

Aus der Klinik für Neurologie  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. med. K. Faßbender

**Inhibition der sauren Sphingomyelinase bei der experimentellen  
autoimmunen Enzephalomyelitis**

Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2019

vorgelegt von: Sonja Penth  
geb. am: 15. September 1988 in Saarbrücken

Tag der Promotion: 28.01.2021  
Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger  
Berichterstatter: Prof. Dr. med. Klaus Faßbender  
Prof. Dr. med. Walter Schulz-Schaeffer

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>6</b>
3.1	Multiple Sklerose - Ein Überblick.....	6
3.2	Pathogenese der Multiplen Sklerose .....	7
3.3	Aktuelle Therapiemöglichkeiten .....	10
3.4	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE).....	13
3.5	Sphingolipide.....	14
3.6	Ziel dieser Arbeit.....	19
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
4.1	Material .....	20
4.2	Methoden.....	29
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>36</b>
5.1	Adhäsionsassays mit medikamentös behandelten Lymphozyten .....	36
5.2	Medikamentöse Hemmung der sauren Sphingomyelinase in EAE immunisierten Mäusen - A: vorbeugende Behandlung .....	38
5.3	Medikamentöse Hemmung der sauren Sphingomyelinase in EAE immunisierten Mäusen - B: Behandlung ab Symptombeginn.....	46
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>58</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis .....	58
7.2	Tabellenverzeichnis.....	60
7.3	Abkürzungsverzeichnis .....	60
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>62</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>70</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>71</b>

# 1 Zusammenfassung

Mit einer Prävalenz in Europa von 80 Fällen pro 100 000 Einwohner und einem mittleren Erkrankungsalter von 30 Jahren ist die Multiple Sklerose eine der wichtigsten Ursachen für Behinderungen im jungen Erwachsenenalter. Trotz intensiver Forschungsanstrengungen stoßen die aktuellen Therapiemöglichkeiten aufgrund des Nebenwirkungsprofils oder einer über die Jahre nachlassenden Wirkung häufig an ihre Limits.

Ein wichtiger Schritt im Pathomechanismus dieser chronisch-entzündlichen Erkrankung ist die Adhäsion und Transmigration autoreaktiver T-Lymphozyten über die Blut-Hirn-Schranke in das zentrale Nervensystem, wo es zu einer Autoimmunreaktion gegen die Myelinscheide und Oligodendrozyten kommt. Die hierdurch zerebral und spinal entstehenden entzündlichen, demyelinisierten, gliotischen Plaques rufen vielseitige neurologische Symptome hervor wie Parästhesien, spastischen Paresen, Koordinationsstörungen oder kognitive Einschränkungen. Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, welche unter anderem durch eine Immunisierung mit Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein initiiert wird, dient als wichtigstes Tiermodell der Multiplen Sklerose.

Sphingolipide, vorwiegend in der äußeren Zellmembran eukaryoter Zellen lokalisiert, sind maßgeblich an vielen physiologischen und pathologischen Zellprozessen beteiligt. Ceramid, ein Sphingoid, welches durch das Enzym saure Sphingomyelinase aus Sphingomyelin freigesetzt wird, kumuliert innerhalb der äußeren Zellmembran zu ceramidreichen Makrodomänen. Diese dienen der Anhäufung von Rezeptormolekülen, wodurch deren Signale amplifiziert werden. Die Aktivierung dieses sauren Sphingomyelinase-Ceramid-Signalweges wurde für Moleküle gezeigt, die an der Endothelschicht der Blut-Hirn-Schranke oder auf Immunzellen exprimiert werden und an der Adhäsion und Transmigration autoaggressiver T-Lymphozyten in das zentrale Nervensystem beteiligt sind.

In dieser Arbeit wurde anhand von *in vitro* Adhäsionsassays gezeigt, dass die Vorbehandlung autoreaktiver T-Zellen mit Amitriptylin und Sertralin, funktionelle Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase, zu einem deutlich reduzierten Anhaftungsverhalten an der Hirnendothelschicht führt. Des Weiteren zeigte sich unter der vorbeugenden intraperitonealen Anwendung der Inhibitoren Clemastin und Sertralin *in vivo* an mit Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein immunisierten Mäusen ein Ausbleiben der klinischen Symptome und eine signifikante Reduktion der immunhistologisch in Hirn und Rückenmark der Tiere zur Darstellung kommenden entzündlichen Infiltrate. Wurden die Medikamente erst ab Symptombeginn verabreicht konnte unter Amitriptylin und Sertralin ein abgeschwächter Krankheitsverlauf beobachtet werden. Amitriptylin führte zusätzlich zu kleineren Infiltraten.

Demnach ist die Gruppe der funktionellen Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase, zu der viele bereits langjährig im klinischen Alltag erprobte Medikamente zählen, ein vielversprechender Ansatz für weiterführende klinische Studien hinsichtlich neuer Therapieoptionen für Patienten mit Multipler Sklerose.

## **2 Abstract - Inhibition of acid sphingomyelinase in experimental autoimmune encephalomyelitis**

With a prevalence of 80/100 000 in Europe and a mean age of onset of 30 years, multiple sclerosis is one of the major causes of disability in young adulthood. Despite intensive research efforts, the current treatment options often reach their limits due to the side effect profile or a decreasing effect over the years.

One important step in the pathomechanism of this chronic inflammatory disease is the adhesion and transmigration of autoreactive T lymphocytes across the blood brain barrier into the central nervous system, where it comes to an autoimmune reaction against the myelin sheath and oligodendrocytes. The resulting inflammatory, demyelinated, gliotic plaques located in the brain and spinal cord cause a variety of neurological symptoms such as paresthesias, pareses, ataxia or cognitive impairment. Experimental autoimmune encephalomyelitis, which is amongst others initiated by immunization with myelin oligodendrocyte glycoprotein, serves as the major animal model of multiple sclerosis.

Sphingolipids, located predominantly in the outer cell membrane of eukaryotic cells, are involved in many physiological and pathological cell processes. Ceramide, a sphingoid released from sphingomyelin by the enzyme acid sphingomyelinase, aggregates within the outer cell membrane into ceramide-rich macrodomains. These serve to accumulate receptor molecules resulting in an amplification of their signals. Activation of this acid sphingomyelinase ceramide pathway has been demonstrated for molecules which are expressed at the endothelial layer of the blood-brain barrier or at immune cells and take part in the adhesion and transmigration of autoaggressive T lymphocytes into the central nervous system.

In this work, *in vitro* adhesion assays have been used to demonstrate that pretreatment of autoreactive T cells with amitriptyline and sertraline, functional inhibitors of acid sphingomyelinase, results in considerably reduced adherence to the cerebral endothelial layer. Furthermore, under the preventive intraperitoneal application of the inhibitors clemastine and sertraline *in vivo* in mice immunized with myelin oligodendrocyte glycoprotein, there was a lack of clinical symptoms and a significant reduction of inflammatory infiltrates immunohistochemically displayed in the brain and spinal cord of the animals. When the drugs administration was only began with the onset of symptoms a weakened disease course could be observed under amitriptyline and sertraline. Amitriptyline additionally resulted in smaller infiltrates.

Accordingly, the group of functional inhibitors of acid sphingomyelinase, which includes many drugs that have been used in clinical practice for many years, is a promising approach for further clinical trials regarding new treatment options for patients with multiple sclerosis.

## 3 Einleitung

### 3.1 Multiple Sklerose - Ein Überblick

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine entzündliche, demyelinisierende Erkrankung von Hirn und Rückenmark. Mit einer Prävalenz in Europa von 80 Fällen pro 100 000 Einwohner betrifft sie Frauen etwa doppelt so häufig wie Männer (WHO, 2008). Sie ist eine der häufigsten Ursachen für neurologische Behinderung im jungen Erwachsenenalter.

Als definierte Erkrankung wurde die Multiple Sklerose erstmals 1868 von Charcot beschrieben, der sie als "sclérose en plaques" bezeichnete, da er im Hirngewebe einer jungen Frau die für die Erkrankung typischen Narben feststellte. Charcot nannte bereits Sehstörungen als ein häufiges klinisches Symptom der MS und auch heute noch gilt die Neuritis nervi optici, die eine transiente Sehstörung hervorruft, als typische Erstmanifestation der Erkrankung. Auch die Symptomtrias aus Nystagmus, Dysarthrie und Ataxie wurde von ihm als Symptomatik bei Hirnstamm- und Kleinhirnbeteiligung beschrieben (CHARCOT, 1868),(CHARCOT, 1877).

Die klinischen Symptome der Patienten sind durch einen Verlust neurologischer Funktionen bedingt und können äußerst vielseitig und individuell sehr unterschiedlich sein. Sie reichen von Parästhesien, spastischen Paresen und Koordinationsstörungen über die Einschränkung kognitiver Fähigkeiten bis hin zu Blasen- und Mastdarmstörungen. Daneben kommt es im Verlauf bei vielen Patienten auch zu psychischen Symptomen wie einer ausgeprägten Fatigue, einer emotionalen Instabilität oder einer Depression (NOSEWORTHY et al., 2000).

Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 30 Jahren (CONFAVREUX et al., 2000). 50 Prozent der Patienten können 15 Jahre nach Krankheitsbeginn nicht mehr ohne Hilfe gehen (WEINSHENKER et al., 1989). Die Erkrankung betrifft folglich junge Erwachsene und kann durch die entstehenden Behinderungen erhebliche Auswirkungen auf die Lebensqualität der Patienten haben.

Die Krankheit kann verschiedene Verlaufsformen aufweisen. Ungefähr 85 Prozent der Patienten zeigen initial einen schubförmigen-remittierenden Typ (RR-MS, engl. relapsing-remittend), welcher in den meisten Fällen früher oder später in eine sekundär progrediente Form (SP-MS, engl. secondary progressive) übergeht. Bei den restlichen 15 Prozent der Betroffenen ist die Krankheit primär progredient (PP-MS, engl. primary progressive) (CONFAVREUX et al., 2000). Auch schubförmig-progrediente Verläufe (PR-MS; engl. progressive-relapsing) kommen bei einem geringen Anteil der Patienten vor (LUBLIN, REINGOLD, 1996). Der Schub ist hierbei definiert als ein Neuauftreten von

Symptomen oder eine Symptomverschlimmerung, die länger als 24 Stunden andauert und dann über Tage oder Wochen wieder abklingt (POSER et al., 1983). Der progressive Verlauf charakterisiert sich durch ein Fortschreiten der Krankheitssymptome über einen Zeitraum von mindestens sechs Monaten (NOSEWORTHY et al., 2000).

Da das Erscheinungsbild der MS äußerst vielseitig ist, sind exakte Kriterien wichtig, die die Diagnosestellung erleichtern. Schumacher stützte 1965 die Diagnosestellung rein auf die klinische Untersuchung. Hierbei mussten bereits eine räumliche und eine zeitliche Dissemination nachweisbar, sowie andere Ursachen der Symptome ausgeschlossen sein (SCHUMACHER et al., 1965).

Poser ergänzte diese Kriterien 1983 durch apparative und laborchemische Diagnostik (POSER et al., 1983). Die aktuell gültigen Leitlinien stützen sich auf die 2001 entwickelten McDonald Kriterien, welche 2005, 2011 und 2017 erneut revidiert wurden, um eine vereinfachte Diagnosestellung zu ermöglichen (MCDONALD et al., 2001), (POLMAN et al., 2005), (POLMAN et al., 2011), (THOMPSON et al., 2018). Dies ist überaus wichtig, da ein frühzeitiger Therapiebeginn die Prognose verbessert (ROVARIS et al., 2006). Die McDonald Kriterien verlangen den Nachweis einer räumlichen und zugleich zeitlichen Dissemination, welcher klinisch, magnetresonanztomographisch oder durch den Nachweis spezifischer oligoklonaler Banden in der isoelektrischen Fokussierung des Liquors gegeben sein kann. Zusätzlich dienen Liquor- und Blutuntersuchungen dem Ausschluss anderer Erkrankungen, die ebenfalls entzündliche Herde in der weißen Substanz hervorrufen können.

## **3.2 Pathogenese der Multiplen Sklerose**

### **3.2.1 Ätiologie**

Die genaue Ätiologie der Erkrankung ist bisher noch nicht geklärt. Man weiß jedoch, dass zum einen eine genetische Prädisposition eine Rolle spielt und zusätzlich auch Umweltfaktoren einen wichtigen Einfluss haben. Der genetische Einfluss wurde klinisch in vielen Geschwister-, Zwillings- und Adoptionsstudien belegt. Das Risiko, an MS zu erkranken, erhöht sich bei Verwandten von MS-Patienten mit dem Verwandtschaftsgrad. Unter eineiigen Zwillinge liegt die Konkordanz beispielsweise bei 31 Prozent, unter zweieiigen Zwillingen hingegen nur bei fünf Prozent (SADOVNICK et al., 1993). Geschwister erkrankter Patienten haben im Vergleich zur restlichen Bevölkerung ein 30 bis 40-fach erhöhtes Risiko, ebenfalls zu erkranken. Bei Kindern eines betroffenen Elternteils ist das Risiko nur noch 5,5-fach erhöht (ROBERTSON et al., 1996), (SADOVNICK et al., 1988).

Eindeutig einzelne Gene zu identifizieren, die für die erbliche Komponente der Erkrankung verantwortlich sind, hat sich zunächst trotz vieler verschiedener Forschungsbestrebungen als schwierig erwiesen. Einzig das HLA - DR2 Allel wurde frühzeitig mit einem erhöhten Risiko assoziiert

(JERSILD et al., 1973). Dies wurde zuletzt 2007 durch eine internationale Studie bestätigt, die weitere erbliche Risikogene identifizieren konnte, unter anderem die Allele von IL2RA und IL7RA (INTERNATIONAL MULTIPLE SCLEROSIS GENETICS et al., 2007).

Ein Einfluss von Umweltfaktoren wird zum einen darauf zurückgeführt, dass die Inzidenz der Erkrankung weltweit stark variiert und grob gesagt mit der Distanz zum Äquator zunimmt (KURTZKE, 1975). Migrationsstudien zeigen hierbei, dass das Risiko bei einem Ortswechsel in der Kindheit dem des Ziellandes entspricht, wohingegen Personen die erst im Erwachsenenalter auswandern ein Erkrankungsrisiko haben, welches ihrem Geburtsland entspricht (KURTZKE, 1993), (DEAN, KURTZKE, 1971), (ELIAN et al., 1990).

Als negative Umwelteinflüsse werden eine verspätete Infektion mit bestimmten Viren (vor allem Epstein-Barr-Virus, EBV), eine verminderte Sonnenexposition, Vitamin D Mangel, Luftverschmutzung und Toxine diskutiert (COMPSTON, COLES, 2008), (MARRIE, 2004).

### **3.2.2 Pathomechanismus**

Aufgrund der hohen Vielfalt der Symptome, den individuell sehr unterschiedlichen Krankheitsverläufen und des mehr oder weniger starken Ansprechens verschiedener Patienten auf dieselben therapeutischen Ansätze ist von mehreren Pathomechanismen auszugehen, die in unterschiedlicher Gewichtung zum Ausbruch der Multiplen Sklerose führen können. Obwohl es noch viele ungeklärte Fragen bezüglich der Pathogenese der Multiplen Sklerose gibt, so hat die Forschung doch schon einige Erkenntnisse erlangt. Grundsätzlich wird nach heutigem Stand der Wissenschaft davon ausgegangen, dass die Frühsymptome durch eine Demyelinisierung der Axone entstehen, welche in den meisten Fällen autoimmuner Genese ist. Körper eigene T-Lymphozyten überwinden die Blut-Hirn-Schranke und lösen im zentralen Nervensystem (ZNS) eine Immunreaktion aus, welche sich gegen Antigene auf der Oberfläche der Myelinscheide oder auf den Oligodendrozyten richtet. Es kommt zu multiplen demyelinisierten Läsionen mit zunächst, in Relation gesehen, gut erhaltenen Axonen. Dieser Prozess ist zu einem gewissen Maße reversibel durch Remyelinisierungsprozesse, bei denen gliotisches Narbengewebe entsteht. Im Verlauf kommt zusätzlich eine Schädigung der Axone selbst hinzu, was zu irreversiblen neurologischen Ausfällen führt (NOSEWORTHY et al., 2000).

Die entzündlichen, demyelinisierten und gliotischen Plaques sind das Hauptmerkmal der Erkrankung und erscheinen als T2-hyperintense Herde in der Kernspintomographie. Sie sind vor allem im Rückenmark (50%), dem Nervus opticus (25%), in Hirnstamm und Kleinhirn (20%) und periventrikulär lokalisiert (REJDAK et al., 2010). Lucchinetti et. al. untersuchten im Jahr 2000 akut entzündliche Läsionen im Hirngewebe von MS-Patienten immunologisch und neurobiologisch hinsichtlich des Ausmaßes des Myelinverlustes, der Geographie und Größe der Plaques, dem Muster der Oligodendrozytenzerstörung und dem Nachweis einer Komplementaktivierung. Hieraus ergaben

sich vier grundverschiedene Mechanismen der Demyelinisierung. Die Typen I und II glichen dabei einer autoimmunen Enzephalomyelitis, wohingegen die Typen III und IV Zeichen einer Oligodendrozytendystrophie aufwiesen. Letzteres warf die Diskussion einer neurodegenerativen Komponente oder Form der MS auf. Alle vier verschiedenen Arten von Infiltraten haben jedoch eine hohe Dichte an T-Lymphozyten gemeinsam (LUCCHINETTI et al., 2000). In der akuten, entzündlichen Phase der Erkrankung spielt demnach die Migration autoreaktiver CD4- und CD8-positiver T-Lymphozyten in das ZNS-Gewebe eine sehr wichtige Rolle. Mechanismen, welche zu einer falschen Prägung der T-Zellen diskutiert werden sind unter anderem eine Bystanderaktivierung oder molekulare Mimikry.

Die Migration der T-Lymphozyten beginnt mit einer Adhäsion an Endothelzellen des ZNS. Dies ist ein mehrschrittiger Prozess, bei dem viele Signal- und Rezeptormoleküle involviert sind. Der erste, flüchtige Kontakt der zirkulierenden Immunzelle mit dem Gefäßendothel erfolgt über Adhäsionsmoleküle der Selektinfamilie (L-, E- oder P-Selektin) und deren glycosylierte Liganden oder über  $\alpha 4$ -Integrine, deren Liganden der Immunglobulinsuperfamilie angehören und als VCAM-1 (engl. vascular cell adhesion molecule) und MAdCAM-1 (engl. mucosal adressin cell adhesion molecule) bezeichnet werden. Als Folge dieser flüchtigen Interaktion rollt die Immunzelle mit verminderter Geschwindigkeit entlang der Gefäßwand und ist in der Lage, Chemokine zu binden, die entlang der Endothelzellschicht präsentiert werden. Die Chemokine erhöhen über einen G-Protein gekoppelten Mechanismus die Affinität von auf der Immunzelle befindlichen Integrinen ( $\alpha 4$ - und  $\beta 2$ - Integrine) durch Änderung deren Konformation und Bildung von Clustern. Die Erhöhung von Affinität und Avidität der Integrine ermöglicht deren Bindung an ihre endothelialen Liganden, ICAM-1, ICAM-2 (engl. intracellular adhesion molecule), VCAM-1, und MAdCAM-1. Dies festigt die Adhäsionsbindung und führt zum sogenannten Crawling (engl. Krabbeln) der Immunzelle entlang der Gefäßwand. Dieser Vorgang wird maßgeblich durch LFA-1. (engl. leukocyte function-associated antigen) und die beiden endothelialen Liganden ICAM-1 und ICAM-2 reguliert. Auf das Crawling folgt die parazelluläre oder transzelluläre Diapedese (ENGELHARDT, RANSOHOFF, 2012).

Im ZNS-Parenchym erfolgt dann die Reaktivierung der T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen (APZ). Die aktivierten Lymphozyten identifizieren Proteine wie Myelin Basic Protein (MBP), Myelin Oligodendrozyten Glycoprotein (MOG), oder Proteolipid Protein (PLP) fälschlicherweise als körperfremd und lösen durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie Interleukin (IL) - 2, Interferon (IFN) - gamma und Tumornekrosefaktor (TNF) - alpha, eine Entzündungskaskade aus, die sich gegen diese körpereigenen Proteine richtet. Die Entzündungsfaktoren schädigen die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke, wodurch weitere Immunzellen ins ZNS migrieren können und die Entzündungskaskade amplifiziert wird (NOSEWORTHY et al., 2000).

### 3.3 Aktuelle Therapiemöglichkeiten

Bei der Therapie der Multiplen Sklerose wird zwischen der Behandlung des akuten Schubes und einer verlaufsmodifizierenden Langzeittherapie unterschieden. Im Schub erfolgt eine intravenöse Kortisonstoßtherapie mit 500 bis 1000 mg Kortison (Methylprednisolon) pro Tag über drei bis fünf Tage. Diese wirkt über eine Suppression der Entzündungsreaktion. Führt dies nach zwei Wochen nicht zum Rückgang der Symptome, sollte eine Eskalation mit 2000 mg Methylprednisolon pro Tag über fünf Tagen erfolgen (MSTKG, RIECKMANN, 2006). In schwerwiegenden Fällen kommen auch eine Plasmapherese oder eine Immunadsorption in Frage.

Die verlaufsmodifizierende Therapie hat das Ziel, die Schubhäufigkeit und -dauer zu reduzieren. Bei mildem oder moderatem Verlauf erfolgt möglichst früh die Gabe eines Basistherapeutikums, zu denen Interferon (IFN)- $\beta$  1b und 1a, Glatirameracetat und als neuere Präparate auch pegyliertes (PEG)-IFN- $\beta$  1a, Dimethylfumarat und Teriflunomid zählen. Bei hochaktiven Verlaufsformen und Persistenz einer hohen Schubrate stehen Alemtuzumab, Fingolimod und Natalizumab als erste Wahl und Mitoxantron als zweite Wahl zur Eskalationstherapie zur Verfügung (siehe Abbildung 1). Als erstes und einziges in Europa für den primär progredienten Verlauf zugelassene Medikament wurde Anfang 2018 Ocrelizumab zugelassen.

Indikation	CIS <sup>1</sup>		RRMS <sup>1</sup>			SPMS <sup>1</sup>		PPMS
Verlaufsmodifizierende Therapie	(Hoch-) aktive Verlaufsform		<b>1. Wahl</b> - Alemtuzumab - Fingolimod - Natalizumab - Ocrelizumab	<b>2. Wahl</b> - Mitoxantron (- Cyclophosphamid) <sup>4</sup>	<b>3. Wahl</b> - Experimentelle Verfahren	mit aufgesetzten Schüben - Ocrelizumab	ohne aufgesetzte Schübe - Mitoxantron (- Cyclophosphamid) <sup>4</sup>	- Ocrelizumab
	Milde/moderate Verlaufsform	- Glatirameracetat - Interferon- $\beta$ 1a im - Interferon- $\beta$ 1a sc - Interferon- $\beta$ 1b sc	- Dimethylfumarat - Glatirameracetat - Interferon- $\beta$ 1a im - Interferon- $\beta$ 1a sc - Interferon- $\beta$ 1b sc - PEG- IFN- $\beta$ 1a sc - Teriflunomid (- Azathioprin) <sup>2</sup> (- IVIg) <sup>3</sup>			- Interferon- $\beta$ 1a sc - Interferon- $\beta$ 1b sc - Mitoxantron (- Cyclophosphamid) <sup>4</sup>		
Schubtherapie	<b>2. Wahl</b> - Plasmaseparation							
	<b>1. Wahl</b> - Methylprednisolonpuls							

Bei Versagen einer verlaufsmodifizierenden Therapie bei milder/moderater Verlaufsform einer MS werden diese Patienten wie eine aktive MS behandelt.

