Aus dem Institut für Molekulare und Klinische Immunologie

der Medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Untersuchungen zur Wirkung von Inhibitoren der enzymatischen Aktivitäten der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) und der Aminopeptidase N (APN) sowie der Wirkung der Tetracyclinderivate Minocyclin und Pentaacetylcyclin auf Immunzellen *in vitro* und im Tiermodell der Multiplen Sklerose, der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis *in vivo*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Dominik Entz

aus Paderborn

Magdeburg 2017

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Dominik Entz:

Untersuchungen zur Wirkung von Inhibitoren der enzymatischen Aktivitäten der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) und der Aminopeptidase N (APN) sowie der Wirkung der Tetracyclinderivate Minocyclin und Pentaacetylcyclin auf Immunzellen *in vitro* und im Tiermodell der Multiplen Sklerose, der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis *in vivo.* – 2017 – 100 Bl., 29 Abb., 6 Tab.

Kurzreferat

Die Ektoenzyme Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) und Aminopeptidase N (APN) besitzen wichtige regulatorische Funktionen innerhalb des Immunsystems. Die Inhibition der enzymatischen Funktion von DP IV und APN bewirkt antiinflammatorische Effekte über die Hemmung der T-Zell-Proliferation und der Synthese inflammatorischer Zytokine sowie die Induktion von Transforming Growth Factor-β1 (TGF-β1) *in vitro* und *in vivo*.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die neu entwickelten dualen DP IV-/APN-Inhibitoren PETIR-001 und PETIR-004 ("Peptidase-targeted Immunoregulation") die T-Zell-Proliferation muriner Splenozyten und die Synthese proinflammatorischer Zytokine (IL-2, IFN-γ, IL-17) hemmt. *In vivo* reduziert PETIR™ zudem die klinischen Symptome der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), dem Mausmodell der Multiplen Sklerose (MS), nach intraperitonealer und oraler Applikation sowie die Anzahl inflammatorischer Läsionen im ZNS. Eine TGF-β1-Induktion konnte nach peroraler Gabe von PETIR-001 nachgewiesen werden.

Daneben wurden in ähnlichen Experimenten die Tetracyclinderivate Minocyclin und das neuentwickelte A-Ring-aromatisierte Acetylminocyclin Pentaacetylcyclin hinsichtlich ihrer immunmodulierenden Wirkungen *in vitro* und *in vivo* untersucht. Beide Substanzen vermitteln an murinen Splenozyten über eine Inhibierung der T-Zell-Proliferation und der Synthese der Zytokine IL-2, IL-17 und IFN-γ antiinflammatorische Wirkungen. Es liegen Hinweise vor, dass Pentaacetylcyclin verglichen mit Minocyclin dieselben Effekte mit niedrigeren Konzentrationen erzielt, was sich auch in *in vivo*-Experimenten andeutet, in denen beide Substanzen positive Wirkung auf die klinischen Symptome der EAE ausüben. Der Effekt hinsichtlich einer TGF-β-Induktion war schwach.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen insgesamt die potentielle Eignung sowohl von PETIR™ als auch von Minocyclin und Pentaacetylcyclin als neue Ansätze zur Therapie von Autoimmunität und chronischer Entzündung.

Schlüsselwörter: Dipeptidylpeptidase IV, Aminopeptidase N, PETIR™, Minocyclin, Pentaacetylcyclin, Multiple Sklerose, Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis

