stimulations-Mix aktiviert (Methode siehe 3.19).

Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion des toleranzfördernden Markers CD206 sowie der pro-inflammatorischen Marker CD54, CD1a, CD1c, CD40, CD197, CD209, CD80 und CD86 bei 50 μM Steroid Substanz 1o. Die relative Expression der Oberflächenmarker HLA-DR, CD83 und CD141 waren nicht signifikant verändert.

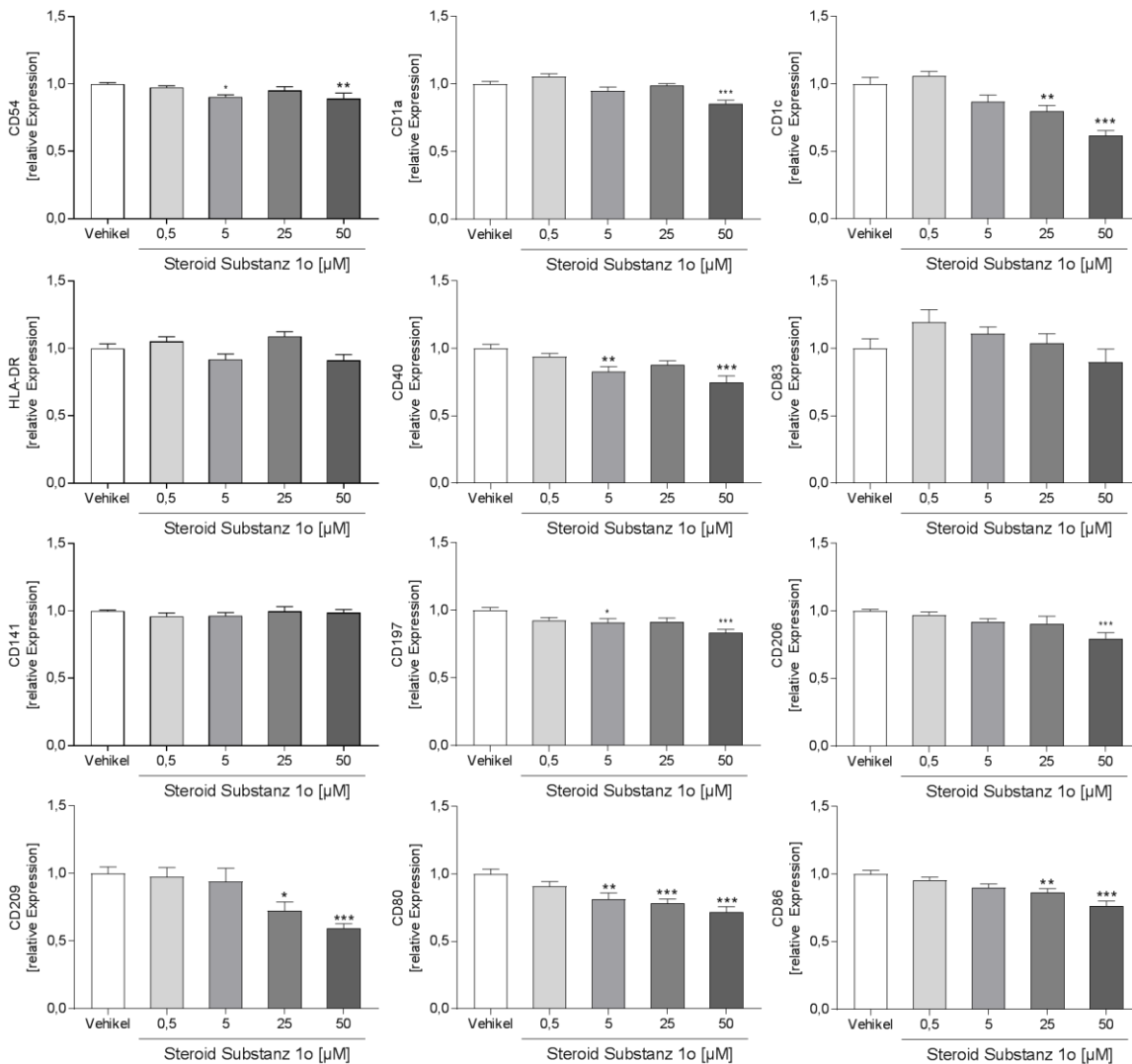


Abbildung 46: Einfluss von Steroid Substanz 1o auf die Oberflächenmarker aktivierter humaner Dendritischer Zellen. Aus Buffy-Coats isolierte humane Monozyten wurden mit hu_GM-CSF ($c = 10 \text{ ng/ml}$) und hu_IL-4 ($c = 10 \text{ ng/ml}$) für 5 Tage zu Dendritischen Zellen differenziert. Anschließend wurden die Dendritischen Zellen durch die Zugabe eines Stimulations-Mix bestehend aus TNF- α , IL-6, IL-1 β (c (TNF- α , IL-6, IL-1 β) = 5 ng/ml) und PGE2 ($c = 500 \text{ ng/ml}$) in Anwesenheit von unterschiedlichen Steroid Substanz 1o-Konzentrationen (0,5/ 5/ 25/ 50 μM) oder Vehikel (DMSO) für 24 h aktiviert. Nach abgeschlossener Aktivierung wurden die Oberflächenmarker der aktivierten Dendritischen Zellen mittels Durchflusszytometrie in Triplikaten bestimmt. Die relative Expression der spezifischen Oberflächenmarker wurde durch Bezug auf die Vehikel behandelten Kontrollen bestimmt ($n=6$). Signifikanzen wurden mittels 1-Way-ANOVA mit Dunnett's post hoc Test bezogen auf die Vehikel-Gruppe ermittelt. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

Im Überstand der aktivierten Dendritischen Zellen erhöhten 25 und 50 μM Steroid Substanz 1o die Konzentration des pro-inflammatorischen Zytokins IL-23 (Abbildung 47). Die Konzentration der weiteren Zytokine IL-12p70, IL-10, IL-8 und IL-6 wurden nicht signifikant beeinflusst.

Somit zeigt Steroid Substanz 1o bei der Aktivierung der Dendritischen Zellen eine Reduktion zahlreicher pro-inflammatorischer Oberflächenmarker sowie eines toleranzfördernden Oberflächenmarkers. Dadurch scheint Steroid Substanz 1o die Aktivierung der Dendritischen Zellen zu verringern. Interessanterweise scheinen die pro-inflammatorischen Oberflächenmarker dabei besonders betroffen zu sein.

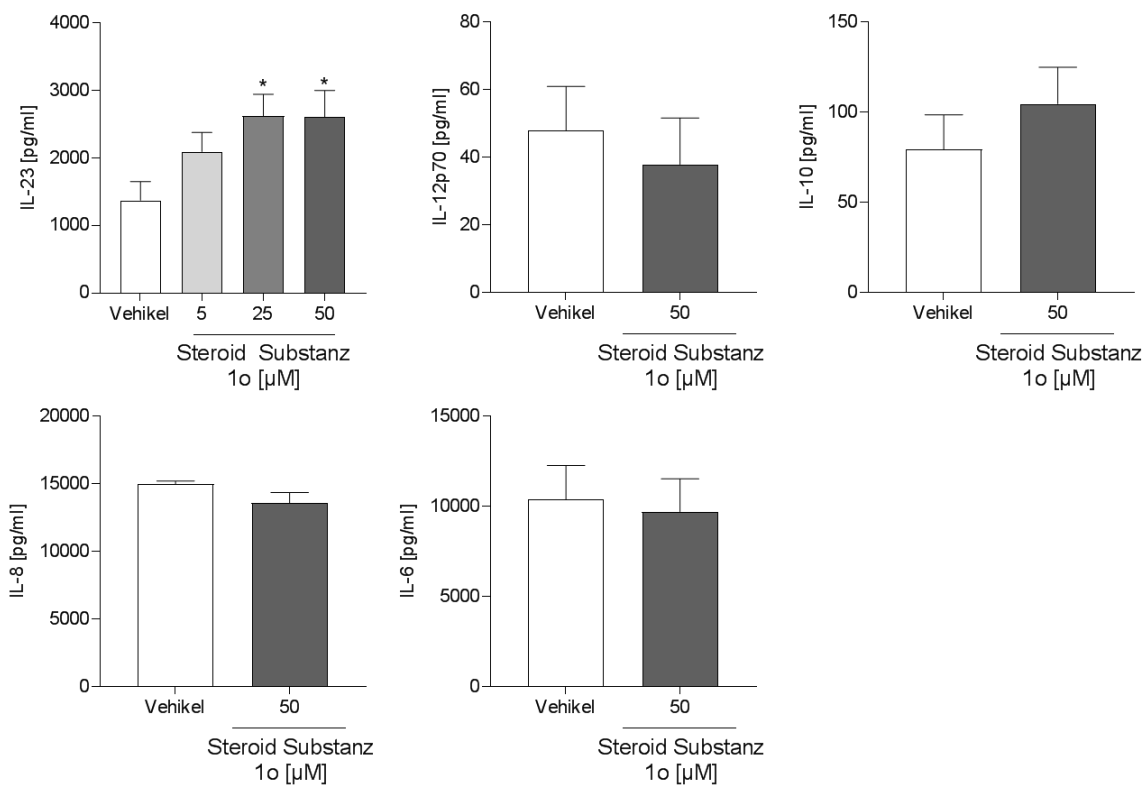


Abbildung 47: Einfluss von Steroid Substanz 1o auf die sezernierten Zytokine aktivierter humaner Dendritischer Zellen. Aus Buffy-Coats isolierte humane Monozyten wurden mit hu_GM-CSF ($c = 10 \text{ ng/ml}$) und hu_IL-4 ($c = 10 \text{ ng/ml}$) für 5 Tage zu Dendritischen Zellen differenziert. Anschließend wurden die Dendritischen Zellen durch die Zugabe eines Stimulations-Mix bestehend aus TNF- α , IL-6, IL-1 β (c (TNF- α , IL-6, IL-1 β) = 5 ng/ml) und PGE2 ($c = 500 \text{ ng/ml}$) in Anwesenheit von $50 \mu\text{M}$ Steroid Substanz 1o oder Vehikel (DMSO) für 24 h aktiviert. Nach abgeschlossener Aktivierung wurden die Zytokine der aktivierten Dendritischen Zellen im Überstand mittels zytometrischem Bead Array (IL-12p70, IL-10, IL-8, IL-6) oder ELISA (IL-23) in Triplikaten bestimmt ($n=6$). Signifikanzen wurden mittels 1-Way-ANOVA mit Dunnett's post hoc Test bezogen auf die Vehikel-Gruppe (IL-23) oder ungepaartem t-Test (IL-12p70, IL-10, IL-8, IL-6) ermittelt. * $p < 0,05$.

5 Diskussion

5.1 Auswirkungen von Phytol im murinen EAE-Modell

Die Untersuchungen des Naturstoffs Phytol im murinen EAE-Modell zeigten, dass die orale Gabe von Phytol die Anzahl der T-Zellen, Makrophagen und Neutrophilen in den inguinalen Lymphknoten und im lumbalen Rückenmark verringerte (Blum et al., 2018b). Interessanterweise konnte in Ratten die höchste Akkumulation von Phytol in den Lymphknoten nachgewiesen werden (Olofsson et al., 2007). Daher ist es naheliegend, dass die stärksten Effekte von Phytol dort auftreten. Die reduzierte Anzahl an Immunzellen in den Lymphknoten könnte folglich zu einer reduzierten Anzahl an infiltrierenden Immunzellen im lumbalen Rückenmark führen. Dafür spricht auch die damit einhergehende weniger ausgeprägte Demyelinisierung im lumbalen Rückenmark, welche letztlich zu der Reduktion der klinischen EAE-Scores führt. Weiterhin beeinflussten Phytol und seine Metaboliten die Proliferationsfähigkeit von T-Zellen sowie das Verhältnis der T-Zell-Subtypen indem die Anzahl der pro-inflammatorischen T_H1-Zellen reduziert wurde. Zudem verringerte Phytol ROS-vermittelte DNA-Schäden im lumbalen Rückenmark. Immunhistologische Untersuchungen zeigten, dass die ROS-vermittelten DNA-Schäden vornehmlich in der unmittelbaren Umgebung von eingewanderten Immunzellen auftraten und dass vor allem die ZNS ansässigen Mikroglia sensitiv auf ROS reagierten. Die *ex vivo* Untersuchungen mit NOX2KO-Tieren wiesen auf einen partiellen Einfluss von NOX2 bei der Wirkung von Phytol hin. In EAE-Versuchen mit NOX2KO-Tieren konnte dennoch ein positiver Einfluss von Phytol auch in Abwesenheit von NOX2 festgestellt werden. Dies legt nahe, dass die Wirkungen von Phytol nur zum Teil von NOX2 abhängig sind.

5.1.1 Immunmodulatorische Effekt von Phytol durch ROS-Interaktionen

Die Gabe von Phytol reduzierte die Ausprägung der klinischen Symptome von EAE-Tieren und verzögerte den Beginn der Erkrankung (Blum et al., 2018b). Gleichartige Effekte konnten auch in Untersuchungen an der RA festgestellt werden. Dabei verringerte die Gabe von Phytol die gezeigten klinischen Symptome in Ratten und erhöhte die Kapazität des oxidativen Bursts von Granulozyten *in vitro* (Hultqvist et al., 2006). Hultqvist et al. postulierten, dass die verstärkte ROS-Produktion dabei möglicherweise auf der Aktivierung von NOX2 beruht (Hultqvist et al., 2015). Des Weiteren konnte in einem Transfer-Modell der RA ein Einfluss von Phytol auf autoreaktive T-Zellen beobachtet werden (Olofsson et al., 2003, Hultqvist et al., 2006). Untersuchungen im Bereich der Schmerzforschung zeigten ebenfalls Effekte von Phytol auf ROS. Ratten mit einem Polymorphismus in Gen *Ncf1*, welches die zytosolische Untereinheit

der NADPH-Oxidasen codiert, produzierten weniger ROS nach CCL2-Stimulation und verhinderten dadurch eine CCL2-induzierte Hyperalgesie. Durch die Gabe von Phytol konnte in diesen Tieren die ROS-Produktion gesteigert und die CCL2-induzierbare Hyperalgesie wiederhergestellt werden (Hackel et al., 2013).

Allgemein sind die Auswirkungen von ROS vielseitig und in der Literatur kontrovers diskutiert (Schieber and Chandel, 2014, Di Meo et al., 2016). Durch die Oxidation von Lipiden und der Denaturierung von Proteinen können ROS zur vielfältigen Zellschädigungen führen (Cross et al., 1987). Speziell im ZNS führt oxidativer Stress zur Schädigung von ansässigen Zelltypen, wie Oligodendrozyten und Neuronen, was eine verstärkte Demyelinisierung zur Folge hat (Gilgun-Sherki et al., 2004, Friese et al., 2014). Phytol konnte auf mRNA-Ebene die Expression von NOX2 im lumbalen Rückenmark reduzieren (Blum et al., 2018b). Die dadurch reduzierte Produktion von ROS passt zu der verringerten Demyelinisierung in Mäusen mit Phytol-Diät im Vergleich zu Mäusen mit Standard-Diät sowie die verringerten ROS-vermittelten DNA-Schäden (Abbildung 10 & Abbildung 17).

Jedoch haben ROS nicht nur schädigende, sondern auch physiologische sowie anti-inflammatorische Wirkungen (Droge, 2002, Mittal et al., 2014). Beispielsweise fungieren ROS bei zahlreichen Signalwegen als Botenstoffe (Finkel, 2011) und sind bei der Regulation von neuronalen Aktivitäten beteiligt (Beckhauser et al., 2016). Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einem Knockout des Gens *Ncf1* stärker ausgeprägte Krankheit-Symptome im Modell der RA aufweisen als Wildtyp-Tiere. Holmdahl et al. stellten die Hypothese auf, dass ROS als immunologische Botenstoffe von APZ gebildet werden und u.a. für die Regulation von autoimmunen T-Zellen verantwortlich sind (Holmdahl et al., 2013). Eine verringerte ROS-Produktion führt neben den Modellen der RA auch bei Morbus Crohn zu einer Verschlechterung der Erkrankung was die Hypothese der immunregulatorischen Funktion von ROS weiter untermauert (Olofsson et al., 2003, Hultqvist et al., 2004, Conway et al., 2012). Eine Ausnahme stellt Diabetes Typ 1 dar: Die Mutation des *Ncf1* Gens führt hierbei zu einer Verbesserung der Symptomatik. In diesem Fall wird ROS eine überwiegende Beteiligung an der Zerstörung der β -Zellen innerhalb der Langerhans-Inseln zugeschrieben (Thayer et al., 2011).

Die Reduktion von ROS führt auch abseits der Autoimmunreaktionen zu einer Verschlechterung der Symptomatik, beispielsweise bei Zymosan- oder Beta-Glucan induzierten Entzündungen. Dies weist darauf hin, dass unterschiedliche Signalwege durch ROS reguliert werden können (van de Loo et al., 2003, Deffert et al., 2012).

Des Weiteren besteht ein negativer Einfluss von ROS, produziert von Phagozyten, auf die Signalwege, die Aktivierung sowie die Proliferationsrate von T-Zellen (Belikov et al., 2015). Diese Befunde passen zu der beobachteten Reduktion der Anzahl der T-Zellen im lumbalen

Rückenmark und in den inguinalen Lymphknoten (Abbildung 11) sowie der Hochregulation der NOX2 mRNA in den inguinalen Lymphknoten durch die Gabe von Phytol (Blum et al., 2018b). Somit würde die Regulation der T-Zell-Aktivität indirekt durch die von Phagozyten produzierten ROS erfolgen. Weiterhin konnte auch im Blut von EAE-Tieren mit Phytol-Diät eine signifikante Verringerung der T-Zellen detektiert werden (Tafferner, 2016). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Regulation der T-Zellen im Gewebe durch die Interaktionen mit den von APZ sezernierten ROS vermittelt wird so wie es Holmdahl et al. postuliert haben.

Richards und Clark zeigten, dass auch ROS aus anderen Quellen einen Einfluss auf die Immunantwort haben können (Richards and Clark, 2009). Beispielsweise produzieren B-Zellen ebenfalls ROS, welche die eigene Proliferationsrate verringern indem die Zellen in der G₀-Phase zurückgehalten werden. Durch die Deletion der NOX2-Untereinheit gp91^{phox} konnte die Produktion von ROS verringert werden und die B-Zellen zeigten eine erhöhte Proliferation im Vergleich zum Wildtyp (Richards and Clark, 2009).

In Studien zu MS und dem Guillain-Barré-Syndrom konnte gezeigt werden, dass isolierte und stimulierte Phagozyten von Patienten mit schwerem Krankheitsverlauf eine geringere ROS-Produktion aufwiesen als die Phagozyten von Patienten mit einem milderem Krankheitsverlauf. Allerdings konnten keine Unterschiede zwischen den Patienten und der Kontrollgruppe festgestellt werden was darauf hinweist, dass die verringerte ROS-Produktion eher eine Begleiterscheinung und nicht die Ursache darstellt (Mossberg et al., 2007, Mossberg et al., 2009, Mossberg et al., 2010).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Auswirkungen von ROS von der Lokalisation (Gewebe- und Zelltyp) und dem Zeitpunkt (Beginn oder akute Phase) der Entstehung abhängig sind und sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Wirkungen zeigen.

5.1.2 Zeitliche Verzögerung der Phytol-Effekte

Während der akuten Phase der Erkrankung (Tag 16) konnten entgegen der Erwartung keine Unterschiede in der Anzahl der ins ZNS infiltrierenden T-Zellen zwischen Standard- und Phytol-Diät festgestellt werden. Die klinischen Scores der beiden Versuchsgruppen unterschieden sich zu diesem Zeitpunkt signifikant, weshalb auch eine verringerte Anzahl an infiltrierenden T-Zellen erwartet wurde. In der Anfangsphase der Erkrankung (Tag 12) waren jedoch signifikante Unterschiede zwischen Standard- und Phytol-Diät bei der Immunzellzahl im ZNS messbar. Somit könnte die verringerte frühe Infiltration von Immunzellen bei der Phytol-Diät zu einer zeitlichen Verzögerung bei der Ausbildung der klinischen Symptome führen. Bei der Standard-Diät kam es wahrscheinlich durch die rasche Infiltration zu einer

gesteigerten Inflammation in der Anfangsphase, welche sich später in den stärker ausgeprägten klinischen Symptomen während der akuten Phase zeigte.

EAE-Studien zeigten, dass es während dem Krankheitsverlauf zunächst zu einem Anstieg der Immunzellen in den inguinalen Lymphknoten kommt und später zu einer Infiltration in das lumbale Rückenmark (Barthelmes et al., 2016). Die hier erhobenen Daten zeigen jedoch ein umgekehrtes Verhalten (Abbildung 11). In Tieren mit Standard-Diät zeigte sich die höchste Anzahl an Immunzellen im lumbalen Rückenmark bereits an Tag 12/14 während die Immunzellkonzentration in den inguinalen Lymphknoten erst an Tag 16 ihr Maximum erreichte. Dies lässt sich ebenfalls durch die zeitliche Verzögerung der Krankheitsprozesse im EAE-Modell erklären: Möglicherweise kam es bei Beginn der Erkrankung zu einer starken Infiltration des ZNS, welche nach Tag 14 bereits wieder abnahm. Dadurch kam es zu einer Akkumulation der Immunzellen in der Peripherie was zu dem beobachteten Maximum der Immunzellen in den inguinalen Lymphknoten an Tag 16 führte. Ebenso wäre es möglich das Immunzellen aus dem lumbalen Rückenmark zurück in die Peripherie wanderten und den Effekt somit weiter verstärkten.