<sup>1</sup> Substanzen in alphabetischer Reihenfolge; die hier gewählte Darstellung impliziert KEINE Überlegenheit einer Substanz gegenüber einer anderen innerhalb einer Indikationsgruppe (dargestellt innerhalb eines Kastens)

<sup>2</sup> zugelassen wenn Interferon- $\beta$  nicht möglich oder unter Azathioprin-Therapie stabiler Verlauf erreicht

<sup>3</sup> Einsatz nur *postpartal* im Einzelfall gerechtfertigt, insbesondere vor dem Hintergrund fehlender Behandlungsalternativen

<sup>4</sup> zugelassen für bedrohlich verlaufende Autoimmunkrankheiten, somit lediglich nur für fulminante Fälle als Ausweichtherapie vorzusehen, idealerweise nur an ausgewiesenen MS-Zentren

Abbildung 1: Stufenschema zur Behandlung der Multiplen Sklerose aus den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie angepasst an die aktuell vorhandenen Therapieoptionen

Interferon- $\beta$  1b war das erste Medikament, das einen deutlichen Effekt auf die Schubrate zeigte (MSSG, 1993) und mit Glatirameracetat zusammen revolutionierten die Interferone vor über 20 Jahren

die MS Therapie. Der Vorteil ist deshalb heute, dass langjährige Erfahrungen in der Anwendung gesammelt wurden und das Nebenwirkungsprofil bekannt ist. Der Nachteil ist, dass nicht alle Patienten auf die Therapie reagieren und der Effekt oft eher moderat ist (CARRITHERS, 2014). Des Weiteren lässt die Wirkung aller IFN- $\beta$ -Präparate durch die Bildung neutralisierender Antikörper mit der Zeit nach (SORENSEN et al., 2003).  $\beta$ -Interferone und Glatirameracetat wirken vorwiegend über eine Suppression der Immunantwort durch die Modulation der T-Lymphozytendifferenzierung und -funktion (KASPER, REDER, 2014), (ARNON, AHARONI, 2004). Wie aus dem Schema ersichtlich sind Interferone hauptsächlich für die frühzeitige Therapie des klinisch isolierten Syndroms (KIS) und den schubförmig remittierenden Verlauf zugelassen. Beim sekundär progredienten Verlauf zeigen IFN- $\beta$ 1b und IFN- $\beta$ 1a nur dann noch eine Wirkung wenn weiterhin überlagernde Schübe auftreten (KAPPOS et al., 2004). Als Nebenwirkung treten bei den Interferonen häufig grippeähnliche Symptome auf, hin und wieder lokale Reizungen an der Einstichstelle, da sie subkutan oder intramuskulär injiziert werden, sowie selten Veränderungen des Blutbildes (WALTHER, HOHLFELD, 1999). Das PEG-Interferon- $\beta$ 1a bietet bei ähnlich guter Wirksamkeit den Vorteil, dass es nur noch alle 2 Wochen injiziert werden muss, da durch die Konjugation mit Polyethylenglycol eine deutlich höhere Halbwertszeit erreicht wird (WHITE et al., 2016). Glatirameracetat ist nur für das KIS und die schubförmig-remittierende MS (RRMS) zugelassen und zeigt häufig milde Nebenwirkungen wie eine lokale Entzündungsreaktion an der Einstichstelle und eine systemische Flushsymptomatik unmittelbar nach der Injektion. Andere Nebenwirkungen wie Infektionen oder eine Lymphadenopathie sind selten (HOHLFELD, 1999), (WINDHAGEN et al., 2001).

Dimethylfumarat kam 2013 als MS-Medikament auf den Markt, nachdem es bereits lange Zeit bei der Psoriasis zum Einsatz kam. Es bietet den entscheidenden Vorteil einer oralen Einnahme. Der Effekt entsteht über die Suppression aktivierter T-Lymphozyten und die Induktion einer antiinflammatorischen Tendenz in dendritischen Zellen (FOX et al., 2012). Nebenwirkungen schließen Flushing, gastrointestinale Symptome, Infektionen der oberen Atemwege und Erythema ein; ernsthafte Nebenwirkungen wurden beim Einsatz in der MS-Therapie bisher nicht beobachtet (GHORESCHI et al., 2011).

Teriflunomid, ebenfalls seit 2013 zur Basistherapie des schubförmig-remittierenden Verlaufs zugelassen, wirkt vermutlich über die reversible Hemmung der Pyrimidinsynthese und verhindert damit die Proliferation und Zytokinsekretion in Immunzellen (CHERWINSKI et al., 1995). Milde Infektionen, gastrointestinale Beschwerden, Hypästhesien, Kopfschmerzen und ein Anstieg der Transaminase zählen zu den häufigen Nebenwirkungen (CONFAVREUX et al., 2012).

Natalizumab ist ein monoklonaler Antikörper, der die Einwanderung von Monozyten und Lymphozyten über die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS einschränkt. Dies wird durch eine Blockade von alpha-4-Integrinen erreicht, welche bei der Adhäsion der Immunzellen an die Endothelzellschicht der Blut-Hirn-Schranke eine wichtige Rolle spielen (RICE et al., 2005). Obwohl es sehr gut wirksam ist und die Lebensqualität der Patient verbessert, muss Natalizumab mit Vorsicht angewendet werden,

da es mit der lebensbedrohlichen progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML) assoziiert ist. Ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer PML besteht bei Nachweis eines erhöhten Anti-JC Virustiters im Blut und bei einer prolongierten Anwendung von über zwei Jahren. Die Erkrankung ist in 20 Prozent der Fälle letal (CARRITHERS, 2014).

Der zweite zur MS-Eskalationstherapie zugelassene monoklonale Antikörper, Alemtuzumab, wirkt über eine Modulierung des CD52 Moleküls auf Mono- und Lymphozyten, was zu einer Lyse aller CD52 positiven Zellen führt. Auch dieses Medikament verspricht eine deutliche Reduktion der Schubrate. Allerdings zeigten Studien auch hier schwerwiegende Nebenwirkungen, zumeist ausgelöst durch die Immunsuppression und sekundäre Autoimmunität, wie die Graves Krankheit, das Goodpasture Syndrom, Neoplasien und opportunistische Infektionen (COLES et al., 2012).

Ocrelizumab, ein rekombinanter humanisierter Anti-CD20-Antikörper, wirkt über den Abbau der zirkulierenden reifen und unreifen B-Zellen unter Aussparung der CD20-negativen Plasmazellen. Anti-CD20-Antikörper entwickeln ihre Wirkung über eine komplementabhängige Zytotoxizität und eine antikörperabhängige zelluläre Toxizität (MULERO et al., 2018). Zusätzlich zu den B-Zellen wirkt Ocrelizumab laut einer aktuellen Studie auch auf CD20-positive T-Zellen (GINGELE et al., 2018).

Weitere monoklonale Antikörper wie Ofatumumab und Ublituximab befinden sich noch in der Testphase (MULERO et al., 2018).

Fingolimod bindet an den Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor und verhindert damit den Austritt von Lymphozyten aus den sekundär lymphatischen Organen (CHIBA et al., 2011). Mehrere Studien zeigten eine sehr gute Wirksamkeit der Substanz und sogar eine Überlegenheit gegenüber IFN- $\beta$ . Jedoch traten auch bei Fingolimod ernsthafte Nebenwirkungen auf, weshalb das Medikament nur zur Eskalationstherapie bei schweren Verläufen zugelassen wurde. Ungewünschte Begleiterscheinungen waren unter anderem Herpes Zoster Infektionen, Neoplasien und vor allem kardiale Nebenwirkungen wie Bradykardie und AV-Blöcke (CALABRESI et al., 2014). Sogar eine Asystolie und der plötzliche Herztod wurden mit Fingolimod assoziiert (ESPINOSA, BERGER, 2011), (LINDSEY et al., 2012).

Mitoxantron ist ein Topoisomerase-II-Inhibitor, der DNA-Strangbrüche hervorruft, die DNA-Reparation behindert und die Anzahl der T-Lymphozyten reduziert. Es wird auch in der Chemotherapie von Malignomen angewandt und hat eine erhebliche Menge an ernsthaften Nebenwirkungen, wie die Erhöhung des Malignomrisikos und Kardiotoxizität. Bei der MS-Behandlung ist es in der Eskalationstherapie zugelassen, allerdings erst nach Versagen der anderen Eskalationstherapeutika (Natalizumab, Alemtuzumab, Fingolimod und Ocrelizumab). Außerdem ist es als einziges Medikament beim sekundär progredienten Verlauf ohne Schubauflagerung wirksam und wird hier, aus Mangel an Alternativen, trotz der Gefahr massiver Nebenwirkungen angewendet (HAGHIKIA et al., 2013).

Einen weiteren, derzeit noch in der Forschung befindlichen, therapeutischen Ansatz stellt die Reduktion von oxidativem Stress dar, welcher mit der Pathogenese autoimmuner Erkrankungen wie der MS in Verbindung gebracht wird. Beispielsweise konnte für die Anwendung von Liponsäure eine Reduktion von oxidativem Stress und eine Erhöhung der Aktivität antioxidativer Enzyme gezeigt werden (WASLO et al., 2019).

Zusammenfassend bestehen demnach zwar verschiedene Möglichkeiten, die Symptomatik zu verbessern und den Krankheitsverlauf zu verlangsamen. Aber diese Medikamente sind entweder nur begrenzt wirksam oder sie haben eine nicht unerhebliche Menge an ernststen Nebenwirkungen, welche die dauerhafte Anwendung in vielen Fällen verhindern. Des Weiteren kann es hinsichtlich der unterschiedlichen Entstehungsmechanismen und der großen Variabilität der Multiplen Sklerose von großer Bedeutung für den einzelnen Patienten sein, eine für seine individuelle Ausprägung passende Therapie anzuwenden. Bisher greifen alle zugelassenen Therapeutika an der Immunpathogenese an, die neurodegenerative Komponente des Krankheitsgeschehens ist noch unbehandelt (DE JAGER, HAFLER, 2007). Auch muss gesagt werden, dass es bis jetzt keine wirksame Therapie des sekundär progredienten Verlaufs gibt und zurzeit noch keine Substanzen zur Verfügung stehen, die das Krankheitsgeschehen komplett stoppen können.

Aus diesen genannten Gründen ist es von höchster Wichtigkeit, neue Therapiealternativen für Patienten mit Multipler Sklerose zu finden.

### **3.4 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)**

Viele bedeutende Erkenntnisse über Pathogenese, Diagnostik und Therapie der Multiplen Sklerose wurden aus ihrem wichtigsten Tiermodell gewonnen, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis. Unter anderem führte die EAE-Forschung direkt zu der Entwicklung dreier wichtiger MS-Medikamente: Glatirameracetat, Mitoxantron und Natalizumab (DENIC et al., 2011). Die Ursprünge dieses Modells liegen im Jahr 1885, als Louis Pasteur eine Impfung gegen Tollwut einführte, bei der die Erreger aus dem Rückenmark infizierter Kaninchen gewonnen wurden. Nach mehreren Jahren erfolgreicher Anwendung der Impfung traten vermehrt Fälle einer aufsteigenden Paralyse auf, als Folge einer Enzephalomyelitis. Histologisch zeigte sich um Blutgefäße eine Demyelinisierung mit lymphozytären Infiltraten. Nachdem hirnspezifische Antikörper nachgewiesen wurden, brachte man die Entzündung mit einer spezifischen Immunantwort in Verbindung. Diese Beobachtung wurde 1935 in das erste EAE-Modell in Primaten umgesetzt. Seither wurde die EAE in verschiedenen weiteren Spezies etabliert und modifiziert. Ihr Verlauf ist variabel, abhängig von immunisierter Tierart und verwendetem Antigen. (Zusammengefasst in (BAXTER, 2007))

Heute werden die meisten Versuche mit Mäusen durchgeführt und die beiden verbreitetsten Formen der EAE sind die aktive EAE und die adoptive transfer EAE (AT-EAE). Die aktive Immunisierung erfolgt über die subkutane Injektion einer Emulsion aus einem hirnspezifischen Protein, wie Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), Myelin Basisches Protein (MBP) oder Proteolipid Protein (PLP) und komplettem Freund-Adjuvans, bestehend aus Paraffinöl und Mykobakterium tuberculosis. Zusätzlich erfolgt bei der aktiven EAE eine intraperitoneale Injektion von Pertussistoxin. Bei der Transfer-EAE werden naiven Tieren Myelin-reaktive CD4-positive Th1-Lymphozyten injiziert (MIX et al., 2008).

Die Folge der aktiven Immunisierung von C57Bl6-Mäusen mit MOG ist eine Autoimmunreaktion die derjenigen der MS ähnelt. Der erste Schritt ist hierbei die T-Zellprägung und -aktivierung im peripheren Blut und darauf folgt die Rekrutierung ins ZNS mit anschließender Effektorphase (BECHER et al., 2006). Die Folgen sind, wie bei der MS, die Zerstörung der Myelinschicht mit einer relativen Verschonung der Axone und Nervenzellen, die Entwicklung multipler Läsionen, die vor allem perivaskulär in Rückenmark und Hirnstamm zu finden sind und der Nachweis von Immunglobulinen im Liquor (ADAMS, KUBIK, 1952).

### **3.5 Sphingolipide**

Zellmembranen im ZNS bestehen, wie alle eukaryoten Zellmembranen aus einer Phospholipiddoppelschicht. Eine wichtige Untergruppe der Phospholipide sind die Sphingolipide, welche vorwiegend im äußeren Blatt der Membran zu finden sind und abhängig von ihrer Zusammensetzung in drei Gruppen unterteilt werden können: Die erste Gruppe umfasst Ceramid und andere Sphingoide, die zweite Gruppe sind die Phosphosphingolipide, vor allem Sphingomyelin und Sphingosin-1-Phosphat und die dritte Gruppe bilden die Glykosphingolipide (PODBIELSKA et al., 2012). In den letzten Jahren haben viele Studien gezeigt, dass Sphingolipide zusätzlich zu ihrer Strukturfunktion auch maßgeblich an der Signaltransduktion wichtiger Zellprozesse wie Apoptose, Differenzierung und Proliferation beteiligt sind (HANNUN, OBEID, 2008). Hierbei spielen vor allem Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Ceramid eine entscheidende Rolle. Sie sind an vielen physiologischen und pathologischen Abläufen beteiligt, so auch an der Pathogenese der Multiplen Sklerose (ZHENG et al., 2006), (JANA, PAHAN, 2007).

Ceramid entsteht durch Hydrolyse aus Sphingomyelin, dem in Membranen am häufigsten vorkommenden Sphingolipid. Dieses besteht aus einem hydrophoben Ceramidrest und einer hydrophilen Phosphorylcholin Kopfgruppe. Die Spaltung von Sphingomyelin in Ceramid und Phosphorylcholin wird durch Sphingomyelinasen katalysiert, einer Gruppe von Enzymen, die je nach

ihrem pH-Optimum als saure, neutrale und alkalische Sphingomyelinase bezeichnet werden. Die saure Sphingomyelinase (ASM) befindet sich im Lysosom und wird bei Aktivierung in das äußere Zellblatt verlagert (GATT, 1963), (FOWLER, 1969). Die Bedeutung der sauren Sphingomyelinase wurde erstmals in Zusammenhang mit der Erforschung der Niemann-Pick Krankheit Typ A und B erkannt (BRADY et al., 1966). Bei dieser Erkrankung kommt es aufgrund eines genetischen Defektes der sauren Sphingomyelinase in vielen Organen zu Anomalien, unter anderem durch eine Anreicherung von Sphingomyelin (SCHUCHMAN, WASSERSTEIN, 2015). Zusätzlich zu der Ceramidproduktion durch die saure Sphingomyelinase, welches den Hauptmechanismus darstellt, kann das Ceramidlevel außerdem durch De-Novo-Synthese, Umwandlung in komplexe Sphingolipide, Phosphorylierung durch die Ceramidkinase oder Hydrolyisierung durch die Ceramidase reguliert werden. Bei der zuletzt genannten Reaktion entsteht Sphingosin, welches über Anhängen eines Phosphatrestes durch das Enzym Sphingosinkinase zu Sphingosin-1-Phosphat (S1P) umgewandelt werden kann (BARTKE, HANNUN, 2009).

Sphingolipide interagieren in der äußeren Zellmembran über hydrophile Verbindungen miteinander und trennen sich aufgrund ihres höheren Schmelzpunktes von den anderen Phospholipiden. Mit Hilfe von Cholesterol, ebenfalls einem wichtigen Bestandteil der Membran, verbinden sie sich zu sphingolipid- und cholesterolreichen Mikrodomänen, welche aufgrund ihrer schwimmenden Eigenschaft innerhalb der Membran als Rafts bezeichnet werden (engl. raft = Floß) (SIMONS, IKONEN, 1997), (HARDER, SIMONS, 1997). Wird nun innerhalb dieser sphingolipidreichen Mikrodomänen durch die saure Sphingomyelinase Ceramid freigesetzt, führt dies durch eine spontane Verbindung der Ceramidmoleküle zur Bildung ceramidreicher Mikrodomänen, welche spontan zu großen, ceramidreichen Makrodomänen, oder Plattformen verschmelzen können (HOLOPAINEN et al., 1998),(KOLESNICK et al., 2000).

Diese Plattformen dienen der Reorganisation und Anhäufung von Rezeptormolekülen, was eine hohe Dichte an Rezeptoren zur Folge hat. Die Bildung von Ceramid dient demnach der vereinfachten und verstärkten Weiterleitung von bestimmten Signalen. Der Mechanismus der Rezeptorclusterbildung durch die Aktivierung des sauren Sphingomyelinase - Ceramid - Systems wurde vor allem für Apoptose fördernde Stimuli gezeigt wie TNF-alpha, Il-1beta, Fas-Ligand, Chemotherapeutika, Glukokortikoide, Antikörper Cross-Linking, Hitze-Schock-Proteine, ionisierende und ultraviolette Strahlung sowie virale oder bakterielle Infektionen. Aber auch die Stimulation weiterer Rezeptoren wie CD28, CD40, CD14, CD5 oder des Adhäsionsmoleküls LFA-1 triggert die Freisetzung von Ceramid (GULBINS, LI, 2006).

### 3.5.1 Bedeutung des ASM/Ceramid Signalwegs für die MS

In den letzten Jahren haben viele Studien mehr und mehr Erkenntnisse über die wichtige Rolle von Sphingolipiden bei der Pathogenese der Multiplen Sklerose geliefert. Sie sind auf sehr unterschiedliche Arten in großem Maße an der Entstehung der Erkrankung aber auch an regenerativen und regulierenden Mechanismen beteiligt (JANA, PAHAN, 2010), (HALMER et al., 2014). Bis jetzt ist jedoch erst ein wichtiges Medikament als Produkt dieser komplexen Forschungsanstrengung hervorgegangen: Fingolimod/FTY720, ein Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-Modulator, welcher den Lymphozytenaustritt aus sekundär lymphatischen Organen hemmt (CHIBA et al., 2011).

Im Folgenden soll auf die Aspekte des Pathomechanismus der MS eingegangen werden, die durch den ASM/Ceramid Signalweg und die Bildung von ceramidreichen Membranplattformen beeinflusst werden.

Eine wichtige Rolle spielen Lipid Rafts zum Ersten bei der T-Zell Aktivierung (LUO et al., 2008). Hierbei reicht der alleinige Kontakt des T-Zell Rezeptors (TCR) mit dem, auf den Major Histokompatibilitätskomplexen (MHC) I oder II der antigenpräsentierenden Zelle (APC) präsentierten, Antigen nicht aus, sondern es sind zusätzliche kostimulierende Faktoren nötig, um die T-Zelle komplett zu aktivieren. CD28 und CD40 vermitteln beispielsweise solche kostimulierenden Signale. Der CD28 Rezeptor auf T-Zellen interagiert mit seinem Bindungspartner, B7, einem Membranmolekül auf APCs (JUNE et al., 1994). Es konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation von ruhenden oder voraktivierten T-Zellen mit anti-CD28 Antikörpern zu einer Aktivierung der sauren Sphingomyelinase und damit zur Generation von Ceramid führt (BOUCHER et al., 1995). CD40 ist ein Rezeptormolekül, welches von B-Lymphozyten exprimiert wird. Bei Kontakt mit dem entsprechenden, auf T-Lymphozyten befindlichen, Liganden CD40L kommt es zur B-Zell Aktivierung und durch Antigenstimulation zum Ig-Klassenwechsel der B-Zelle. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Lymphozyten über den CD40 Rezeptor zu einer p53-abhängigen Aktivierung der sauren Sphingomyelinase führt, wobei diese von intrazellulär an die Zelloberfläche wandert, wo es zur Bildung ceramidreicher Rafts kommt. Ein genetisch bedingtes Fehlen der sauren Sphingomyelinase, die Neutralisierung von Ceramid sowie die Zerstörung von Sphingolipid-Rafts verhindern ein CD40 Clustering und die darauffolgenden Signalwege (GRASSME et al., 2002a), (GRASSME et al., 2002b).

Der CD95- oder Fas-Rezeptor gehört zu den TNF-Rezeptoren und gibt, bei Bindung des Fas-Liganden (FasL) oder eines Agonisten, ein apoptotisches Signal an die Zelle. Dies führt über eine proteolytische Kaskade, die eine Auflösung der Zellmembran, Zellkernkondensation und DNA-Fragmentierung zur Folge hat, zum Zelltod (NAGATA, GOLSTEIN, 1995). In chronischen Läsionen im ZNS-Gewebe MS-erkrankter Patienten konnte eine erhöhte Expression des Fas-Moleküls auf Oligodendrozyten ausgemacht werden, was eine Beteiligung des Fas-FasL-Systems an der, bei der MS beobachteten, Apoptose der Oligodendrozyten nahelegt (D'SOUZA et al., 1996). Auch Studien am EAE-Model

belegen diese These. Mäuse, die CD95 aufgrund einer genetischen Defizienz nicht exprimieren sind teilweise resistent gegen die Induktion einer EAE und bei Mäusen mit einer Mutation von FasL kommt es zu einer deutlich verminderten Ausprägung der Erkrankung und zu einer geringeren Demyelinisierung (DITTEL, 2000), (SABELKO-DOWNES et al., 1999). Die Bindung am CD95-Rezeptor erhöht die katalytische Aktivität der sauren Sphingomyelinase und hat eine Translokation des Enzyms in die äußere Zellmembran zur Folge (CIFONE et al., 1994), (GULBINS et al., 1995). Hier führt die CD95 getriggerte Aktivierung der ASM wiederum zur Freisetzung von Ceramid und zu einem CD95-Clustering innerhalb sphingolipidreicher Membran Rafts. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine ASM-Defizienz, die Zerstörung der Rafts und die Neutralisierung von Ceramid ein CD95 Clustering und den Zelltod verhindern können. (GRASSME et al., 2001).

Lymphocyte function associated protein (LFA)-1 ist ein wichtiges Molekül auf der Oberfläche enzephalogener T-Lymphozyten. Es interagiert mit ICAM-1 auf Endothelzellen und spielt eine entscheidende Rolle bei der Transmigration der T-Zellen über die Blut-Hirn-Schranke (LASCHINGER et al., 2002). Die Stimulation von LFA-1 durch ICAM-1 führt zu einer erhöhten Aktivität der sauren Sphingomyelinase (NI et al., 1999).

Für Ceramid wurde weiterhin gezeigt, dass es eine vermehrte Exozytose von Weibel Palade Körperchen triggert, welche von Willebrandt Faktor (vWF) und P-Selektin beinhalten. Diese beiden Moleküle induzieren das T-Zell-"Rolling", einen wichtigen Schritt der T-Lymphozyten Adhäsion an die Endothelzellschicht (BHATIA et al., 2004), (ENGELHARDT, RANSOHOFF, 2012).

Studien an Mäusen mit einem genetisch hervorgerufenen Mangel an ASM ergaben einen fast vollständigen Schutz der Tiere vor den klinischen Symptomen der EAE und entzündlichen Infiltraten im ZNS. In diesen ASM-defizienten Tieren blieb die Integrität der Blut-Hirn-Schranke unter Initiierung einer EAE erhalten und die Hirnendothelschicht exprimierte eine verminderte Anzahl der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 (BECKER et al., 2017).