Inhaltsverzeichnis

Dokumentationsblatt	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1. Die Rolle der Ektopeptidasen Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) und Aminopeptidase N (APN) im Immunsystem und Einfluss von Inhibitoren ihrer enzymatischer Funktionen	1
1.1.1. Dipeptidylpeptidase IV (DP IV, CD 26)	1
1.1.1.1. Struktur der DP IV	1
1.1.1.2. Expressionsmuster und Funktionen der DP IV	2
1.1.1.3. Rolle der DP IV im Immunsystem und DP IV-verwandte Enzyme	4
1.1.2. Aminopeptidase N (APN, CD 13)	8
1.1.2.1. Struktur der APN	8
1.1.2.2. Expressionsmuster und Funktionen der APN	8
1.1.2.3. Rolle der APN im Immunsystem	9
1.1.3. Duale Inhibitoren von Dipeptidylpeptidase IV und Aminopeptidase N: "Peptidase- targeted Immunoregulation" (PETIR™)	10
Bedeutung von Minocyclin und A-Ring-aromatisierten Acetylminocyclinen im Immunsystem und für Erkrankungen des zentralen Nervensystems	12
1.2.1. Minocyclin: Pharmakologische Charakteristika und therapeutischer Einsatz	12
Immunmodulation und Neuroprotektion sowie Einfluss Minocyclins auf die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis und Multiple Sklerose	14
1.2.3. Pentaacetylcyclin, ein A-Ring-aromatisiertes Acetylminocyclin	16
1.3. Multiple Sklerose	18
1.3.1. Epidemiologie	18
1.3.2. Immunpathogenese der MS	19
1.3.3. Symptome, klinischer Verlauf und Diagnostik der MS	24
1.3.4. Medikamentöse Therapie	25
1.4. Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)	27
2. Zielstellung der Arbeit	29
3. Material und Methoden	30
3.1. Material	30
3.1.1. Reagenzien	30
3.1.2. Verbrauchsmaterial	30
3.1.3. Geräte	31
3.1.4. Versuchstiere	31

3.2. Methoden	31
3.2.1. Isolierung muriner Splenozyten und Lymphozyten aus regionalen Lymphknoten	31
3.2.2. Messung der DNS-Synthese mitogen- und anti-CD3-stimulierter Splenozyten	31
3.2.3. Messung der Zellvitalität	32
3.2.4. Herstellung von Zellkulturüberständen zur Bestimmung der Zytokinfreisetzung	32
3.2.5. Gewinnung von Plasmen aus Vollblutproben von SJL/J-Mäusen zur Zytokinbestimmung	33
3.2.6. Quantitative Bestimmung von murinem IFN- γ , IL-2, IL-17 und TGF- β 1 mittels Enzyr Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	
3.2.7. <i>In-vivo</i> -Experimente unter Einsatz der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) in SJL/J-Mäusen	34
3.2.7.1. Versuchstiere	34
3.2.7.2. Induktion der EAE	34
3.2.7.3. Therapeutische Applikationen	35
3.2.7.4. Evaluation des EAE-Erkankungsgrades	35
3.2.8. Histopathologie des ZNS an EAE-erkrankter SJL/J-Mäuse	37
3.2.9. Statistische Auswertung	37
4. Ergebnisse	38
4.1. Die dualen DP IV-/ APN-Inhibitoren PETIR-001 und PETIR-004: <i>In vitro- und in vivo-</i> Experimente	38
4.1.1. Einfluss der dualen DP IV-/ APN-Inhibitoren PETIR-001 und PETIR-004 auf die DN Synthese und die Vitalität mitogen- und anti-CD3-stimulierter SJL/J-Maus-Splenozyten	
4.1.2. Einfluss der kombinierten DP IV-/ APN-Inhibitoren PETIR-001 und PETIR-004 auf der proinflammatorischen Zytokine IFN-γ, IL-2 und IL-17 mitogen-stimulierter SJI Maus-Splenozyten	_/J-
4.1.2.1. IFN-γ	44
4.1.2.2. IL-2	45
4.1.2.3. IL-17	46
4.1.3. Einfluss von PETIR-001 und PETIR-004 auf die klinischen Symptome der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) in SJL/J-Mäusen	48
4.1.3.1. Intraperitoneale PETIR-001-Applikation	48
4.1.3.2. Perorale PETIR-001-Applikation	49
4.1.3.3. Intraperitoneale PETIR-004-Applikation	51
4.1.3.4. Perorale PETIR-004-Applikation	52
4.1.4. Histopathologische Untersuchungen zum Einfluss von PETIR-001 und PETIR-004 Immunzellinfiltrate im Rückenmark EAE-erkrankter SJL/J-Mäuse	
4.1.5. Einfluss von PETIR-001 und PETIR-004 auf die Konzentration von latentem TGF- β Plasmen von Mäusen mit EAE	
4.2. Minocyclin und Pentaacetylcyclin: <i>In vitro-</i> und <i>in vivo-</i> Experimente	58