5.1.3 Die Rolle der Metaboliten Phytan- und Pristansäure

Neben Phytol selbst wurden auch die beiden Metaboliten Phytan- sowie Pristansäure *ex vivo* untersucht, insbesondere, weil beiden Substanzen immunmodulierende Eigenschaften zugesprochen werden. Beispielsweise können Phytan- sowie Pristansäure den „free fatty acid receptor 1“ (FFA1, GPR40) Rezeptor aktivieren (Kruska and Reiser, 2011). Dieser G-Protein gekoppelte Rezeptor aktiviert die glukose-abhängige Insulin-Sekretion durch Phosphoinositid-Phospholipase C (PLC)-abhängige intrazelluläre Freisetzung von Ca^{2+} . Neben den Auswirkungen auf den Glukose Stoffwechsel beeinflusst die Aktivierung des GPR40 Rezeptors außerdem den inflammatorischen Prozess durch eine Reduktion der Apoptose in β -Zellen (Verma et al., 2014). Ein Knockout von GPR40 in Mäusen führt zur verstärkten zerebralen Entzündung (Sartorius et al., 2015). Diese Effekte wurden bisher in β -Zellen aus dem Pankreas sowie in Astrozyten beobachtet, aber es ist durchaus möglich, dass die Aktivierung von GPR40 ebenfalls eine Rolle bei den Signalwegen von Lymphozyten innehat.

Trotz der strukturellen Ähnlichkeit unterscheiden sich Phytan- und Pristansäure in ihrem Einfluss auf die Proliferationsrate von T-Zellen, da nur die Inkubation mit Phytansäure zu einer signifikanten Reduktion der Proliferationsrate führte. Dies deutet zunächst darauf hin, dass die anti-inflammatorischen Effekte der Phytol-Diät möglicherweise vor allem auf dem primären Metaboliten Phytansäure und nicht auf der mittels α -Oxidation gewonnenen Pristansäure beruhen. Dies ist insofern erstaunlich da der Phytansäure einige toxische Effekte, wie die Induktion von Apoptose in Purkinje Zellen (Powers et al., 1999) sowie die direkte Schädigung

von Mitochondrien (Kahlert et al., 2005), zugesprochen werden. Zusätzlich führt die Akkumulation von Phytansäure im Organismus zum Refsum-Syndrom (Wanders and Komen, 2007). Die toxische Wirkung von Phytansäure soll auf 2 Wirkmechanismen beruhen: Durch die strukturelle Ähnlichkeit mit Geranylgeraniol sowie den Vitaminen A, E und K kann Phytansäure als Anti-Metabolit wirken. Des Weiteren soll Phytansäure durch den Einbau in die Zellmembran dort vorhandene Membranlipide- und Proteine schädigen und die Durchlässigkeit der Membran erhöhen (Young et al., 2001, Wanders and Komen, 2007). Jedoch kann die Phytansäure auch protektive Wirkungen durch die Stimulation des nukleären Transkriptionsfaktor Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor- α (PPAR- α) ausüben. Die Stimulation dieses Transkriptionsfaktors verbessert den Krankheitsverlauf im EAE-Modell durch die Veränderung des Zytokin-Profiles von IL-12 und der verstärkten Freisetzung von IL-4 (Xu et al., 2007, Yang et al., 2008). Der genetische KO von PPAR- α in Mäusen zeigt ebenfalls die anti-inflammatorische Funktion des Transkriptionsfaktors: Die Stimulation von T-Zellen aus PPAR- α KO Tieren führt im Vergleich zu Wildtyp-Tieren zu einer erhöhten pro-inflammatorischen Zytokin-Produktion sowie einer erhöhten Proliferationsrate (Choi and Bothwell, 2012). Des Weiteren kann Phytansäure zu einer verstärkten Produktion von ROS führen, welche neben den potentiell schädigenden Wirkungen auch anti-inflammatorische Prozesse beeinflussen können (Kahlert et al., 2005).

In den Untersuchungen zur Beeinflussung der T-Zell-Subtypen in Wildtyp-Tieren zeigten sowohl Phytan- als auch Pristansäure eine Reduktion der pro-inflammatorischen T_H1 -Zellen. Die Stimulation mit Pristansäure erhöhte zusätzlich die Anzahl der anti-inflammatorischen T_H2 -Zellen (Abbildung 14). Somit zeigte Pristansäure zwar keine Verringerung der Proliferationsfähigkeit von isolierten T-Zellen, jedoch konnten in dieser Arbeit die T-Zell-Subtypen zu Gunsten der anti-inflammatorischen Seite beeinflusst werden.

Im Gegensatz zu diesen Befunden werden der Pristansäure in der Literatur primär pro-inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben. In Untersuchungen der RA bei Ratten konnte Pristan den Krankheitsverlauf induzieren während Phytol keinen Einfluss darauf zeigte. Interessanterweise führte in diesen Versuchen Pristan, im Gegensatz zu Phytol, zu keiner erhöhten ROS-Produktion (Hultqvist et al., 2006). Des Weiteren ist eine erhöhte Sezernierung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, IFN- γ sowie IL-17A durch T-Zellen nach Stimulation mit Pristansäure beschrieben (Tafferner, 2016). In den gleichen Versuchen konnte zwar auch eine erhöhte Konzentration des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 nachgewiesen werden, jedoch wurde geschlussfolgert, dass die pro-inflammatorischen Auswirkungen überwiegen. Gerade IL-6 spielt eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von naiven T-Zellen zu den pro-inflammatorischen Subtypen T_H1 sowie T_H17 und ist maßgeblich bei der Pathogenese im EAE-Modell beteiligt, da IL-6KO Tiere keine Ausbildung von klinischen Symptomen nach EAE-Induktion zeigen (Mendel et al., 1998, Tanaka et al., 2014). Die Blockierung des IL-6-

Rezeptors ist ein pharmakologischer Ansatz, welcher bei der Therapie der RA durch den Einsatz des humanisierten Antikörpers Tocilizumab verfolgt wird (Tanaka et al., 2013). Das pro-inflammatorische Zytokin IL-17A ist ebenfalls maßgeblich an dem Krankheitsverlauf der MS beteiligt und in chronischen MS-Läsionen hochreguliert (Das Sarma et al., 2009). IL-17A fördert des Weiteren die Produktion von IL-6 im ZNS (Amedei et al., 2012, Erta et al., 2012). Somit könnte Pristansäure möglicherweise die Produktion von IL-17A und somit indirekt auch die Produktion von IL-6 sowie weiteren pro-inflammatorischen Zytokinen induzieren. Durch die Widersprüche in den hier ermittelten Befunden und der Literatur ist keine klare Tendenz der Wirkungsweise von Pristansäure innerhalb des Entzündungsprozesses bei der EAE erkennbar.

5.1.4 Die Beteiligung von NOX2 an den Effekten von Phytol

In der Literatur wird Phytol als ein Aktivator von NOX2 beschrieben (Olofsson et al., 2003, Hultqvist et al., 2006). Aus diesem Grund wurde überprüft inwiefern die hier untersuchten Effekte von Phytol durch NOX2 vermittelt werden.

Die Daten der *ex vivo* Versuche deuten zum Teil auf eine Abhängigkeit der Phytol-vermittelten Effekte hin. Die verringerte Proliferationsfähigkeit von Splenozyten durch die Gabe von Phytol in Wildtyp-Mäusen (Tafferner, 2016, Blum et al., 2018b) konnte in NOX2KO-Tieren nicht nachgewiesen werden (Abbildung 20). Untersuchungen in der Jurkat T-Zell-Linie zeigen, dass Phytol einen Arrest der Zellen in der S-Phase induziert und so zu einem erhöhten Zelltod führt. Weiterhin konnten diese Effekte von Phytol durch die Gabe von NOX-Inhibitoren aufgehoben werden (Itoh et al., 2018). Somit scheint die Interaktion von Phytol mit der Familie der NOX von Bedeutung für die Induktion des Zellzyklusarrestes zu sein.

Die beiden Metaboliten von Phytol scheinen dagegen unabhängig von NOX2 auf die Proliferationsfähigkeit von isolierten T-Zellen zu wirken. Der Einfluss der Phytansäure unterschied sich nicht zwischen NOX2WT und NOX2KO während Pristansäure die Proliferationsfähigkeit der T-Zellen nur im NOX2KO reduzierte, jedoch nicht im NOX2WT (Vergleiche Abbildung 13 und Abbildung 21). Eine Inhibition der Proliferationsfähigkeit durch Phytansäure wurde ebenfalls bei der PC-3 Prostatakrebs-Zelllinie (Tang et al., 2007) sowie bei bovinen PBMCs nachgewiesen (Renner et al., 2013). Möglicherweise reduzieren Phytan- und Pristansäure die Proliferationsfähigkeit der T-Zellen unabhängig von NOX2 über einen anderen Wirkmechanismus als Phytol. Aktuell sind in der Literatur keine Auswirkungen von Pristansäure auf die Proliferationsfähigkeit humaner Zellen beschrieben.

Bei der Untersuchung des Einflusses von Phytan- und Pristansäure auf die T-Zell-Subtypen zeigten sich in NOX2KO- und NOX2WT-Tieren gleichartige Tendenzen. Lediglich die Anzahl

der T_H17-Zellen wurde im NOX2WT nur tendenziell und nicht signifikant durch Pristansäure reduziert, wohingegen die Reduktion im NOX2KO signifikant war (Vergleiche Abbildung 14 und Abbildung 22). Bei der Analyse der sezernierten Zytokine der T-Zellen zeigten NOX2KO- und NOX2WT-Tiere eine gleichartige Reduktion von IFN- γ durch die Gabe von Phytansäure bei 48 h Inkubation. Ein solch inhibitorischer Effekt von Phytansäure auf IFN- γ wurde bereits auch auf mRNA- sowie Protein-Ebene beschrieben (Nakanishi et al., 2018).

Im NOX2KO konnte zusätzliche eine leicht signifikante Verringerung von IL-6 durch Phytansäure festgestellt werden, welche im NOX2WT nicht vorhanden war (Vergleiche Abbildung 15 und Abbildung 23). Eine Reduktion von IL-6 sowie weiteren pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , TNF- α) wurde bei Untersuchungen der Auswirkungen von Linolsäure-Isomeren auf isolierte Schweine-PBMCs nach LPS-Stimulation festgestellt (Changhua et al., 2005). Da Linolsäure eine strukturelle Ähnlichkeit zu Phytansäure aufweist, könnten diese beiden Substanzen ähnliche immunmodulatorische Auswirkungen innehaben.

Somit scheint NOX2 bei einigen, aber nicht bei allen, *ex vivo* Effekten von Phytol beteiligt zu sein. Möglicherweise werden auch andere Familienmitglieder der NOX Familie durch Phytol oder dessen Metaboliten aktiviert und können bei nicht vollständiger Funktionalität von NOX2 einen Teil der Effekte vermitteln. Da NOX1 sowie NOX3 Homologien in Struktur und Aktivierung aufweisen, könnten diese beiden Enzyme daran beteiligt sein (Brandes et al., 2014).

Die Untersuchungen der Krankheitsverläufe von Wildtyp und kompletten NOX2KO-Mäusen zeigte eine Verringerung der klinischen Symptome durch Phytol in beiden Gruppen (Abbildung 24). Damit scheint der positive Effekt von Phytol auf die klinischen Scores *in vivo* nicht durch NOX2 beeinflusst zu werden. Die Forschungen von Holmdahl et al. zeigten, dass Ratten mit einem Polymorphismus in der Ncf1/p47^{phox}-Untereinheit von NOX2 eine stark verringerte Kapazität des oxidativen Bursts aufweisen, welche dennoch durch die Gabe von Phytol deutlich gesteigert werden konnte (Hultqvist et al., 2006). Die hier verwendeten NOX2KO-Mäuse weisen einen Knockout in der gp91^{phox}-Untereinheit auf. Möglicherweise kann Phytol die ROS-Produktion von NOX2 trotz der unvollständigen gp91^{phox}-Untereinheit aktivieren und somit auch im NOX2KO zumindest einen Teil der Funktionen ausführen, ähnlich wie bei dem beschriebenen p47^{phox}-Polymorphismus.

Interessanterweise zeigten die EAE-Versuche eine grundsätzlich geringere Ausbildung klinischer Scores bei NOX2KO-Tieren im Vergleich zum Wildtyp sowohl bei Standard- als auch bei Phytol-Diät (Abbildung 24). In der Literatur ist ebenfalls ein protektiver Effekt des NOX2KO im murinen EAE-Modell beschrieben (Li et al., 2011, Ravelli et al., 2019). Somit scheint der Knockout der gp91^{phox}-Untereinheit von NOX2 insgesamt einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf im EAE-Modell zu haben. Möglicherweise überwiegen dabei die negativen

Auswirkungen der ROS im gesamten Organismus die positiven Aspekte der gedämpften Immunantwort. Einige Studien zu gp91^{phox}KO Tieren zeigten verringerte oxidative Stress Level im Gehirn nach Reperfusionsschäden (Kunz et al., 2007, Chen et al., 2009) sowie eine geringere Schädigung der BHS (Kahles et al., 2007). Eine Inhibition der NOX2 durch Apocynin führt zu reduzierten klinischen Symptomen, weniger Demyelinisierung sowie verringerter Infiltration durch Immunzellen (Choi et al., 2015). Folglich zeigen ROS sowohl positive immunmodulatorische als auch negative direkte Einflüsse auf die unterschiedlichen Mechanismen und die genaue Lokalisation der ROS-Entstehung sowie die Menge an ROS ist ausschlaggebend, ob in der Summe die protektiven oder die schädigenden Einflüsse überwiegen (Schuh et al., 2014). Die klinischen Krankheitsverläufe von Mäusen mit einem komplettem Knockout der gp91^{phox}-Untereinheit und Phytol-Fütterung unterschieden sich deutlich von denen Mäusen mit einem Knockout in den peripheren Blutzellen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Phytol die anti-inflammatorischen Effekte überwiegend durch die Wirkung von NOX2 in peripheren Zellen vermittelt. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Vorgang der Knochenmarkstransplantation auch einen Einfluss auf den klinischen Krankheitsverlauf hat. Durch die Bestrahlung kann es zu vielfältigen Modifikationen des Immunsystems sowie zu einer Beeinträchtigung der Integrität der BHS kommen. Es dauert in etwa 2 Wochen bis das Immunsystem wiederhergestellt ist und die Mäuse wieder ihr Initialgewicht erreichen (Duran-Struuck and Dysko, 2009). Um die Auswirkungen der Bestrahlung und das daraufhin geschwächte Immunsystem auf den Krankheitsverlauf zu minimieren, wurde die EAE erst 4 Wochen nach Bestrahlung induziert. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass zu diesem Zeitpunkt die BHS noch geschädigt war. Wenn dies der Fall war, konnten Phytol sowie die Zellen des Immunsystems die BHS einfacher passieren und verstärkt in das ZNS eindringen. Innerhalb des ZNS führte Phytol dann möglicherweise zu einer erhöhten NOX2-Aktivität und zu einer daraus resultierenden ROS-Produktion. Im ZNS ist die Produktion von ROS ausschlaggebend für neuronale Schädigungen (Nayernia et al., 2014). Zwar führt der KO der NOX2-Expression in Lymphozyten zu einem verringerten Migrationspotential dieser in das ZNS, doch könnte eine geschädigte BHS dafür sorgen, dass die gesteigerte schädigende Wirkung innerhalb des ZNS die protektiven Effekte in der Peripherie überwiegen. Entweder durch den KO von NOX2 in den Lymphozyten, durch die strahleninduzierte Schädigung der BHS, durch die Aktivierung von NOX2 im ZNS durch Phytol oder durch ein Zusammenspiel aller Faktoren kommt es zu einer Verschlechterung der gezeigten klinischen Symptome innerhalb der Gruppe der NOX2KO-Chimären mit Phytol-Diät.

5.1.5 Therapeutische Anwendungsmöglichkeiten von Phytol / NOX2

Die in dieser Arbeit und in Vorarbeiten generierten Ergebnisse zeigen einen überwiegend positiven Einfluss von Phytol auf den Krankheitsverlauf von EAE-Tieren. Auch in anderen Indikationen, wie zum Beispiel der RA zeigte die Gabe von Phytol positive Auswirkungen auf den Verlauf. Aus diesem Grund kann der Einsatz von Phytol zur Therapie der MS oder ähnlichen entzündlichen Erkrankungen zumindest in Betracht gezogen werden.

Für die Verwendung von Phytol als Therapeutikum gilt es jedoch zu beachten, dass eine langfristige Gabe von Phytol möglicherweise zu einer Gewichtsreduktion sowie zur Vergrößerung der Leber führen kann (Mackie et al., 2009). Ebenfalls gilt es zu bedenken, welche Auswirkungen die Abbauprodukte von Phytol auf den Organismus haben. Bei Mutationen im Fettsäureabbau können die Metaboliten sich anreichern und Phytansäure kann bei gesteigerter Konzentration toxische Auswirkungen auf die Leber haben (Selkala et al., 2015). Des Weiteren sollte der genaue Wirkmechanismus und die Interaktion mit NOX2 sowie den weiteren NOX-Familienmitgliedern weiter charakterisiert werden. Untersuchungen mit strukturverwandten Substanzen von Phytol zeigten deutliche Unterschiede in der Wirkung: Kurzkettige gesättigte Alkane mit einer Kettenlänge zwischen C11 und C13 aktivierten die ROS-Produktion in humanen HL-60-Zellen in ähnlicher Art und Weise wie Phytol und hatten keinen Einfluss bei der Induktion der RA im Tiermodell. Dahingegen führten gesättigte Alkane mit einer Kettenlänge von C14 bis C17 sowie Pristansäure zu keiner gesteigerten ROS-Produktion in den humanen HL-60-Zellen und konnten die RA in Ratten induzieren (Hultqvist et al., 2006). Demnach haben kleine strukturelle Änderungen bereits einen signifikanten Effekt auf die Wirkung. Möglicherweise spielt die Polarität der Substanzen eine entscheidende Rolle bei der Wirkung, da diese die Interaktionsfähigkeit mit Membranen beeinflusst und die Substanzen somit auch einen Einfluss auf die Zusammensetzung dieser Membranen haben könnten. Die Zusammensetzung von Membranen hat des Weiteren einen entscheidenden Einfluss auf die Lokalisation von NOX2 und dessen Aktivität (Shao et al., 2003).

Neben Phytol könnten auch anderen NOX2-aktivierende Substanzen als neue Therapieoptionen dienen. Bisher wurde vornehmlich nach Substanzen gesucht, welche die ROS-Produktion durch NOX2 inhibieren (Lambeth et al., 2008, Jaquet et al., 2009). Die Suche nach NOX2-Agonisten gestaltet sich als schwierig, da direkte Interaktionen mit einem Enzymkomplex wie NOX2 nur schwer vorherzusagen sind. Die meisten Ansätze beschäftigen sich daher mit der möglichen Beeinflussung von vorgeschalteten Zielstrukturen. Dabei ist zu beachten, dass eine genaue Regulation sowie Lokalisation der potentiellen NOX2-Agonisten ausschlaggebend für die Wirkung ist (Hultqvist et al., 2015).

Der Ansatz neurodegenerative Erkrankungen durch eine Modulation der ROS-Produktion zu therapieren ist jedoch längst nicht nur auf die Familie der NOX beschränkt (Sorice et al., 2017).

Im ZNS können ROS ebenfalls von Stickstoffmonoxid-Synthasen, Monoaminoxidasen, sowie Xanthinoxidasen generiert werden (Reyes et al., 2005). Eine Beeinflussung dieser Redox-Systeme könnte ähnliche Effekte wie die Modulation von NOX2 ergeben, jedoch sind stets die positiven sowie die negativen Aspekte der ROS-Modulation abzuwägen.

5.2 Immunmodulation durch den Naturstoff Silvestrol

Der anti-viral wirksame Naturstoff Silvestrol wurde bezüglich seines Einflusses auf die Differenzierung sowie die Polarisierung bzw. Aktivierung humaner Immunzellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Silvestrol-vermittelten Effekte abhängig von der Art der Immunzellen sowie deren Aktivierungsstatus waren (Übersicht siehe Abbildung 48).

Während der Differenzierung von humanen Makrophagen scheint Silvestrol überwiegend das anti-inflammatorische bzw. resolutionsfördernde Potential zu inhibieren, da es zu einer Reduktion der relativen Expression der Oberflächenmarker CD206 sowie TREM2 kam. Weiterhin wurden die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und CCL18 im Überstand der differenzierten Makrophagen durch Silvestrol verringert.

In bereits ausdifferenzierten Makrophagen verstärkt Silvestrol wahrscheinlich den pro-inflammatorischen Status der M1-Makrophagen durch die gesteigerte Sezernierung des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α . Jedoch kann die Rekrutierung weiterer Immunzellen möglicherweise verringert werden, da es zur verringerten Ausschüttung von Chemokinen kam.

Bei M2-Makrophagen verstärkt Silvestrol den anti-inflammatorischen bzw. resolutionsfördernden Phänotyp indem entsprechende Oberflächenmarker verstärkt exprimiert wurden. Weiterhin kam es zur verringerten Bildung der Chemokine IL-8 und CCL2, welche an der Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten beteiligt sind (Mukaida, 2000, Reichel et al., 2009). Durch eine verringerte Rekrutierung dieser Immunzellen wird der anti-inflammatorische bzw. resolutionsfördernde Einfluss der M2-Makrophagen von Silvestrol unterstützt.