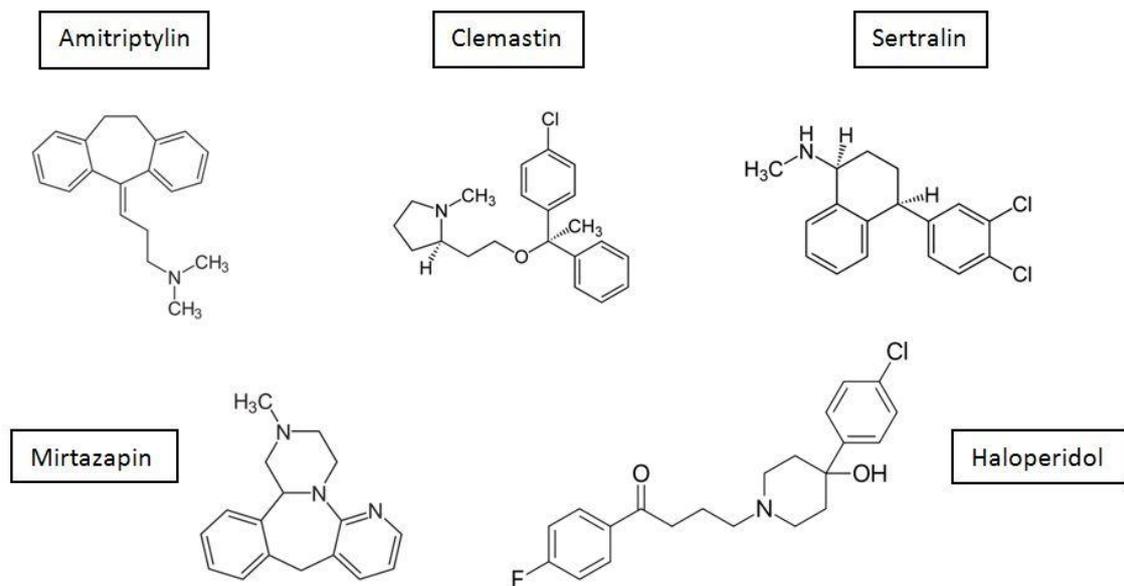
Zusammenfassend legen diese Erkenntnisse nahe, dass die saure Sphingomyelinase entscheidend an vielen Schritten des Pathomechanismus von MS und EAE wie der Aktivierung der T-Lymphozyten, deren Adhäsion an die Endothelzellschicht der Blut-Hirn-Schranke mit darauffolgender Transmigration ins ZNS, der Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke sowie dem Oligodendrozytenuntergang beteiligt ist.

### **3.5.2 Funktionelle Hemmstoffe der Sauren Sphingomyelinase**

Die in diesem Experiment verwendeten Hemmstoffe der sauren Sphingomyelinase gehören zu einer Gruppe von Medikamenten, die als FIASMA bezeichnet werden (engl. Functional Inhibitors of Acid

Sphingomyelinase) (KORNHUBER et al., 2010). Diese Substanzen sind schwache organische Basen und führen, möglicherweise durch eine Änderung des pH-Wertes, zu einem Auslösen der ASM aus der Lipidschicht der Zellmembran, was sie zugänglich für Proteasen macht (KOLZER et al., 2004). FIASMAs inhibieren die ASM also nicht direkt sondern wirken, wie der Name sagt, indirekt, als funktionelle Inhibitoren. Zur Anwendung kommen in dieser Arbeit Medikamente, welche bereits lange Jahre im klinischen Gebrauch sind: das trizyklische Antidepressivum Amitriptylin, die selektiven Serotonin-Reuptake-Inhibitoren (SSRI) Sertralin und Fluoxetin und das Antihistaminikum Clemastin.

Haloperidol, ein Neuroleptikum und Mirtazapin, ein tetrazyklisches Antidepressivum ähneln den FIASMAs im Strukturaufbau (Abbildung 2), hemmen die saure Sphingomyelinase aber nicht (KORNHUBER et al., 2008). Sie dienen bei den Adhäsionsassays als Nachweis, dass nicht die doppelte Ringstruktur für die verminderte Anhaftung verantwortlich ist.



**Abbildung 2:** Strukturformeln der FIASMAs Amitriptylin, Sertralin und Clemastin und der Substanzen Mirtazapin und Haloperidol, welche die ASM nicht hemmen

### 3.6 Ziel dieser Arbeit

Basierend auf fundierten Hinweisen auf eine entscheidende Beteiligung der sauren Sphingomyelinase an der Adhäsion autoreaktiver T-Lymphozyten an die Blut-Hirn-Schranke und an mehreren weiteren Schritten im Pathomechanismus der Multiplen Sklerose und deren Tiermodell, der EAE, sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Reduzieren Amitriptylin, Sertralin, Fluoxetin und Clemastin als funktionelle Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase (FIASMs) im *in vitro* Adhäsionsassay die Anhaftung von T-Lymphozyten, gewonnen aus EAE-immunisierten Mäusen, an einer Hirnendothelschicht? Zeigt sich insbesondere ein Unterschied zu Nicht-FIASMs wie Mirtazapin und Haloperidol mit ähnlicher, ringförmiger Strukturformel?
2. In wieweit sind die oben genannten FIASMs bei der vorbeugenden *in vivo* Anwendung an Mäusen in der Lage, den klinischen Verlauf der EAE abzuschwächen und zeigt sich hierbei histologisch eine Verminderung der entzündlichen Infiltrate in Hirn- und Rückenmark der Tiere?
3. Hat auch ein Therapiebeginn mit Sertralin und Amitriptylin ab Einsetzen der ersten Symptome der Tiere noch eine Auswirkung auf den Verlauf der EAE und auf Anzahl und Größe der entzündlichen Infiltrate?

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Geräte

Bezeichnung	Bezugsquelle
Accu-Jet Pipettierhelfer	BrandTech Scientific Essex, USA
Autoklav 3870 ELV	Systemec Wettenberg, Deutschland
Axiovert 25 Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy Jena, Deutschland
Trockenschrank	Heraeus Hanau, Deutschland
Einkanalpipetten 2µl-20µl, 10µl-100µl, 100µl-1000µl	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Eismaschine	Eurfrigor Ice Makers Srl Lainate, Italien
Fixed-angle rotor for Optima MAX series ultracentrifuge MLA-130, TLA-100.3, TLA-100	Beckman Coulter Fullerton, USA
Fluoreszenzmikroskop Eclipse E600	Nikon Alzenau, Deutschland
General Rotator, STR4	Stuart Scientific Staffordshire, Großbritannien
Gefrierschrank BOSCH (-24°C)	BOSCH Deutschland
HERAcell CO <sub>2</sub> Inkubator	Heraeus Hanau, Deutschland
HERAsafe HS 12, mikrobiologische Sicherheitswerkbank Klasse	Heraeus Hanau, Deutschland
Kühlschrank comfort (4°C)	Liebherr Ochsenhausen, Deutschland
Kryostat CM3050 S	Leica Nussloch, Deutschland

Laborator Zentrifuge 4K15C	Sigma Laborzentrifugen GmbH Osterode am Harz, Deutschland
Mikroskop Zeiss Axio Scope	Carl Zeiss Göttingen, Deutschland
MLA-130 Rotor, Fixed Angle, Titanium for Ultracentrifuge	Beckman Coulter Brea, USA
Pipette PIPETMAN P2, P20, P200, P1000	Gilson Villiers le Bel, Frankreich
Präzisionswaage 770	Sohn & Kern Balingen, Deutschland
Präzisionswaage CP 4202 S	Sartorius Göttingen, Deutschland
pH-Meter InoLab pH 720	WTW Weilheim, Deutschland
PURELAB Ultra Reinstwasseranlage	ELGA Celle, Deutschland
Sterilbank KOJAIR	Thermo Scientific Langenselbold, Deutschland
Thermomixer Comfort	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Tiefkühlschrank Sanyo Ultra low temperature - 86°C	Sanyo Electric Biomedical & Co. Wood Dale, IL, USA
Ultraschallstab Sonopuls HD2070	Bandelin Electronic Berlin, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries Bohemia, USA
Wipptisch 3013	GFL Deutschland
Zentrifuge Eppendorf 5415K	Eppendorf Hamburg, Deutschland

#### 4.1.2 Gebrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Base Molds, Einbettkästchen für Kryo	Richard-Allan Scientific Kalamazoo, Mi, USA
Serologische Pipetten, 5ml, 10ml, 25ml	Starstedt Nümbrecht, Deutschland
BD Plastipak Spritze, 1ml	BD Bioscience Heidelberg, Deutschland
Chamber slides, 16 well mit Deckel	Thermo Scientific Rochester, NY
Chirurgische Skalpellklingen, steril	B. Braun Tuttlingen, Germany
Combitips (plus) 5ml, 10ml, 12.5ml	Eppendorf Hamburg, Germany
Cryopure Gefäß 1,8 ml	Sarstedt Nümbrecht, Germany
Dako pen	Dako Glostrup, Dänemark
Deckgläschen 24x24mm	R. Langenbrinck Emmerdingen, Deutschland
Falcons 15ml, 50ml	Sarstedt Nümbrecht, Deutschland
Flaschenaufsatzfilter 500ml, 0.22mm	Sarstedt Nümbrecht, Germany
Glashomogenisierer mit Kolben, (Glaspotter)	A.Hartenstein GmbH Würzburg, Germany
Glasware für Labor	Schott Mainz, Germany VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland
Kanülen 20G, 23G, 26G, 27G	BD & Co. Franklin Lakes, USA
Kombinationskappe	Fresenius Kabi AG Homburg, Germany
Kryoeinfrierbehälter, Nalgene, "Mr Frosty"	A. Hartenstein GmbH Würzburg, Deutschland

Kryotomklingen Typ C35	Pfm Medical Ag Köln; Deutschland
Luerlock Spritzen 1 ml	Becton and Dickson Heidelberg, Deutschland
Multiwell Zellkulturplatten, 24well, 48well, 96well	Falcon, Becton Dickinson Heidelberg, Deutschland
Neubauer Kammer	A.Hartenstein GmbH Würzburg, Germany
Objektträger 76 x 26mm	R. Langenbrinck Emmendingen, Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging Chicago, USA
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt Nümbrecht, Germany
Präparierbesteck	VWR Darmstadt; Deutschland
Safe-Lock Micro Test Tube 0,5 ml, 1,5 ml, 2.0 ml	Sarstedt Nümbrecht, Germany
Serologische Pipetten, 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt Nümbrecht, Deutschland
Sterile Insulinspritze 1ml	Becton, Dickinson and Company Heidelberg, Germany
Spritzen, 2ml, 5ml, 10ml, 20ml	B Braun Tuttlingen, Germany
Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup>	BD Heidelberg, Deutschland
Zellsieb, 70µm	BD Biosciences San Jose, USA

#### 4.1.3 Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
2-Methylbutan	Sigma Schnelldorf, Deutschland
Aceton	SAV LP GmbH Flintsbach, Deutschland

Amino-ethylcarbazol (AEC) Tabletten	Sigma-Aldrich Chemie Steinheim, Deutschland
Amitriptyline hydrochloride	Sigma Schnelldorf, Deutschland
Antibiotikum Antimykotikum (Anti-Anti, 100x)	Gibco, Life Technologies USA
Aquatex	Merck Darmstadt, Deutschland
Casein	Serva Feinbiochemie Darmstadt, Deutschland
Clemastine fumarate	Chemos GmbH Regenstauf, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (High Glucose) + Glutamax	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
EDTA – Trypsin 0,5%	Sigma Schnelldorf, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth GmbH und Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 100%	Sigma-Aldrich Chemie Steinheim, Deutschland
Evans Blue dye	Sigma-Aldrich Chemie Steinheim, Deutschland
Fetal calf serum (FCS)	Invitrogen Darmstadt, Deutschland
Fibronectin 50µg/ml	Roche Deutschland Holding GmbH Mannheim, Deutschland
Flüssigstickstoff	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH Düsseldorf, Deutschland
Fluoxetine	Santa Cruz Biotechnology Dallas, Texas, USA
FTY720-P	Biomol Hamburg, Deutschland
Glutardialdehyd	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
Haloperidol	Sigma

	Schnelldorf, Deutschland
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	Apotheke der Universitätsklinik des Saarlandes
HBSS H1387	Sigma-Aldrich Chemie Steinheim, Deutschland
HEPES	Serva Heidelberg, Deutschland
Inkomplettes Freundsches Adjuvant (IFA)	BD, Bioscience Durham, USA
Immersion – Öl	Carl Zeiss Göttingen, Deutschland
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH Unterschleißheim, Deutschland
Kieselgel	Merck Darmstadt, Deutschland
Mayers Hämalaun Lösung	Merck Darmstadt, Deutschland
Mirtazapin	Sigma Schnelldorf, Deutschland
Mycobacterium tuberculosis H37 Ra	BD Biosciences Durham, USA
Myelin Oligodendrocytic peptide 35-55	Charité Berlin, Deutschland
Natriumacetat	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
N,N-Dimethylformamide	Sigma-Aldrich Chemie Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyde (PFA)	Merck Darmstadt, Deutschland
Pertussis toxin	Alexis Chemicals über Enzo Life Sciences GmbH Lörrach, Deutschland
Salzsäure (HCL) 32%	Über Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes
Sertralin Hydrochlorid	Santa Cruz Biotechnologies Dallas, Texas, USA
Sertralin Hydrochlorid	LKT Laboratories, Incorporation St. Paul, MN, USA

Tissue Tek	A. Hartenstein GmbH Würzburg, Deutschland
Tryptanblau	Sigma-Aldrich Chemie Steinheim, Deutschland
TWEEN 20	Sigma Alderich Steinheim, Deutschland
Zinkchlorid	Sigma-Aldrich Chemie Steinheim, Deutschland

#### 4.1.4 Antikörper und Kits

Kit	Bezugsquelle
Vectastain Elite ABC kit Rat IgG	Vectastain, Linearis Wertheim-Bettingen, Deutschland

Antikörper	Species	Typ	Bezugsquelle
Mouse anti-CD45	Rat	Monoclonal	BD Pharmingen Biosciences Durham, USA
Mouse anti-CD4	Rat	Monoclonal	BD Pharmingen Biosciences Durham, USA
Mouse anti-CD8	Rat	Monoclonal	BD Pharmingen Biosciences Durham, USA
Mouse anti-CD45R (B220)	Rat	Monoclonal	Bd Pharmingen Bioscience Durham, USA
Mouse IgG2 $\alpha$ k	Rat	Monoclonal	IQ products Groningen, Niederlande
Mouse IgG2 $\beta$ k	Rat	Monoclonal	IQ products Groningen, Niederlande

#### 4.1.5 Zelllinie bEnd.3

Organismus	Gewebe	Zelltyp	Antigen-expression	Wachstums-eigenschaften	Bezugsquelle
Mus musculus	Hirn, Kortex	Endotheliom	ICAM-1 VCAM-1 MAdCAM-1	Adhärent	ATCC Wesel, Deutschland

#### 4.1.6 Lösungen

##### AEC - Färbelösung

AEC-Puffer	1,4 ml
AEC stock	100 µl
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,5 µl

##### AEC – Stock:

1 AEC-Tablette gelöst in 2,5 ml Dimethylformamid (DMF)  
Lagerung bei -20°C

##### AEC Puffer

0,1 M Natriumazetat	2,1 ml
0,1 M Essigsäure	7,9 ml

##### bEnd3 Nährmedium

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; High Glucose)	445 ml
FCS (Fetal Calf Serum)	50 ml
Antibiotikum Antimykotikum (100×)	5 ml

##### bEnd.3 Gefriermedium

Nährmedium	9,5 ml
DMSO	0,5 ml

**HBSS-Puffer:**

HBSS	437,5 ml
FCS 10%	50 ml
25mM HEPES IM	12,5 ml

**Herstellung HBSS:**

- 1 Flasche HI387 in 90ml destilliertem Wasser lösen
- 0.35g Natriumbicarbonat hinzufügen
- 900 ml destilliertes Wasser zufüllen
- pH-Wert mit Hilfe von Natronlauge und Salzsäure auf 7,4 einstellen
- auf 1 Liter auffüllen

**MAM Medium**

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; High Glucose)	457 ml
Fetal calf serum	25 ml
Antibiotikum-Antimykotikum (100×)	5 ml
HEPES (1M)	12.5 ml

**PBS**

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 mM

Puffer und Medien wurden mit einem 0,22 µm Flaschenaufsatzfilter filtriert und bei 4°C gelagert.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 bEnd.3 - Zellkultur

Alle Arbeiten mit der Endothelzelllinie bEnd.3 erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Zellen wurden in 25 cm<sup>3</sup>-Zellkulturflaschen mit fünf Milliliter Nährmedium pro Flasche bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Wechsel des Nährmediums und bei dichtem Wachstum wurden die Zellen 1:2 oder 1:3 gesplittet.

#### *Splitting-Prozedur*

Zum Splitten wurde zunächst das alte Medium aus den Flaschen abgesaugt. Daraufhin wurde jede Flasche zehn Minuten bei 37°C mit fünf Milliliter warmem EDTA-Trypsin inkubiert, um die Zellen vom Boden zu lösen. Nach Transfer in einen Falcon wurden das Zell-Medium-Gemisch acht Minuten bei 250 x g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einem Milliliter bEnd.3-Medium resuspendiert und diese Suspension konnte nun für Experimente ausgezählt (s.u.) oder durch Zugabe von neuem Medium auf zwei oder drei frische Zellkulturflaschen verteilt werden.

#### *Einfrieren der Endothelzellen*

Zur langfristigen Lagerung wurde das Zellpellet von zwei bis drei Flaschen in einem Milliliter Gefriermedium resuspendiert und in CryoPure Gefäßen bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierzu mussten die Gefäße vorher über Nacht mit Hilfe eines Kryo-Gefrierbehälters auf -80°C gekühlt werden.

#### *Auftauen der Endothelzellen*

Zum Auftauen wurden die Zellen aus einem Cryo-Pure Gefäß nach zehnmütigem Erwärmen bei 30°C in einem Milliliter Nährmedium resuspendiert, in Falcon Röhrchen übertragen und nach Auffüllen mit der entsprechenden Menge Nährmedium auf frische Zellkulturflaschen verteilt. Der erste Medienwechsel erfolgte erst nach einer mikroskopischen Kontrolle der vollständigen Adhäsion der Zellen am Flaschenboden.

#### *Zellzählung*

Das Zählen von einem Milliliter einer beliebigen Zellsuspension erfolgte durch eine Verdünnung von 10µl der Suspension mit Trypan-Blau zunächst auf 1:10, dann auf 1:100. 10µl dieser Verdünnung wurden in eine Neubauer Zählkammer pipettiert und es wurde der Mittelwert aus allen vier ausgezählten Quadraten gebildet. Durch Multiplikation dieses Wertes mit dem Neubauerfaktor 10<sup>4</sup> und der Verdünnung 100 ergibt sich die Zellzahl in einem Milliliter der Zellsuspension.

#### 4.2.2 Adhäsionsassays

Die Aussaat der bEnd.3 Zellen erfolgte bereits zwei Tage vor Durchführung des Assays. Hierzu wurde unter sterilen Bedingungen zunächst ein 16-Well Chamber Slide mit Fibronectin überzogen, um die Haftung der Endothelzellen zu verbessern. In jedes Well wurden 50µl einer 1:20 mit PBS verdünnten Fibronectinlösung gegeben, woraufhin eine 30- bis 40-minütige Inkubation bei 37°C erfolgte. Nach Absaugen der Lösung, konnte dann in jede Kammer 200µl einer Zelllösung mit 100.000 Zellen pro Milliliter Nährmedium gegeben werden. Bis zum Experiment wurde der Chamber Slide im Brutschrank inkubiert.

Zusätzlich wurden bereits die Verdünnungen der Medikamente angesetzt, welche im Experiment im Verhältnis 1:10 Verwendung fanden. Es wurden 100µM Lösungen aus Amitriptylin, Sertralin, Fluoxetin, Mirtazapin und Clemastin hergestellt und eine 15µM Lösung aus FTY720. Die pulverförmigen Medikamente wurden zunächst je nach Herstellerangaben in destilliertem Wasser (Aqua dest.) oder DMSO gelöst und dann mit DMEM auf die gewünschte Stoffmengenkonzentration verdünnt.

**Tabelle 1: Stoffmengenkonzentration und Lösemittel der eingesetzten Medikamente**

<b>Medikament</b>	<b>Lösemittel</b>	<b>Stoffmengenkonzentration</b>
Amitriptylin	bereits in Lösung	100 µM
Sertralin	DMSO	100 µM
Fluoxetin	DMSO	100 µM
Mirtazapin	bereits in Lösung	100 µM
Clemastin	Aqua dest.	100 µM
FTY720	DMSO	15 µM

Am Tag des Experiments wurde zunächst eine Lymphozyteneinzelzellsuspension (siehe Abschnitt 4.2.3) hergestellt und die darin enthaltenen Zellen gezählt (siehe Abschnitt 4.2.1). Die Lymphozyten wurden daraufhin mit den verschiedenen Medikamenten behandelt.

Hierzu wurden die Zellen 40 Minuten bei 37°C mit dem jeweiligen Medikament inkubiert. Erst nach dieser Inkubationszeit wurden die Lymphozyten 300.000 pro Well auf den zwei Tage zuvor ausgesäten bEnd.3 – Zellrasen gegeben. Es wurden jeweils Duplikate angesetzt (Abbildung 3).

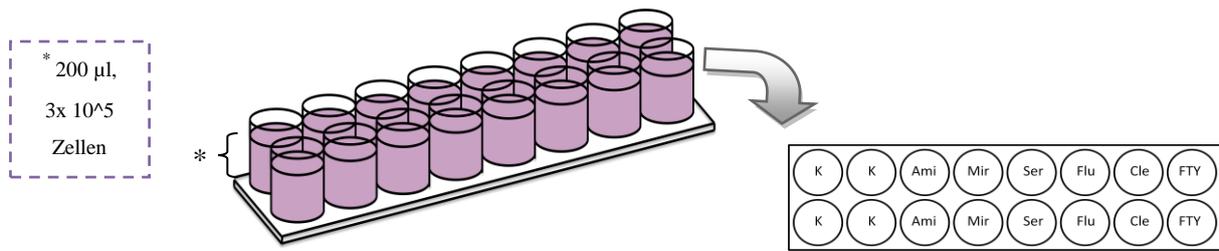


Abbildung 3: Schematische Darstellung des gefüllten Chamberslides und Füllschema der Medikamente, K = Kontrolle, Ami=Amitriptylin, Mir=Mirtazapin, Ser=Sertralin, Flu=Fluoxetin, Cle=Clemastin, FTY=FTY720

Die Anhaftungsreaktion erfolgte für 40 Minuten bei 8°C auf einem Wipptisch. Um eine optimale Anhaftung zu erzielen, musste die Ausrichtung des Slides nach der Hälfte der Zeit um 90° gedreht werden.

Zum Stoppen der Reaktion wurde die Well-Leiste von der Platte des Chamberslides gebrochen (Abbildung 4) und in PBS gedippt, um dann zwei Stunden in 2,5 % Glutaraldehyd fixiert zu werden. Die Platten wurden danach in PBS gelagert und innerhalb von zwei Tagen ausgezählt.

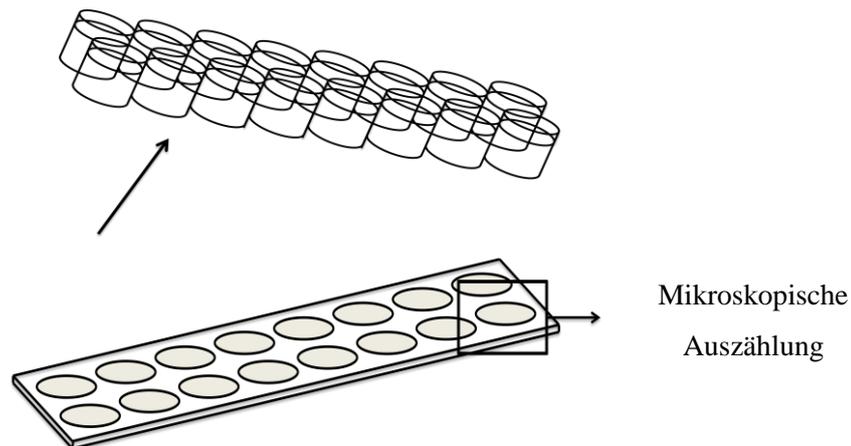


Abbildung 4: Abbruch der Well - Leiste von dem Chamberslide

### Mikroskopische Auswertung

Das Auszählen der Adhäsionsassays erfolgte unter einem Lichtmikroskop mithilfe eines Zählgitters und unter 10-facher Vergrößerung. An fünf Stellen des Wellbodens wurde die Anzahl der anhaftenden Lymphozyten in einer Reihe des Gitters ausgezählt. Bei einer Gesamtgröße des Gitters von einem Quadratmillimeter entsprach die ausgezählte Reihe einer Fläche von 0,1 Quadratmillimeter. Hieraus ergab sich rechnerisch eine durchschnittliche Anzahl anhaftender Lymphozyten pro Quadratmillimeter.

### 4.2.3 Tierexperimentelle Methoden

#### *Versuchstiere*

Es wurden für die Experimente sieben bis neun Wochen alte C57Bl6/J Mäuse der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden in der Tierhaltung der Experimentellen Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes unter speziellen pathogenfreien Bedingungen (SPF) gehalten. Alle Experimente wurden durch das Landesamt für Verbraucherschutz des Saarlandes genehmigt.