4.2. Synt	.1. Einfluss der Tetracyclinderivate Minocyclin und Pentaacetylcyclin auf die DNS- nthese und Vitalität mitogen- und anti-CD3-stimulierter SJL/J-Maus-Splenozyten	58
•	.2. Einfluss Minocyclins und Pentaacetylcyclins auf die Produktion der inflammatorischen Zytokine IFN-γ, IL-2 und IL-17 mitogen-stimulierter SJL/J-Mausenozyten	61
	.3. <i>In vivo</i> -Untersuchungen zum Einfluss Minocyclins und Pentaacetylcyclins auf di ischen Symptome der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) in SJI usen nach therapeutischer intraperitonealer und peroraler Applikation	L/J-
4.2.	.3.1. Intraperitoneale Applikation	63
4.2.	.3.2. Perorale Applikation	65
4.2.4 Pen	.4. Histopathologische Untersuchungen zum Einfluss von Minocyclin und ntaacetylcyclin auf Immunzellinfiltrate im Rückenmark EAE-erkrankter SJL/J-Mäuse	66
4.2. Mau	.5. Einfluss von Minocyclin und Pentaacetylcyclin auf TGF-β1-Konzentrationen in E usplasmen	
5.	Diskussion	69
6.	Zusammenfassung	80
7.	Literaturverzeichnis	82
8.	Anhang	97
8.1.	Danksagung	97
8.2.	Liste der Veröffentlichungen	99
8.3.	Erklärung	100

Abkürzungsverzeichnis

Å Angström

ACK Ammonium Chloride Potassium Puffer

ADA Adenosin Desaminase
ANA Antinukleäre Antikörper

ANOVA Analysis of Variance (Varianzanalyse)

AK Antikörper

APC Antigenpräsentierende Zelle

APN Aminopeptidase

B-CLL Chronisch lymphatische Leukämie vom B-

Zell-Typ

BDNF Brain-derived Neurotrophic Factor

BME Beta-Mercaptoethanol
CD Cluster of Differentiation

CFA Freund's Complete Adjuvant

CI Curie

CIS Clinically Isolated Syndrome
CPBS Central Pore Binding Site

Cpm Counts per Minute

CYP Cytochrom

DMSO Dimethylsulfoxid

DNS Desoxyribonukleinsäure

DP Dipeptidylpeptidase

EAE Experimentelle Autoimmune

Enzephalomyelitis

EBV Epstein-Barr-Virus

EC Enzyme Classification Number
EDSS Expanded Disability Status Scale

ELISA Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FAP Fibroblasten Aktivierungs Protein