Die Differenzierung und Aktivierung von Dendritischen Zellen scheint durch Silvestrol unterdrückt zu werden, da zahlreiche Differenzierungsmarker eine verringerte Expression aufwiesen. Die Stoffwechselwege der oxidativen Phosphorylierung sowie der Glykolyse wurden in Makrophagen und Dendritischen Zellen durch Silvestrol signifikant reduziert. Der Einfluss von Silvestrol auf den zellulären Energiestoffwechsel könnte über die Inhibition von „proto-oncogene serine/threonine-protein kinase Pim“ (PIM)1 bzw. PIM2 vermittelt werden, da Silvestrol ein stark inhibitorisches Potential gegenüber dieser beiden Kinasen zeigt (Schatz et al., 2011). Eine Inhibition der PIM-Kinasen führt zur Beeinflussung des zellulären Energiestoffwechsels über den Signalweg von „mammalian target of rapamycin“ (mTORC1)

und verringert u.a. den Vorgang der Glykolyse (Beharry et al., 2011, Song et al., 2015). Somit könnte Silvestrol über diesen Wirkmechanismus Einfluss auf den Energiestoffwechsel und somit auch auf die Aktivität der Immunzellen nehmen. In Monozyten war der Einfluss auf den Stoffwechsel weniger stark ausgeprägt was an der kürzeren Inkubationsdauer mit Silvestrol liegen könnte.

Während der Differenzierung der Makrophagen verringerte Silvestrol die Expression des resolutionsfördernden Oberflächenmarkers CD206. Dieser Rezeptor dient zur Erkennung des Zuckers Mannose auf der Oberfläche von Pathogenen, wie Viren oder Bakterien, und vermittelt u.a. den Vorgang der Phagozytose (Azad et al., 2014). Da die Erkennung und die Phagozytose von Pathogenen zu den Kernaufgaben der Makrophagen gehört, behindert Silvestrol somit deren Funktionalität. Interessanterweise war gleichzeitig CD163, ein immunologischer Sensor für Bakterien (Fabriek et al., 2009), durch Silvestrol hochreguliert was auf einen gegenläufigen Effekt hinweist. Neben der Phagozytose von Pathogenen dient der Oberflächenmarker CD206 auch zur Aufnahme von freien entzündungsvermittelten Glykoproteinen. Im Entzündungsprozess werden Glykoproteine mit einem hohen Anteil an Mannose gebildet, welche während der Entzündungsauflösung wieder abgebaut werden um eine anhaltende Inflammation zu verhindern (Gazi and Martinez-Pomares, 2009). Zu diesen Glykoproteinen gehören die lysosomale Hydrolasen, der gewebespezifische Plasminogenaktivator sowie die Myeloperoxidase. Demnach ist die Expression von CD206 entscheidend für die korrekt abgestimmte Auflösung der inflammatorischen Reaktion (Lee et al., 2002). Eine Reduktion der CD206-Expression wirkt insofern pro-inflammatorisch, da die immunstimulierenden Glykoproteine verlangsamt abgebaut werden. Weiterhin war während der Differenzierung der Makrophagen die Sezernierung des Zytokins IL-6 durch Silvestrol reduziert, welches entscheidend für den Differenzierungsprozess ist (Chomarat et al., 2000). Demnach behindert Silvestrol auch den Differenzierungsprozess der Makrophagen an sich. Im weiteren Verlauf der Entzündungsreaktion rekrutieren Makrophagen weitere Immunzellen wie beispielsweise T-Zellen. Dieser Prozess der T-Zell-Rekrutierung wird durch die Chemokine CCL17 und CCL18 vermittelt deren beider Konzentration im Überstand der Makrophagen durch Silvestrol verringert war (Adema et al., 1997, Imai et al., 1997, Chenivesse et al., 2012). Dies könnte auch durch die reduzierte Konzentration an IL-10 bedingt sein, da IL-10 zu einer Freisetzung von CCL18 in APZ führt (van der Voort et al., 2005). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Schlüsselfunktionen der Makrophagen (Erkennung von Pathogenen und Rekrutierung weiterer Immunzellen) durch Silvestrol beeinträchtigt werden.

Bei der Polarisierung von M2-Makrophagen kam es interessanterweise zu einer Induktion von CD206. Durch die Rolle von CD206 bei der Aufnahme von Pathogenen und immunstimulierenden Glykoproteinen führt die erhöhte Expression von CD206 zu einer

Stärkung der resolutionsfördernden Funktionen der M2-Makrophagen. Des Weiteren war der anti-inflammatorische bzw. resolutionsfördernde Oberflächenmarker TREM2 signifikant erhöht und die pro-inflammatorischen Chemokine IL-8 und CCL2 verringert. Durch die verringerte Rekrutierung von Monozyten und Neutrophilen wird der inflammatorische Prozess eingedämmt und die Entzündungsauflösung gefördert. In den M2-Makrophagen vermittelt Silvestrol demnach nur resolutionsfördernde Effekte und verstärkt damit die M2-Makrophagen in ihrem anti-inflammatorischen Aufgabenspektrum.

Auffällig war, dass IL-8 und CCL2 ebenfalls von M1-Makrophagen signifikant weniger sezerniert wurden. Jedoch kam es gleichzeitig zu einer Verstärkung der pro-inflammatorischen Aspekte in M1-Makrophagen: Die verringerte Expression des resolutionsfördernden Oberflächenmarkers TREM2, die reduzierte Konzentration des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 und die gesteigerte Konzentration des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α betonen die pro-inflammatorischen Eigenschaften der M1-Makrophagen. Die erhöhte Bildung von TNF- α kann weiterhin die Aktivierung der Immunzellen vorantreiben. Das für die Polarisierung der M1-Makrophagen verwendete IFN- γ vermittelt seine Effekte u.a. über die Signalwege STAT-1 und „nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“ (NF κ B). In Osteoblasten konnte gezeigt werden, dass eine Runterregulation von STAT-1 oder STAT-3 zu einer reduzierten CCL2-Expression führt (Kok et al., 2009). In einer Lungenkrebszelllinie konnte eine Verbindung zwischen der STAT-1 und der IL-8-Expression nachgewiesen werden (Huang et al., 2017), während die Bildung von TNF- α durch den NF κ B-Signalweg reguliert wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Silvestrol die Expression von STAT-1 und STAT-3 reduziert (Patton et al., 2015, Cerezo et al., 2018). Folglich könnten die verringerten Konzentrationen von IL-8 und CCL2 auf der reduzierten STAT-1/3-Expression beruhen. Zusammengefasst konnte beobachtet werden, dass sowohl pro- als auch anti-inflammatorische bzw. resolutionsfördernde Aspekte in M1-Makrophagen moduliert wurden und daher keine klare Tendenz auszumachen war.

Silvestrol scheint die Aktivierung der Immunzellen in unterschiedlicher Art und Weise zu beeinflussen. Daraus ergibt sich die Frage, welche Signalwege dem Wirken von Silvestrol zugrunde liegen könnten. Die primäre Wirkung von Silvestrol ist die Inhibition der Helikase eIF4a welche Teil des eIF4F-Proteinkomplexes ist. Dieser Komplex bindet an die 5' Methylguanosin Cap Struktur der mRNA und rekrutiert die 40S-Untereinheit der Ribosomen an die mRNA und initiiert so die Cap-abhängige mRNA Translation (Merrick, 2015). In diesem Prozess ist die Helikase eIF4a notwendig für die Entwindung der mRNA. In Krebszelllinien konnte nachgewiesen werden, dass die Inhibition von eIF4a durch Silvestrol zu einer verringerten Translation spezifischer mRNAs führt (Wolfe et al., 2014). Der Vorgang und die Auswirkungen der eIF4a-Inhibition durch Silvestrol wurde in Immunzellen zuvor nicht untersucht.

Silvestrol scheint die Differenzierung der Dendritischen Zellen größtenteils zu unterdrücken, da die Mehrheit der untersuchten Oberflächenmarker in ihrer Expression signifikant verringert wurden (CD83, CD206, CD1a, CD1c, HLA-DR, CD54, CD209, CD86). Weiterhin sanken die Konzentrationen von IL-10, IL-8 und IL-6 im Überstand der differenzierten Dendritischen Zellen. Die inhibitorischen Eigenschaften von Silvestrol gegenüber den Dendritischen Zellen könnten, ähnlich wie bei den polarisierten Makrophagen, auf den STAT-3-Signalweg zurückzuführen sein. So zeigten verschiedene Publikationen, dass STAT-3 die Reifung und Aktivierung von Dendritischen Zellen durch die Inhibition von MHC Klasse II Molekülen sowie kostimulatorischen Molekülen auf den Dendritischen Zellen unterdrückt (Bauer et al., 2009, Hillmer et al., 2016). Weiterhin hemmt STAT-3 die Freisetzung von TLR-induzierten pro-inflammatorischen Zytokinen (Woffle et al., 2011). Die Hemmung der Dendritischen Zellreifung bzw. deren Funktionalität kann durch die IL-6-STAT-3 oder IL-10-STAT-3 vermittelten Signalwege oder indirekt über inhibitorische Moleküle, welche IL-6 induzieren, erreicht werden (Corinti et al., 2001, Liang et al., 2008). Bei der Aktivierung der Dendritischen Zellen steigerte Silvestrol die Konzentration an IL-6 und IL-10. Dadurch könnte es über den STAT-3-Signalweg zur Inhibierung der Aktivierung der Dendritischen Zellen kommen. Dagegen spricht jedoch, dass es während der Differenzierung auch schon zu einer starken Reduktion zahlreicher Oberflächenmarker kam, jedoch IL-6 und IL-10 beide in verringerten Konzentrationen vorlagen. Ebenfalls dagegen spricht, dass Silvestrol selbst die Phosphorylierung von STAT-3 teilweise inhibiert (Patton et al., 2015) was zu einem gegenläufigen Effekt führen könnte. Somit müssen auch andere Signalwege in Betracht gezogen werden, über welche Silvestrol seine inhibitorischen Effekte auf Dendritische Zellen vermitteln kann. Untersuchungen in Tumormodellen zeigten, dass die mRNA-Expression von STAT-1 durch Silvestrol inhibiert wird (Patton et al., 2015, Cerezo et al., 2018). Das macht Silvestrol nicht nur in der Onkologie zu einer vielversprechenden Leitsubstanz, sondern könnte auch die beobachtete Hemmung der Dendritischen Zellen erklären. STAT-1 wird während der Reifung von Dendritischen Zellen sowohl durch IL-4 als auch durch GM-CSF induziert und ist essenziell für die Bildung von „suppressor of cytokine signaling 1“ (SOCS1) und SOCS3, welche beide an der Differenzierung der Dendritischen Zellen beteiligt sind (Jackson et al., 2004, McCormick and Heller, 2015). Aufgrund der Inhibition von STAT-1 durch Silvestrol verbleiben die Dendritischen Zellen möglicherweise in einem unreifen Stadium. Dies würde die Reduktion der relativen Expression zahlreicher Oberflächenmarker durch Silvestrol erklären.

Möglicherweise reduziert Silvestrol auch die Immunzellinfiltration, da die Freisetzung von Chemokinen bei den meisten Untersuchungen reduziert wurde und es zu einer verringerten Expression von Adhäsionsmolekülen kam. Während der Differenzierung der Dendritischen Zellen wurde die relative Expression des Oberflächenproteins CD54 signifikant verringert. Dieses Protein gehört zur Familie der Integrine und ist entscheidend am Prozess der

Leukodiapedese beteiligt (Long, 2011). Auch andere immunmodulatorische Wirkstoffe wie beispielsweise Makrolide reduzieren die Expression von CD54 (Khair et al., 1995, Kawasaki et al., 1998) und inhibieren die Migration von Neutrophilen (Oda et al., 1994). Des Weiteren reduzierte Silvestrol die Expression von CCL18 und CCL17 während der Differenzierung von Makrophagen sowie die Expression von IL-8 (= CXCL8) und CCL2 in M1- und M2-Makrophagen. IL-8 war weiterhin auch bei der Differenzierung sowie Aktivierung der Dendritischen Zellen signifikant verringert. Die Stoffgruppe der Tetrazykline reduziert die LPS-induzierte Produktion von Chemokinen wie IL-8, CCL3 und CCL4 in der THP-1 Zelllinie durch den NFκB-Signalweg (Sun et al., 2015). Möglicherweise erfolgt die Reduktion von IL-8 und CCL2 durch Silvestrol ebenfalls über diesen Signalweg. Somit könnte Silvestrol durch die Abschwächung des Migrationsprozesses die Anzahl an Immunzellen am Ort der Entzündungsreaktion verringern und damit resolutionsfördernd wirken.

Die hier erhobenen Daten sowie die vorhandene Literatur weisen darauf hin, dass die Silvestrol-vermittelten Effekte von den jeweiligen Immunzellen sowie deren Differenzierungs- bzw. Aktivierungsstatus abhängig sind. Zu Beginn einer Entzündungsreaktion unterdrückt Silvestrol offenbar das entzündungsmodulierende Potential von Makrophagen und Dendritischen Zellen während der Differenzierungsvorgänge. Im Laufe der Entzündungsreaktion verstärkt Silvestrol das anti-inflammatorische bzw. resolutionsfördernde Potential von M2-Makrophagen während der Einfluss auf M1-Makrophagen keine klare Tendenz zeigt.

5.3 Immunmodulation durch die Steroid Substanz 1o

Die Steroid Substanz 1o wurde als potenzieller neuer Wirkstoffkandidat für die Behandlung von Malaria sowie Schistosomiasis identifiziert (Krieg et al., 2017). Abseits der direkten anti-parasitären Wirkung wurde dieser Wirkstoff in der vorliegenden Arbeit auf sein immunologisches Profil überprüft. Dabei zeigte sich, dass Steroid Substanz 1o in den humanen Immunzellen (Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen) keine Reduktion der Zellviabilität bis zu einer Konzentration von 50 μM vermittelte. Höhere Konzentrationen waren dagegen mit einer reduzierten Viabilität und einer Clusterbildung der Zellen verbunden. Weiterhin verstärkte Steroid Substanz 1o das pro-inflammatorische Potential von M1-Makrophagen, lenkte den Phänotyp von M2-Makrophagen in Richtung von M1-Makrophagen und unterdrückte die Differenzierung und Aktivierung von Dendritischen Zellen (Übersicht siehe Abbildung 49). Die Regulation des zellulären Energiestoffwechsels durch Steroid Substanz 1o stützt die beobachteten Effekte der Makrophagen Polarisation durch eine Reduktion der oxidativen Phosphorylierung in M1- und M2-Makrophagen sowie einer Stärkung der Glykolyse in M2-Makrophagen.

In weiteren Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe wurde das Sicherheitsprofil des Wirkstoffes analysiert (Blum et al., eingereicht). Dabei zeigte sich, dass die Steroid Substanz 1o keine Off-Target Effekte vermittelte, keinen Einfluss auf die Integrität der Zellbarriere ausübte, keine Apoptose auslöste und kein mutagenes Potential besaß. Interessanterweise reduzierte Steroid Substanz 1o jedoch die Viabilität von HCT116-Zellen ab einer Konzentration von 10 μM . Dies erfolgt möglicherweise durch die Induktion eines G1-Blocks (Blum et al., eingereicht). In Primärzellen konnten keine Verringerung der Zellviabilität bis zu einer Konzentration von 50 μM festgestellt werden. Der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse liegt wahrscheinlich an dem unterschiedlichen Status der Zellen. Da sich die Krebszellen fortwährend teilten und damit die unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus durchschritten, konnten diese auch innerhalb dieser Zellzyklusphasen angehalten werden. Dagegen befanden sich die Primärzellen nicht im Zellzyklus und teilten sich auch nicht weiter.

Ein akzeptables Toxizitätsprofil für neue Wirkstoffe ist gegeben, wenn die toxische Konzentration mindestens um den Faktor 50 höher ist als die therapeutisch verabreichte Dosis (Hughes et al., 2011). Demnach wäre auch die in den Krebszelllinien festgestellte verringerte Viabilität ab 10 μM akzeptabel, da die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von Steroid Substanz 1o bei $4,1 \pm 1,6$ nM gegenüber dem Parasiten *P. falciparum* (Stamm 3D7) liegt (Krieg et al., 2017). Weiterhin gilt es zu beachten, dass die Ergebnisse in den Primärzellen für die mögliche therapeutische Anwendung von größerer Bedeutung sind als die Ergebnisse in einer artifizialen Krebszelllinie. Weiterhin zeigten die Analysen der Off-Targets weitestgehend keine Aktivitäten bis zu einer Konzentration von 100 μM . Die einzig potentielle Inhibition war

mit dem „human ether-a-go-go related gene“ (hERG) assoziiert ($40,25 \pm 9,11$ % Inhibierung bei $100 \mu\text{M}$ Steroid Substanz 1o) (Blum et al., eingereicht). Diese lag jedoch innerhalb des tolerierbaren Bereichs.

Untersuchungen in Caco-2-Zellen zeigten einen geringen Permeabilitätskoeffizienten (Blum et al., eingereicht). Dies deutet darauf hin, dass Steroid Substanz 1o nur in geringem Maße absorbiert werden kann. *In vitro* Versuche zeigten, dass die Serum Level von Steroid Substanz 1o nach i.p. Gabe von 100 mg/kg bei ca. $19 \mu\text{M}$ lagen (Krieg et al., 2017).

Bei der Untersuchung der immunmodulatorischen Auswirkungen von Steroid Substanz 1o konnte festgestellt werden, dass Steroid Substanz 1o den pro-inflammatorischen Phänotyp von M1-Makrophagen weiter verstärkt und M2-Makrophagen ebenfalls pro-inflammatorisch beeinflusst. In M1- und M2-Makrophagen unterscheidet sich der Energiestoffwechsel nach der Aktivierung (O'Neill and Hardie, 2013, Netea et al., 2016). In M1-Makrophagen wird der Vorgang der Glykolyse verstärkt, während die oxidative Phosphorylierung abgeschwächt wird. Weiterhin wird der Citratzyklus bei der Weiterverarbeitung von Citrat und Succinat teilweise unterbrochen. Dadurch kommt es zum Anstieg von Citrat, Itaconsäure und Succinat (Tannahill et al., 2013, Jha et al., 2015). Bei dem Fettsäuremetabolismus wird Citrat als Ausgangsstoff für die vermehrte Bildung von pro-inflammatorischen Prostaglandinen verwendet. Des Weiteren kommt es zur verstärkten Bildung der pro-inflammatorischen Mediatoren ROS und NO (Kelly and O'Neill, 2015). Itaconsäure unterstützt die anti-bakterielle Wirkungsweise von M1-Makrophagen (Strelko et al., 2011). Die verstärkte Ansammlung von Succinat kann den Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierter Faktor-1 α (HIF-1 α) aktivieren, welcher zahlreiche Gene und darüber die Expression verschiedener inflammatorischer Mediatoren wie IL-1 β , IL-8 und CCL2 reguliert (Cane et al., 2010, Baay-Guzman et al., 2012, Tannahill et al., 2013). In M1-Makrophagen konnte eine gesteigerte Konzentration von PGE2 detektiert werden, welche auf eine Unterbrechung des Citratzyklus hinweist. Eine Steigerung von IL-8 konnte sowohl in M1- als auch in M2-Makrophagen gemessen werden. Eine Regulation von IL-1 β und CCL2 fand jedoch nur in M2-Makrophagen statt. Dennoch konnte gezeigt werden, dass Makrophagen durch die Inkubation mit Steroid Substanz 1o während der Polarisierung mehr pro-inflammatorische Zytokine bilden. Dies könnte an einem beeinflussten Energiestoffwechsel der Makrophagen liegen. Die Untersuchungen des Stoffwechsels polarisierter M1-Makrophagen zeigte eine signifikante Reduktion der OCR durch Steroid Substanz 1o während die ECAR nicht beeinflusst wurde. Da die mittels OCR quantifizierte oxidative Phosphorylierung, welche für M2-Makrophagen charakteristisch ist, durch Steroid Substanz 1o reduziert wird, begünstigt dies den pro-inflammatorischen Phänotyp der M1-Makrophagen. Interessanterweise war die OCR in polarisierten M2-Makrophagen ebenfalls signifikant reduziert, während die ECAR durch Steroid Substanz signifikant erhöht wurde. Die ECAR spiegelt die Glykolyse wieder, welche für M1-Makrophagen charakteristisch ist (O'Neill

and Hardie, 2013). Dies weist daraufhin, dass die M2-Makrophagen durch Steroid Substanz 1 α in Richtung eines pro-inflammatorischen, M1-Makrophagen ähnlichen, Phänotyp beeinflusst werden. Somit können die beobachteten Veränderungen im Oberflächenmarker- sowie Zytokin-Profil der polarisierten Makrophagen möglicherweise auf den beeinflussten Stoffwechsel zurückgeführt werden.

Die gesteigerte Sezernierung von pro-inflammatorischen Zytokinen durch Steroid Substanz 1 α behandelte Makrophagen kann weiterhin die Umgebung der Entzündungsreaktion beeinflussen. Durch eine Verstärkung der pro-inflammatorischen Aspekte könnte Steroid Substanz 1 α das Immunsystem bei der initialen Abwehr der Pathogene über unterschiedliche Wirkmechanismen unterstützen. Die gesteigerte Konzentration von IL-23 kann beispielsweise die Bildung von T_H17-Zellen induzieren, welche vor allem IL-17 produzieren. Dadurch spielen T_H17-Zellen eine essenzielle Rolle bei der Immunabwehr von Viren und Bakterien (Li et al., 2018). Während der Erythrozyten-Phase einer akuten *Plasmodium chabaudi* Infektion konnten T_H17-Zellen vor allem in der Leber lokalisiert werden. Da die Leber eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Malaria einnimmt, könnten die T_H17-Zellen dort für die Bekämpfung der Parasiten von Bedeutung sein. In IL-17-defizienten Mäusen konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede im Krankheitsverlauf nach *Plasmodium chabaudi* Infektion festgestellt werden. Demnach ist die Rolle von T_H17-Zellen im Krankheitsverlauf der Malaria noch unklar (Mastelic et al., 2012, Perez-Mazliah and Langhorne, 2014).