#### *Aktive Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis*

Zur Induktion der EAE wurden die Mäuse mit einer Emulsion aus 300µg Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) und kompletten Freudschem Adjuvans (10 mg/ml) im Mengenverhältnis 1:1 immunisiert. Zur Herstellung dieser Emulsion wurden die Substanzen in einer latexfreien Spritze auf Eis gemischt und dann in zwei 30 Sekunden-Zyklen mit einer Intensität von 45% homogenisiert. Dieser Vorgang wurde, nach einer einminütigen Kühlpause auf Eis, jeweils so oft wiederholt, bis eine homogene, weiße Masse entstanden war. Die Emulsion wurde dann bei -20°C eingefroren, um am nächsten Tag erneut nach oben genanntem Schema homogenisiert. Jede Maus erhielt 200 µl der Paste, wobei jeweils 50 µl subkutan in jede der vier axillären und inguinalen Lymphknotenregionen injiziert wurde. An Tag null und zwei nach Immunisierung wurde den Mäusen zur Aktivierung des Endothels 300ng Pertussis Toxin (PTX) intraperitoneal verabreicht. Die immunisierten Mäuse wurden entweder unbehandelt an Tag 14 zur Lymphknotengewinnung für die Adhäsionsassays getötet oder medikamentös behandelt. Bei allen Tieren wurden täglich das Gewicht und der Krankheitsscore anhand der unten stehenden Tabelle bestimmt.

#### **Tabelle 2: Scoringsystem nach Krankheitssymptomen**

0	= gesund
0,5	= Schwanzparese
1	= leichtgradige Parese der Hinterbeine
2	= hochgradige Parese der Hinterbeine
3	= Plegie der Hinterbeine und Inkontinenz
4	= Tetraparese

#### *Medikamentöse Behandlung der immunisierten C57Bl6/J Mäuse*

Die Behandlung der immunisierten Mäuse erfolgte nach zwei verschiedenen Schemata: Das erste stellte eine vorbeugenden Behandlung dar, welche das Ziel hatte, den Ausbruch der Symptome zu verhindern oder abzuschwächen. Hierbei kamen die Medikamente Fluoxetin, Clemastin und Sertralin zur Anwendung. Fluoxetin wurde bereits drei Wochen lang vor der Immunisierung in einer

Konzentration von 30mg/l im Trinkwasser verabreicht, um einen ausreichend hohen Wirkspiegel zu erreichen. Die Medikamente Clemastin (0,5 mg/kg KG) und Sertralin in den Dosierungen 5 und 10 mg/kg KG wurden in 100µl destilliertem Wasser gelöst und mussten alle 12 Stunden intraperitoneal injiziert werden.

Als zweite Variante erfolgte eine Behandlung ab Symptombeginn, das heißt ab dem Tag an dem die einzelne Maus zum ersten Mal einen Score > 0 aufwies. Hierbei wurden Amitriptylin (25 mg/kg KG) und Sertralin (10 mg/kg KG) getestet. Auch hierbei erfolgte die intraperitoneale Injektion der in destilliertem Wasser angesetzten Medikamente halbtäglich.

Entsprechend wurde den unbehandelten Kontrollen 100µl destilliertes Wasser injiziert.

**Tabelle 3: Einteilung der einzelnen Behandlungsgruppen mit Angabe von Dosierung und Fallzahl**

Vorbeugende Behandlung			Behandlung ab Symptombeginn		
Medikament	Dosierung	n=Anzahl Mäuse	Medikament	Dosierung	n=Anzahl Mäuse
Fluoxetin	30 mg/l im Trinkwasser	5	Amitriptylin	25 mg/kg KG i.p.	12
Sertralin	5 mg/kg KG i.p.	6	Sertralin	10 mg/kg KG i.p.	7
Sertralin	10 mg/kg KG i.p.	6	Kontrollen		9
Clemastin	0,5 mg/kg KG i.p.	4			
Kontrollen		5			

### *Gewebepräparation*

Die medikamentös behandelten Mäuse wurden an Tag 21 bis 24 nach Immunisierung durch eine inhalative Überdosis Isofluran getötet. Daraufhin wurde der Brustkorb eröffnet und zur Entfernung des Blutes und Fixierung des Gewebes erfolgte eine Perfusion mit 20 Millilitern 5 prozentigem PFA durch den linken Ventrikel. Hirn und Rückenmark wurden präpariert und entnommen und in Gewebeschälchen mit Tissue-Tek bedeckt. Die Schälchen wurden daraufhin, in einem Zylinder, mit Hilfe von Isopentan als Kältevermittler, in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Blöcke wurden zum Schneiden kurzfristig bei -20°C und langfristig bei -80°C gelagert.

### *Herstellung einer Lymphozyten – Einzelzellsuspension*

Den 14 Tage zuvor nach Protokoll immunisierten Mäusen wurden die Lymphknoten der Achsel- und Leistenregionen entnommen. Zum Homogenisieren wurden die Lymphknoten viermal in fünf Milliliter HBSS Puffer in einem Glashomogenisierer gepottert und über einen 70µm Filter in ein Falcon Röhrchen filtriert. Nach achtminütiger Zentrifugation bei 8°C und 250 x g wurden die Lymphozyten in einem Milliliter MAM resuspendiert und gezählt.

#### **4.2.4 Histologie**

##### *Silanisierung der Objektträger*

Um die Haftung der Gewebe auf den Objektträgern zu gewährleisten, wurden diese nach kurzem Waschen in Aceton eine Minute lang mit 5% Silan beschichtet. Danach wurden sie erneut in Aceton, dann in destilliertem Wasser gewaschen.

##### *Anfertigung von Gefrierschnitten*

An einem Kryostat wurden sechs Mikrometer dicke Schnitte angefertigt, welche mit silanisierten Objektträgern aufgenommen und einen Tag bei Raumtemperatur getrocknet wurden. Am nächsten Tag erfolgte die Fixierung der Schnitte für zehn Minuten in -20°C kaltem Aceton. Die trockenen Objektträger wurden zusammen mit einem Beutel Kieselgel bei -20°C gelagert.

##### *Immunhistochemische Färbungen: CD45, CD4, CD8, B220*

Alle Schnitte wurden zunächst mit einem CD45 Antikörper angefärbt. Hierzu wurden die Objektträger zehn Minuten in einer Trockenkammer aufgetaut und dann erneut zehn Minuten in eiskaltem Aceton fixiert. Nach Trocknung wurden die Schnitte fünf Minuten in PBS gewaschen, um danach 45 Minuten in 0,2 % Casein geblockt zu werden. Danach wurden in einer Feuchtkammer jeweils 100µl der im Folgenden genauer aufgezählten Antikörper auf die Gewebe gegeben. Zwischen den genannten Schritten wurden die Schnitte jeweils für fünf Minuten in PBS + 0,1% Tween gewaschen:

- Anti-CD45 Antikörper in einer Verdünnung von 1:50 mit PBS + 0,1% Tween 20 für 60 Minuten
- Anti-Goat-Anti-Rat Biotin Antikörper (Vectastain-Sets) in einer Verdünnung von 1:200 mit PBS für 30 Minuten
- Strep-HRP (Vectastain-Set) in einer Verdünnung von 1:100 mit PBS + 0,1% Tween für 30 min

Danach wurden die Schnitte fünf Minuten lang in PBS gewaschen. Die Farbmarkierung erfolgte mit 100µl der AEC-Färbelösung, welche direkt vor Gebrauch zuzubereiten ist.

Bei Rosafärbung des Gewebes wurde die Entwicklung lichtmikroskopisch kontrolliert und in PBS gestoppt. Danach wurden die Schnitte mit Meyers Hämatoxylin für ein bis zwei Minuten gegengefärbt, dreimal mit destilliertem und dreimal mit Leitungswasser überspült und zuletzt mit Aquatex und einem Deckglas geschützt.

Gewebe, bei denen durch die CD45-Färbung Infiltrate sichtbar waren, wurde zusätzlich mit Antikörpern gegen CD4, CD8 und B220 gefärbt, um genauer zwischen den Entzündungszellen unterscheiden zu können. Das Protokoll ist bis auf den Antikörper identisch. Statt CD45 wurden hier die anderen Antikörper in derselben Verdünnung angewendet.

Zu den genannten infiltrataufweisenden Geweben wurden Negativkontrollen mit den Isotyp-Kontrollantikörpern Rat IgG2ak und Rat IgG2bk angefertigt.

#### *Mikroskopische Auswertung*

Unter einem Lichtmikroskop wurden für jede Maus die Anzahl aller Infiltrate in drei Querschnitten durch das Hirn und aller Infiltrate in einem Längsschnitt durch das Rückenmark bestimmt und jeweils einem Scorewert zugeordnet:

0: keine Infiltrate

I: 1-2 Infiltrate

II: 3-4 Infiltrate

III: 5 und mehr Infiltrate

Daraus ergaben sich zwei Scorewerte pro Maus, einer für die Infiltratanzahl im Rückenmark und einer für diejenige im Hirn. Der Mittelwert der beiden Zahlen stellt den endgültige Infiltratscore der Maus dar.

Bei der Behandlung ab Symptombeginn wurde zusätzlich die Größe der Infiltrate in folgender Weise festgehalten: 1 = klein, 2 = mittel, 3 = groß.

Als Infiltrat wurden nur diejenigen angefärbten Areale gewertet, bei denen deutlich eine Ansammlung von Zellen abgrenzbar war.

#### **4.2.5 Statistik**

Die Daten in den Graphiken werden als Mittelwerte mit Standardabweichung (standard deviation, SD) dargestellt und wurden mit Excel 2007 zusammengestellt. Als statistische Signifikanz wurde ein p-Wert unter 0,05 festgesetzt, berechnet mit dem Student'schen t-Test.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Adhäsionsassays mit medikamentös behandelten Lymphozyten aus EAE immunisierten Mäusen

Verschiedene funktionelle Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase (FIASMAS) wurden im Vergleich zu Substanzen mit ähnlicher Struktur jedoch ohne Wirkung auf die ASM (Mirtazapin, Haloperidol) hinsichtlich ihres Einflusses auf das Anhaftungsverhalten von Lymphozyten an einer Endothelzellschicht getestet. Hierzu wurden T-Lymphozyten aus Mäusen isoliert, welche 14 Tage zuvor mit MOG und CFA voll immunisiert worden waren. Diese Immunzellen wurden mit den verschiedenen Medikamenten inkubiert und daraufhin auf eine dünne Schicht Hirnendothelium gegeben. Nach der Adhäsionsreaktion wurde die Anzahl anhaftender Lymphozyten pro Quadratmillimeter mikroskopisch ausgewertet.

#### *FIASMAS Amitriptylin und Sertralin sowie FTY720 verringern die Lymphozytenanhaftung signifikant*

Im Vergleich zu den unbehandelten Lymphozyten mit einer durchschnittliche Anhaftung von 16,73 Zellen pro mm<sup>2</sup> (+/- 8,05 SD), hafteten nach Amitriptylinbehandlung durchschnittlich nur 8,39 (+/- 3,43 SD, p = 0,0023) Zellen pro mm<sup>2</sup> an. Ähnlich stark wirkte FTY720 (Fingolimod) mit einer resultierenden Anhaftung von 8,71 Zellen pro mm<sup>2</sup> (+/- 4,5 SD, p = 0,0033). Die Kombination aus beiden Substanzen konnte die durchschnittliche Anhaftung weiter auf 7,71 Zellen pro mm<sup>2</sup> verringern (+/- 4,64 SD, p = 0,0067).

Auch Sertralin konnte als potenter Hemmstoff der Lymphozytenanhaftung identifiziert werden. Unter diesem Medikament resultierte eine Anhaftung von 8,65 Zellen pro mm<sup>2</sup> (+/- 4,41 SD, p = 0,0054). (Abbildung 5)

#### *Keine Reduktion der Lymphozytenanhaftung durch die FIASMAS Clemastin und Fluoxetin sowie die Nicht-FIASMAS Haloperidol und Mirtazapin*

Die Clemastinbehandlung resultierte in einer Anhaftung von 11,47 Zellen pro mm<sup>2</sup> (+/- 4,62 SD) und blieb damit mit einem p - Wert von 0,08 unter dem Signifikanzniveau. Auch die mit Fluoxetin (14,24 +/- 9,03), Mirtazapin (15,52 +/- 9,58) und Haloperidol (15,4 +/- 3,09) behandelten Lymphozyten zeigten keinen Unterschied in der Anhaftung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. (Abbildung 5)

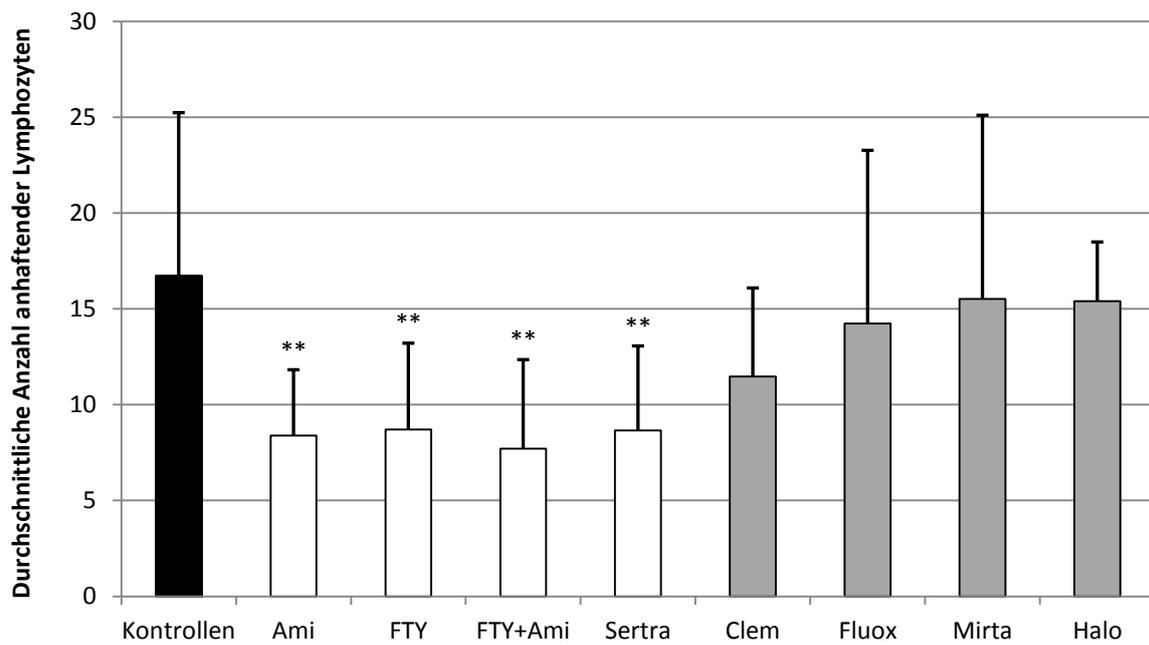


Abbildung 5: Durchschnittliche Anzahl der anhaftenden Lymphozyten auf dem bEnd3-Zellrasen auf einer Fläche von 1 mm<sup>2</sup> nach Behandlung mit den Medikamenten Ami = Amitriptylin, FTY = FTY720 (Fingolimod), Sertra = Sertralin, Clem = Clemastin, Fluox =Fluoxetin, Mirta = Mirtazapin, Halo = Haloperidol. \*\*= p < 0,01

## **5.2 Medikamentöse Hemmung der sauren Sphingomyelinase in EAE immunisierten Mäusen - A: vorbeugende Behandlung**

*Clemastinbehandlung ab Tag 1 nach Immunisierung verhindert Ausbruch der Krankheit (Abbildungen 6-8)*

Um die vorbeugende Wirksamkeit des ASM-Inhibitors Clemastin bei der EAE zu testen, wurden weibliche C57Bl6/J-Mäuse mit MOG und PTX voll immunisiert. Ab Tag 1 nach Immunisierung erfolgte alle 12 Stunden die intraperitoneale Verabreichung von 0,5 mg Clemastin pro Kilogramm Körpergewicht.

Im Gegensatz zu den Kontrollmäusen, welche nur 100µl destilliertes Wasser injiziert bekamen und ab Tag 13 Krankheitssymptome entwickelten, blieben die mit Clemastin behandelten Tiere komplett gesund (siehe Abbildung 6). Ab Tag 15 liegt das Signifikanzniveau bei  $p < 0,01$ .

Zusätzlich zum Scoren wurden die Mäuse täglich gewogen. Die Kontrollmäuse entwickelten ab Tag 6 den für die EAE typischen Gewichtsabfall. Abbildung 7 zeigt deutlich, dass die Clemastinbehandlung einen weniger starken Gewichtsabfall mit sich brachte. An den Tagen 12 bis 18 ist dieser Unterschied signifikant ( $p < 0,05$ ), an Tag 14 liegt der p-Wert sogar unter 0,01.

Um die Infiltratdichte im ZNS der Mäuse einschätzen zu können wurden bei jeder Maus drei Querschnitte durch das Hirn und einem Längsschnitt durch das Rückenmark angefertigt und gegen CD45 gefärbt. Die Bewertung der Infiltratdichte erfolgte durch Zuordnung der Infiltratanzahl zu den Scorewerten 0 bis 3.

Nur bei einer der drei ausgewerteten Clemastin-Mäusen war im Rückenmark ein Infiltrat sichtbar, wodurch sich ein durchschnittlicher Infiltratscore von  $0,17 \pm 0,29$  SD ergibt. Die Kontrollmäusen zeigten mit jeweils fünf oder mehr Infiltraten einen durchschnittlichen Infiltratscore von  $1,67 \pm 0,29$  SD. Das Signifikanzniveau liegt hier bei  $p < 0,001$  (Abbildung 8).

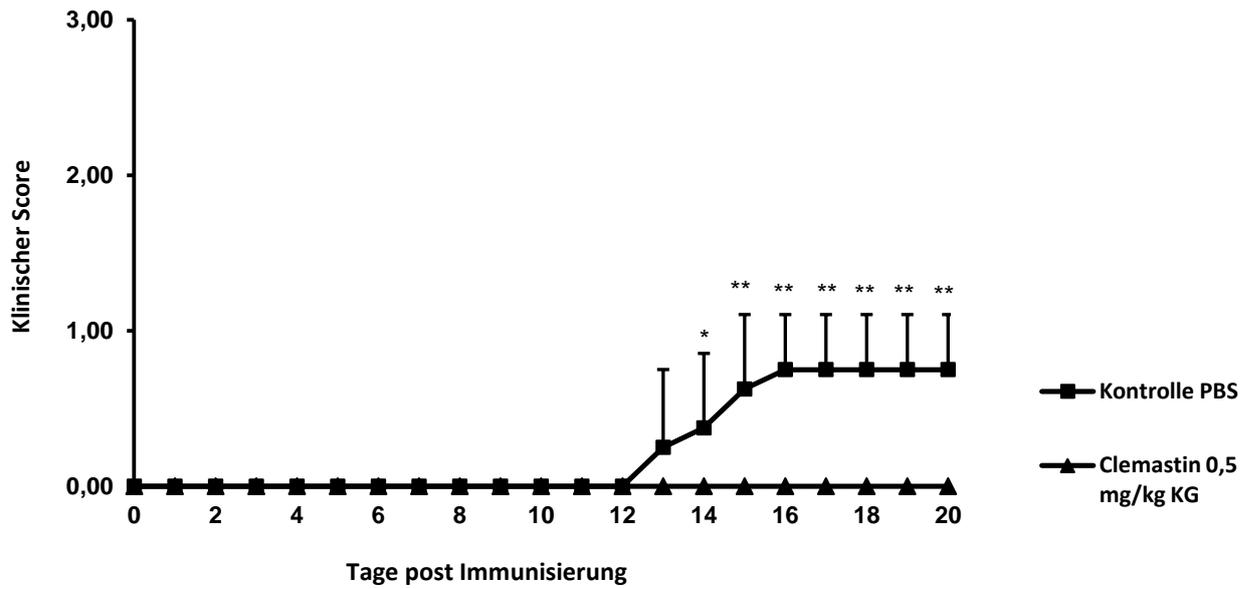


Abbildung 6: Verlauf des klinischen Scores der ab Tag 1 mit 0,5 mg/kg KG Clemastin behandelten Mäuse(n=4) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (nur PBS, n=4) \*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$

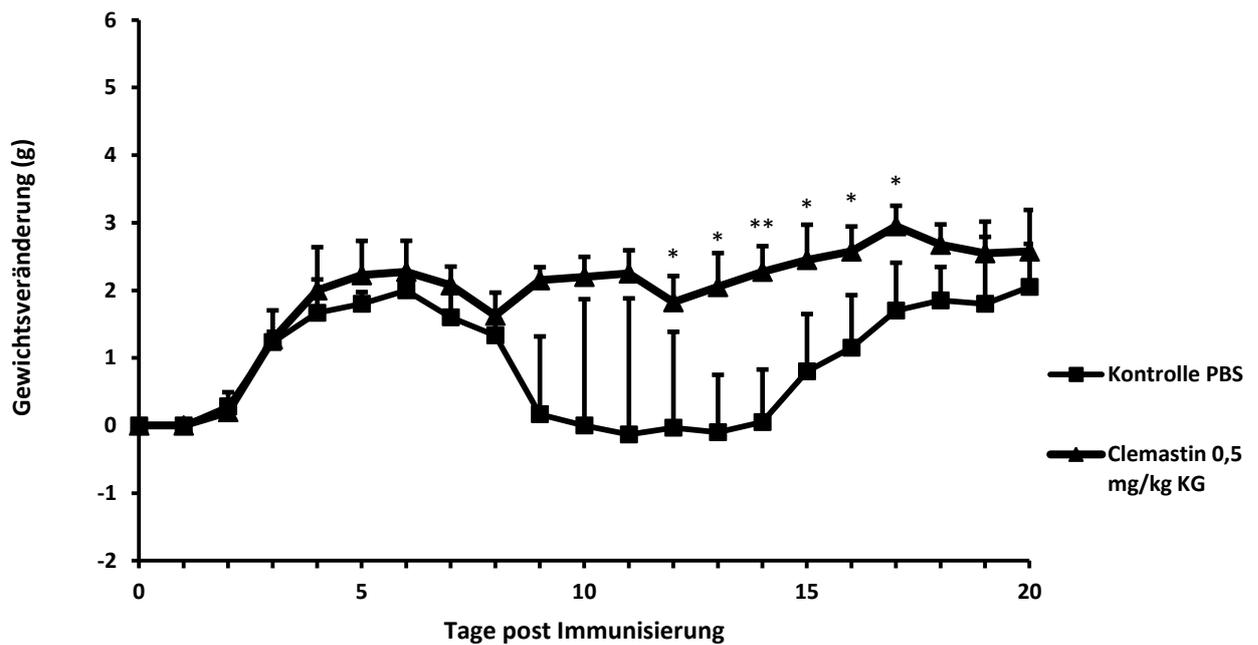
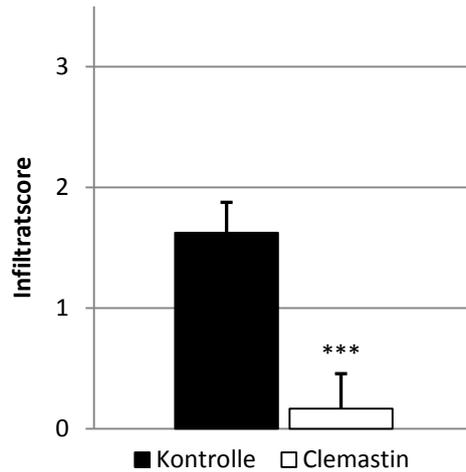


Abbildung 7: Gewichtsveränderung der ab Tag 1 mit 0,5 mg Clemastin pro kg Körpergewicht behandelten Mäuse (n=4) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (n=3) , \*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$



**Abbildung 8:** Durchschnittlicher Scorewert für die Anzahl an Infiltraten, errechnet aus allen Infiltraten jeder Maus in jeweils 3 Schnitten durch das Hirn und einem Längsschnitt durch das Rückenmark, Clemastin behandelte Mäuse (n=3) verglichen mit unbehandelten Kontrollen (n=4), \*\*\*=p<0,001

#### *Fluoxetinbehandlung ab Tag -21 vor Immunisierung kann EAE - Ausbruch nicht verhindern*

Um eine ausreichend hohe Konzentration des ASM-Inhibitors Fluoxetin im Blut der Mäuse zu erreichen, erfolgte die Verabreichung bereits drei Wochen vor der Immunisierung über das Trinkwasser in einer Dosierung von 30mg/l. Die Dokumentation des Krankheitsverlaufs erfolgte ab dem Zeitpunkt der Immunisierung.