IL-8, oder auch CXCL8 genannt, gehört zu der Gruppe der Chemokine und ist für die Rekrutierung von Neutrophilen am Ort der Infektion sowie für die gesteigerte Phagozytose verantwortlich. Im Krankheitsverlauf der Malaria spielen Neutrophile eine entscheidende Rolle, da sie die Erreger mittels Phagozytose und oxidativem Burst unschädlich machen können. Weiterhin werden über IL-8 und CXCL10 zusätzliche Immunzellen wie Monozyten, Dendritische Zellen und T-Gedächtniszellen angezogen (Aitken et al., 2018). Durch die verstärkte Akkumulation der Immunzellen am Ort der Infektion kann die Beseitigung der eingedrungenen Pathogenen verbessert und der Krankheitsverlauf positiv beeinflusst werden. Die gesteigerte Produktion von TNF- α könnte sich ebenfalls positiv auswirken: TNF- α wirkt anti-parasitär und steigert gemeinsam mit IFN- γ die Produktion von NO und weiteren toxischen Radikalen, welche die Parasiten schädigen (Anstey et al., 1996). Bei einer zu sehr gesteigerten Produktion von TNF- α könnte jedoch auch der Wirt selbst durch das vermehrte Auftreten der Radikale geschädigt werden. Daher sind exakte Level an TNF- α sowie weiteren Zytokine essenziell für eine optimale Immunantwort (Artavanis-Tsakonas et al., 2003).

In der Literatur wird bei Malaria Infektionen ein Ungleichgewicht zwischen dem M1- und M2-Phänotyp bei Monozyten zugunsten des M2-Phänotyps beschrieben (Bobade et al., 2019). Die Stärkung des M2-Phänotypes geht dabei wahrscheinlich auf Hämозoin zurück. Dies ist ein Malaria-Pigment, welches bei dem Abbau des humanen Hämoglobins durch die Parasiten

gebildet wird und zahlreiche immunologische Effekte vermittelt (Esposito et al., 2008). Die Gabe von Hämozoin erhöhte die Expression des resolutionsfördernden Oberflächenrezeptors CD206 sowie die Sekretion der Zyto- und Chemokine IL-10, CCL17 und CCL1 in humanen Monozyten (Bobade et al., 2019). Weiterhin wurde der M1-Phänotyp unterdrückt indem es zu einer geringeren Bildung von NO und ROS kam. Dabei wurde eine Beteiligung der Signalwege p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38 MAPK), Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) /Proteinkinase B sowie NFκB bei der Verstärkung des M2-Phänotyps nachgewiesen. Der M2-Phänotyp ist weiterhin durch die Expression des Oberflächenmarkers CD163 und die Bildung des Enzyms Arginase 1 charakterisiert. Untersuchungen in Malaria-infizierten Kindern zeigten erhöhte Level von Arginase 1 und IL-10, reduzierte Mengen an NO sowie eine verstärkte Expression von M2-Markern (CD163, CD206) (Weinberg et al., 2016). Die Wirkstoffe Chloroquin und Artemisinin reduzierten den durch Hämozoin induzierten M2-Phänotyp durch eine Reduktion von IL-10 und CD206 (Bobade et al., 2019). Beide Wirkstoffe finden Anwendung in der Behandlung bzw. der Prophylaxe von Malaria. Durch die Verstärkung des M1-Phänotyp und die Abschwächung des M2-Phänotyps von Makrophagen durch Steroid Substanz 1o könnte dies ähnlich wie bei Chloroquin und Artemisinin den Effekten von Hämozoin entgegenwirken und den Krankheitsverlauf der Malaria verbessern. Des Weiteren können folgende Substanzen ebenfalls die Aktivierung des M2-Phänotyps reduzieren und damit möglicherweise ähnliche Effekte hervorrufen: Bisphosphonate (Coscia et al., 2010), GM-CSF (Vogel et al., 2014), LPS sowie IFN-γ (Nathan et al., 1983, Mosser and Edwards, 2008, Weinberg et al., 2016). Untersuchungen von Bisphosphonaten sowie darauf basierende Weiterentwicklungen zeigten durch die Inhibierung des parasitären Enzyms „farnesyl diphosphate synthase/geranylgeranyl diphosphate synthase“ (FPPS/GGPPS) vielversprechende Effekte in unterschiedlichen Malaria-Modellen und könnten einen neuen Ansatz für die Therapie der Malaria darstellen (Dunford et al., 2008, No et al., 2012, Gisselberg et al., 2018). Ein zusätzlicher immunmodulierender Mechanismus könnte den primären Effekten dabei zugutekommen. In GM-CSF-KO Mäusen konnte eine gesteigerte Anfälligkeit gegenüber *Plasmodium chabaudi* nachgewiesen werden (Riopel et al., 2001). Dies betont ebenfalls die entscheidende Rolle von M1-Makrophagen bei der Abwehr der Malaria. Dennoch gilt es zu bedenken, dass es in humanen Erkrankungen nicht üblich ist reine M1- oder M2-Phänotypen vorzufinden. Tatsächlich handelt es sich zumeist um ein Gemisch beider Formen, welche nebeneinander vorkommen und sich gegenseitig beeinflussen. Das genaue Verhältnis ist dabei von zahlreichen Faktoren wie aktivierenden und inhibierenden Stimuli sowie direkten Einflüssen aus der Umgebung abhängig (Martinez and Gordon, 2014, Murray et al., 2014).

Bei dem Prozess der Malariainfektion nehmen Dendritische Zellen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der T-Zellen und der Einbindung der adaptiven Immunität ein. In der Literatur sind unterschiedliche Auswirkungen einer Malariainfektion auf Dendritische Zellen beschrieben.

Die Ergebnisse unterscheiden sich zum Teil stark, was möglicherweise auf die Verwendung unterschiedlicher *Plasmodium* Stämme sowie unterschiedliche Aktivierungs-Stadien der untersuchten Dendritischen Zellen zurückzuführen ist. Zunächst beschrieben Urban et al., dass durch die Inkubation mit *Plasmodium falciparum* infizierte rote Blutzellen (iRBCs) die Reifung und die Fähigkeit der T-Zell-Aktivierung von Dendritischen Zellen inhibiert wird (Urban et al., 1999). Spätere Untersuchungen zeigten jedoch, dass diese Inhibition nur auftritt, wenn das Verhältnis von iRBCs zu Dendritischen Zellen bei 100:1 liegt (Elliott et al., 2007). Bei einem geringeren Verhältnis von 10:1 kommt es dagegen sogar zu einer gesteigerten Reifung und Polarisation der Dendritischen Zellen. Bei Feldstudien an Kindern in Kenia während der akuten Phase der Malariainfektion konnte im Vergleich zu gesunden Probanden eine signifikant gesteigerte Anzahl an CD141⁺-Dendritischen Zellen nachgewiesen werden, während die Anzahl an CD1c⁺-Dendritischen Zellen nicht beeinflusst wurde (Urban et al., 2006a). Des Weiteren konnte eine Korrelation zwischen der Menge an CD141⁺-Dendritischen Zellen und dem Schweregrad der Malariaerkrankung festgestellt werden (Urban et al., 2006b, Guermonprez et al., 2013). Durch die Gabe von Steroid Substanz 1 α bei der Differenzierung von Dendritischen Zellen konnte eine gesteigerte Expression von CD141 festgestellt werden. Bei der Aktivierung der Dendritischen Zellen wurde CD141 jedoch nicht beeinflusst. Möglicherweise ist die beobachtete Regulation von CD141 somit gegenläufig zu den zuvor in Makrophagen beobachteten überwiegend pro-inflammatorischen Effekten. Da jedoch auch der pro-inflammatorische Oberflächenmarker CD80 bei der Differenzierung der Dendritischen Zellen hochreguliert wurde, könnten sich möglicherweise diese beiden Effekte gegenseitig aufheben.

Eine schwere Komplikation bei Infektionen mit *Plasmodium falciparum* ist die zerebrale Malaria. Die durch den Erreger infizierten Erythrozyten verändern ihre Oberflächenstruktur und bilden verstärkt Adhäsionsmoleküle aus. Dadurch kommt es vermehrt zu einem Anhaften der infizierten Erythrozyten an den Innenwänden der Kapillaren und einer Blockierung des Blutstroms. Diese wird durch die Akkumulation von Immunzellen und Blutplättchen weiter verstärkt. Ein dadurch reduzierter Blutfluss kann vor allem im Gehirn zu schwerwiegenden Komplikationen führen. Folgen der verringerten Sauerstoffversorgung sind komatöse Zustände, Zuckungen, Blutungen der Netzhaut und Bewegungsstörungen (Bruneel, 2019). Untersuchungen in mit *Plasmodium berghei* ANKA infizierten C57BL/6-Mäusen zeigten eine elementare Beteiligung von Dendritischen Zellen bei der Induktion der zerebralen Malaria (deWalick et al., 2007). Eine andere Quelle berichtet von einer drastischen Reduktion an Dendritischen Zellen während der Infektion mit *Plasmodium berghei* ANKA durch die Aktivierung der Caspase-3 und einer gesteigerten Apoptose-Rate (Tamura et al., 2015). Demnach ist die genaue Rolle der Dendritischen Zellen während dem Infektionsmechanismus von *Plasmodium falciparum* und der zerebralen Malaria noch nicht vollständig geklärt (Amorim

et al., 2016). Durch die Reduktion der Differenzierung sowie Aktivierung von Dendritischen Zellen könnte Steroid Substanz 1o das Risiko der zerebralen Malaria möglicherweise verringern, jedoch gilt es zu bedenken, dass die wiederum pro-inflammatorische Beeinflussung der Makrophagen Polarisation durch Steroid Substanz 1o bei einer ausgebildeten zerebralen Malaria gegenläufig wirken könnte. Um der zerebralen Malaria entgegen zu wirken werden u.a. Statine verwendet (Reis et al., 2012), welche die anti-inflammatorischen Aspekte der Makrophagen verstärken und so die Auflösung der Entzündungsreaktion im Gehirn begünstigen (Zhang and Zhang, 2015, Zhang et al., 2018). Da in den hier durchgeführten Versuchen ein gegenläufiger Effekt von Steroid Substanz 1o auf die Makrophagen beobachtet wurde, stellt eine ausgebildete zerebrale Malaria möglicherweise eine Kontraindikation für die Gabe der Steroid Substanz 1o dar.

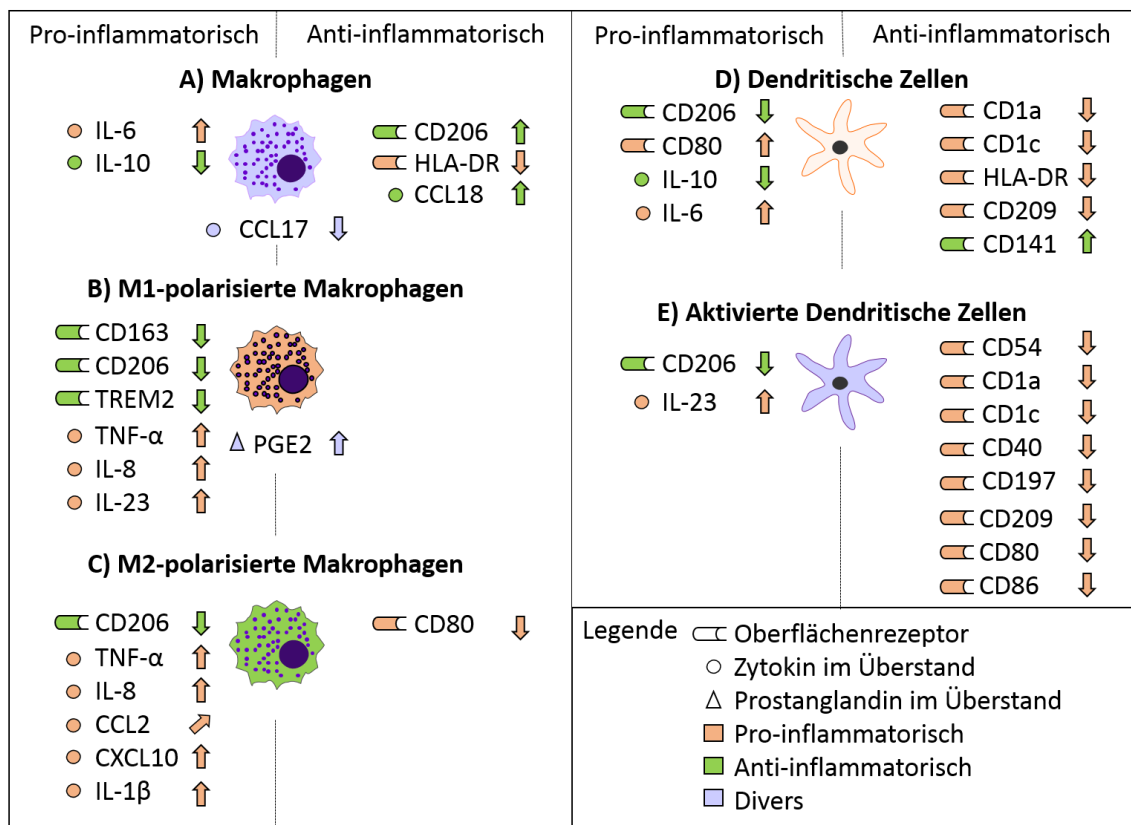


Abbildung 49: Immunmodulation durch die Steroid Substanz 1o. Regulation von Oberflächenrezeptoren und sezernierten Zytokinen im Überstand von Makrophagen (A), M1-polarisierten Makrophagen (B), M2-polarisierten Makrophagen (C), Dendritischen Zellen (D) sowie aktivierten Dendritischen Zellen (E) nach Differenzierung (A/D), Polarisierung (B/C) oder Aktivierung (E) mit 50 µM Steroid Substanz 1o. Die Oberflächenmarker, Zytokine und Prostaglandine wurden anhand ihrer überwiegenden Eigenschaften in die Kategorien pro- oder anti-inflammatorisch bzw. resolutionsfördernd eingeordnet. Wenn keine klare Zuordnung möglich war wurden diese als divers gekennzeichnet.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation gliedert sich in 2 Abschnitte: Im 1. Abschnitt wurden die Auswirkungen des Naturstoffs Phytol auf den Krankheitsverlauf des murinen EAE-Modells charakterisiert, während im 2. Abschnitt die immunmodulierenden Eigenschaften der neuartigen Leitsubstanzen Silvestrol sowie Steroid Substanz 1o untersucht wurden.

Vorarbeiten zeigten einen positiven Einfluss von Phytol auf den Krankheitsverlauf im murinen EAE-Modell für Multiple Sklerose, eine verringerte Proliferationsfähigkeit von Splenozyten sowie eine Regulation der NOX2 mRNA-Expression (Blum et al., 2018b).

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Gabe von Phytol den Prozess der Demyelinisierung im lumbalen Rückenmark deutlich reduzierte und die Anzahl der Immunzellen in den inguinalen Lymphknoten sowie im lumbalen Rückenmark signifikant verringerte. Weiterhin konnte eine Regulation der spezifischen T-Zell-Transkriptionsfaktoren T-Bet sowie Foxp3 nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass Phytansäure, nicht jedoch Pristansäure, die beiden Metaboliten von Phytol, die Proliferationsfähigkeit der T-Zellen signifikant verringerte. Beide Metaboliten zeigten zusätzlich unterschiedlichen Einfluss auf die T-Zell-Subtypen. Hultqvist et al. konnten eine verstärkte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Phytol nachweisen (Hultqvist et al., 2006). Vorarbeiten zeigten eine Steigerung der mRNA-Expression des ROS-produzierenden Enzymkomplex NOX2 im Verlauf des EAE-Modells sowie eine Regulation der NOX2-Expression im lumbalen Rückenmark und in den inguinalen Lymphknoten durch Phytol (Blum et al., 2018b). Deshalb wurde die Rolle von NOX2 an den Phytol-vermittelten Effekten weiter charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass die gesteigerte NOX2-Expression im lumbalen Rückenmark auf die eingewanderten Immunzellen zurückzuführen war. Die von NOX2 im zentralen Nervensystem (ZNS) gebildeten ROS, welche zur Schädigung der Myelinschicht beitragen können, wurden durch die Gabe von Phytol im lumbalen Rückenmark verringert. Untersuchungen in NOX2KO-Mäusen zeigten, dass die beobachteten *ex vivo* Effekte von Phytol sowie dessen Metaboliten nur teilweise NOX2-abhängig waren. Im murinen EAE-Modell mit NOX2KO-Mäusen zeigte Phytol weiterhin einen positiven Einfluss auf die klinischen Symptome. Auffällig war dabei, dass NOX2KO-Tiere grundsätzlich weniger klinische Scores zeigten als Wildtyp-Tiere. In NOX2-Chimären hatte Phytol keinen signifikanten Einfluss auf den Krankheitsverlauf. Grund dafür könnte eine Beschädigung der Blut-Hirn-Schranke bei der Generierung der Chimären und eine damit verbundene verstärkte Infiltration von Immunzellen in das ZNS gewesen sein. Weiterhin konnte Phytol möglicherweise über die geschädigte Blut-Hirn-Schranke verstärkt in das ZNS eindringen und dort über eine gesteigerte ROS-Produktion zu schädigenden Effekten führen.

Die *in vivo* Daten weisen auf einen überwiegend NOX2-unabhängigen Wirkmechanismus von Phytol hin. Dennoch scheint NOX2 bei einigen Effekten zumindest beteiligt zu sein. Zusammenfassend zeigte die Gabe von Phytol einen überwiegend positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf im murinen EAE-Modell, dennoch ist die Phytol-vermittelte Induktion von NOX2 und die Bildung von ROS kritisch zu sehen, da diese sowohl positive als auch negative Effekte vermitteln und stark von der Quantität sowie der Lokalisation der Bildung abhängig sind.

Im 2. Teilprojekt wurden die immunmodulierenden Auswirkungen der neuartigen Leitsubstanzen Silvestrol sowie Steroid Substanz 1o charakterisiert. Der anti-viral wirksame Naturstoff Silvestrol zeigte dabei diverse Auswirkungen auf die Differenzierung sowie Polarisierung von humanen Makrophagen. Während der Differenzierung inhibierte Silvestrol das anti-inflammatorische bzw. resolutionsfördernde Potential der Makrophagen durch eine Reduktion der resolutionsfördernden Oberflächenmarker CD206 und TREM2. Weiterhin wurde die Sezernierung der anti-inflammatorischen Zyto- bzw. Chemokine IL-10 und CCL18 verringert. Der pro-inflammatorische Phänotyp von M1-Makrophagen wurde weiterhin durch die vermehrte Bildung von TNF- α unterstützt, während bei M2-Makrophagen der anti-inflammatorische bzw. resolutionsfördernde Phänotyp verstärkt wurde. In Dendritischen Zellen schien Silvestrol sowohl die Differenzierung als auch die Aktivierung zu inhibieren, da zahlreiche Oberflächenmarker und sezernierte Zytokine signifikant verringert wurden. Die Stoffwechselwege der oxidativen Phosphorylierung und der Glykolyse wurden sowohl in Makrophagen als auch in Dendritischen Zellen signifikant reduziert. Demnach ist unklar, ob in der Summe die pro- oder anti-inflammatorischen Aspekte von Silvestrol überwiegen und ob der Einfluss auf den Stoffwechsel die Immunantwort beeinträchtigt.

Der anti-parasitäre Wirkstoff Steroid Substanz 1o zeigte keinen negativen Einfluss auf die Viabilität in primären humanen Immunzellen bis zu einer Konzentration von 50 μ M und verstärkte das pro-inflammatorische Profil von M1-Makrophagen. Weiterhin wurde der anti-inflammatorische bzw. resolutionsfördernde Phänotyp von M2-Makrophagen unterdrückt und stattdessen die pro-inflammatorischen Aspekte verstärkt. Diese Beobachtungen der veränderten Oberflächenmarker sowie der sezernierten Zytokine wurden weiterhin durch die Veränderung des zellulären Stoffwechsels gestützt. Dabei steigerte Steroid Substanz 1o die Glykolyse in M2-Makrophagen, welche eigentlich für M1-Makrophagen charakteristisch ist. Dadurch kann die Verschiebung der M2-Makrophagen zu einem M1-Phänotyp erklärt werden. Weiterhin beeinträchtigte Steroid Substanz 1o die Differenzierung und Aktivierung von Dendritischen Zellen. Zusammenfassend verstärkte Steroid Substanz 1o überwiegend die pro-inflammatorischen Aspekte der Immunreaktion durch eine Aktivierung der M1-Makrophagen. Bei der möglichen Anwendung als Therapeutikum für Malaria sowie Schistosomiasis kann somit das Immunsystem bei der initialen Abwehr der Parasiten unterstützt werden.

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verlaufsformen der Multiplen Sklerose.....	3
Abbildung 2: Pathomechanismus der Multiplen Sklerose.	10
Abbildung 3: Regulation der T _H -Zelldifferenzierung.	12
Abbildung 4: Der azyklische Diterpenalkohol Phytol und seine Metaboliten.....	15
Abbildung 5: Schematischer Aufbau des NOX2-Komplexes.	17
Abbildung 6: Strukturformel von Silvestrol.	25
Abbildung 7: Strukturformel von Steroid Substanz 1o.....	26
Abbildung 8: Beispielhafte Gating-Strategie muriner Immunzellen.....	35
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Prinzips der Dichtegradientenzentrifugation. ...	48
Abbildung 10: Färbung der Myelinschicht des murinen lumbalen Rückenmark.....	54
Abbildung 11: Einfluss von Phytol auf die murine Immunzellverteilung.....	56
Abbildung 12: Einfluss von Phytol auf die Expression muriner Transkriptionsfaktoren und Zytokine.	57
Abbildung 13: Proliferationsfähigkeit stimulierter T-Zellen <i>ex vivo</i>	58
Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse von murinen T-Zell-Subtypen.....	59
Abbildung 15: Sezernierte Zytokine von murinen Wildtyp-T-Zellen.....	60
Abbildung 16: Regulation der relativen NOX2 mRNA-Expression in NOX2-Chimären.....	61
Abbildung 17: Immunhistologische Analyse der ROS-vermittelten DNA-Schäden.....	62
Abbildung 18: Lokalisation der ROS-vermittelten DNA-Schäden.	63
Abbildung 19: Kolokalisation der ROS-vermittelten DNA-Schäden.....	64
Abbildung 20: Proliferationsfähigkeit von isolierten NOX2KO-Splenozyten.....	65
Abbildung 21: Proliferationsfähigkeit von isolierten NOX2KO-T-Zellen.	66
Abbildung 22: Einfluss von Phytan- sowie Pristansäure auf die T-Zell-Subtypen von NOX2KO- Tieren.....	67
Abbildung 23: Sezernierte Zytokine von NOX2KO-T-Zellen.....	68
Abbildung 24: Einfluss von Phytol auf den EAE-Verlauf von NOX2WT- und -KO-Tieren.	69
Abbildung 25: Einfluss von Phytol auf den EAE-Verlauf von NOX2-Chimären.....	70
Abbildung 26: Einfluss von Silvestrol auf die Zellviabilität.	72
Abbildung 27: Einfluss von Silvestrol auf die Differenzierung humaner Makrophagen.	73

Abbildung 28: Einfluss von Silvestrol auf die Oberflächenmarker M1-polarisierter Makrophagen.....	74
Abbildung 29: Einfluss von Silvestrol auf die sezernierten Zytokine M1-polarisierter Makrophagen.....	75
Abbildung 30: Einfluss von Silvestrol auf die Oberflächenmarker M2-polarisierter Makrophagen.....	76
Abbildung 31: Einfluss von Silvestrol auf die sezernierten Zytokine M2-polarisierter Makrophagen.....	77
Abbildung 32: Einfluss von Silvestrol auf die Oberflächenmarker humaner Dendritischer Zellen während der Differenzierung.....	78
Abbildung 33: Einfluss von Silvestrol auf die sezernierten Zytokine humaner Dendritischer Zellen während der Differenzierung.....	79
Abbildung 34: Einfluss von Silvestrol auf die Oberflächenmarker aktivierter humaner Dendritischer Zellen.....	81
Abbildung 35: Einfluss von Silvestrol auf die sezernierten Zytokine aktivierter humaner Dendritischer Zellen.....	82
Abbildung 36: Einfluss von 5 nM Silvestrol auf den zellulären Energiestoffwechsel.....	84
Abbildung 37: Einfluss von Steroid Substanz 1o auf die Zellviabilität.....	86
Abbildung 38: Einfluss von 50 µM Steroid Substanz 1o auf den zellulären Energiestoffwechsel von Immunzellen.....	88
Abbildung 39: Einfluss von Steroid Substanz 1o auf die Differenzierung humaner Makrophagen.....	90
Abbildung 40: Einfluss von Steroid Substanz 1o auf die Oberflächenmarker M1-polarisierter Makrophagen.....	91
Abbildung 41: Einfluss von Steroid Substanz 1o auf die sezernierten Zytokine M1-polarisierter Makrophagen.....	92
Abbildung 42: Einfluss von Steroid Substanz 1o auf die Oberflächenmarker M2-polarisierter Makrophagen.....	93
Abbildung 43: Einfluss von Steroid Substanz 1o auf die sezernierten Zytokine M2-polarisierter Makrophagen.....	94
Abbildung 44: Einfluss von Steroid Substanz 1o auf die Oberflächenmarker humaner Dendritischer Zellen während der Differenzierung.....	96
Abbildung 45: Einfluss von Steroid Substanz 1o auf die sezernierten Zytokine humaner Dendritischer Zellen während der Differenzierung.....	97

Abbildung 46: Einfluss von Steroid Substanz 1o auf die Oberflächenmarker aktivierter humaner Dendritischer Zellen.	98
Abbildung 47: Einfluss von Steroid Substanz 1o auf die sezernierten Zytokine aktivierter humaner Dendritischer Zellen.	99
Abbildung 48: Immunmodulation durch den Naturstoff Silvestrol.	114
Abbildung 49: Immunmodulation durch die Steroid Substanz 1o.	120

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der klinischen EAE-Scores.	13
Tabelle 2: Einteilung humaner Makrophagen-Subtypen.	21
Tabelle 3: Genotypisierung von C57BL/6N-gp91phox Mäusen.....	29
Tabelle 4: cDNA Synthese.....	32
Tabelle 5: Quantitative Echtzeit-PCR.	33
Tabelle 6: Charakterisierung von murinen Immunzellen.	35
Tabelle 7: Verwendete Antikörper zur Analyse der murinen T-Zell-Subtypen.	36
Tabelle 8: Verwendete Antikörper zur Analyse von PBMCs.....	37
Tabelle 9: Charakterisierung humaner Makrophagen-Subtypen.	38
Tabelle 10: Charakterisierung humaner Dendritischer Zellen.	39
Tabelle 11: Stimulation isolierter muriner T-Zellen.....	41
Tabelle 12: Quantifizierung von Zytokinen in humane Proben.....	44
Tabelle 13: Verwendete immunhistologische Primär- und Sekundärantikörper.	46
Tabelle 14: Konditionen der humanen Immunzellendifferenzierung.....	50
Tabelle 15: Energiestoffwechsel-Stimulation von humanen Immunzellen.....	53

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius (Einheit)
µl	Mikroliter (Einheit)
µm	Mikrometer (Einheit)
µM	Mikromolar (Einheit)
AF	Alexa Fluor
AMACR	„α-Methylacyl-CoA-Racemase“
ANOVA	Statistischer Test („analysis of variance“)
APZ	Antigenpräsentierende Zelle

ATP	Adenosintriphosphat
AUC	„Area under the curve“
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderalbumin
Bzw.	beziehungsweise
CCL2	„CC-chemokine ligand 2“
CD	„Cluster of differentiation“
cDNA	Komplementäre DNA („complementary DNA“)
CFA	Freund-Adjuvans („Complete Freund’s Adjuvans“)
CGD	Chronische Granulomatose („chronic granulomatous disease“)
CIS	Klinisch isoliertes Syndrom („clinically isolated syndrom“)
Ct	„Cycle threshold“
CXCL10	„C-X-C motif chemokine 10“
DAPI	4’6-Diamidin-Phenylindol
DMF	Dimethylfumarat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
DUOX	duale Oxidase
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Eppstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF4a	eukaryotischer Initiationsfaktor 4A
ELISA	„Enzyme-linked Immunosorbent Assay“
et al.	Und andere (et alii/aliae/alia)
EU	Europäische Union
F	Dendritische Zelle
F4/80	„EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1“
FACS	Durchflusszytometrie („fluorescence-activated cell sorting“)
FcR	Fc-Rezeptor
FFA1/GPR40	„Free fatty acid receptor 1“
FKS	Fetales Kälberserum
FM	Fluoromyelin
Foxp3	„forkhead-box-protein p3“
FPPS/GGPPS	„farnesyl diphosphate synthase/geranylgeranyl diphosphate synthase“
FSC	Vorwärtsstreulicht („forward scatter“)

g	Gramm (Einheit)
g	Fallbeschleunigung (Einheit)
GATA3	„GATA binding protein 3“
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor
Gy	Gray (Einheit)
h	Stunde (Einheit)
HBSS	„Hanks‘ Balanced Salt Solution“
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
hERG	„Human Ether-a-go-go Related Gene“
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor-1 α
HLA	„Human Leukocyte Antigen“
HLA-DR	„Human leukocyte antigen-DR isotype“
i.p.	intraperitoneal
Iba1	„ionized calcium-binding adapter molecule 1“
IC	„Immune complex“
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
iRBC	infizierte roten Blutzellen
IRF4	„Interferon regulatory factor 4“
kDa	Kilodalton (Einheit)
KO	Knockout
Konz.	Konzentration
LK	Inguinale Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharide
Ly6G	„Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D“
MACS	„magnetic activated cell sorting“
M-CSF	Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor
mg	Milligramm (Einheit)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“)
min	Minute (Einheit)
ml	Milliliter (Einheit)
mM	Millimolar (Einheit)
MoDC	Myeloide Dendritische Zelle
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
mRNA	Boten-RNA („Messenger RNA“)
MS	Multiple Sklerose

mTORC1	„mammalian target of rapamycin“
M ϕ	Makrophage
n	Anzahl (Versuche, „number“)
n. d.	Nicht detektierbar
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-Adenine-Dinucleotid-Phosphat
Ncf1	„Neutrophil Cytosolic Factor 1“
NF κ B	„Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells“
nm	Nanometer (Einheit)
nM	Nanomolar (Einheit)
NO	Stickstoffmonoxid
NOX	NADPH Oxidase
Nrf2	„Nuclear Factor-Related Factor 2“
OD	Optische Dichte
OHG	Hydroxyguanosin
P38 MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PBMC	„Peripheral Blood Mononuclear Cell“
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	PBS/Triton X-100
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
pDC	Plasmazytoide Dendritische Zelle
PFA	Paraformaldehyd
PGE2	Prostaglandin E2
PH	Phytol
Phy.	Phytansäure
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIM	„Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase Pim“
PLC	Phosphoinositid-Phospholipase C
PLP	Proteolipid-Protein
POD	Peroxidase
PPAR- α	„Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor- α “
PPIA	„Peptidylprolyl Isomerase A“
PPMS	Primär progrediente Multiple Sklerose
Pris.	Pristansäure
PTX	Pertussis-Toxin
qPCR	Quantitative Echtzeit PCR
Ra	Rezeptorantagonist
RA	Rheumatoide Arthritis
RML	Lumbales Rückenmark

RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
ROR- γ t	„RAR-related orphan receptor gamma t“
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“)
rpm	Umdrehungen pro Minute („revolutions per minute“ (Einheit))
RRMS	Schubförmig-remittierende Multiple Sklerose (relapse remitting MS)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwert („Standard error of the mean“)
SPMS	Sekundär progrediente Multiple Sklerose
SSC	Seitwärtsstreulicht („side scatter“)
ST	Standard
STAT	„Signal Transducers and Activators of Transcription“
Stim.	Stimuliert
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
T-Bet	„T-box expressed in T cells“
TGF	„Transforming growth factor“
T _H	T-Helfer-Zelle
TLR	„Toll-like receptor“
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
TREM2	„Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2“
u.a.	unter anderem
ü.N.	Über Nacht
Unstim.	Unstimuliert
v/v	„Volume per volume“
VLA-4	„Very late antigen-4“
w/v	„Weight per volume“
WHO	„World Health Organization“
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

9 Literaturverzeichnis

- Abdulkhaleq LA, Assi MA, Abdullah R, Zamri-Saad M, Taufiq-Yap YH, Hezmee MNM (2018) The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Vet World* 11:627-635.
- Adema GJ, Hartgers F, Verstraten R, de Vries E, Marland G, Menon S, Foster J, Xu Y, Nooyen P, McClanahan T, Bacon KB, Figdor CG (1997) A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* 387:713-717.
- Aitken EH, Alemu A, Rogerson SJ (2018) Neutrophils and Malaria. *Front Immunol* 9:3005.
- Amedei A, Prisco D, D'Elia MM (2012) Multiple sclerosis: the role of cytokines in pathogenesis and in therapies. *Int J Mol Sci* 13:13438-13460.
- Amorim KN, Chagas DC, Sulczewski FB, Boscardin SB (2016) Dendritic Cells and Their Multiple Roles during Malaria Infection. *J Immunol Res* 2016:2926436.
- Anstey NM, Weinberg JB, Hassanali MY, Mwaikambo ED, Manyenga D, Misukonis MA, Arnette DR, Hollis D, McDonald MI, Granger DL (1996) Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression. *J Exp Med* 184:557-567.
- Arango Duque G, Descoteaux A (2014) Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol* 5:491.
- Artavanis-Tsakonas K, Tongren JE, Riley EM (2003) The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin Exp Immunol* 133:145-152.
- Ascherio A, Munger KL (2016) Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention-An Update. *Semin Neurol* 36:103-114.
- Atri C, Guerfali FZ, Laouini D (2018) Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int J Mol Sci* 19.
- Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F (2007) Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317:666-670.
- Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F (2009) Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27:669-692.
- Azad AK, Rajaram MV, Schlesinger LS (2014) Exploitation of the Macrophage Mannose Receptor (CD206) in Infectious Disease Diagnostics and Therapeutics. *J Cytol Mol Biol* 1.
- Baay-Guzman GJ, Bebenek IG, Zeidler M, Hernandez-Pando R, Vega MI, Garcia-Zepeda EA, Antonio-Andres G, Bonavida B, Riedl M, Kleerup E, Tashkin DP, Hankinson O, Huerta-Yepez S (2012) HIF-1 expression is associated with CCL2 chemokine expression in airway inflammatory cells: implications in allergic airway inflammation. *Respir Res* 13:60.
- Baker D, Amor S (2015) Mouse models of multiple sclerosis: lost in translation? *Curr Pharm Des* 21:2440-2452.
- Banchereau J, Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
- Barthelmes J, Tafferner N, Kurz J, de Bruin N, Parnham MJ, Geisslinger G, Schiffmann S (2016) Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice and Evaluation of the Disease-dependent Distribution of Immune Cells in Various Tissues. *J Vis Exp*.
- Bauer K, Binder S, Klein C, Simon J, Horn F (2009) Inhibition of dendritic cell maturation and activation is mediated by STAT3. *Cell Commun Signal* 7:A68.
- Beckhauser TF, Francis-Oliveira J, De Pasquale R (2016) Reactive Oxygen Species: Physiological and Physiopathological Effects on Synaptic Plasticity. *J Exp Neurosci* 10:23-48.
- Bedard K, Krause KH (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87:245-313.
- Behan PO, Chaudhuri A (2014) EAE is not a useful model for demyelinating disease. *Mult Scler Relat Disord* 3:565-574.

- Beharry Z, Mahajan S, Zemskova M, Lin YW, Tholanikunnel BG, Xia Z, Smith CD, Kraft AS (2011) The Pim protein kinases regulate energy metabolism and cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:528-533.
- Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JP, Tzoulaki I (2015) Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet Neurol* 14:263-273.
- Belikov AV, Schraven B, Simeoni L (2015) T cells and reactive oxygen species. *J Biomed Sci* 22:85.
- Biedenkopf N, Lange-Grunweller K, Schulte FW, Weisser A, Muller C, Becker D, Becker S, Hartmann RK, Grunweller A (2017) The natural compound silvestrol is a potent inhibitor of Ebola virus replication. *Antiviral Res* 137:76-81.
- Blanco P, Palucka AK, Pascual V, Banchereau J (2008) Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 19:41-52.
- Blum L, Gul S, Ulshoefer T, Henke M, Krieg R, Berneburg I, Thomas D, Trautmann S, Kurz J, Geyer J, Geisslinger G, Becker K, Parnham M, Schiffmann S (eingereicht) *In vitro* safety and immunomodulatory profile of an anti-parasitic arylmethylaminosteroid
- Blum L, Schiffmann S, Parnham MJ (2018a) Immunomodulation by antibiotics. In: *Fighting Antimicrobial Resistance* (Budimir, A., ed), pp 351-370 Zagreb, Croatia: IAPC Publishing.
- Blum L, Tafferfer N, Spring I, Kurz J, deBruin N, Geisslinger G, Parnham MJ, Schiffmann S (2018b) Dietary phytol reduces clinical symptoms in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) at least partially by modulating NOX2 expression. *J Mol Med (Berl)* 96:1131-1144.
- Bobade D, Khandare AV, Deval M, Shastry P, Deshpande P (2019) Hemozoin-induced activation of human monocytes toward M2-like phenotype is partially reversed by antimalarial drugs-chloroquine and artemisinin. *Microbiologyopen* 8:e00651.
- Bordeleau ME, Robert F, Gerard B, Lindqvist L, Chen SM, Wendel HG, Brem B, Greger H, Lowe SW, Porco JA, Jr., Pelletier J (2008) Therapeutic suppression of translation initiation modulates chemosensitivity in a mouse lymphoma model. *J Clin Invest* 118:2651-2660.
- Botros SS, Bennett JL (2007) Praziquantel resistance. *Expert Opin Drug Discov* 2:S35-40.
- Brandes RP, Weissmann N, Schroder K (2014) Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic Biol Med* 76:208-226.
- Brinkmann V (2009) FTY720 (fingolimod) in Multiple Sclerosis: therapeutic effects in the immune and the central nervous system. *Br J Pharmacol* 158:1173-1182.
- Brinkmann V, Billich A, Baumruker T, Heining P, Schmouder R, Francis G, Aradhye S, Burtin P (2010) Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov* 9:883-897.
- Bruneel F (2019) Human cerebral malaria: 2019 mini review. *Rev Neurol (Paris)*.
- Cachat J, Deffert C, Hugues S, Krause KH (2015) Phagocyte NADPH oxidase and specific immunity. *Clin Sci (Lond)* 128:635-648.
- Cane G, Ginouves A, Marchetti S, Busca R, Pouyssegur J, Berra E, Hofman P, Vouret-Craviari V (2010) HIF-1 α mediates the induction of IL-8 and VEGF expression on infection with Afa/Dr diffusely adhering *E. coli* and promotes EMT-like behaviour. *Cell Microbiol* 12:640-653.
- Carton H, Vlietinck R, Debruyne J, De Keyser J, D'Hooghe MB, Loos R, Medaer R, Truyen L, Yee IM, Sadovnick AD (1997) Risks of multiple sclerosis in relatives of patients in Flanders, Belgium. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 62:329-333.
- Cavaillon JM, Adrie C, Fitting C, Adib-Conquy M (2005) Reprogramming of circulatory cells in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res* 11:311-320.
- Cerezo M, Guemiri R, Druillennec S, Girault I, Malka-Mahieu H, Shen S, Allard D, Martineau S, Welsch C, Agoussi S, Estrada C, Adam J, Libenciuc C, Routier E, Roy S, Desaubry L, Eggermont AM, Sonenberg N, Scoazec JY, Eychene A, Vagner S, Robert C (2018) Translational control of tumor immune escape via the eIF4F-STAT1-PD-L1 axis in melanoma. *Nat Med* 24:1877-1886.
- Changhua L, Jindong Y, Defa L, Lidan Z, Shiyan Q, Jianjun X (2005) Conjugated linoleic acid attenuates the production and gene expression of proinflammatory cytokines in weaned pigs challenged with lipopolysaccharide. *J Nutr* 135:239-244.

- Chen H, Song YS, Chan PH (2009) Inhibition of NADPH oxidase is neuroprotective after ischemia-reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 29:1262-1272.
- Chen WL, Pan L, Kinghorn AD, Swanson SM, Burdette JE (2016) Silvestrol induces early autophagy and apoptosis in human melanoma cells. *BMC Cancer* 16:17.
- Chenivesse C, Chang Y, Azzaoui I, Ait Yahia S, Morales O, Ple C, Foussat A, Tonnel AB, Delhem N, Yssel H, Vorng H, Wallaert B, Tscopoulos A (2012) Pulmonary CCL18 recruits human regulatory T cells. *J Immunol* 189:128-137.
- Chenivesse C, Tscopoulos A (2018) CCL18 - Beyond chemotaxis. *Cytokine* 109:52-56.
- Choi BY, Kim JH, Kho AR, Kim IY, Lee SH, Lee BE, Choi E, Sohn M, Stevenson M, Chung TN, Kauppinen TM, Suh SW (2015) Inhibition of NADPH oxidase activation reduces EAE-induced white matter damage in mice. *J Neuroinflammation* 12:104.
- Choi JM, Bothwell AL (2012) The nuclear receptor PPARs as important regulators of T-cell functions and autoimmune diseases. *Mol Cells* 33:217-222.
- Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK (2000) IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* 1:510-514.
- Claussen MC, Korn T (2012) Immune mechanisms of new therapeutic strategies in MS: teriflunomide. *Clin Immunol* 142:49-56.
- Cole TS, McKendrick F, Cant AJ, Pearce MS, Cale CM, Goldblatt DR, Gennery AR, Titman P (2013) Cognitive ability in children with chronic granulomatous disease: a comparison of those managed conservatively with those who have undergone hematopoietic stem cell transplant. *Neuropediatrics* 44:230-232.
- Coles AJ, Wing M, Smith S, Coraddu F, Greer S, Taylor C, Weetman A, Hale G, Chatterjee VK, Waldmann H, Compston A (1999) Pulsed monoclonal antibody treatment and autoimmune thyroid disease in multiple sclerosis. *Lancet* 354:1691-1695.
- Collin M, Bigley V (2018) Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* 154:3-20.
- Collin M, McGovern N, Haniffa M (2013) Human dendritic cell subsets. *Immunology* 140:22-30.
- Compston A, Coles A (2008) Multiple Sclerosis. *The Lancet* 372(9648):pp. 1502-1517.
- Conway KL, Goel G, Sokol H, Manocha M, Mizoguchi E, Terhorst C, Bhan AK, Gardet A, Xavier RJ (2012) p40phox expression regulates neutrophil recruitment and function during the resolution phase of intestinal inflammation. *J Immunol* 189:3631-3640.
- Corinti S, Albanesi C, la Sala A, Pastore S, Girolomoni G (2001) Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol* 166:4312-4318.
- Coscia M, Quaglino E, Iezzi M, Curcio C, Pantaleoni F, Riganti C, Holen I, Monkkonen H, Boccadoro M, Forni G, Musiani P, Bosia A, Cavallo F, Massaia M (2010) Zoledronic acid repolarizes tumour-associated macrophages and inhibits mammary carcinogenesis by targeting the mevalonate pathway. *J Cell Mol Med* 14:2803-2815.
- Crane MJ, Daley JM, van Houtte O, Brancato SK, Henry WL, Jr., Albina JE (2014) The monocyte to macrophage transition in the murine sterile wound. *PLoS One* 9:e86660.
- Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D (1987) Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 107:526-545.
- Cruz-Orengo L, Daniels BP, Dorsey D, Basak SA, Grajales-Reyes JG, McCandless EE, Piccio L, Schmidt RE, Cross AH, Crosby SD, Klein RS (2014) Enhanced sphingosine-1-phosphate receptor 2 expression underlies female CNS autoimmunity susceptibility. *J Clin Invest* 124:2571-2584.
- Das Sarma J, Ciric B, Marek R, Sadhukhan S, Caruso ML, Shafagh J, Fitzgerald DC, Shindler KS, Rostami A (2009) Functional interleukin-17 receptor A is expressed in central nervous system glia and upregulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation* 6:14.
- de Vos AF, van Meurs M, Brok HP, Boven LA, Hintzen RQ, van der Valk P, Ravid R, Rensing S, Boon L, t Hart BA, Laman JD (2002) Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J Immunol* 169:5415-5423.
- Deffert C, Carnesecchi S, Yuan H, Rougemont AL, Kelkka T, Holmdahl R, Krause KH, Schappi MG (2012) Hyperinflammation of chronic granulomatous disease is abolished by NOX2 reconstitution in macrophages and dendritic cells. *J Pathol* 228:341-350.
- Dendrou CA, Fugger L, Friese MA (2015) Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 15:545-558.