Die mit Fluoxetin behandelten Mäuse entwickelten einen ähnlich ausgeprägten Scoreverlauf wie die unbehandelten Kontrollmäuse. Der durchschnittliche Score erreichte sogar schneller derart hohe Werte, dass das Experiment schon an Tag 15 beendet wurde (Abbildung 9).

Der durchschnittliche Infiltratscore errechnet aus der Anzahl der Infiltrate in drei Querschnitten durch das Hirn und einem Längsschnitt durch das Rückenmark jeder Maus lag bei den Fluoxetin - Mäusen mit 2,75 +/- 0,35 SD höher als bei den unbehandelten Kontrollen (Abbildung 10).

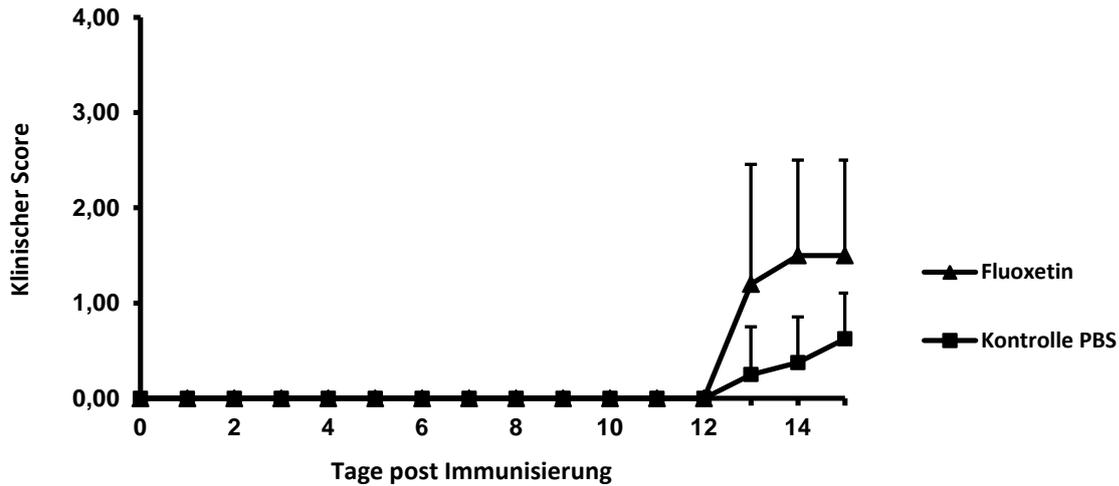


Abbildung 9: Verlauf des klinischen Scores der Mäuse (n=5), die über 3 Wochen prä Immunisierung mit Fluoxetin im Trinkwasser behandelt wurden im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (n=4)

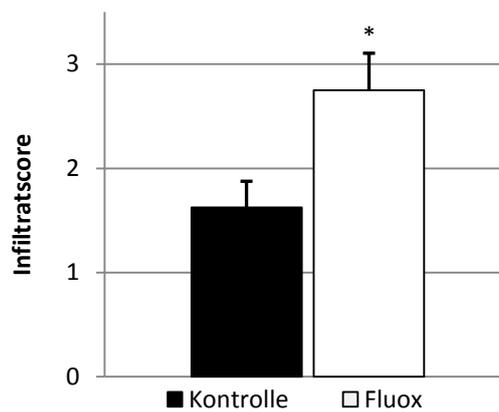


Abbildung 10: Durchschnittlicher Scorewert für die Anzahl an Infiltraten, errechnet aus den Infiltraten einer Maus in jeweils 3 Schnitten durch das Hirn und einem Längsschnitt durch das Rückenmark; Fluoxetin behandelte Mäuse (n=2) verglichen mit unbehandelten Kontrollen (n=3), \* =  $p < 0,05$

*Sertralinbehandlung in der Dosierung 10mg/kg KG ab Tag 1 nach Immunisierung verhindert Ausbruch der Krankheit (Abbildungen 11-14)*

Der ASM-Inhibitor Sertralin wurde ebenfalls ab Tag 1 nach Immunisierung alle 12 Stunden durch eine intraperitoneale Injektion verabreicht. Es wurden zwei unterschiedliche Dosen getestet. Bei einer Dosierung von 5 mg pro Kilogramm Körpergewicht konnte die Symptomatik nicht komplett unterdrückt werden ( Abbildung 11). Sertralin in der Dosierung 10 mg pro Kilogramm Körpergewicht führte hingegen zum völligen Ausbleiben der klinischen Symptomatik, wie in Abbildung 12 deutlich wird. Ab Tag 15 liegt der Signifikanzwert bei  $p < 0,01$ .

Der Gewichtsverlauf zeigt sich, anders als bei den mit Clemastin behandelten Mäusen, bei der Sertralinbehandlung nicht signifikant stabiler (Abbildung 13).

Der durchschnittliche Infiltratscore pro Maus liegt bei der Dosierung von 10 mg Sertralin pro Kilogramm Körpergewicht mit  $0,17 \pm 0,29$  SD ebenfalls deutlich unter demjenigen der Kontrollmäuse ( $1,67 \pm 0,29$  SD). Dieser Unterschied ist hoch signifikant mit  $p < 0,001$ . Die halbe Dosis reichte hingegen nicht aus, um die Anzahl der ZNS-Infiltrate signifikant zu erniedrigen. (Abbildung 14).

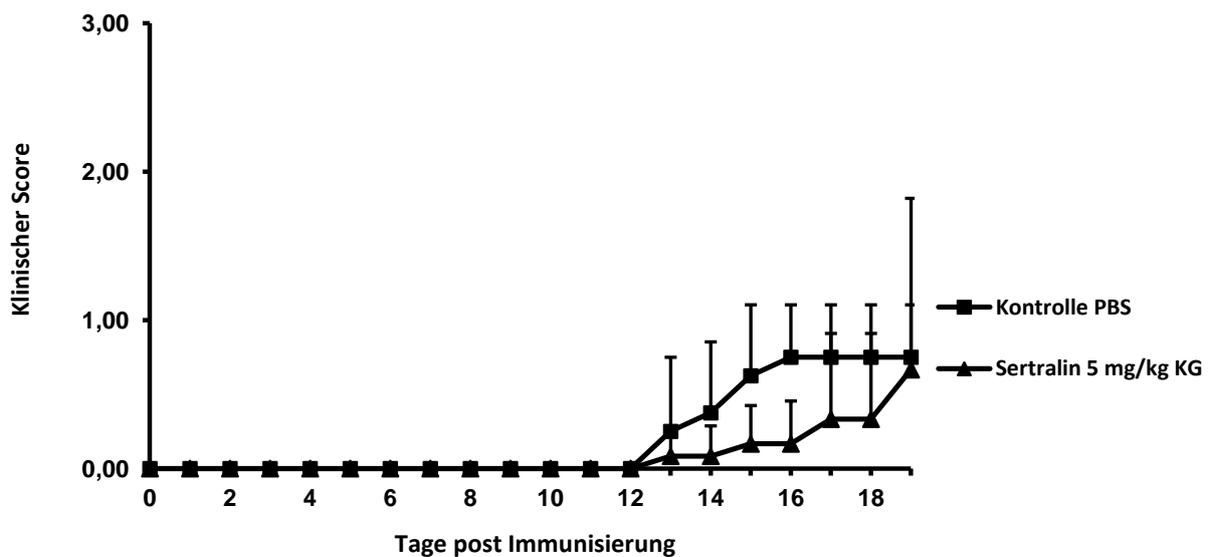


Abbildung 11: Verlauf des klinischen Scores der ab Tag 1 mit 5 mg/kg KG Sertralin behandelten Mäuse (n=6) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (n=4)

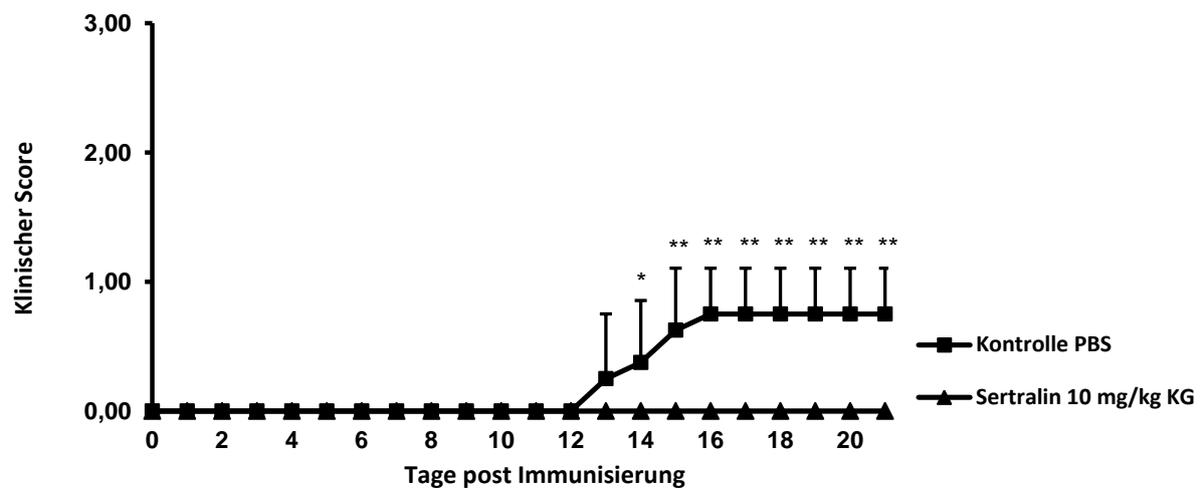


Abbildung 12: Verlauf des klinischen Scores der ab Tag 1 mit 10 mg/kg KG Sertralin behandelten Mäuse (n=6) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (n=4) \*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$

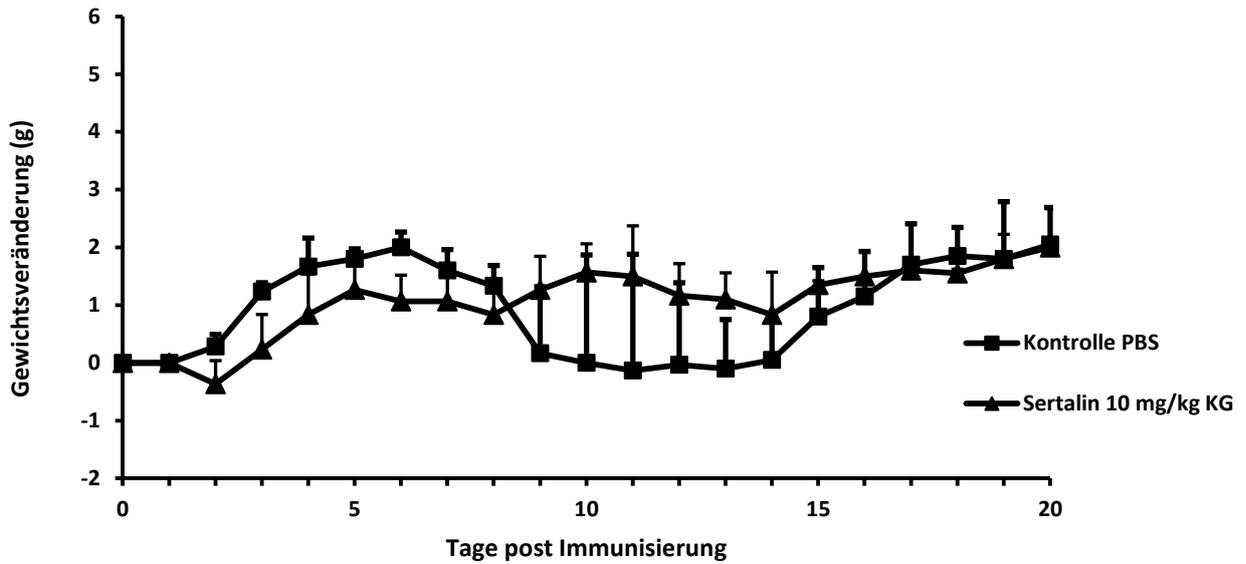


Abbildung 13: Gewichtsveränderung der mit 10 mg Sertralin pro kg KG behandelten Mäuse (n=6) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (n=4)

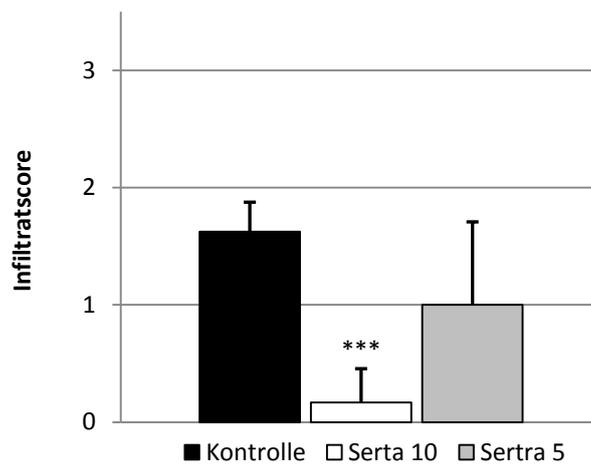
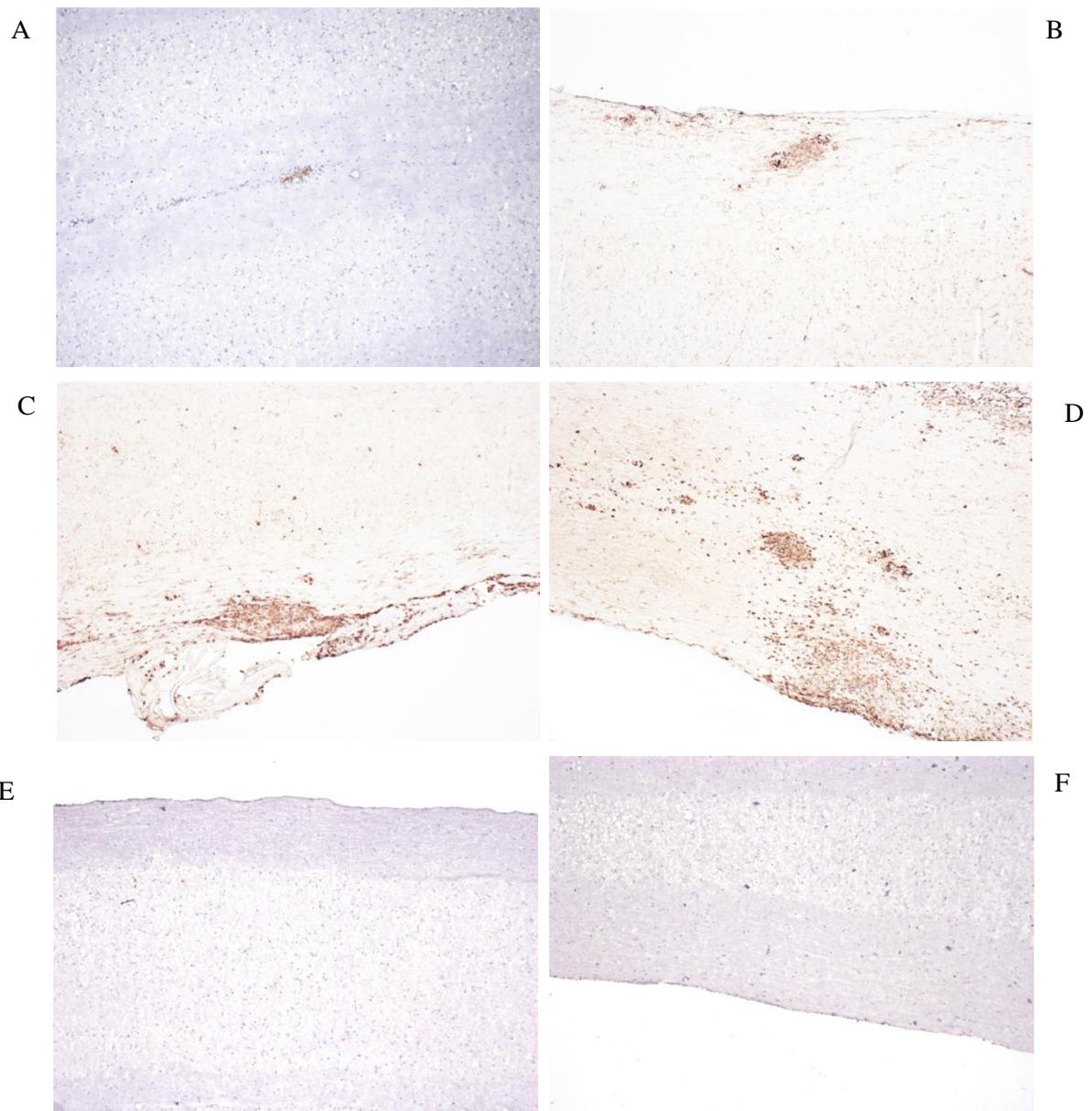


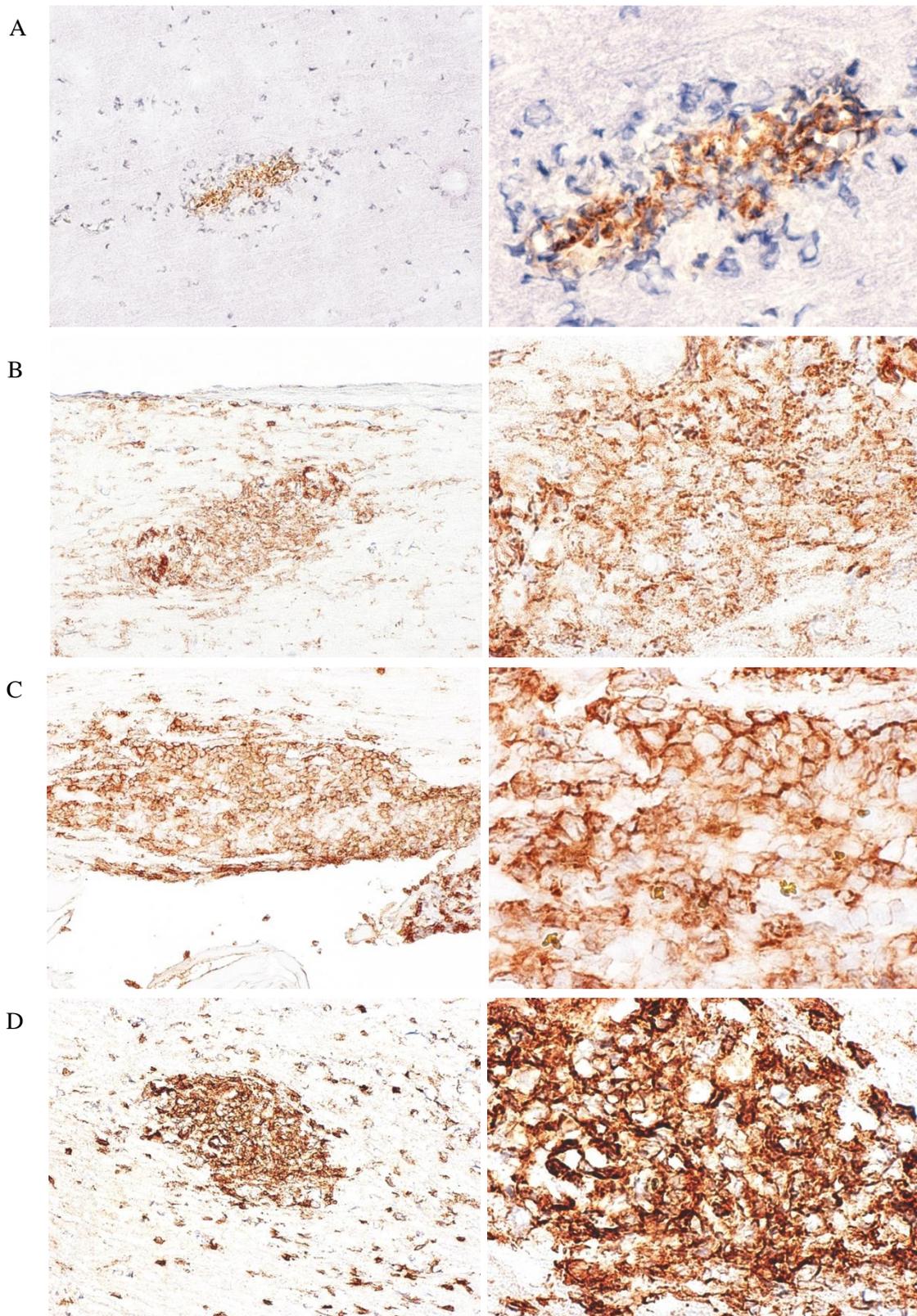
Abbildung 14: Durchschnittlicher Scorewert für die Infiltranzahl, errechnet aus den Infiltraten einer Maus in jeweils 3 Schnitten durch das Hirn und einem Längsschnitt durch das Rückenmark; in Mäusen unter Sertralin – Behandlung in den Dosierungen 5 (n=4) oder 10 mg/kg KG (n=3) verglichen mit unbehandelten Kontrollen (n=4), \*\*\*=p<0,001

## Histologie

Abbildung 15 zeigt beispielhaft Übersichtsbilder in 50-facher Vergrößerung über Rückenmarksgewebe von jeweils einer Maus aus jeder der fünf verschiedenen Versuchsgruppen. Die Bilder der mit destilliertem Wasser gespritzten Kontrollmäuse (A) und (B), der mit Sertralin in der Dosierung 5 mg/kg KG behandelten Mäuse (C) und diejenigen der mit Fluoxetin im Trinkwasser behandelten Mäuse (D) zeigen jeweils ein typisches Infiltrat, welches sich mit einem Antikörper gegen CD45 anfärben ließ. In den Geweben der mit Clemastin (E) und Sertralin in der Dosierung 10 mg/kg KG behandelten Tieren (F) finden sich keine Infiltrate. In der darauffolgenden Abbildung (16) sind die drei infiltrataufweisenden Gewebe 100 - fach und 630 - fach vergrößert dargestellt.



**Abbildung 15: Übersichtsbilder in 50 facher Vergrößerung, Rückenmarksschnitte: A und B zwei verschiedene Kontrollen, C Sertralin 5 mg/kg KG, D Fluoxetin im Trinkwasser, E Sertralin 10 mg /kg KG, F Clemastin. Färbung gegen CD45.**



**Abbildung 16: Vergrößerungen der links gezeigten Gewebe mit Infiltraten: Rückenmark zweier Kontrollmäuse (A) und (B), sowie einer mit Sertralin 5mg/kg KG (C) und einer mit Fluoxetin (D) behandelten Maus, jeweils in 100 und in 630-facher Vergrößerung.**

### **5.3 Medikamentöse Hemmung der sauren Sphingomyelinase in EAE immunisierten Mäusen - B: Behandlung ab Symptombeginn**

Mit MOG immunisierte Mäuse wurden ab dem Tag ihres jeweiligen Symptombeginns (Krankheitsscore  $\geq 0,5$ ) alle 12 Stunden intraperitoneal mit 10 mg Sertralin oder 25 mg Amitriptylin pro Kilogramm Körpergewicht behandelt. Zur Dokumentation des Krankheitsverlaufs wurden die Tiere täglich gewogen und ihr Krankheitsscore bestimmt. Nach dem Tod wurden Hirn und Rückenmark entnommen und durch immunhistochemische Färbungen auf Anzahl und Größe der Infiltrate untersucht.

#### *Sertralinbehandlung ab Symptombeginn führt zu günstigerem Krankheitsverlauf*

Der funktionelle ASM-Inhibitor Sertralin wurde bei der Behandlung des Schubes in der Dosierung 10 mg pro Kilogramm Körpergewicht eingesetzt, welche sich zuvor in der vorbeugenden Therapie als wirksam erwiesen hatte.

Der in Abbildung 17 dargestellte Verlauf des klinischen Scores der mit Sertralin behandelten Tiere unterschied sich an den Tagen vier bis sechs nach Symptombeginn signifikant von den Werten der unbehandelten Kontrollmäusen. Die Behandlung führte dazu, dass der Wert nicht anstieg sondern ungefähr auf dem Ausgangsniveau blieb. Während am dritten Krankheitstag die Scorewerte der beiden Gruppen mit  $0,57 \pm 0,35$  SD (Sertralinmäuse) bzw.  $0,6 \pm 0,22$  SD (Kontrollen) noch ungefähr auf einer Höhe lagen, zeigte sich am vierten Krankheitstag bereits ein mit  $p < 0,05$  signifikanter Unterschied. Die Sertralinmäuse hatte hier einen durchschnittlichen Krankheitsscore von  $0,43 \pm 0,19$  SD während der Score der Kontrollen auf  $1,0 \pm 0,6$  SD anstieg. Der Unterschied blieb über drei Tage bestehen.