- deWalick S, Amante FH, McSweeney KA, Randall LM, Stanley AC, Haque A, Kuns RD, MacDonald KP, Hill GR, Engwerda CR (2007) Cutting edge: conventional dendritic cells are the critical APC required for the induction of experimental cerebral malaria. *J Immunol* 178:6033-6037.
- Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM (2016) Harmful and Beneficial Role of ROS. *Oxid Med Cell Longev* 2016:7909186.
- Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95.
- Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles MP, Grimaud L, Lenoir J, Preisser L, Aneon I, Catala L, Ifrah N, Descamps P, Gamelin E, Gascan H, Hebbar M, Jeannin P (2007) Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* 110:4319-4330.
- Dunford JE, Kwaasi AA, Rogers MJ, Barnett BL, Ebetino FH, Russell RG, Oppermann U, Kavanagh KL (2008) Structure-activity relationships among the nitrogen containing bisphosphonates in clinical use and other analogues: time-dependent inhibition of human farnesyl pyrophosphate synthase. *J Med Chem* 51:2187-2195.
- Duran-Struuck R, Dysko RC (2009) Principles of bone marrow transplantation (BMT): providing optimal veterinary and husbandry care to irradiated mice in BMT studies. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 48:11-22.
- Elgner F, Sabino C, Basic M, Ploen D, Grunweller A, Hildt E (2018) Inhibition of Zika Virus Replication by Silvestrol. *Viruses* 10.
- Elian M, Nightingale S, Dean G (1990) Multiple sclerosis among United Kingdom-born children of immigrants from the Indian subcontinent, Africa and the West Indies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 53:906-911.
- Elliott SR, Spurck TP, Dodin JM, Maier AG, Voss TS, Yosaatmadja F, Payne PD, McFadden GI, Cowman AF, Rogerson SJ, Schofield L, Brown GV (2007) Inhibition of dendritic cell maturation by malaria is dose dependent and does not require *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Infect Immun* 75:3621-3632.
- Erta M, Quintana A, Hidalgo J (2012) Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci* 8:1254-1266.
- Esposito A, Tiffert T, Mauritz JM, Schlachter S, Bannister LH, Kaminski CF, Lew VL (2008) FRET imaging of hemoglobin concentration in *Plasmodium falciparum*-infected red cells. *PLoS One* 3:e3780.
- Fabrick BO, van Bruggen R, Deng DM, Ligtenberg AJ, Nazmi K, Schornagel K, Vloet RP, Dijkstra CD, van den Berg TK (2009) The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood* 113:887-892.
- Finkel T (2011) Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol* 194:7-15.
- Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KH (2010) T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 162:1-11.
- Frankenberger M, Eder C, Hofer TP, Heimbeck I, Skokann K, Kassner G, Weber N, Moller W, Ziegler-Heitbrock L (2011) Chemokine expression by small sputum macrophages in COPD. *Mol Med* 17:762-770.
- Friese MA, Schattling B, Fugger L (2014) Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 10:225-238.
- Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H (2009) The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain* 132:1175-1189.
- Frohman EM, Racke MK, Raine CS (2006) Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 354:942-955.
- Gazi U, Martinez-Pomares L (2009) Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology* 214:554-561.
- Gerold G, Pietschmann T (2013) Opportunities and Risks of Host-targeting Antiviral Strategies for Hepatitis C. *Current Hepatitis Reports* 12:200-213.
- Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D (2004) The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy. *J Neurol* 251:261-268.
- Gilroy D, De Maeyer R (2015) New insights into the resolution of inflammation. *Semin Immunol* 27:161-168.

- Gisselberg JE, Herrera Z, Orchard LM, Llinas M, Yeh E (2018) Specific Inhibition of the Bifunctional Farnesyl/Geranylgeranyl Diphosphate Synthase in Malaria Parasites via a New Small-Molecule Binding Site. *Cell Chem Biol* 25:185-193 e185.
- Glitscher M, Himmelsbach K, Woytinek K, Johne R, Reuter A, Spiric J, Schwaben L, Grunweller A, Hildt E (2018) Inhibition of Hepatitis E Virus Spread by the Natural Compound Silvestrol. *Viruses* 10.
- Godkin A, Smith KA (2017) Chronic infections with viruses or parasites: breaking bad to make good. *Immunology* 150:389-396.
- Gold R, Wolinsky JS (2011) Pathophysiology of multiple sclerosis and the place of teriflunomide. *Acta Neurol Scand* 124:75-84.
- Gopal S, Mikulskis A, Gold R, Fox RJ, Dawson KT, Amaravadi L (2017) Evidence of activation of the Nrf2 pathway in multiple sclerosis patients treated with delayed-release dimethyl fumarate in the Phase 3 DEFINE and CONFIRM studies. *Mult Scler* 23:1875-1883.
- Gordon S (2007) The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol* 37 Suppl 1:S9-17.
- Gratchev A, Kzhyshkowska J, Kothe K, Muller-Molinet I, Kannookadan S, Utikal J, Goerdts S (2006) Mphi1 and Mphi2 can be re-polarized by Th2 or Th1 cytokines, respectively, and respond to exogenous danger signals. *Immunobiology* 211:473-486.
- Gregersen JW, Kranc KR, Ke X, Svendsen P, Madsen LS, Thomsen AR, Cardon LR, Bell JI, Fugger L (2006) Functional epistasis on a common MHC haplotype associated with multiple sclerosis. *Nature* 443:574-577.
- Grytten N, Aarseth JH, Lunde HM, Myhr KM (2016) A 60-year follow-up of the incidence and prevalence of multiple sclerosis in Hordaland County, Western Norway. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87:100-105.
- Guermontprez P, Helft J, Claser C, Deroubaix S, Karanje H, Gazumyan A, Darasse-Jeze G, Telerman SB, Breton G, Schreiber HA, Frias-Staheli N, Billerbeck E, Dorner M, Rice CM, Ploss A, Klein F, Swiecki M, Colonna M, Kamphorst AO, Meredith M, Niec R, Takacs C, Mikhail F, Hari A, Bosque D, Eisenreich T, Merad M, Shi Y, Ginhoux F, Renia L, Urban BC, Nussenzweig MC (2013) Inflammatory Flt3l is essential to mobilize dendritic cells and for T cell responses during Plasmodium infection. *Nat Med* 19:730-738.
- Haanstra KG, Jagessar SA, Bauchet AL, Doussau M, Fovet CM, Heijmans N, Hofman SO, van Lubbeek-Veth J, Bajramovic JJ, Kap YS, Laman JD, Touin H, Watroba L, Bauer J, Lachapelle F, Serguera C, Hart BA (2013) Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis with recombinant human myelin oligodendrocyte glycoprotein in incomplete Freund's adjuvant in three non-human primate species. *J Neuroimmune Pharmacol* 8:1251-1264.
- Hackel D, Pflucke D, Neumann A, Viebahn J, Mousa S, Wischmeyer E, Roewer N, Brack A, Rittner HL (2013) The connection of monocytes and reactive oxygen species in pain. *PLoS One* 8:e63564.
- Hall IH, Schwab UE, Ward ES, Ives TJ (2003) Effects of moxifloxacin in zymogen A or S. aureus stimulated human THP-1 monocytes on the inflammatory process and the spread of infection. *Life Sci* 73:2675-2685.
- Handel A, Margolis E, Levin BR (2009) Exploring the role of the immune response in preventing antibiotic resistance. *J Theor Biol* 256:655-662.
- Hartung HP, Aktas O, Boyko AN (2015) Alemtuzumab: a new therapy for active relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler* 21:22-34.
- Hartung HP, Aktas O, Menge T, Kieseier BC (2014) Immune regulation of multiple sclerosis. *Handb Clin Neurol* 122:3-14.
- Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B, Lublin F, Montalban X, Rammohan KW, Selmaj K, Traboulsee A, Wolinsky JS, Arnold DL, Klingelschmitt G, Masterman D, Fontoura P, Belachew S, Chin P, Mairon N, Garren H, Kappos L, Opera I, Investigators OIC (2017) Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 376:221-234.
- Hauser SL, Chan JR, Oksenberg JR (2013) Multiple sclerosis: Prospects and promise. *Ann Neurol* 74:317-327.
- Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP (2002) New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 3:291-301.
- Henss L, Scholz T, Grunweller A, Schnierle BS (2018) Silvestrol Inhibits Chikungunya Virus Replication. *Viruses* 10.

- Heusinkveld M, van der Burg SH (2011) Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *J Transl Med* 9:216.
- Hillmer EJ, Zhang H, Li HS, Watowich SS (2016) STAT3 signaling in immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 31:1-15.
- Hoglund RA, Maghazachi AA (2014) Multiple sclerosis and the role of immune cells. *World J Exp Med* 4:27-37.
- Holland SM (2010) Chronic granulomatous disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 38:3-10.
- Holmdahl R, Sareila O, Pizzolla A, Winter S, Hagert C, Jaakkola N, Kelkka T, Olsson LM, Wing K, Backdahl L (2013) Hydrogen peroxide as an immunological transmitter regulating autoreactive T cells. *Antioxid Redox Signal* 18:1463-1474.
- Horga A, Castillo J, Montalban X (2010) Fingolimod for relapsing multiple sclerosis: an update. *Expert Opin Pharmacother* 11:1183-1196.
- Horga A, Tintore M (2011) Natalizumab for relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurologia* 26:357-368.
- Huang Q, Duan I, Qian X, Fan J, Lv Z, Zhang X, Han J, Wu F, Guo M, Hu G, Du J, Chen C, Jin Y (2017) Corrigendum: IL-17 Promotes Angiogenic Factors IL-6, IL-8, and Vegf Production via Stat1 in Lung Adenocarcinoma. *Sci Rep* 7:39566.
- Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL (2011) Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol* 162:1239-1249.
- Hultqvist M, Olofsson P, Gelderman KA, Holmberg J, Holmdahl R (2006) A new arthritis therapy with oxidative burst inducers. *PLoS Med* 3:e348.
- Hultqvist M, Olofsson P, Holmberg J, Backstrom BT, Tordsson J, Holmdahl R (2004) Enhanced autoimmunity, arthritis, and encephalomyelitis in mice with a reduced oxidative burst due to a mutation in the *Ncf1* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:12646-12651.
- Hultqvist M, Olofsson P, Wallner FK, Holmdahl R (2015) Pharmacological Potential of NOX2 Agonists in Inflammatory Conditions. *Antioxid Redox Signal* 23:446-459.
- Imai T, Baba M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Yoshie O (1997) The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4. *J Biol Chem* 272:15036-15042.
- Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM (1992) Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176:1693-1702.
- Investigators CT, Coles AJ, Compston DA, Selmaj KW, Lake SL, Moran S, Margolin DH, Norris K, Tandon PK (2008) Alemtuzumab vs. interferon beta-1a in early multiple sclerosis. *N Engl J Med* 359:1786-1801.
- Italiani P, Mazza EM, Lucchesi D, Cifola I, Gemelli C, Grande A, Battaglia C, Bicciato S, Boraschi D (2014) Transcriptomic profiling of the development of the inflammatory response in human monocytes in vitro. *PLoS One* 9:e87680.
- Itoh T, Ono A, Kawaguchi K, Teraoka S, Harada M, Sumi K, Ando M, Tsukamasa Y, Ninomiya M, Koketsu M, Hashizume T (2018) Phytol isolated from watermelon (*Citrullus lanatus*) sprouts induces cell death in human T-lymphoid cell line Jurkat cells via S-phase cell cycle arrest. *Food Chem Toxicol* 115:425-435.
- Jackson SH, Yu CR, Mahdi RM, Ebong S, Egwuagu CE (2004) Dendritic cell maturation requires STAT1 and is under feedback regulation by suppressors of cytokine signaling. *J Immunol* 172:2307-2315.
- Jaguin M, Houlbert N, Fardel O, Lecureur V (2013) Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell Immunol* 281:51-61.
- Jaquet V, Scapozza L, Clark RA, Krause KH, Lambeth JD (2009) Small-molecule NOX inhibitors: ROS-generating NADPH oxidases as therapeutic targets. *Antioxid Redox Signal* 11:2535-2552.
- Jha AK, Huang SC, Sergushichev A, Lampropoulou V, Ivanova Y, Loginicheva E, Chmielewski K, Stewart KM, Ashall J, Everts B, Pearce EJ, Driggers EM, Artyomov MN (2015) Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity* 42:419-430.
- Kahlert S, Schonfeld P, Reiser G (2005) The Refsum disease marker phytanic acid, a branched chain fatty acid, affects Ca²⁺ homeostasis and mitochondria, and reduces cell viability in rat hippocampal astrocytes. *Neurobiol Dis* 18:110-118.

- Kahles T, Luedike P, Endres M, Galla HJ, Steinmetz H, Busse R, Neumann-Haefelin T, Brandes RP (2007) NADPH oxidase plays a central role in blood-brain barrier damage in experimental stroke. *Stroke* 38:3000-3006.
- Kamm CP, Uitdehaag BM, Polman CH (2014) Multiple sclerosis: current knowledge and future outlook. *Eur Neurol* 72:132-141.
- Kawasaki S, Takizawa H, Ohtoshi T, Takeuchi N, Kohyama T, Nakamura H, Kasama T, Kobayashi K, Nakahara K, Morita Y, Yamamoto K (1998) Roxithromycin inhibits cytokine production by and neutrophil attachment to human bronchial epithelial cells in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 42:1499-1502.
- Kelly B, O'Neill LA (2015) Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res* 25:771-784.
- Khair OA, Devalia JL, Abdelaziz MM, Sapsford RJ, Davies RJ (1995) Effect of erythromycin on *Haemophilus influenzae* endotoxin-induced release of IL-6, IL-8 and sICAM-1 by cultured human bronchial epithelial cells. *Eur Respir J* 8:1451-1457.
- Kieseier BC, Hemmer B, Hartung HP (2005) Multiple sclerosis--novel insights and new therapeutic strategies. *Curr Opin Neurol* 18:211-220.
- Kim S, Hwang BY, Su BN, Chai H, Mi Q, Kinghorn AD, Wild R, Swanson SM (2007) Silvestrol, a potential anticancer rocaglate derivative from *Aglaia foveolata*, induces apoptosis in LNCaP cells through the mitochondrial/apoptosome pathway without activation of executioner caspase-3 or -7. *Anticancer Res* 27:2175-2183.
- Kogure T, Kinghorn AD, Yan I, Bolon B, Lucas DM, Grever MR, Patel T (2013) Therapeutic potential of the translation inhibitor silvestrol in hepatocellular cancer. *PLoS One* 8:e76136.
- Kok SH, Hong CY, Kuo MY, Wang CC, Hou KL, Lin YT, Galson DL, Lin SK (2009) Oncostatin M-induced CCL2 transcription in osteoblastic cells is mediated by multiple levels of STAT-1 and STAT-3 signaling: an implication for the pathogenesis of arthritis. *Arthritis Rheum* 60:1451-1462.
- Krieg R, Jortzik E, Goetz AA, Blandin S, Wittlin S, Elhabiri M, Rahbari M, Nuryyeva S, Voigt K, Dahse HM, Brakhage A, Beckmann S, Quack T, Grevelding CG, Pinkerton AB, Schonecker B, Burrows J, Davioud-Charvet E, Rahlfs S, Becker K (2017) Arylmethylamino steroids as antiparasitic agents. *Nat Commun* 8:14478.
- Kruska N, Reiser G (2011) Phytanic acid and pristanic acid, branched-chain fatty acids associated with Refsum disease and other inherited peroxisomal disorders, mediate intracellular Ca²⁺ signaling through activation of free fatty acid receptor GPR40. *Neurobiol Dis* 43:465-472.
- Kugler S, Bocker K, Heusipp G, Greune L, Kim KS, Schmidt MA (2007) Pertussis toxin transiently affects barrier integrity, organelle organization and transmigration of monocytes in a human brain microvascular endothelial cell barrier model. *Cell Microbiol* 9:619-632.
- Kuhns DB, Alvord WG, Heller T, Feld JJ, Pike KM, Marciano BE, Uzel G, DeRavin SS, Priel DA, Soule BP, Zarembek KA, Malech HL, Holland SM, Gallin JI (2010) Residual NADPH oxidase and survival in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med* 363:2600-2610.
- Kunz A, Anrather J, Zhou P, Orio M, Iadecola C (2007) Cyclooxygenase-2 does not contribute to postischemic production of reactive oxygen species. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:545-551.
- Labro MT (2000) Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or "immuno-fairy tales"? *Clin Microbiol Rev* 13:615-650.
- Lambeth JD, Krause KH, Clark RA (2008) NOX enzymes as novel targets for drug development. *Semin Immunopathol* 30:339-363.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201:233-240.
- Laria A, Lurati A, Marrazza M, Mazzocchi D, Re KA, Scarpellini M (2016) The macrophages in rheumatic diseases. *J Inflamm Res* 9:1-11.
- Lassmann H, van Horssen J (2011) The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis. *FEBS Lett* 585:3715-3723.

- Lee SJ, Evers S, Roeder D, Parlow AF, Risteli J, Risteli L, Lee YC, Feizi T, Langen H, Nussenzweig MC (2002) Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis. *Science* 295:1898-1901.
- Lees JR, Iwakura Y, Russell JH (2008) Host T cells are the main producers of IL-17 within the central nervous system during initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis induced by adoptive transfer of Th1 cell lines. *J Immunol* 180:8066-8072.
- Leto TL, Morand S, Hurt D, Ueyama T (2009) Targeting and regulation of reactive oxygen species generation by Nox family NADPH oxidases. *Antioxid Redox Signal* 11:2607-2619.
- Li S, Vana AC, Ribeiro R, Zhang Y (2011) Distinct role of nitric oxide and peroxynitrite in mediating oligodendrocyte toxicity in culture and in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience* 184:107-119.
- Li Y, Wei C, Xu H, Jia J, Wei Z, Guo R, Jia Y, Wu Y, Li Y, Qi X, Li Z, Gao X (2018) The Immunoregulation of Th17 in Host against Intracellular Bacterial Infection. *Mediators Inflamm* 2018:6587296.
- Liang S, Ristich V, Arase H, Dausset J, Carosella ED, Horuzsko A (2008) Modulation of dendritic cell differentiation by HLA-G and ILT4 requires the IL-6--STAT3 signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:8357-8362.
- Lill CM (2014) Recent advances and future challenges in the genetics of multiple sclerosis. *Front Neurol* 5:130.
- Liu R, Dong HF, Guo Y, Zhao QP, Jiang MS (2011) Efficacy of praziquantel and artemisinin derivatives for the treatment and prevention of human schistosomiasis: a systematic review and meta-analysis. *Parasit Vectors* 4:201.
- Long EO (2011) ICAM-1: getting a grip on leukocyte adhesion. *J Immunol* 186:5021-5023.
- Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sorensen PS, Thompson AJ, Wolinsky JS, Balcer LJ, Banwell B, Barkhof F, Bebo B, Jr., Calabresi PA, Clanet M, Comi G, Fox RJ, Freedman MS, Goodman AD, Inglese M, Kappos L, Kieseier BC, Lincoln JA, Lubetzki C, Miller AE, Montalban X, O'Connor PW, Petkau J, Pozzilli C, Rudick RA, Sormani MP, Stuve O, Waubant E, Polman CH (2014) Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* 83:278-286.
- Lucas DM, Edwards RB, Lozanski G, West DA, Shin JD, Vargo MA, Davis ME, Rozewski DM, Johnson AJ, Su BN, Goettl VM, Heerema NA, Lin TS, Lehman A, Zhang X, Jarjoura D, Newman DJ, Byrd JC, Kinghorn AD, Grever MR (2009) The novel plant-derived agent silvestrol has B-cell selective activity in chronic lymphocytic leukemia and acute lymphoblastic leukemia in vitro and in vivo. *Blood* 113:4656-4666.
- Mackie JT, Atshaves BP, Payne HR, McIntosh AL, Schroeder F, Kier AB (2009) Phytol-induced hepatotoxicity in mice. *Toxicol Pathol* 37:201-208.
- Mader P, Rennar GA, Ventura AMP, Grevelding CG, Schlitzer M (2018) Chemotherapy for Fighting Schistosomiasis: Past, Present and Future. *ChemMedChem* 13:2374-2389.
- Mameli G, Cossu D, Cocco E, Masala S, Frau J, Marrosu MG, Sechi LA (2014) Epstein-Barr virus and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis peptides are cross recognized by anti-myelin basic protein antibodies in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 270:51-55.
- Marrodan M, Alessandro L, Farez MF, Correale J (2019) The role of infections in multiple sclerosis. *Mult Scler* 25:891-901.
- Martinez FO, Gordon S (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 6:13.
- Mason CP, Tarr AW (2015) Human lectins and their roles in viral infections. *Molecules* 20:2229-2271.
- Mastelic B, do Rosario AP, Veldhoen M, Renaud JC, Jarra W, Sponaas AM, Roetyneck S, Stockinger B, Langhorne J (2012) IL-22 Protects Against Liver Pathology and Lethality of an Experimental Blood-Stage Malaria Infection. *Front Immunol* 3:85.
- McCormick SM, Heller NM (2015) Regulation of Macrophage, Dendritic Cell, and Microglial Phenotype and Function by the SOCS Proteins. *Front Immunol* 6:549.
- Mendel I, Katz A, Kozak N, Ben-Nun A, Revel M (1998) Interleukin-6 functions in autoimmune encephalomyelitis: a study in gene-targeted mice. *Eur J Immunol* 28:1727-1737.
- Merrick WC (2015) eIF4F: a retrospective. *J Biol Chem* 290:24091-24099.

- Miller DM, Weinstock-Guttman B, Bethoux F, Lee JC, Beck G, Block V, Durelli L, LaMantia L, Barnes D, Sellebjerg F, Rudick RA (2000) A meta-analysis of methylprednisolone in recovery from multiple sclerosis exacerbations. *Mult Scler* 6:267-273.
- Milo R, Kahana E (2010) Multiple sclerosis: geoeidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev* 9:A387-394.
- Milo R, Miller A (2014) Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 13:518-524.
- Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB (2014) Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal* 20:1126-1167.
- Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M (1999) Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med* 5:49-55.
- Moharreggh-Khiabani D, Linker RA, Gold R, Stangel M (2009) Fumaric Acid and its esters: an emerging treatment for multiple sclerosis. *Curr Neuropharmacol* 7:60-64.
- Mossberg N, Andersen O, Nilsson S, Dahlgren C, Hellstrand K, Lindh M, Svedhem A, Bergstrom T, Movitz C (2007) Oxygen radical production and severity of the Guillain-Barre syndrome. *J Neuroimmunol* 192:186-191.
- Mossberg N, Andersen O, Nordin M, Nilsson S, Svedhem A, Bergstrom T, Hellstrand K, Movitz C (2010) Leukocyte oxygen radical production determines disease severity in the recurrent Guillain-Barre syndrome. *J Inflamm (Lond)* 7:40.
- Mossberg N, Movitz C, Hellstrand K, Bergstrom T, Nilsson S, Andersen O (2009) Oxygen radical production in leukocytes and disease severity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 213:131-134.
- Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8:958-969.
- Mukaida N (2000) Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Int J Hematol* 72:391-398.
- Muller C, Schulte FW, Lange-Grunweller K, Obermann W, Madhugiri R, Pleschka S, Ziebuhr J, Hartmann RK, Grunweller A (2018) Broad-spectrum antiviral activity of the eIF4A inhibitor silvestrol against corona- and picornaviruses. *Antiviral Res* 150:123-129.
- Muller KH, Kakkola L, Nagaraj AS, Cheltsov AV, Anastasina M, Kainov DE (2012) Emerging cellular targets for influenza antiviral agents. *Trends Pharmacol Sci* 33:89-99.
- Murdoch D, Lyseng-Williamson KA (2005) Subcutaneous recombinant interferon-beta-1a (Rebif): a review of its use in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Drugs* 65:1295-1312.
- Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Ginderachter JA, Vogel SN, Wynn TA (2014) Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 41:14-20.
- Murray PJ, Wynn TA (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11:723-737.
- Murray TJ (2006) Diagnosis and treatment of multiple sclerosis. *BMJ* 332:525-527.
- Mylonas KJ, Nair MG, Prieto-Lafuente L, Paape D, Allen JE (2009) Alternatively activated macrophages elicited by helminth infection can be reprogrammed to enable microbial killing. *J Immunol* 182:3084-3094.
- Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ (2007) The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 204:3037-3047.
- Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y (2003) Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 171:6173-6177.
- Nakanishi T, Motoba I, Anraku M, Suzuki R, Yamaguchi Y, Erickson L, Eto N, Sugamoto K, Matsushita Y, Kawahara S (2018) Naturally occurring 3RS, 7R, 11R-phytanic acid suppresses in vitro T-cell production of interferon-gamma. *Lipids Health Dis* 17:147.
- Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY (1983) Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med* 158:670-689.

- Nayernia Z, Jaquet V, Krause KH (2014) New insights on NOX enzymes in the central nervous system. *Antioxid Redox Signal* 20:2815-2837.
- Netea MG, Joosten LA, Latz E, Mills KH, Natoli G, Stunnenberg HG, O'Neill LA, Xavier RJ (2016) Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science* 352:aaf1098.
- Neuhaus O, Archelos JJ, Hartung HP (2003) Immunomodulation in multiple sclerosis: from immunosuppression to neuroprotection. *Trends Pharmacol Sci* 24:131-138.
- Neuhaus O, Kieseier BC, Hartung HP (2006) Therapeutic role of mitoxantrone in multiple sclerosis. *Pharmacol Ther* 109:198-209.
- No JH, de Macedo Dossin F, Zhang Y, Liu YL, Zhu W, Feng X, Yoo JA, Lee E, Wang K, Hui R, Freitas-Junior LH, Oldfield E (2012) Lipophilic analogs of zoledronate and risedronate inhibit Plasmodium geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPPS) and exhibit potent antimalarial activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:4058-4063.
- Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000) Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343:938-952.
- O'Connor RA, Prendergast CT, Sabatos CA, Lau CW, Leech MD, Wraith DC, Anderton SM (2008) Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 181:3750-3754.
- O'Neill LA, Hardie DG (2013) Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature* 493:346-355.
- O'Neill S, Braut J, Stasia MJ, Knaus UG (2015) Genetic disorders coupled to ROS deficiency. *Redox Biol* 6:135-156.
- Oda H, Kadota J, Kohno S, Hara K (1994) Erythromycin inhibits neutrophil chemotaxis in bronchoalveoli of diffuse panbronchiolitis. *Chest* 106:1116-1123.
- Olofsson P, Holmberg J, Tordsson J, Lu S, Akerstrom B, Holmdahl R (2003) Positional identification of Ncf1 as a gene that regulates arthritis severity in rats. *Nat Genet* 33:25-32.
- Olofsson P, Nerstedt A, Hultqvist M, Nilsson EC, Andersson S, Bergelin A, Holmdahl R (2007) Arthritis suppression by NADPH activation operates through an interferon-beta pathway. *BMC Biol* 5:19.
- Panitch HS, Hirsch RL, Schindler J, Johnson KP (1987) Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology* 37:1097-1102.
- Papadopoulou A, D'Souza M, Kappos L, Yaldizli O (2010) Dimethyl fumarate for multiple sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs* 19:1603-1612.
- Parnham MJ (2005) Antibiotics, inflammation and its resolution: An overview. In: Rubin B.K., Tamaoki J. (eds) *Antibiotics as Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Agents*. Progress in Inflammation Research. Birkhäuser Basel. Basel, Switzerland,,: Birkhäuser Verlag.
- Parnham MJ (2011) Immunomodulatory approaches to the treatment of infections. *Infektol glasn/Croat J Infect* 31:15-27.
- Parnham MJ, Erakovic Haber V (2016) *Compendium of Inflammatory Diseases*. Basel, Switzerland,,: Springer.
- Parnham MJ, Erakovic Haber V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Perletti G, Verleden GM, Vos R (2014) Azithromycin: mechanisms of action and their relevance for clinical applications. *Pharmacol Ther* 143:225-245.
- Patsopoulos NA (2018) Genetics of Multiple Sclerosis: An Overview and New Directions. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8.
- Patton JT, Lustberg ME, Lozanski G, Garman SL, Towns WH, Drohan CM, Lehman A, Zhang X, Bolon B, Pan L, Kinghorn AD, Grever MR, Lucas DM, Baiocchi RA (2015) The translation inhibitor silvestrol exhibits direct anti-tumor activity while preserving innate and adaptive immunity against EBV-driven lymphoproliferative disease. *Oncotarget* 6:2693-2708.
- Perez-Mazliah D, Langhorne J (2014) CD4 T-cell subsets in malaria: TH1/TH2 revisited. *Front Immunol* 5:671.
- Perumal J, Filippi M, Ford C, Johnson K, Lisak R, Metz L, Tselis A, Tullman M, Khan O (2006) Glatiramer acetate therapy for multiple sclerosis: a review. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2:1019-1029.

- Petry A, Weitnauer M, Gorch A (2010) Receptor activation of NADPH oxidases. *Antioxid Redox Signal* 13:467-487.
- Powers JM, Kenjarski TP, Moser AB, Moser HW (1999) Cerebellar atrophy in chronic rhizomelic chondrodysplasia punctata: a potential role for phytanic acid and calcium in the death of its Purkinje cells. *Acta Neuropathol* 98:129-134.
- Przybek J, Gniatkowska I, Mirowska-Guzel D, Czlonkowska A (2015) Evolution of diagnostic criteria for multiple sclerosis. *Neurol Neurochir Pol* 49:313-321.
- Pucci E, Giuliani G, Solari A, Simi S, Minozzi S, Di Pietrantonj C, Galea I (2011) Natalizumab for relapsing remitting multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev* CD007621.
- Punturieri A, Filippov S, Allen E, Caras I, Murray R, Reddy V, Weiss SJ (2000) Regulation of elastolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages. *J Exp Med* 192:789-799.
- Racke MK, Lovett-Racke AE (2011) Glatiramer acetate treatment of multiple sclerosis: an immunological perspective. *J Immunol* 186:1887-1890.
- Raddatz BB, Hansmann F, Spitzbarth I, Kalkuhl A, Deschl U, Baumgartner W, Ulrich R (2014) Transcriptomic meta-analysis of multiple sclerosis and its experimental models. *PLoS One* 9:e86643.
- Ransohoff RM (2007) Natalizumab for multiple sclerosis. *N Engl J Med* 356:2622-2629.
- Ravelli KG, Santos GD, Dos Santos NB, Munhoz CD, Azzi-Nogueira D, Campos AC, Pagano RL, Britto LR, Hernandez MS (2019) Nox2-dependent Neuroinflammation in An EAE Model of Multiple Sclerosis. *Transl Neurosci* 10:1-9.
- Regis G, Pensa S, Boselli D, Novelli F, Poli V (2008) Ups and downs: the STAT1:STAT3 seesaw of Interferon and gp130 receptor signalling. *Semin Cell Dev Biol* 19:351-359.
- Reichel CA, Rehberg M, Lerchenberger M, Berberich N, Bihari P, Khandoga AG, Zahler S, Krombach F (2009) Ccl2 and Ccl3 mediate neutrophil recruitment via induction of protein synthesis and generation of lipid mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:1787-1793.
- Reid CD (1997) The dendritic cell lineage in haemopoiesis. *Br J Haematol* 96:217-223.
- Reis e Sousa C (2004) Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 16:21-25.
- Reis PA, Estado V, da Silva TI, d'Avila JC, Siqueira LD, Assis EF, Bozza PT, Bozza FA, Tibirica EV, Zimmerman GA, Castro-Faria-Neto HC (2012) Statins decrease neuroinflammation and prevent cognitive impairment after cerebral malaria. *PLoS Pathog* 8:e1003099.
- Ren Y, Khan FA, Pandupuspitasari NS, Zhang S (2017) Immune Evasion Strategies of Pathogens in Macrophages: the Potential for Limiting Pathogen Transmission. *Curr Issues Mol Biol* 21:21-40.
- Renner L, Kersten S, Duevel A, Schuberth HJ, Danicke S (2013) Effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid, linoleic acid, phytanic acid and the combination of various fatty acids on proliferation and cytokine expression of bovine peripheral blood mononuclear cells. *Nutrients* 5:2667-2683.
- Reyes BM, Danese S, Sans M, Fiocchi C, Levine AD (2005) Redox equilibrium in mucosal T cells tunes the intestinal TCR signaling threshold. *J Immunol* 175:2158-2166.
- Richards SM, Clark EA (2009) BCR-induced superoxide negatively regulates B-cell proliferation and T-cell-independent type 2 Ab responses. *Eur J Immunol* 39:3395-3403.
- Riesbeck K (2002) Immunomodulating activity of quinolones: review. *J Chemother* 14:3-12.
- Riopel J, Tam M, Mohan K, Marino MW, Stevenson MM (2001) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice have impaired resistance to blood-stage malaria. *Infect Immun* 69:129-136.
- Robb CT, Regan KH, Dorward DA, Rossi AG (2016) Key mechanisms governing resolution of lung inflammation. *Semin Immunopathol* 38:425-448.
- Rogers GW, Jr., Komar AA, Merrick WC (2002) eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 72:307-331.
- Roszer T (2015) Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm* 2015:816460.
- Rubin SM (2013) Management of multiple sclerosis: an overview. *Dis Mon* 59:253-260.
- Russ BE, Prier JE, Rao S, Turner SJ (2013) T cell immunity as a tool for studying epigenetic regulation of cellular differentiation. *Front Genet* 4:218.

- Sadlish H, Galicia-Vazquez G, Paris CG, Aust T, Bhullar B, Chang L, Helliwell SB, Hoepfner D, Knapp B, Riedl R, Roggo S, Schuierer S, Studer C, Porco JA, Jr., Pelletier J, Movva NR (2013) Evidence for a functionally relevant rocaglamide binding site on the eIF4A-RNA complex. *ACS Chem Biol* 8:1519-1527.
- Sallusto F, Lanzavecchia A (1994) Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179:1109-1118.
- Sanford M, Lyseng-Williamson KA (2011) Subcutaneous recombinant interferon-beta-1a (Rebif(R)): a review of its use in the treatment of relapsing multiple sclerosis. *Drugs* 71:1865-1891.
- Santos CC, Salvadori MS, Mota VG, Costa LM, de Almeida AA, de Oliveira GA, Costa JP, de Sousa DP, de Freitas RM, de Almeida RN (2013) Antinociceptive and Antioxidant Activities of Phytol In Vivo and In Vitro Models. *Neurosci J* 2013:949452.
- Sareila O, Kelkka T, Pizzolla A, Hultqvist M, Holmdahl R (2011) NOX2 complex-derived ROS as immune regulators. *Antioxid Redox Signal* 15:2197-2208.
- Sartorius T, Drescher A, Panse M, Lastovicka P, Peter A, Weigert C, Kostenis E, Ullrich S, Haring HU (2015) Mice Lacking Free Fatty Acid Receptor 1 (GPR40/FFAR1) are Protected Against Conjugated Linoleic Acid-Induced Fatty Liver but Develop Inflammation and Insulin Resistance in the Brain. *Cell Physiol Biochem* 35:2272-2284.
- Sato K, Fujita S (2007) Dendritic cells: nature and classification. *Allergol Int* 56:183-191.
- Savill J (2000) Apoptosis in resolution of inflammation. *Kidney Blood Press Res* 23:173-174.
- Schatz JH, Oricchio E, Wolfe AL, Jiang M, Linkov I, Maragulia J, Shi W, Zhang Z, Rajasekhar VK, Pagano NC, Porco JA, Jr., Teruya-Feldstein J, Rosen N, Zelenetz AD, Pelletier J, Wendel HG (2011) Targeting cap-dependent translation blocks converging survival signals by AKT and PIM kinases in lymphoma. *J Exp Med* 208:1799-1807.
- Schieber M, Chandel NS (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol* 24:R453-462.
- Schmidt SV, Nino-Castro AC, Schultze JL (2012) Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation. *Front Immunol* 3:274.
- Schuh C, Wimmer I, Hametner S, Haider L, Van Dam AM, Liblau RS, Smith KJ, Probert L, Binder CJ, Bauer J, Bradl M, Mahad D, Lassmann H (2014) Oxidative tissue injury in multiple sclerosis is only partly reflected in experimental disease models. *Acta Neuropathol* 128:247-266.
- Segal AW, Peters TJ (1976) Characterisation of the enzyme defect in chronic granulomatous disease. *Lancet* 1:1363-1365.
- Segal BM, Constantinescu CS, Raychaudhuri A, Kim L, Fidelus-Gort R, Kasper LH, Ustekinumab MSI (2008) Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study. *Lancet Neurol* 7:796-804.
- Selkala EM, Nair RR, Schmitz W, Kvist AP, Baes M, Hiltunen JK, Autio KJ (2015) Phytol is lethal for Amacr-deficient mice. *Biochim Biophys Acta* 1851:1394-1405.
- Shao D, Segal AW, Dekker LV (2003) Lipid rafts determine efficiency of NADPH oxidase activation in neutrophils. *FEBS Lett* 550:101-106.
- Sies H (2017) Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol* 11:613-619.
- Silva RO, Sousa FB, Damasceno SR, Carvalho NS, Silva VG, Oliveira FR, Sousa DP, Aragao KS, Barbosa AL, Freitas RM, Medeiros JV (2014) Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. *Fundam Clin Pharmacol* 28:455-464.
- Simmons SB, Pierson ER, Lee SY, Goverman JM (2013) Modeling the heterogeneity of multiple sclerosis in animals. *Trends Immunol* 34:410-422.
- Sinha S, Medhi B, Sehgal R (2014) Challenges of drug-resistant malaria. *Parasite* 21:61.
- Solari R, Pease JE (2015) Targeting chemokine receptors in disease--a case study of CCR4. *Eur J Pharmacol* 763:169-177.
- Song JH, An N, Chatterjee S, Kistner-Griffin E, Mahajan S, Mehrotra S, Kraft AS (2015) Deletion of Pim kinases elevates the cellular levels of reactive oxygen species and sensitizes to K-Ras-induced cell killing. *Oncogene* 34:3728-3736.

- Sorce S, Stocker R, Seredenina T, Holmdahl R, Aguzzi A, Chio A, Depaulis A, Heitz F, Olofsson P, Olsson T, Duveau V, Sanoudou D, Skosgater S, Vlahou A, Wasquel D, Krause KH, Jaquet V (2017) NADPH oxidases as drug targets and biomarkers in neurodegenerative diseases: What is the evidence? *Free Radic Biol Med* 112:387-396.
- Sorensen PS, Blinkenberg M (2016) The potential role for ocrelizumab in the treatment of multiple sclerosis: current evidence and future prospects. *Ther Adv Neurol Disord* 9:44-52.
- Spadaro M, Montarolo F, Perga S, Martire S, Brescia F, Malucchi S, Bertolotto A (2017) Biological activity of glatiramer acetate on Treg and anti-inflammatory monocytes persists for more than 10 years in responder multiple sclerosis patients. *Clin Immunol* 181:83-88.
- Spiller KL, Wrona EA, Romero-Torres S, Pallotta I, Graney PL, Witherell CE, Panicker LM, Feldman RA, Urbanska AM, Santambrogio L, Vunjak-Novakovic G, Freytes DO (2016) Differential gene expression in human, murine, and cell line-derived macrophages upon polarization. *Exp Cell Res* 347:1-13.
- Steinman L, Zamvil SS (2006) How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Ann Neurol* 60:12-21.
- Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J (2006) Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis* 6:411-425.
- Stockwin LH, McGonagle D, Martin IG, Blair GE (2000) Dendritic cells: immunological sentinels with a central role in health and disease. *Immunol Cell Biol* 78:91-102.
- Strelko CL, Lu W, Dufort FJ, Seyfried TN, Chiles TC, Rabinowitz JD, Roberts MF (2011) Itaconic acid is a mammalian metabolite induced during macrophage activation. *J Am Chem Soc* 133:16386-16389.
- Sun J, Shigemi H, Tanaka Y, Yamauchi T, Ueda T, Iwasaki H (2015) Tetracyclines downregulate the production of LPS-induced cytokines and chemokines in THP-1 cells via ERK, p38, and nuclear factor-kappaB signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 4:397-404.
- van Hart BA, Gran B, Weissert R (2011) EAE: imperfect but useful models of multiple sclerosis. *Trends Mol Med* 17:119-125.
- Tafferfer N (2016) Der Einfluss der Alpha-methylacyl-CoA-Racemase und Phytol auf die Pathogenese der Multiplen Sklerose: Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main 2016.
- Tamura T, Kimura K, Yui K, Yoshida S (2015) Reduction of conventional dendritic cells during Plasmodium infection is dependent on activation induced cell death by type I and II interferons. *Exp Parasitol* 159:127-135.
- Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T (2014) IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:a016295.
- Tanaka T, Ogata A, Narazaki M (2013) Tocilizumab: An Updated Review of Its Use in the Treatment of Rheumatoid Arthritis and Its Application for Other Immune-Mediated Diseases. *Clinical Medicine Insights: Therapeutics* 5:CMT.S9282.
- Tang XH, Suh MJ, Li R, Gudas LJ (2007) Cell proliferation inhibition and alterations in retinol esterification induced by phytanic acid and docosahexaenoic acid. *J Lipid Res* 48:165-176.
- Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, Frezza C, Bernard NJ, Kelly B, Foley NH, Zheng L, Gardet A, Tong Z, Jany SS, Corr SC, Haneklaus M, Caffrey BE, Pierce K, Walmsley S, Beasley FC, Cummins E, Nizet V, Whyte M, Taylor CT, Lin H, Masters SL, Gottlieb E, Kelly VP, Clish C, Auron PE, Xavier RJ, O'Neill LA (2013) Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha. *Nature* 496:238-242.
- Taoufik E, Tseveleki V, Euagelidou M, Emmanouil M, Voulgari-Kokota A, Haralambous S, Probert L (2008) Positive and negative implications of tumor necrosis factor neutralization for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurodegener Dis* 5:32-37.
- Tedesco S, Bolego C, Toniolo A, Nassi A, Fadini GP, Locati M, Cignarella A (2015) Phenotypic activation and pharmacological outcomes of spontaneously differentiated human monocyte-derived macrophages. *Immunobiology* 220:545-554.