Der Gewichtsverlauf unter Sertralinbehandlung entsprach weitestgehend demjenigen unbehandelter Mäuse (Abbildung 18).

Auch Infiltratanzahl und Infiltratgröße waren, wie Abbildung 19 zeigt, nicht zu unterscheiden. Die nächsten beiden Abbildungen (Abbildung 20 und Abbildung 21) zeigen exemplarisch ein Infiltrat im Hirn einer Maus, die Sertralin erhielt und eines im Hirn einer unbehandelten Maus. Die Infiltrate waren gegen die Antigene CD45, CD4, CD8 und B220 anfärbbar.

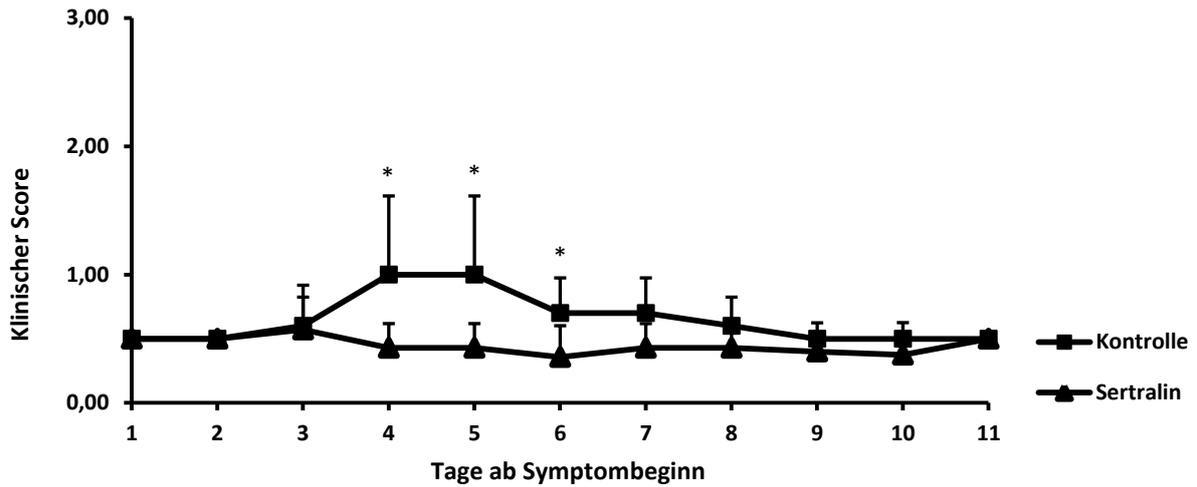


Abbildung 17: Verlauf des klinischen Scores der Mäuse (n=7), die ab dem Tag des Auftretens der Symptomatik eine Behandlung mit 10 mg Sertralin pro kg KG erhielten im Vergleich zu den Kontrollen (n=5); \*= $p < 0,05$

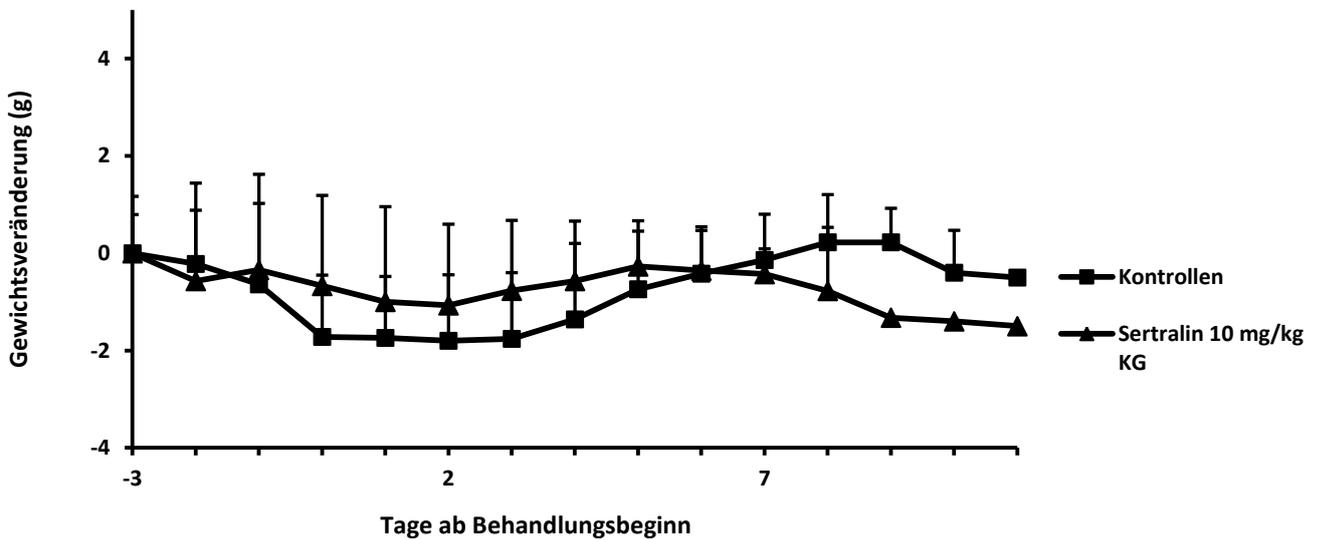


Abbildung 18: Gewichtsveränderung ab 3 Tage vor Behandlungs- und Symptombeginn der ab diesem Zeitpunkt mit Sertralin behandelten Mäuse (n=7) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (n=5)

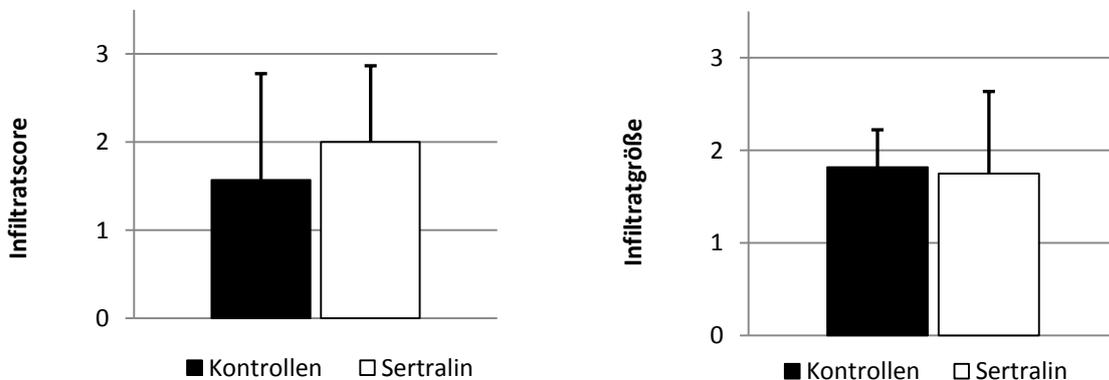
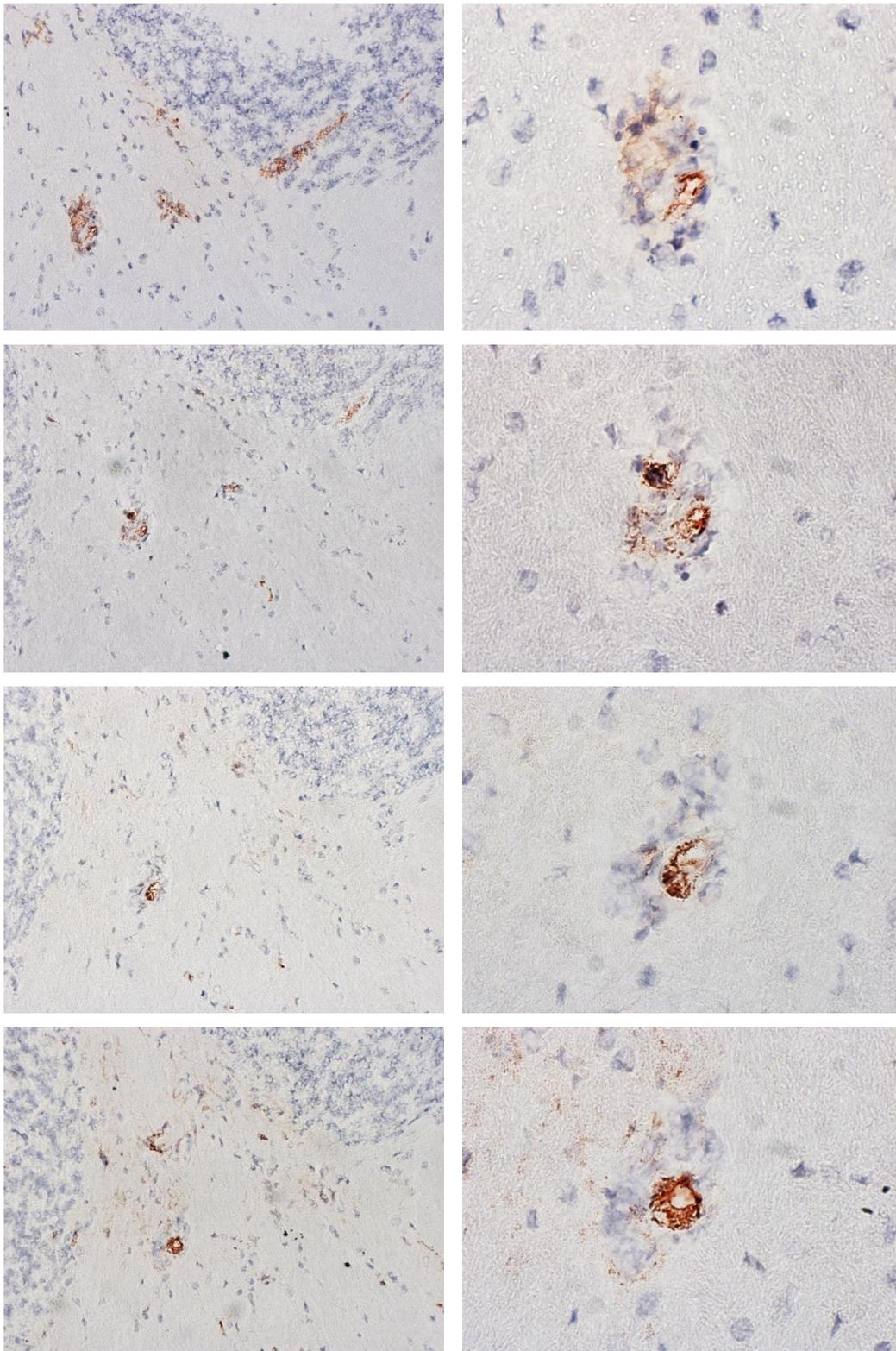


Abbildung 19: Durchschnittliche Anzahl (im Infiltratscore abgebildet, links) und Größe (rechts) der ZNS-Infiltrate in 3 Querschnitten durch das Hirn und einem Längsschnitt durch das Rückenmark, Sertralin behandelte Mäuse im Vergleich zu unbehandelten Mäusen



**Abbildung 20: Infiltrat im Hirn einer ab Symptombeginn mit Sertralin behandelten Maus mit Färbungen gegen die Antigene: (A) CD45; (B) CD4; (C) CD8; (D) B220 in 200 und 630-facher Vergrößerung**

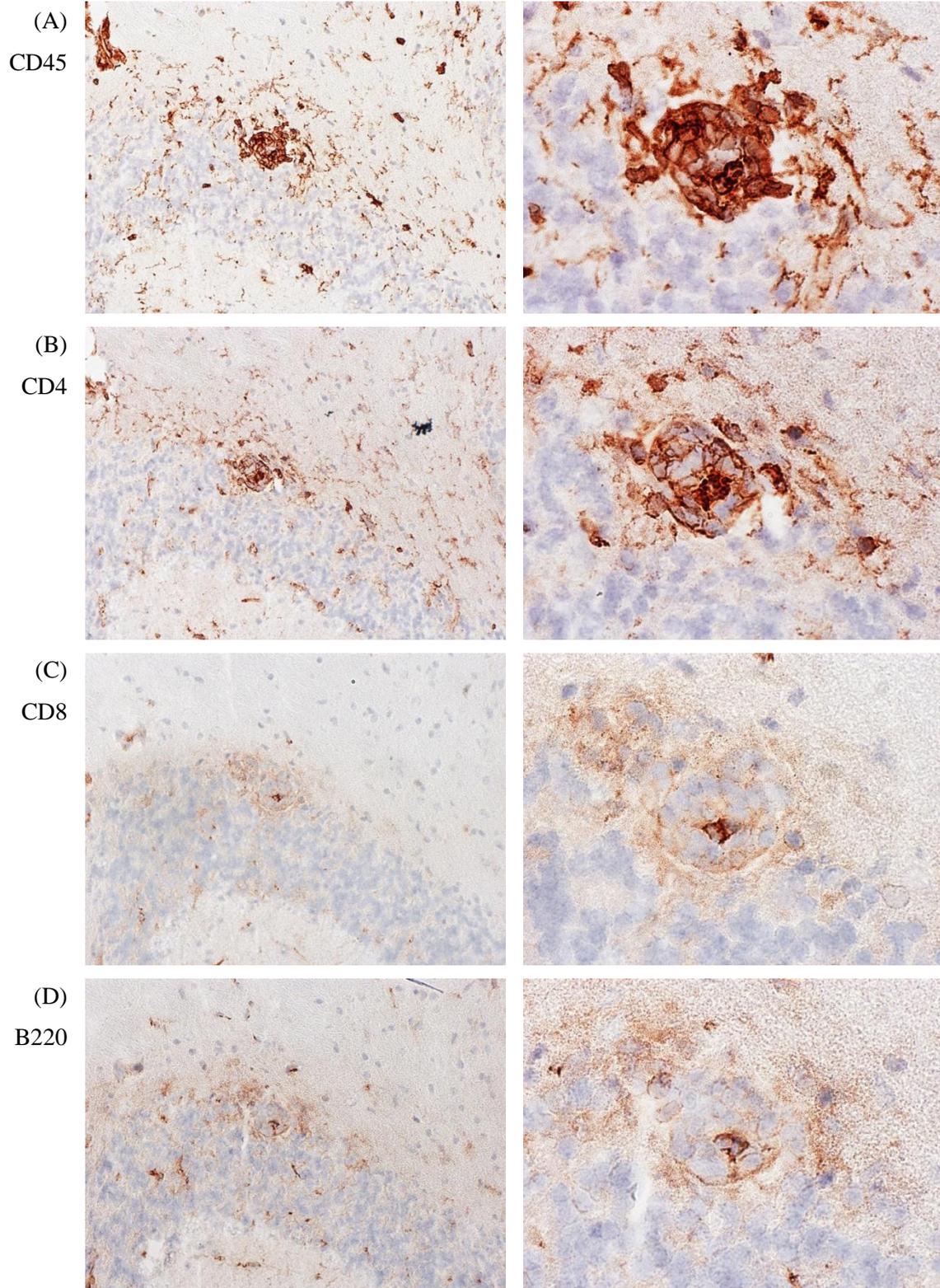


Abbildung 21: Infiltrat im Hirn einer Kontrollmaus, gefärbt gegen die Antigene CD45, CD4, CD8, B220 in den Vergrößerungen 200x und 630x

*Behandlung mit Amitriptylin führt zu geringerer klinischer Symptomatik und kleineren Infiltraten (Abbildungen 22 bis 26)*

Wie aus Abbildung 22 ersichtlich, lagen die durchschnittlichen Werte des klinischen Scores der mit Amitriptylin behandelten Mäuse an den Tagen sechs bis neun nach Symptombeginn signifikant ( $p < 0,05$ ) unter denen der unbehandelten Kontrollen. Der größte Unterschied zeigte sich am achten Krankheitstag mit einem  $p$ -Wert kleiner 0,01. Hier betrug der durchschnittliche klinische Score der behandelten Mäuse  $0,1 \pm 0,22$  SD im Vergleich zu den Kontrollen mit  $0,6 \pm 0,22$  SD.

Die Gewichtsänderung der Mäuse, die Amitriptylin erhielten, zeigte allerdings einen ungünstigeren Verlauf im Vergleich zu den Kontrollmäusen (Abbildung 23). Der EAE typische Gewichtsverlust war stärker ausgeprägt. Das Gewicht der Mäuse fiel nach Krankheitsbeginn, welcher als Tag 0 bezeichnet ist, stärker ab und erreichte nicht wieder den Ausgangswert von Tag -1, dem Tag vor Beginn der Symptome.

Auf den durchschnittlichen Infiltratscore, welcher die Anzahl der Infiltrate in Hirn und Rückenmark widerspiegelt, zeigte die Amitriptylinbehandlung keine signifikante Wirkung (Abbildung 24).

Die Größe der Infiltrate hingegen war im ZNS-Gewebe mit Amitriptylin behandelter Mäuse im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen signifikant kleiner mit  $p < 0,05$ . Die Infiltrate der behandelten Tiere erreichten durchschnittlich eine Größe von  $1,3 \pm 0,5$  SD, die der unbehandelten Mäuse eine Größe von  $1,8 \pm 0,4$  SD. Abbildung 25 zeigt exemplarisch ein typisches Infiltrat im Hirn einer mit Amitriptylin behandelten Maus, welches kleiner ist als das in Abbildung 26 dargestellte Infiltrat einer Kontrollmaus an einer ähnliche Stelle im Hirn. Die Infiltrate waren gegen die Antigene CD45, CD4, CD8 und B220 anfärbbar.

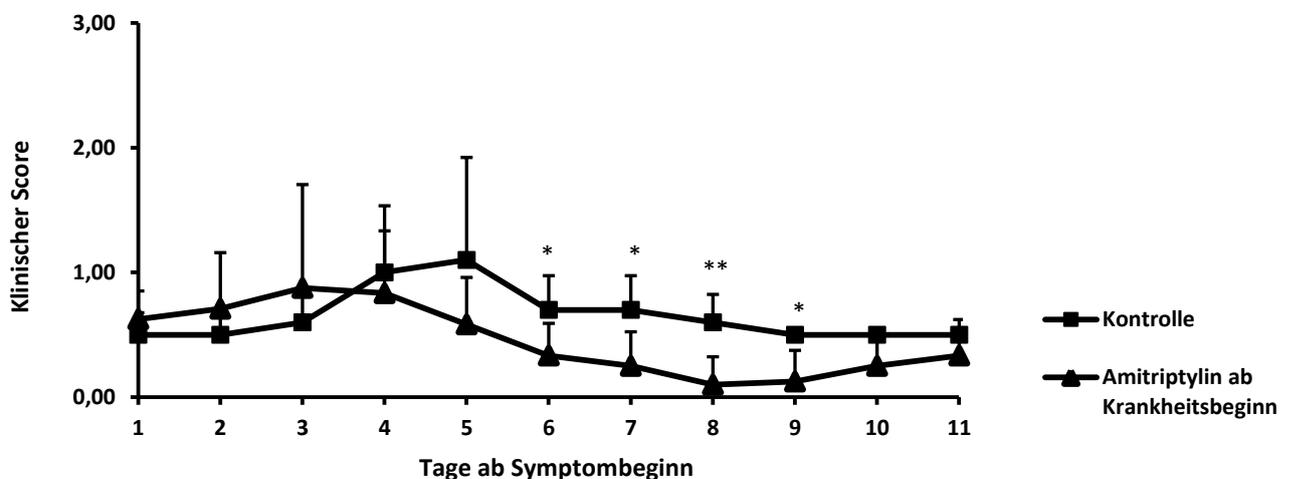


Abbildung 22: Verlauf des klinischen Scores der ab dem ersten Tag der klinischen Symptomatik mit Amitriptylin (25mg/kg KG) behandelten Mäuse (n=12) im Vergleich zu den Kontrollen (n=9), die ab diesem jeweiligen Tag Aqua dest. erhielten.

\*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$

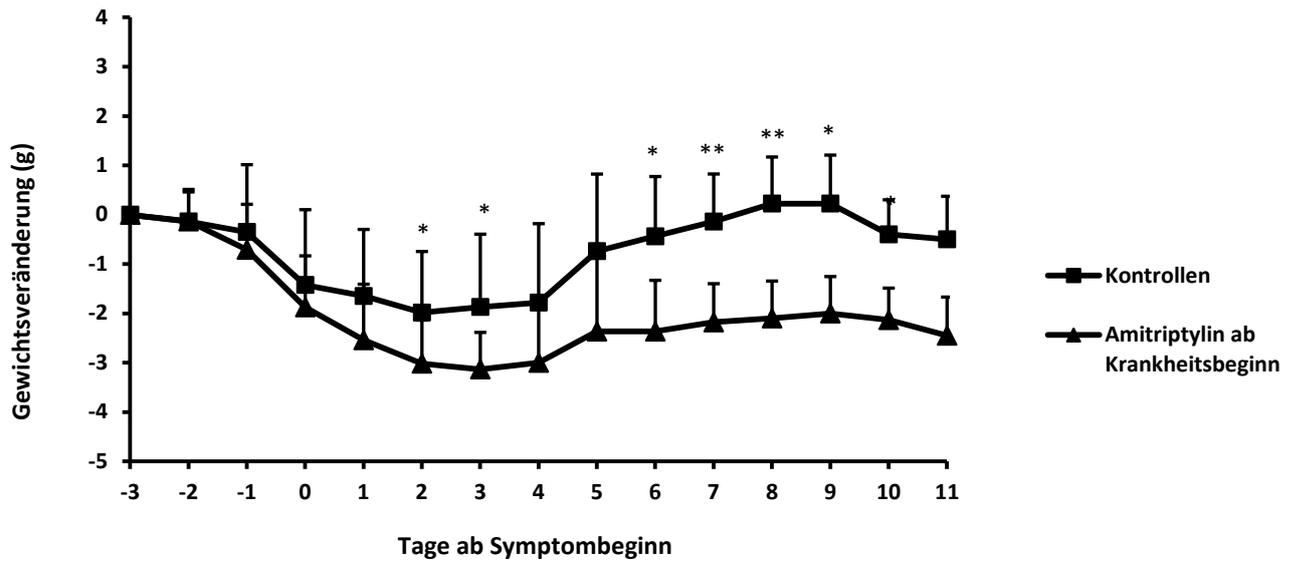


Abbildung 23: Gewichtsveränderung der ab dem ersten Tag der klinischen Symptomatik mit Amitriptylin (25mg/kg KG) behandelten Mäuse (n=12) und der unbehandelten Kontrollen (n=9). \*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$

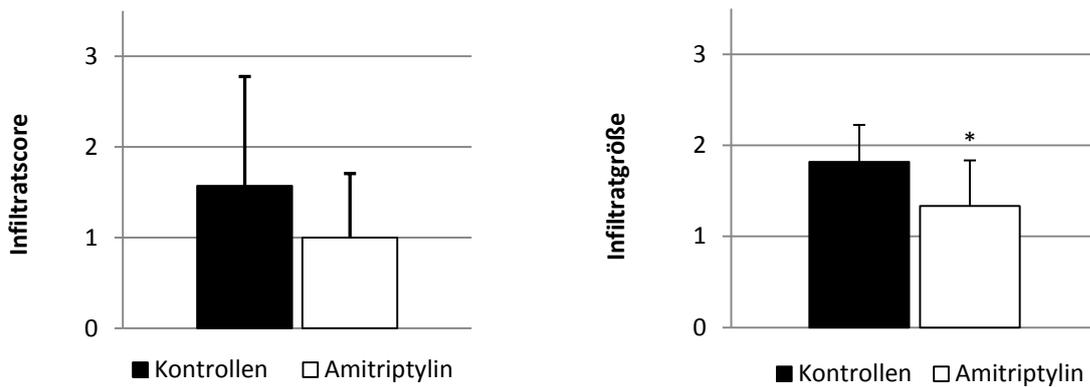
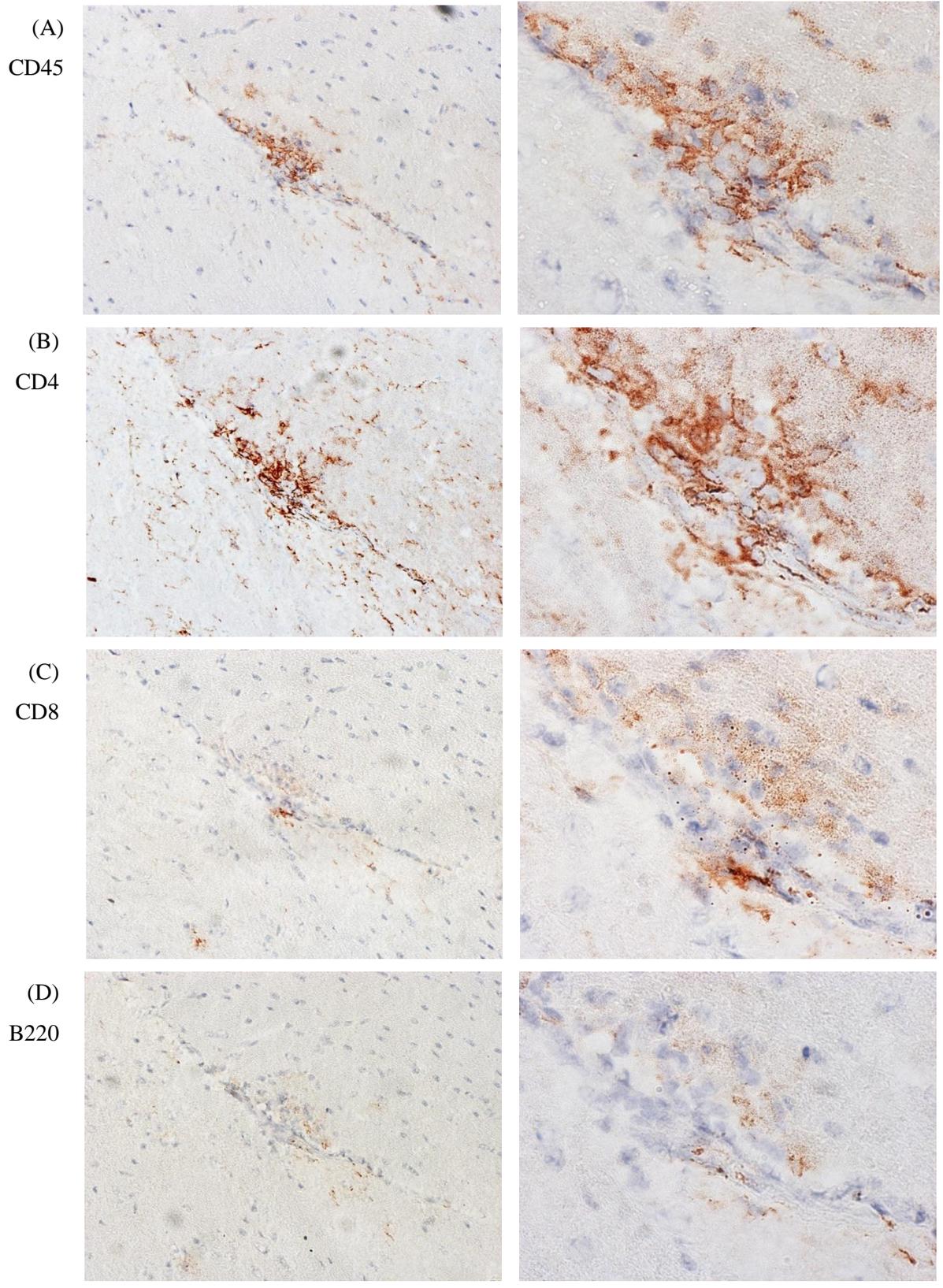


Abbildung 24: Durchschnittliche Anzahl (im Infiltratscore abgebildet, links) und Größe (rechts) der ZNS-Infiltrate in 3 Querschnitten durch das Hirn und einem Längsschnitt durch das Rückenmark, Amitriptylin behandelte Mäuse im Vergleich zu unbehandelten Mäusen



**Abbildung 25: Infiltrat im Hirn einer ab Symptombeginn mit Amitriptylin behandelten Maus in 200-facher und 630-facher Vergrößerung der Färbungen gegen die folgenden Antigene: (A) CD45; (B) CD4; (C) CD8; (D) B220**

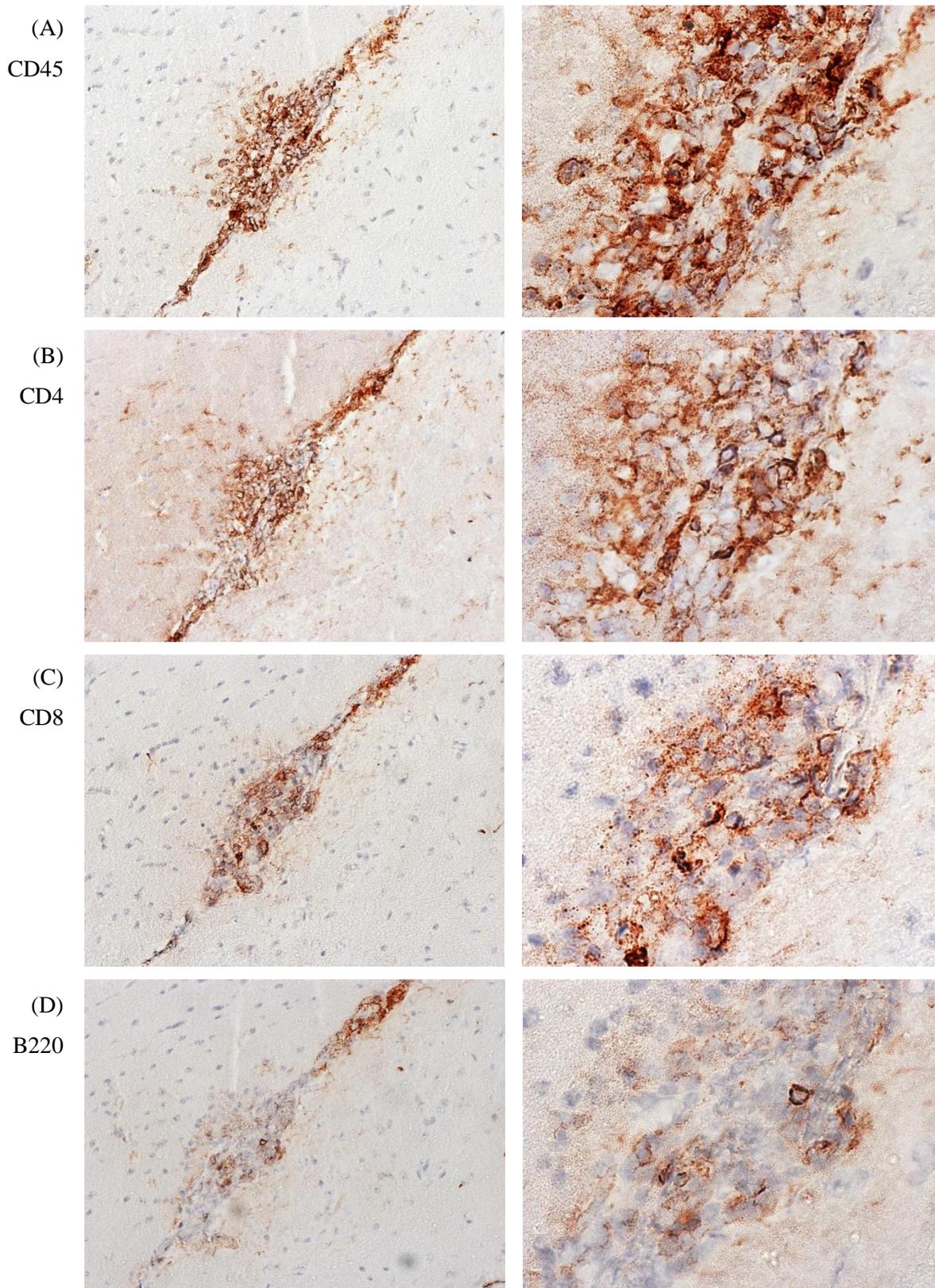


Abbildung 26: Infiltrat im Gehirn einer Kontrollmaus in 200-facher und 630-facher Vergrößerung gefärbt gegen die folgenden Antigene: CD45, CD4, CD8, B220

## 6 Diskussion

Nach aktuellem Stand der Wissenschaft kommt es bei der Multiplen Sklerose durch die Einwanderung autoaggressiver T-Lymphozyten ins ZNS zu einer Immunreaktion, die zu einer Gewebeschädigung mit multiplen entzündlichen, demyelinisierten Plaques führt. Neuste Studien legen eine entscheidende Beteiligung der sauren Sphingomyelinase (ASM) an der Pathogenese der MS nahe. Das Enzym setzt aus Sphingomyelin in der äußeren Zellmembran eukaryotischer Zellen Ceramid frei, welches sich dort zu ceramidreichen Membranplattformen zusammenlagert (HOLOPAINEN et al., 1998; KOLESNICK et al., 2000). Diese Plattformen dienen wiederum der Clusterbildung bestimmter Rezeptormoleküle, deren Signale erst hierdurch übertragen und verstärkt werden (GULBINS, LI, 2006). Dieser Mechanismus der Signalverstärkung spielt eine wichtige Rolle bei der Bindung von Adhäsionsmolekülen auf autoreaktiven T-Lymphozyten an Liganden der Endothelzellschicht der Blut-Hirn-Schranke, wie VCAM-1 und ICAM-1 (LASCHINGER et al., 2002; NI et al., 1999). Die saure Sphingomyelinase ist daher wahrscheinlich maßgeblich an der Adhäsion und Transmigration von T-Lymphozyten über die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS involviert. Dies wird durch eine aktuelle Studie von 2016 bestätigt: Pinheiro et al. verglichen das Adhäsionsverhalten von T-Lymphozyten an Endothelzellen mit oder ohne ASM Aktivität. Sie konnten eine deutlich verminderte Adhäsion und Transmigration der Immunzellen durch die Endothelzellschicht feststellen, die keine ASM Aktivität aufwies. Als Mechanismus konnten sie eine durch den ASM-Mangel verursachte Fehlfunktion des ICAM-1 Moleküls ausmachen (LOPES PINHEIRO et al., 2016). Studien unserer Arbeitsgruppe an ASM knockout Mäusen bestätigen die wichtige Rolle des Enzyms bei der Entwicklung der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einem Tiermodell der MS. Mäuse mit einem genetischen Defekt der ASM waren komplett vor dem Ausbruch der EAE geschützt (BECKER et al., 2017). Eine medikamentöse Hemmung der sauren Sphingomyelinase sollte dementsprechend zum einen zu einer verminderten Adhäsion von T-Lymphozyten an die Blut-Hirn-Schranke führen und zum anderen die Entwicklung einer EAE verhindern oder zumindest deren Symptome abschwächen. Von Kornhuber et. al. wurde eine Gruppe funktioneller Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase (FIASMAS) identifiziert, aus der die in dieser Arbeit getesteten Substanzen ausgewählt wurden (KORNHUBER et al., 2008), (KORNHUBER et al., 2011).

### *Adhäsionsassays*

Als *in vitro* Modell der Blut-Hirn-Schranke diente ein Zellrasen der murinen bEnd.3 Hirnendothelzelllinie. Im ersten Teil der Studie wurden Adhäsionsassays durchgeführt, bei denen das Anhaftungsverhalten von T-Lymphozyten an einem bEnd.3-Zellrasen beobachtet wurde. Die T-Zellen wurden aus EAE-immunisierten Mäusen gewonnen und vor dem Adhäsionsvorgang mit verschiedenen Substanzen behandelt. Für die Anwendung der FIASMAS Amitriptylin und Sertralin konnte eine deutlich verminderte Adhäsion gezeigt werden. Die Substanzen Clemastin und Fluoxetin,

ebenfalls FIASMAs, konnten keinen Effekt auf die Anhaftung erreichen. Geht man davon aus, dass tatsächlich eine Hemmung der sauren Sphingomyelinase für die verminderte Adhäsion der Lymphozyten verantwortlich ist, so entsprechen die Ergebnisse für Amitriptylin und Sertralin, den Erwartungen. Kornhuber et al. fanden durch Einfluss der beiden Substanzen eine Reduktion der Aktivität der sauren Sphingomyelinase auf 11,7 bzw. 12,3 Prozent (KORNHUBER et al., 2008). Eine Diskrepanz ergibt sich jedoch bei den erhobenen Daten von Clemastin und Fluoxetin, welche die ASM laut Kornhuber ebenfalls stark hemmen (ASM-Restaktivität von 12,6 bzw. 13,0 Prozent), hier jedoch nicht zu einer verminderten Anhaftung führten. Bei Clemastin kann mit einer zu geringen Fallzahl als mögliche Ursache der negativen Ergebnisse argumentiert werden, da der p-Wert knapp unter dem Signifikanzniveau liegt. Dies ist jedoch bei Fluoxetin nicht der Fall. Bei diesem Medikament scheinen andere Faktoren mit ein Rolle zu spielen.

Als Negativkontrollen dienten Mirtazapin und Haloperidol, welche mit einer durch Kornhuber et al. gemessenen ASM-Restaktivität von 100,2 bzw. 86,1 Prozent nicht zu den FIASMAs zählen. Haloperidol wurde hierbei ausgewählt, da es eine den Trizykla ähnliche chemische Struktur aufweist. Beide Substanzen zeigten, wie erwartet, in den Adhäsionsassays keinen Einfluss auf die Lymphozytenadhäsion.

Zusätzlich zeigte Fingolimod (FTY720) eine deutliche Reduktion anhaftender T-Lymphozyten. Es ist ein Sphingosin-1-Phosphat (S1P)-Rezeptor-Modulator, der den S1P-abhängigen Austritt von T-Lymphozyten aus den Lymphknoten verhindert und bereits zur Behandlung der MS zugelassen ist (CHIBA et al., 2011). Neuere Studien zeigen, dass Fingolimod zusätzlich auch als Inhibitor der sauren Sphingomyelinase wirkt mit einem Mechanismus ähnlich dem der FIASMAs (DAWSON, QIN, 2011).

### *Medikamentöse Hemmung der sauren Sphingomyelinase im EAE-Tiermodell*

Im zweiten Teil der Studie wurden C57Bl6/J Mäuse, bei denen eine EAE induziert wurde, nach zwei verschiedenen Schemata mit den FIASMAs behandelt. Schema A stellte eine vorbeugende Behandlung dar mit Therapiebeginn direkt nach oder im Falle von Fluoxetin bereits vor der Immunisierung. Dies kann als Pendant zur verlaufsmodifizierenden Langzeittherapie der MS bzw. zur Schubprophylaxe angesehen werden. Bei Schema B wurden die Tiere erst ab ihrem jeweiligen Symptombeginn behandelt, was einer Therapie des akuten MS-Schubes entspräche.

Clemastin konnte bei Anwendung nach Schema A den Ausbruch der EAE komplett verhindern. Zusätzlich milderte es den EAE-typische Gewichtsverlust ab und reduzierte die Anzahl histologisch zur Darstellung kommender ZNS-Infiltrate drastisch. Dieser Unterschied zu dem Ergebnis der Adhäsionsassays lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass es *in vivo* viele verschiedene Zelltypen gibt, an denen die Medikamente angreifen und eine Hemmung der ASM bewirken können. Im *in vitro* Modell stehen nur T-Lymphozyten und Endothelzellen als Angriffspunkt zur Verfügung.

Wichtige Produzenten von Ceramid sind jedoch auch die Astrozyten, die mit ihren Ausläufern an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind und innerhalb von MS-Läsionen eine erhöhte Expression der sauren Sphingomyelinase aufweisen (VAN DOORN et al., 2012). Die Wirkung von Clemastin, welches die Blut-Hirn-Schranke passiert, könnte also im Tierversuch über Astrozyten oder andere Zellen eine Migration von Immunzellen ins ZNS verhindern. Eine weitere Erklärung bietet eine Studie, die nahelegt, dass Clemastin auch an Remyelinisierungsprozessen beteiligt ist (MEI et al., 2014). In Micropillar Arrays bewirkte Clemastin eine deutliche Differenzierung und Myelinisierung von Oligodendrozyten, sodass die Arbeitsgruppe um Mei Clemastin auch in einem tierexperimentellen Modell für Demyelinisierung anwendete. Eine tägliche orale Gabe von 10 mg Clemastin pro Kilogramm Körpergewicht führte zu einer erhöhten Oligodendrozytendifferenzierung und einer verminderten Anzahl demyelinisierter Axone 14 Tage nach Induktion der Demyelinisierung. Clemastin wurde schon vor Initiierung des Demyelinisierungsprozesses verabreicht so dass nicht erwiesen ist, ob es sich bei dem beobachteten Effekt um eine Remyelinisierung oder um eine prophylaktische Wirkung handelt, die eine Demyelinisierung verhindert. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie wäre auch dies denkbar. Clemastin ist ein für verschiedene Arten der allergischen Reaktionen zugelassenes Antihistaminikum mit moderatem Nebenwirkungsprofil. Es könnte deshalb nach weiterführenden klinischen Studien eine interessante Ergänzung zu den MS-Therapeutika darstellen.

Fluoxetin war in der Anwendung im Tierversuch wie auch zuvor bei den Adhäsionsassays nicht wirksam. Dies steht im Widerspruch zu einer Studie, bei der Fluoxetin eine Remission der EAE in Ratten hervorrief, welche mit einer deutlich reduzierten Anzahl entzündlicher Infiltrate im Rückenmark einherging (YUAN et al., 2012). Auch die Anwendung bei einer kleinen Gruppe von MS-Patienten zeigte nach 24 Wochen eine Wirkung von Fluoxetin. Auf die letzten 16 Wochen der Anwendung bezogen konnte eine signifikante Reduktion der neu hinzugekommenen Läsionen im MRT erreicht werden (MOSTERT et al., 2008). In einer erneuten Studie mit einer Einnahme über einen Zeitraum von zwei Jahren konnten die Ergebnisse jedoch nicht reproduziert werden (MOSTERT et al., 2013).

Eine mögliche Ursache für die schlechte Wirkung des Medikaments in der vorliegenden Arbeit könnte eine nicht ausreichende Serumkonzentration sein. Fluoxetin wurde über das Trinkwasser verabreicht, wodurch keine eindeutige Kontrolle der aufgenommenen Dosis möglich war. Die bei der Studie von Yuan et. al. angewendete Technik der gastralen Sondenernährung ist hierzu besser geeignet (YUAN et al., 2012).

Sertralin kam nach beiden Schemata zur Anwendung. In einer Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht zweimal täglich zeigte es bei der vorbeugenden Verabreichung eine völlige Unterdrückung der Symptomatik und eine starke Reduktion der entzündlichen Infiltrate. Die Hälfte dieser Dosis war hingegen nicht ausreichend, um eine Auswirkung zu haben. Ab Symptombeginn

injiziert, erreichte Sertralin einen flacheren klinischen Scoreverlauf, aber keine Reduktion der Infiltrate. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigte auch eine anderen Studie eine Wirksamkeit von Sertralin auf die Entwicklung der EAE. Sertralin wurde dort in einer deutlich geringeren Dosis (5mg/kg KG dreimal pro Woche) ab dem 7. Tag nach EAE-Induktion verabreicht, wodurch der Verlauf der EAE abgemildert werden konnte (TALER et al., 2011). Die Ergebnisse für Sertralin sprechen somit für eine deutliche Dosisabhängigkeit, welche auch bei Fluoxetin eine Rolle spielen könnte.

Amitriptylin hatte sich in Studien unserer Arbeitsgruppe bereits in der vorbeugenden Anwendung als wirksam erwiesen und wurde in dieser Arbeit nach Schema B getestet, ab Symptombeginn. Mäuse, die Amitriptylin erhielten wurden weniger stark krank im Vergleich zu den Kontrolltieren und die Größe der Infiltrate in Hirn und Rückenmark waren kleiner. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass als Nebenwirkung des Medikaments ein stärker Gewichtsverlust auffiel. Eine solche Nebenwirkung wurde bei der Anwendung beim Menschen jedoch nicht festgestellt. Im Gegenteil, eine typische Nebenwirkung von Amitriptylin ist eine Gewichtszunahme (LEUCHT et al., 2012).

Amitriptylin reduziert somit zum einen die Adhäsion der T-Lymphozyten *in vitro* und ist zum anderen *in vivo* sowohl in der vorbeugenden Behandlung als auch nach Ausbruch der EAE hoch wirksam. Im Vergleich zu den anderen in dieser Arbeit zur Anwendung kommenden FIASMAs zeigte Amitriptylin in der Versuchsreihe von Kornhuber et. al. die stärkste Hemmung der sauren Sphingomyelinase.

Amitriptylin wurde laut Pubmed - Recherche bisher bezüglich der EAE oder der MS noch nicht mit einem krankheitsmodifizierenden Einfluss in Verbindung gebracht.

### *Ausblick*

Sertralin und Amitriptylin sind beides häufig verschriebene Medikamente bei der unterstützenden, symptomatischen Therapie der MS. Sertralin und andere SSRI sind Mittel der ersten Wahl zur Therapie einer krankheitsbegleitenden Depression (PEREZ et al., 2015). Amitriptylin lindert neben einer Depression auch brennende Dysästhesien, unter denen MS-Patienten immer wieder leiden (POLLMANN, FENEBERG, 2008). Vorteil der in dieser Arbeit getesteten Substanzen ist, dass hinsichtlich der potentiellen Nebenwirkungen nicht die Gefahr besteht, in der klinischen Anwendung unangenehm überrascht zu werden, da das Profil unerwünschter Wirkungen aufgrund der langjährigen Anwendung bereits hinreichend bekannt ist. Hinzu kommt, dass Depressionen, obwohl sie häufig auftreten, bei MS-Patienten oft unterbehandelt sind (MINDEN et al., 2014). Die Schlussfolgerung aus diesen Tatsachen und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass Sertralin und Amitriptylin vielversprechende Kandidaten für klinische Studien sind, bei denen die Wirkung dieser FIASMAs auf die Schubrate, den Behinderungsgrad und die Entstehung neuer Läsionen getestet wird.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stufenschema zur Behandlung der Multiplen Sklerose.....	10
Abbildung 2: Strukturformeln der FIASMAs .....	18
Abbildung 3: Schematische Darstellung des gefüllten Chamberslides .....	31
Abbildung 4: Abbruch der Well – Leiste von dem Chamberslide .....	31
Abbildung 5: Durchschnittliche Anzahl der anhaftenden Lymphozyten nach Behandlung mit den Medikamenten Amitriptylin, FTY720 (Gilenya), Sertralin, Clemastin, Fluoxetin, Mirtazapin, Haloperidol.....	37
Abbildung 6: Verlauf des klinischen Scores der ab Tag 1 mit Clemastin behandelten Mäuse.....	39
Abbildung 7: Gewichtsveränderung der ab Tag 1 mit Clemastin behandelten Mäuse .....	39
Abbildung 8: Durchschnittlicher Scorewert für die Anzahl an Infiltraten in mit Clemastin behandelten Mäusen .....	40
Abbildung 9: Verlauf des klinischen Scores der über 3 Wochen prä Immunisierung mit Fluoxetin behandelten Mäuse .....	41
Abbildung 10: Durchschnittlicher Scorewert für die Anzahl an Infiltraten in mit Fluoxetin behandelten Mäusen .....	41
Abbildung 11: Verlauf des klinischen Scores der ab Tag 1 mit 5 mg/kg KG Sertralin behandelten Mäuse .....	42
Abbildung 12: Verlauf des klinischen Scores der ab Tag 1 mit 10 mg/kg KG Sertralin behandelten Mäuse .....	42
Abbildung 13: Gewichtsveränderung der mit 10 mg Sertralin pro kg KG behandelten Mäuse.....	43

Abbildung 14: Durchschnittlicher Scorewert für die Infiltranzahl in Mäusen unter Sertralin – Behandlung in den Dosierungen 5 oder 10 mg/kg KG .....	43
Abbildung 15: Übersichtsbilder in 50 facher Vergrößerung, Rückenmarksschnitte: A und B zwei verschiedene Kontrollen, C Sertralin 5 mg/kg KG, D Fluoxetin im Trinkwasser, E Sertralin 10 mg /kg KG, F Clemastin. Färbung gegen CD45. ....	44
Abbildung 16: Vergrößerungen der oben gezeigten Gewebe mit Infiltraten: Rückenmark zweier Kontrollmäuse (A) und (B), sowie einer mit Sertralin 5mg/kg KG (C) und einer mit Fluoxetin (D) behandelten Maus, jeweils in 100 und in 630-facher Vergrößerung.....	45
Abbildung 17: Verlauf des klinischen Scores der ab Symptombeginn mit 10 mg/kg KG Sertralin behandelten Mäuse .....	47
Abbildung 18: Gewichtsveränderung der ab Symptombeginn mit Sertralin behandelten Mäuse.....	47
Abbildung 19: Durchschnittlicher Infiltratscore und Größe der ZNS-Infiltrate in mit Sertralin behandelten Mäusen .....	47
Abbildung 20: Infiltrat im Hirn einer ab Symptombeginn mit Sertralin behandelten Maus .....	48
Abbildung 21: Infiltrat im Hirn einer Kontrollmaus, .....	49
Abbildung 22: Verlauf des klinischen Scores der ab dem ersten Tag der klinischen Symptomatik mit Amitriptylin behandelten Mäuse .....	50
Abbildung 23: Gewichtsveränderung der ab dem ersten Tag der klinischen Symptomatik mit Amitriptylin behandelten Mäuse .....	51
Abbildung 24: Durchschnittlicher Infiltratscore und Größe der ZNS-Infiltrate der ab Symptombeginn mit Amitriptylin behandelten Mäusen.....	51
Abbildung 25: Infiltrat im Hirn einer ab Symptombeginn mit Amitriptylin behandelten Maus.....	52
Abbildung 26: Infiltrat im Gehirn einer Kontrollmaus .....	53