- Thayer TC, Delano M, Liu C, Chen J, Padgett LE, Tse HM, Annamali M, Piganelli JD, Moldawer LL, Mathews CE (2011) Superoxide production by macrophages and T cells is critical for the induction of autoreactivity and type 1 diabetes. *Diabetes* 60:2144-2151.
- Thompson AJ, Toosy AT, Ciccarelli O (2010) Pharmacological management of symptoms in multiple sclerosis: current approaches and future directions. *Lancet Neurol* 9:1182-1199.
- Urban BC, Cordery D, Shafi MJ, Bull PC, Newbold CI, Williams TN, Marsh K (2006a) The frequency of BDCA3-positive dendritic cells is increased in the peripheral circulation of Kenyan children with severe malaria. *Infect Immun* 74:6700-6706.
- Urban BC, Ferguson DJ, Pain A, Willcox N, Plebanski M, Austyn JM, Roberts DJ (1999) Plasmodium falciparum-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature* 400:73-77.
- Urban BC, Shafi MJ, Cordery DV, Macharia A, Lowe B, Marsh K, Williams TN (2006b) Frequencies of peripheral blood myeloid cells in healthy Kenyan children with alpha+ thalassemia and the sickle cell trait. *Am J Trop Med Hyg* 74:578-584.
- Utzinger J, Keiser J (2004) Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: common drugs for treatment and control. *Expert Opin Pharmacother* 5:263-285.
- van de Loo FA, Bennink MB, Arntz OJ, Smeets RL, Lubberts E, Joosten LA, van Lent PL, Coenen-de Roo CJ, Cuzzocrea S, Segal BH, Holland SM, van den Berg WB (2003) Deficiency of NADPH oxidase components p47phox and gp91phox caused granulomatous synovitis and increased connective tissue destruction in experimental arthritis models. *Am J Pathol* 163:1525-1537.
- van den Brink DM, Wanders RJ (2006) Phytanic acid: production from phytol, its breakdown and role in human disease. *Cell Mol Life Sci* 63:1752-1765.
- van der Voort R, Kramer M, Lindhout E, Torensma R, Eleveld D, van Lieshout AW, Looman M, Ruers T, Radstake TR, Figdor CG, Adema GJ (2005) Novel monoclonal antibodies detect elevated levels of the chemokine CCL18/DC-CK1 in serum and body fluids in pathological conditions. *J Leukoc Biol* 77:739-747.
- Verma MK, Sadasivuni MK, Yateesh AN, Neelima K, Mrudula S, Reddy M, Smitha R, Biswas S, Chandravanshi B, Pallavi PM, Oommen AM, Jagannath MR, Somesh BB (2014) Activation of GPR40 attenuates chronic inflammation induced impact on pancreatic beta-cells health and function. *BMC Cell Biol* 15:24.
- Vogel DY, Glim JE, Stavenuiter AW, Breur M, Heijnen P, Amor S, Dijkstra CD, Beelen RH (2014) Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared. *Immunobiology* 219:695-703.
- Voskuhl R (2011) Sex differences in autoimmune diseases. *Biol Sex Differ* 2:1.
- Wakkee M, Thio HB (2007) Drug evaluation: BG-12, an immunomodulatory dimethylfumarate. *Curr Opin Investig Drugs* 8:955-962.
- Walton JC, Selvakumar B, Weil ZM, Snyder SH, Nelson RJ (2013) Neuronal nitric oxide synthase and NADPH oxidase interact to affect cognitive, affective, and social behaviors in mice. *Behav Brain Res* 256:320-327.
- Wanders RJ, Komen JC (2007) Peroxisomes, Refsum's disease and the alpha- and omega-oxidation of phytanic acid. *Biochem Soc Trans* 35:865-869.
- Watanabe N, Suzuki Y, Inokuchi S, Inoue S (2016) Sepsis induces incomplete M2 phenotype polarization in peritoneal exudate cells in mice. *J Intensive Care* 4:6.
- Weinberg JB, Volkheimer AD, Rubach MP, Florence SM, Mukemba JP, Kalingonji AR, Langelier C, Chen Y, Bush M, Yeo TW, Granger DL, Anstey NM, Mwaikambo ED (2016) Monocyte polarization in children with falciparum malaria: relationship to nitric oxide insufficiency and disease severity. *Sci Rep* 6:29151.
- Wells TN, Hoof van Huijsduijnen R, Van Voorhis WC (2015) Malaria medicines: a glass half full? *Nat Rev Drug Discov* 14:424-442.
- WHO. (2015) Schistosomiasis. Fact sheet N° 115 (2015). Geneva: World Health Organization.
- WHO. (2018) World Malaria Report 2018. Geneva: World Health Organization.
- WHO., Agua-Agum J, Ariyaratnam A, Aylward B, Blake IM, Brennan R, Cori A, Donnelly CA, Dorigatti I, Dye C, Eckmanns T, Ferguson NM, Formenty P, Fraser C, Garcia E, Garske T, Hinsley W, Holmes D, Hugonnet S, Iyengar S, Jombart T, Krishnan R, Meijers S, Mills HL, Mohamed Y, Nedjati-Gilani G, Newton E, Nouvellet P, Pelletier L, Perkins D, Riley S, Sagrado M, Schnitzler J, Schumacher D, Shah A, Van Kerkhove MD,

- Varsaneux O, Wijekoon Kannangarage N (2015) West African Ebola epidemic after one year--slowing but not yet under control. *N Engl J Med* 372:584-587.
- Wolfe AL, Singh K, Zhong Y, Drewe P, Rajasekhar VK, Sanghvi VR, Mavrakis KJ, Jiang M, Roderick JE, Van der Meulen J, Schatz JH, Rodrigo CM, Zhao C, Rondou P, de Stanchina E, Teruya-Feldstein J, Kelliher MA, Speleman F, Porco JA, Jr., Pelletier J, Ratsch G, Wendel HG (2014) RNA G-quadruplexes cause eIF4A-dependent oncogene translation in cancer. *Nature* 513:65-70.
- Wofle SJ, Strebovsky J, Bartz H, Sahr A, Arnold C, Kaiser C, Dalpke AH, Heeg K (2011) PD-L1 expression on tolerogenic APCs is controlled by STAT-3. *Eur J Immunol* 41:413-424.
- Xu J, Racke MK, Drew PD (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist fenofibrate regulates IL-12 family cytokine expression in the CNS: relevance to multiple sclerosis. *J Neurochem* 103:1801-1810.
- Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H (2014) Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res* 2:1.
- Yang Y, Gocke AR, Lovett-Racke A, Drew PD, Racke MK (2008) PPAR Alpha Regulation of the Immune Response and Autoimmune Encephalomyelitis. *PPAR Res* 2008:546753.
- Young SP, Johnson AW, Muller DP (2001) Effects of phytanic acid on the vitamin E status, lipid composition and physical properties of retinal cell membranes: implications for adult Refsum disease. *Clin Sci (Lond)* 101:697-705.
- Zhang CY, Wu YL, Boxer LM (2002) Impaired proliferation and survival of activated B cells in transgenic mice that express a dominant-negative cAMP-response element-binding protein transcription factor in B cells. *J Biol Chem* 277:48359-48365.
- Zhang O, Zhang J (2015) Atorvastatin promotes human monocyte differentiation toward alternative M2 macrophages through p38 mitogen-activated protein kinase-dependent peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. *Int Immunopharmacol* 26:58-64.
- Zhang X, Xiao S, Li Q (2018) Pravastatin polarizes the phenotype of macrophages toward M2 and elevates serum cholesterol levels in apolipoprotein E knockout mice. *J Int Med Res* 46:3365-3373.
- Zhou Y, Simpson S, Jr., Holloway AF, Charlesworth J, van der Mei I, Taylor BV (2014) The potential role of epigenetic modifications in the heritability of multiple sclerosis. *Mult Scler* 20:135-140.
- Zizzo G, Cohen PL (2015) The PPAR-gamma antagonist GW9662 elicits differentiation of M2c-like cells and upregulation of the MerTK/Gas6 axis: a key role for PPAR-gamma in human macrophage polarization. *J Inflamm (Lond)* 12:36.

10 Anhang

10.1 Chemikalien & Verbrauchsgegenstände

Bezeichnung	Hersteller
4'6-Diamidin-Phenylindol (DAPI)	AppliChem GmbH, Darmstadt
5x Puffer für Reverse Transkriptase	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
70 µm Nylon Filter	Greiner BIO-ONE, Frickenhausen
Accutase	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Agarose	Lonza, Rockland, ME, USA
Ammoniumthiocyanat	Sigma-Aldrich, Schnellendorf
BD FACS™ Lysing Solution	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Biocoll	Merck, Darmstadt
BSA-Lösung (10 %)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD3/CD28-Beads, murin	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
CD14-MicroBeads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD90.2-MicroBeads, murin	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Celecoxib	Biomol, Hamburg
Chloroform	Merck, Darmstadt
Collagenase A	Sigma-Aldrich, Schnellendorf
Desoxy-Nucleosid-Triphosphate (dNTPs), 10 mM	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Schnellendorf
DNA Gel Loading Dye (6x)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Dulbecco`s PBS	PAA Laboratories, Cölbe
Dynabeads® Mouse T-Activator CD3/CD28	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Einbettmedium	Leica Microsystems, Nussloch
Einmalspritzen	Braun, Melsungen
EPPI-Pistill Potter	Schuett Biotec, Göttingen
Ethanol 100 %	Sigma-Aldrich, Schnellendorf
Ethanol 70 %	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Schnellendorf
EvaGreen® qPCR-Mix (Rox), 5x	Bio&Sell, Feucht
FACS Lysing Solution	Beckton Dickinson, Heidelberg
FcR Blocking Reagenz	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Fetales Kälberserum (FKS)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Flow cytometric absolute standard	Polysciences, Eppelheim
Fluoromount-G™	eBioscience, San Diego, CA, USA
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
GM-CSF, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Guanidiniumthiocyanat	Sigma Aldrich, Schnellendorf
HBSS	Gibco Life technologies, Carlsbad, CA, USA
HEPES	Sigma-Aldrich, Schnellendorf
IFN-γ, rekombinant, human	PeproTech, Hamburg
IL-1β, rekombinant, human	PeproTech, Hamburg
IL-2	Life Technologies, Darmstadt

IL-4, premium grade, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
IL-6, rekombinant, human	PeproTech, Hamburg
Isopropyl Alkohol 100 %	Carl Roth, Karlsruhe
Kryoprobenschale Tissue-Tek® Cryomold® Biopsy	Sakura Finetek, Torrance, CA, USA
L-Glutamin, 200 mM	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
LPS	Merck, Darmstadt
LS Säulen (MACS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACSQuant® Calibration Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACSQuant® Running Buffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACSQuant® Storage Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACSQuant® Washing Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
M-CSF, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MicroAMPTM Optical Adhesive Film	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Microseal® B Seal	Bio-Rad, München
Mikrotiter Platte (96 Well)	Greiner, Frickenhausen
Mikrozentrifugenröhrchen	Eppendorf, Hamburg
M-MuLV Reverse Transkriptase (20 U/mL)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
MOG ₃₅₋₅₅ /CFA Emulsion EAE Kit	Hooke Laboratories, Lawrence, KS, USA
Natriumacetat	Sigma Aldrich, Schnellendorf
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Schnellendorf
Natriumpyruvat, 100 mM	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Objektträger Superfrost® Plus	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Parafilm®	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
PCR-Tubes Sapphire	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Penicillin / Streptomycin	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Penicillin/Streptomycin Lösung	PAA Laboratories, Cölbe
peqGOLD DNA Ladder-Mix 100 – 10 000 bp (500 ng/µL)	Peqlab, Erlangen
PGE2	Merck, Darmstadt
Phenol	Sigma Aldrich, Schnellendorf
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Phytansäure 50 mM	Larodan AB, Malmö, Schweden
Phytol-Futter (5 g/kg)	Sniff, Soest
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen gestopft, TipOne	StarLab GmbH, Hamburg
Pristansäure 50 mM	Larodan AB, Malmö, Schweden
Proteinase K (10 µg/mL)	Roche, Mannheim
qPCR Platte 96 Well, Hard-Shell	Bio-Rad, München
RED Extract DNA Polymerase	Ampliqon, Odense, Dänemark
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
RNase Zap	Life Technologies, Darmstadt
Roti-Safe GelStain	Carl Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 Glutamax Medium	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Seahorse XF 1,0 M Glukose Lösung	Agilent, Waldbronn
Seahorse XF RPMI Medium	Agilent, Waldbronn
SepMate® Dichtezentrifugationsröhrchen	Stemcell, Vancouver, Kanada
Silvestrol	AG Arnold Grünweller, Universität Marburg

Steroid Substanz 1o	AG Katja Becker, Universität Gießen
Sucrose	Sigma-Aldrich, Schnellendorf
Taq 2x Master Mix RED (1,5 mM MgCl ₂)	Ampliqon, Odense, Dänemark
Tetramethylbenzidin	Roche, Penzberg
Tissue freezing medium®	Leica Microsystems, Nussloch
TNF- α , human	PeproTech, Hamburg
TRI – Reagenz	AppliChem GmbH, Darmstadt
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Vollblut (Human), Buffy-Coat	DRK-Blutspendedienst, Frankfurt a. M.
Wasser, Nuklease-frei	Qiagen, Hilden

10.2 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
AXIO Observer. Z1	Zeis, Jena
Bio-Rad CFX96™ Real-Time System	Bio-Rad, München
ChemiDoc Imaging System	Bio-Rad, München
CM3050S Research Kryostats	Leica, Nussloch
DMi8 Fluoreszenzmikroskop	Leica, Nussloch
EnSpire® 2300 Multimode Plate Reader	Perkin Elmer, Lübeck
Feuchtekammer M920 StainTray™	Simport, Saint-Mathieu-de-Beloeil, Kanada
Inkubator Galaxy 170S	Eppendorf, Hamburg
Inkubator HeraCell 240	Heraeus, Hanau
Labor Kühl-Gefrierkombination LCv 4010	Liebherr, Bulle FR, Schweiz
M900-EasyDip™	Simport, Saint-Mathieu-de-Beloeil, Kanada
MACSQuant® Analyzer 10 Durchflussszytometer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroliterpipetten Research Plus	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplatten-Dispenser Multidrop 384	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Seahorse XFe96 Analyzer	Agilent, Waldbronn
Sterilwerkbank Herasafe KS	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Tecan SpectraFluor Plus Reader	Tecan, Crailsheim
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Galaxy MiniStar	VWR, Radnor, PA, USA
UV Geldoc Gel Imager	Bio-Rad, München
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Vortexmischer MS 3 basic	IKA, Staufen
Wippschüttler DRS-12	Neo-Lab, Heidelberg
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 40 R	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

10.3 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
8-OHG, Mouse (Speziesunabhängig)	Abcam, Cambridge, UK
AF-488, Donkey Anti-Rabbit	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
AF-488, Goat Anti-Rat	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
AF-555, Goat Anti-Maus	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
CCR4-PE, murin	Bio Legend, Fell
CCR6-PE-Vio770, murin	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
CD11b-VioGreen, murin	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
CD11c-FITC, murin	Bio Legend, Fell
CD11c-PE-Vio770, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD127, APC-Cy7, murin	Bio Legend, Fell
CD141-VioBlue, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD14-APC-Vio770, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD14-VioGreen, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD163-VioBlue, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD197-FITC, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD19-FITC, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD1a-FITC, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD1c-PE, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD206-PE-Vio770, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD209-APC-Vio770, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD25-VioBright FITC, murin	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD3-PE-CF594, murin	Bio Legend, Fell
CD3-VioBlue, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD40-APC, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD45, Rat Anti-Mouse	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
CD45-VioBlue, murin	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD4-APC, murin	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
CD54-Pacific Blue, human	Bio Legend, Fell
CD80-APC, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD83, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD86-FITC, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD8a-PE-Cy5, murin	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
CXCR3-APC, murin	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
F4/80-PE-Cy7, murin	Bio Legend, Fell
FluroMyelin TM Red Fluorescent Myelin Stain	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
HLA-DR-PerCP, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Iba1, Rabbit Anti-Mouse	Wako, Neuss
Ly6G-APC-Cy7, murin	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
TREM2-PE, human	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

10.4 Oligonukleotide zur Quantifizierung muriner Gene

Gen	Sense	Sequenz (5' – 3')	Hersteller
Foxp3	Forward Primer	CCC ATC CCC AGG AGT CTT G	Biomers, Ulm
	Reverse Primer	ACC ATG ACT AGG GGC ACT GTA	
GATA3	Forward Primer	ATC CAG CAC AGA AGG CAG GG	Biomers, Ulm
	Reverse Primer	GCT TGG GCT TGA TAA GGG GC	
IL-4	Forward Primer	GTC ATC CTG CTC TTC TTT CTC G	BioSpring, Frankfurt a. M.
	Reverse Primer	CTG TGG TGT TCT TCG TTG CTG	
IL-10	Forward Primer	TGC CAA GCC TTA TCG GAA ATG	Eurofins Scientific, Luxemburg
	Reverse Primer	ACT CTT CAC CTG CTC CAC TGC C	
IL-17	Forward Primer	TCT GTG TCT CTG ATG CTG TTG	Eurofins Scientific, Luxemburg
	Reverse Primer	CTG CAG GGT CTT CAT TGC GGT GG	
NOX2	Forward Primer	GGG GAA CTG GGC TGT GAA TG	BioSpring, Frankfurt a. M.
	Reverse Primer	CGA GCA ACA CGC ACT GGA AC	
ROR- yt	Forward Primer	AGA ACT GCC CCA TTG ACC GA	Biomers, Ulm
	Reverse Primer	CCT GTT GCT GCT GCT GTT GC	
T-Bet	Forward Primer	GCT CAC CAA CAA CAA GGG GG	Biomers, Ulm
	Reverse Primer	TCT CCA TCA TTC ACC TCC ACG	
IFN-γ	Forward Primer	CAC GGC ACA GTC ATT GAA AGC	BioSpring, Frankfurt a. M.
	Reverse Primer	CAC CAT CCT TTT GCC AGT TCC	
PPIA	Forward Primer	GCT GGA CCA AAC ACA AAC GG	BioSpring, Frankfurt a. M.
	Reverse Primer	GCC ATT CCT GGA CCC AAA AC	

10.5 Kits

Bezeichnung	Hersteller
BD Cytometric Bead Array Human Inflammatory Cytokines Kit	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
BD Cytometric Bead Array Mouse T _H 1/T _H 2/T _H 17 Cytokine Kit	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
BrdU Colorimetric Proliferation Assay	Roche, Penzberg
EAE-Kit EK-2110	Hooke Laboratories, Lawrence, KS, USA
Extract-N-Amp Blood PCR Kit	Sigma Aldrich, Schnellendorf
First-Strand cDNA Synthese Kit	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Human CCL17 (TARC) ELISA Kit	BioLegend, Fell
Human CCL18/PARC ELISA Kit	BosterBio, Pleasanton, CA, USA
Human IL-23 Uncoated ELISA Kit	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Human PGE2 ELISA Kit	Enzo Life Science, Lörrach
MACS Comp Bead Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Orangu™ Cell Counting Solution	Cell Guidance Systems, Cambridge, UK
RNAqueous-Micro Procedure Kit	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Seahorse XFe96 FluxPak	Agilent, Waldbronn
Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit	Bio Legend, Fell

10.6 Lösungen, Puffer & Medien

Reagenz	Zusammensetzung
10x TBE Puffer	108 g Tris Base 55 g Borsäure 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) Ad. 1 l H ₂ O
BD-Lysepuffer	10 % BD FACS™ Lysing Solution 90 % VE-H ₂ O
Erythrozyten-Lysepuffer	150 mM NH ₄ Cl 100 mM NaHCO ₃ 0,1 mM Na-EDTA (pH 7,4)
FACS-Lysepuffer	15 ml HBSS 15 ml Accutase 30 mg/ml Collagenase A
MACS-Puffer	2 mM PBS-EDTA, pH 7,5 0,5 % BSA (w/v) PBS pH 7,2
PBS-T	1 ml Triton X-100 Ad. 1 l PBS
Proteinkinase K	5 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0) 0,15 g CaCl ₂ 25 ml Glycerol Ad. 50 ml H ₂ O
Schwanzlysepuffer	100 mM Tris-HCl (pH 8,5) 5 mM EDTA 0,2% SDS 200 mM NaCl
Seahorse-Medium	Seahorse XF RPMI Medium 1 mM HEPES 10 mM Glucose 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat pH 7,4
TRI-Reagenz	500 g Phenol 116,3 g Guanidiniumthiocyanat (0,8 M) 38,9 g Ammoniumthiocyanat (0,8 M) 41 ml Natriumacetat (3 M, pH 5) 61,5 ml Glycerol (100 %)
Zellkulturmedium	RPMI-Medium-Glutamax 10 % (v/v) FKS 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin

10.7 Software

Bezeichnung	Hersteller
Axio Vision 4.7.2	Zeiss, Jena
Bio-Rad CFX Manager 3.1	Bio-Rad, München
FCAP Array 3.0	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
FlowJow v10	Treestar, Ashland, OR, USA
Graphpad Prism 7	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Image Studio Lite 5.0 Software	LI-COR, Bad Homburg
Leica Application Suite X	Leica, Nussloch
Seahorse Wave Desktop Software	Agilent, Waldbronn

11 Eidesstattliche Erklärung

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlichen oder inhaltlichen Entlehnungen aus anderen benutzten Druckwerken oder digitalisierten Publikationen und Quellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe. Diesem Promotionsverfahren sind keine endgültigen gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen

Frankfurt am Main, 10.12.2019

Ort, Datum



Unterschrift