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stoffmengenkonzentration und Lösemittel der eingesetzten Medikamente.....	30
Tabelle 2: Scoringsystem nach Krankheitssymptomen.....	32
Tabelle 3: Einteilung der einzelnen Behandlungsgruppen mit Angabe von Dosierung und Fallzahl...	33

## 7.3 Abkürzungsverzeichnis

<b>AEC</b>	3-Amino-9-ethylcarbazol
<b>APC</b>	Antigenpräsentierende Zelle
<b>ASM</b>	Engl. acid sphingomyelinase = saure Sphingomyelinase
<b>AT-EAE</b>	Adoptive transfer EAE
<b>Aqua dest.</b>	Destilliertes Wasser
<b>AV-Block</b>	Atrioventrikulärer Block
<b>CAF</b>	Komplettes Freund'sches Adjuvant
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid
<b>EAE</b>	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
<b>EBV</b>	Ebstein-Barr-Virus
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>FasL</b>	Fas-Liganden
<b>FCS</b>	Fetal Calf Serum
<b>FIASMA</b> s	engl. Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase
<b>HBSS</b>	Hank's Balanced Salt Solution
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>HLA</b>	Humanes Leukozytenantigen
<b>ICAM</b>	Intracellular Adhesion Molecule
<b>IFA</b>	Inkomplettes Freund-Adjuvans
<b>IFN</b>	Interferon
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IL2RA</b>	Interleukin-2 receptor alpha chain
<b>IL7RA</b>	Interleukin-7 Receptor Alpha Chain
<b>KG</b>	Körpergewicht

<b>KIS</b>	Klinisch Isoliertes Syndrom
<b>LFA</b>	Leukocyte Function-Associated Antigen
<b>MAdCAM</b>	Mucosal Adressin Cell Adhesion Molecule
<b>MBP</b>	Myelin Basic Protein
<b>MHC</b>	Major Histokompatibilitätskomplex
<b>MOG</b>	Myelinoligodendrozytenglykoprotein
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>MS</b>	Multiple Sklerose
<b>MSTKG</b>	Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe
<b>PEG</b>	Pegyliert
<b>PBS</b>	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
<b>PLP</b>	Proteolipid Protein
<b>PML</b>	Progressive Multifokale Leukenzephalopathie
<b>PP-MS</b>	Primary Progressive Multiple Sclerosis
<b>PR-MS</b>	Progressive Relapsing Multiple Sclerosis
<b>RR-MS</b>	Relapsing Remittend Multiple Sclerosis
<b>S1P</b>	Sphingosin - 1-Phosphat
<b>SD</b>	Standartabweichung (engl. standard deviation)
<b>SPF</b>	Spezielle pathogenfreie Bedingungen
<b>SP-MS</b>	Secondary Progressive Multiple Sclerosis
<b>SSRI</b>	Serotonin-Reuptake-Inhibitoren
<b>TCR</b>	T-Zell Rezeptors
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>VCAM-1</b>	Vascular Cell Adhesion Molecule
<b>WHO</b>	World Health Organization
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem

## 8 Literaturverzeichnis

1. Adams RD, Kubik CS (1952) The morbid anatomy of the demyelinating disease. *Am J Med* 12:510-546
2. Arnon R, Aharoni R (2004) Mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and its potential for the development of new applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2:14593-14598
3. Bartke N, Hannun YA (2009) Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J Lipid Res* 50 Suppl:S91-96
4. Baxter AG (2007) The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol* 7:904-912
5. Becher B, Bechmann I, Greter M (2006) Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain. *J Mol Med (Berl)* 84:532-543
6. Becker KA, Halmer R, Davies L, Henry BD, Ziobro-Henry R, Decker Y, Liu Y, Gulbins E, Fassbender K, Walter S (2017) Blockade of Experimental Multiple Sclerosis by Inhibition of the Acid Sphingomyelinase/Ceramide System. *Neurosignals* 25:88-97
7. Bhatia R, Matsushita K, Yamakuchi M, Morrell CN, Cao W, Lowenstein CJ (2004) Ceramide triggers Weibel-Palade body exocytosis. *Circ Res* 95:319-324
8. Boucher LM, Wiegmann K, Futterer A, Pfeiffer K, Machleidt T, Schutze S, Mak TW, Kronke M (1995) CD28 signals through acidic sphingomyelinase. *J Exp Med* 181:2059-2068
9. Brady RO, Kanfer JN, Mock MB, Fredrickson DS (1966) The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 55:366-369
10. Calabresi PA, Radue EW, Goodin D, Jeffery D, Rammohan KW, Reder AT, Vollmer T, Agius MA, Kappos L, Stites T, Li B, Cappiello L, von Rosenstiel P, Lublin FD (2014) Safety and efficacy of fingolimod in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (FREEDOMS II): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol* 13:545-556
11. Carrithers MD (2014) Update on disease-modifying treatments for multiple sclerosis. *Clin Ther* 36:1938-1945
12. Charcot J (1868) Histologie de la sclérose en plaque. *Gazette des hopi-taux, Paris* 41:554-555
13. Charcot J (1877) Lectures on the diseases of the nervous system, delivered at La Salpêtrière. London : The New Sydenham Society v.1:354
14. Cherwinski HM, Cohn RG, Cheung P, Webster DJ, Xu YZ, Caulfield JP, Young JM, Nakano G, Ransom JT (1995) The immunosuppressant leflunomide inhibits lymphocyte proliferation by inhibiting pyrimidine biosynthesis. *J Pharmacol Exp Ther* 275:1043-1049
15. Chiba K, Kataoka H, Seki N, Shimano K, Koyama M, Fukunari A, Sugahara K, Sugita T (2011) Fingolimod (FTY720), sphingosine 1-phosphate receptor modulator, shows superior efficacy

as compared with interferon-beta in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int Immunopharmacol* 11:366-372

16. Cifone MG, De Maria R, Roncaioli P, Rippon MR, Azuma M, Lanier LL, Santoni A, Testi R (1994) Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase. *J Exp Med* 180:1547-1552
17. Coles AJ, Twyman CL, Arnold DL, Cohen JA, Confavreux C, Fox EJ, Hartung HP, Havrdova E, Selmaj KW, Weiner HL, Miller T, Fisher E, Sandbrink R, Lake SL, Margolin DH, Oyuela P, Panzara MA, Compston DA, investigators C-MI (2012) Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet* 380:1829-1839
18. Compston A, Coles A (2008) Multiple sclerosis. *Lancet* 372:1502-1517
19. Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P (2000) Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343:1430-1438
20. Confavreux C, Li DK, Freedman MS, Truffinet P, Benzerdjeb H, Wang D, Bar-Or A, Traboulsee AL, Reiman LE, O'Connor PW, Teriflunomide Multiple Sclerosis Trial G (2012) Long-term follow-up of a phase 2 study of oral teriflunomide in relapsing multiple sclerosis: safety and efficacy results up to 8.5 years. *Mult Scler* 18:1278-1289
21. D'Souza SD, Bonetti B, Balasingam V, Cashman NR, Barker PA, Troutt AB, Raine CS, Antel JP (1996) Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death. *J Exp Med* 184:2361-2370
22. Dawson G, Qin J (2011) Gilenya (FTY720) inhibits acid sphingomyelinase by a mechanism similar to tricyclic antidepressants. *Biochem Biophys Res Commun* 404:321-323
23. De Jager PL, Hafler DA (2007) New therapeutic approaches for multiple sclerosis. *Annu Rev Med* 58:417-432
24. Dean G, Kurtzke JF (1971) On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *Br Med J* 3:725-729
25. Denic A, Johnson AJ, Bieber AJ, Warrington AE, Rodriguez M, Pirko I (2011) The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology* 18:21-29
26. Dittel BN (2000) Evidence that Fas and FasL contribute to the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 48:381-388
27. 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
28. Engelhardt B, Ransohoff RM (2012) Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol* 33:579-589
29. Espinosa PS, Berger JR (2011) Delayed fingolimod-associated asystole. *Mult Scler* 17:1387-1389

30. Fowler S (1969) Lysosomal localization of sphingomyelinase in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 191:481-484
31. Fox RJ, Miller DH, Phillips JT, Hutchinson M, Havrdova E, Kita M, Yang M, Raghupathi K, Novas M, Sweetser MT, Viglietta V, Dawson KT, Investigators CS (2012) Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 367:1087-1097
32. Gatt S (1963) Enzymic Hydrolysis and Synthesis of Ceramides. *J Biol Chem* 238:3131-3133
33. Ghoreschi K, Bruck J, Kellerer C, Deng C, Peng H, Rothfuss O, Hussain RZ, Gocke AR, Respa A, Glocova I, Valtcheva N, Alexander E, Feil S, Feil R, Schulze-Osthoff K, Rupec RA, Lovett-Racke AE, Dringen R, Racke MK, Rocken M (2011) Fumarates improve psoriasis and multiple sclerosis by inducing type II dendritic cells. *J Exp Med* 208:2291-2303
34. Gingele S, Jacobus TL, Konen FF, Hummert MW, Suhs KW, Schwenkenbecher P, Ahlbrecht J, Mohn N, Muschen LH, Bonig L, Alvermann S, Schmidt RE, Stangel M, Jacobs R, Skripuletz T (2018) Ocrelizumab Depletes CD20(+) T Cells in Multiple Sclerosis Patients. *Cells* 8
35. Grassme H, Jekle A, Riehle A, Schwarz H, Berger J, Sandhoff K, Kolesnick R, Gulbins E (2001) CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 276:20589-20596
36. Grassme H, Bock J, Kun J, Gulbins E (2002a) Clustering of CD40 ligand is required to form a functional contact with CD40. *J Biol Chem* 277:30289-30299
37. Grassme H, Jendrossek V, Bock J, Riehle A, Gulbins E (2002b) Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering. *J Immunol* 168:298-307
38. Gulbins E, Bissonnette R, Mahboubi A, Martin S, Nishioka W, Brunner T, Baier G, Baier-Bitterlich G, Byrd C, Lang F, et al. (1995) FAS-induced apoptosis is mediated via a ceramide-initiated RAS signaling pathway. *Immunity* 2:341-351
39. Gulbins E, Li PL (2006) Physiological and pathophysiological aspects of ceramide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290:R11-26
40. Haghikia A, Hohlfeld R, Gold R, Fugger L (2013) Therapies for multiple sclerosis: translational achievements and outstanding needs. *Trends Mol Med* 19:309-319
41. Halmer R, Walter S, Fassbender K (2014) Sphingolipids: important players in multiple sclerosis. *Cell Physiol Biochem* 34:111-118
42. Hannun YA, Obeid LM (2008) Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:139-150
43. Harder T, Simons K (1997) Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol* 9:534-542
44. Hohlfeld R (1999) Therapeutic strategies in multiple sclerosis. I. Immunotherapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:1697-1710
45. Holopainen JM, Subramanian M, Kinnunen PK (1998) Sphingomyelinase induces lipid microdomain formation in a fluid phosphatidylcholine/sphingomyelin membrane. *Biochemistry* 37:17562-17570

46. International Multiple Sclerosis Genetics C, Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, de Bakker PI, Gabriel SB, Mirel DB, Ivinson AJ, Pericak-Vance MA, Gregory SG, Rioux JD, McCauley JL, Haines JL, Barcellos LF, Cree B, Oksenberg JR, Hauser SL (2007) Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* 357:851-862
47. Jana A, Pahan K (2007) Oxidative stress kills human primary oligodendrocytes via neutral sphingomyelinase: implications for multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol* 2:184-193
48. Jana A, Pahan K (2010) Sphingolipids in multiple sclerosis. *Neuromolecular Med* 12:351-361
49. Jersild C, Fog T, Hansen GS, Thomsen M, Svejgaard A, Dupont B (1973) Histocompatibility determinants in multiple sclerosis, with special reference to clinical course. *Lancet* 2:1221-1225
50. June CH, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB (1994) The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today* 15:321-331
51. Kappos L, Weinshenker B, Pozzilli C, Thompson AJ, Dahlke F, Beckmann K, Polman C, McFarland H, European Interferon beta-1b in Secondary Progressive Multiple Sclerosis Trial Steering C, Independent Advisory B, North American Interferon beta-1b in Secondary Progressive Multiple Sclerosis Trial Steering C, Independent Advisory B (2004) Interferon beta-1b in secondary progressive MS: a combined analysis of the two trials. *Neurology* 63:1779-1787
52. Kasper LH, Reder AT (2014) Immunomodulatory activity of interferon-beta. *Ann Clin Transl Neurol* 1:622-631
53. Kolesnick RN, Goni FM, Alonso A (2000) Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. *J Cell Physiol* 184:285-300
54. Kolzer M, Werth N, Sandhoff K (2004) Interactions of acid sphingomyelinase and lipid bilayers in the presence of the tricyclic antidepressant desipramine. *FEBS Lett* 559:96-98
55. Kornhuber J, Tripal P, Reichel M, Terfloth L, Bleich S, Wiltfang J, Gulbins E (2008) Identification of new functional inhibitors of acid sphingomyelinase using a structure-property-activity relation model. *J Med Chem* 51:219-237
56. Kornhuber J, Tripal P, Reichel M, Muhle C, Rhein C, Muehlbacher M, Groemer TW, Gulbins E (2010) Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMA): a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications. *Cell Physiol Biochem* 26:9-20
57. Kornhuber J, Muehlbacher M, Trapp S, Pechmann S, Friedl A, Reichel M, Muhle C, Terfloth L, Groemer TW, Spitzer GM, Liedl KR, Gulbins E, Tripal P (2011) Identification of novel functional inhibitors of acid sphingomyelinase. *PLoS One* 6:e23852
58. Kurtzke JF (1975) A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. Part one. *Acta Neurol Scand* 51:110-136
59. Kurtzke JF (1993) Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clin Microbiol Rev* 6:382-427

60. Laschinger M, Vajkoczy P, Engelhardt B (2002) Encephalitogenic T cells use LFA-1 for transendothelial migration but not during capture and initial adhesion strengthening in healthy spinal cord microvessels in vivo. *Eur J Immunol* 32:3598-3606
61. Leucht C, Huhn M, Leucht S (2012) Amitriptyline versus placebo for major depressive disorder. *Cochrane Database Syst Rev* 12:CD009138
62. Lindsey JW, Haden-Pinneri K, Memon NB, Buja LM (2012) Sudden unexpected death on fingolimod. *Mult Scler* 18:1507-1508
63. Lopes Pinheiro MA, Kroon J, Hoogenboezem M, Geerts D, van Het Hof B, van der Pol SM, van Buul JD, de Vries HE (2016) Acid Sphingomyelinase-Derived Ceramide Regulates ICAM-1 Function during T Cell Transmigration across Brain Endothelial Cells. *J Immunol* 196:72-79
64. Lublin FD, Reingold SC (1996) Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46:907-911
65. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47:707-717
66. Luo C, Wang K, Liu DQ, Li Y, Zhao QS (2008) The functional roles of lipid rafts in T cell activation, immune diseases and HIV infection and prevention. *Cell Mol Immunol* 5:1-7
67. Marrie RA (2004) Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol* 3:709-718
68. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50:121-127
69. Mei F, Fancy SP, Shen YA, Niu J, Zhao C, Presley B, Miao E, Lee S, Mayoral SR, Redmond SA, Etxeberria A, Xiao L, Franklin RJ, Green A, Hauser SL, Chan JR (2014) Micropillar arrays as a high-throughput screening platform for therapeutics in multiple sclerosis. *Nat Med* 20:954-960
70. Minden SL, Feinstein A, Kalb RC, Miller D, Mohr DC, Patten SB, Bever C, Jr., Schiffer RB, Gronseth GS, Narayanaswami P, Guideline Development Subcommittee of the American Academy of N (2014) Evidence-based guideline: assessment and management of psychiatric disorders in individuals with MS: report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 82:174-181
71. Mix E, Meyer-Rienecker H, Zettl UK (2008) Animal models of multiple sclerosis for the development and validation of novel therapies - potential and limitations. *J Neurol* 255 Suppl 6:7-14
72. Mostert J, Heersema T, Mahajan M, Van Der Grond J, Van Buchem MA, De Keyser J (2013) The effect of fluoxetine on progression in progressive multiple sclerosis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *ISRN Neurol* 2013:370943

73. Mostert JP, Admiraal-Behloul F, Hoogduin JM, Luyendijk J, Heersema DJ, van Buchem MA, De Keyser J (2008) Effects of fluoxetine on disease activity in relapsing multiple sclerosis: a double-blind, placebo-controlled, exploratory study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79:1027-1031
74. MSSG (1993) Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. 1993 [classical article]. *Neurology* 57:S3-9
75. MSTKG, Rieckmann P (2006) Immunmodulatorische Stufentherapie der Multiplen Sklerose. Aktuelle Therapieempfehlungen (September 2006). *Nervenarzt* 77:1506-1518
76. Mulero P, Midaglia L, Montalban X (2018) Ocrelizumab: a new milestone in multiple sclerosis therapy. *Ther Adv Neurol Disord* 11:1756286418773025
77. Nagata S, Golstein P (1995) The Fas death factor. *Science* 267:1449-1456
78. Ni HT, Deeths MJ, Li W, Mueller DL, Mescher MF (1999) Signaling pathways activated by leukocyte function-associated Ag-1-dependent costimulation. *J Immunol* 162:5183-5189
79. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000) Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343:938-952
80. Perez LP, Gonzalez RS, Lazaro EB (2015) Treatment of mood disorders in multiple sclerosis. *Curr Treat Options Neurol* 17:323
81. Podbielska M, Krotkiewski H, Hogan EL (2012) Signaling and regulatory functions of bioactive sphingolipids as therapeutic targets in multiple sclerosis. *Neurochem Res* 37:1154-1169
82. Pollmann W, Feneberg W (2008) Current management of pain associated with multiple sclerosis. *CNS Drugs* 22:291-324
83. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Weinshenker BG, Wolinsky JS (2005) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 58:840-846
84. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS (2011) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69:292-302
85. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, Johnson KP, Sibley WA, Silberberg DH, Tourtellotte WW (1983) New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 13:227-231
86. Rejdak K, Jackson S, Giovannoni G (2010) Multiple sclerosis: a practical overview for clinicians. *Br Med Bull* 95:79-104
87. Rice GP, Hartung HP, Calabresi PA (2005) Anti-alpha4 integrin therapy for multiple sclerosis: mechanisms and rationale. *Neurology* 64:1336-1342

88. Robertson NP, Fraser M, Deans J, Clayton D, Walker N, Compston DA (1996) Age-adjusted recurrence risks for relatives of patients with multiple sclerosis. *Brain* 119 ( Pt 2):449-455
89. Rovaris M, Confavreux C, Furlan R, Kappos L, Comi G, Filippi M (2006) Secondary progressive multiple sclerosis: current knowledge and future challenges. *Lancet Neurol* 5:343-354
90. Sabelko-Downes KA, Cross AH, Russell JH (1999) Dual role for Fas ligand in the initiation of and recovery from experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med* 189:1195-1205
91. Sadovnick AD, Baird PA, Ward RH (1988) Multiple sclerosis: updated risks for relatives. *Am J Med Genet* 29:533-541
92. Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GP, Bulman D, Hashimoto L, Paty DW, Hashimoto SA, Warren S, Hader W, Murray TJ, et al. (1993) A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Ann Neurol* 33:281-285
93. Schuchman EH, Wasserstein MP (2015) Types A and B Niemann-Pick disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 29:237-247
94. Schumacher GA, Beebe G, Kibler RF, Kurland LT, Kurtzke JF, McDowell F, Nagler B, Sibley WA, Tourtellotte WW, Willmon TL (1965) Problems of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis: Report by the Panel on the Evaluation of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 122:552-568
95. Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572
96. Sorensen PS, Ross C, Clemmesen KM, Bendtzen K, Frederiksen JL, Jensen K, Kristensen O, Petersen T, Rasmussen S, Ravnborg M, Stenager E, Koch-Henriksen N, Danish Multiple Sclerosis Study G (2003) Clinical importance of neutralising antibodies against interferon beta in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 362:1184-1191
97. Taler M, Gil-Ad I, Korob I, Weizman A (2011) The immunomodulatory effect of the antidepressant sertraline in an experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model of multiple sclerosis. *Neuroimmunomodulation* 18:117-122
98. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS, Fujihara K, Galetta SL, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Marrie RA, Miller AE, Miller DH, Montalban X, Mowry EM, Sorensen PS, Tintore M, Traboulsee AL, Trojano M, Uitdehaag BMJ, Vukusic S, Waubant E, Weinshenker BG, Reingold SC, Cohen JA (2018) Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* 17:162-173
99. van Doorn R, Nijland PG, Dekker N, Witte ME, Lopes-Pinheiro MA, van het Hof B, Kooij G, Reijerkerk A, Dijkstra C, van van der Valk P, van Horssen J, de Vries HE (2012) Fingolimod attenuates ceramide-induced blood-brain barrier dysfunction in multiple sclerosis by targeting reactive astrocytes. *Acta Neuropathol* 124:397-410
100. Walther EU, Hohlfeld R (1999) Multiple sclerosis: side effects of interferon beta therapy and their management. *Neurology* 53:1622-1627
101. Waslo C, Bourdette D, Gray N, Wright K, Spain R (2019) Lipoic Acid and Other Antioxidants as Therapies for Multiple Sclerosis. *Curr Treat Options Neurol* 21:26

102. Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC (1989) The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain* 112 ( Pt 1):133-146
103. White JT, Newsome SD, Kieseier BC, Bermel RA, Cui Y, Seddighzadeh A, Hung S, Crossman M, Subramanyam M (2016) Incidence, characterization, and clinical impact analysis of peginterferon beta1a immunogenicity in patients with multiple sclerosis in the ADVANCE trial. *Ther Adv Neurol Disord* 9:239-249
104. WHO (2008). Atlas Multiple Sclerosis Resources in the World, Organisation WH, ed.
105. Windhagen A, Maniak S, Marckmann S, Lindert RB, Heidenreich F, Blasczyk R (2001) Lymphadenopathy in patients with multiple sclerosis undergoing treatment with glatiramer acetate. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70:415-416
106. Yuan XQ, Qiu G, Liu XJ, Liu S, Wu Y, Wang X, Lu T (2012) Fluoxetine promotes remission in acute experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. *Neuroimmunomodulation* 19:201-208
107. Zheng W, Kollmeyer J, Symolon H, Momin A, Munter E, Wang E, Kelly S, Allegood JC, Liu Y, Peng Q, Ramaraju H, Sullards MC, Cabot M, Merrill AH, Jr. (2006) Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1758:1864-1884

## 9 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Klaus Faßbender, meinem Doktorvater, für die Bereitstellung dieses spannenden Themas, seine motivierende Unterstützung und die hilfreichen Diskussionen in den Laborbesprechungen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Silke Walter bedanken. Ihre intensive, freundliche und kompetente Betreuung, die vielen Ratschläge, die ehrliche und konstruktive Kritik, ihre unendliche Geduld und das ausführliche Korrekturlesen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Dr. Laura Davies und Frau Dr. Ramona Halmer danke ich herzlich für die umfassende und professionelle Einarbeitung in die Labormethoden, ihr offenes Ohr für meine Sorgen und ihre Freundschaft.

Des Weiteren danke ich vor allem Frau Andrea Schottek und Frau Rebecca Lancaster, aber auch dem restlichen Laborteam der AG Faßbender, für 1000 beantwortete Fragen und Erklärungen, ihre stetige Hilfsbereitschaft und eine sehr angenehme Zusammenarbeit.

Von Herzen danke ich meinem Mann Jakob für die unermüdliche Motivation, den liebevollen Rückhalt in vielerlei Hinsicht sowie seinen nie verlorenen Glauben an die Vollendung dieser Arbeit.

Einen großen Dank möchte ich auch meinen Eltern aussprechen für ihre umfassende Unterstützung während meines kompletten Studiums, ihr Vertrauen und ihre Liebe.

## **10 Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.