GA Glatirameracetat

GIP Glucose-dependent Insulintropic Polypeptide

GLP-1 Glucagon-like Peptide 1

GM-CSF Granulozyten Monozyten-Kolonie

stimulierender Faktor

GRF Growth Hormone Releasing Factor

HHV-6 Humanes Herpes Virus-6

HO-1 Hämoxygenase-1 i.p. Intraperitoneal

IC Inhibitorische Konzentration

IFN-γ Interferon Gamma

lg Immunglobulin

IL Interleukin

IMTM Immune Technologies and Medicine,

Magdeburg

IVIG Intravenöse Immunglobuline

Kb Kilobasen kDa Kilodalton KO Knock out

MBP Myelin-basisches Protein

MCPIP1 Monocyte Chemotactic Protein-induced

Protein1

MDC Macrophage Derived Chemokine
MHC Major Histokompatibilitätskomplex

MMP Matrixmetalloproteasen MNZ Mononukleäre Zellen

MOG Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein

MPO Myeloperoxidase

mRNA Messenger Ribonukleinsäure MRT Magnetresonanztomographie

MS Multiple Sklerose

mTOR Mammalian Target of Rapamycin

NEP Neprylisin

NGF Nerve Growth Factor
NK-Zellen Natürliche Killerzellen
OB Oligoklonale Banden

p.o. Peroral

pANCA Anti-Neutrophile Cytoplasmatische Antikörper

PBS Phosphatgepufferte Salzlösung

PEB Plasmaeiweißbindung

PETIR Peptidase-targeted Immunoregulation

PHA Phytohemagglutinin

PLP Proteolipidprotein

POP Prolyl Oligopeptidase

PPMS Primär-progrediente Multiple Sklerose

PWM Pokeweed Mitogen

RA Rheumatoide Arthritis

RANTES Regulated upon Activation, Normal T cell

Expressed and Secreted

RNS Reaktive Stickstoffspezies
ROS Reaktive Sauerstoffspezies

RRMS Schubförmig-remittierend Multiple Sklerose

S1P Sphingosin-1-Phosphat

SCID Schwerer kombinierter Immundefekt

SEM Standardfehler des Mittelwerts

Tc Zytotoxische T-Zelle

TGF-β Transforming Growth Factor-β1

Th T-Helfer-Zellen

TNF-α Tumor Necrosis Factor

VCAM-1 Vascular Cell Adhesion Molecule-1

VLA-4 Very Late Activation Antigen-4

ZNS Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Die Rolle der Ektopeptidasen Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) und Aminopeptidase N (APN) im Immunsystem und Einfluss von Inhibitoren ihrer enzymatischen Funktionen

1.1.1. Dipeptidylpeptidase IV (DP IV, CD 26)

1.1.1.1. Struktur der DP IV

Das Enzym Dipeptidylpeptidase IV (DP IV, EC 3.4.14.5) ist ein stark glykosyliertes Typ II-Membranglykoprotein, das als Ektopeptidase fungiert und zur Prolyl Oligopeptidase-Familie (POP) der Serin-Proteasen zählt. Es wird auf der Oberfläche einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen, wie Epithel- und Endothelzellen sowie Lymphozyten exprimiert. Das für DP IV codierende Gen ist auf dem langen Arm vom Chromosom 2 (2q24) lokalisiert und weist 26 Exons in einer Größe von 45 b bis 1,4 kb auf [153]. Die Exon-Intron-Organisation stimmt dabei für die murine und humane Form überein [153]. Viele Jahre nach der erstmaligen Beschreibung von DP IV durch Hopsu-Havu und Glenner 1966 [98] konnte gezeigt werden, dass dieses Protein identisch mit dem Oberflächenantigen CD26 (Cluster of Differentiation 26) [69; 233] und dem Adenosin Desaminase (ADA)-Bindeprotein [109] ist, was die Multifunktionalität der DP IV verdeutlicht.

Die humane Form des Enzyms besteht aus 766 Aminosäuren, die zwei identische Untereinheiten mit einer Molekularmasse von je 110 kDa bilden. Die extrazelluläre Domäne stellt mit 739 Aminosäuren den mit Abstand größten Anteil am Gesamtmolekül und lässt sich in drei Hauptregionen unterteilen: Eine N-terminal glykosilierte Region mit sieben Glykosilierungspositionen und einem flexiblen, 20-Aminosäuren umfassenden "Stiel", eine Cystein-reiche Region sowie einen C-terminalen Abschnitt, der die katalytische Sequenz mit einer Triade aus Serin, Aspartat und Histidin enthält [69]. 22 Aminosäuren bilden die transmembranäre Region, die das Enzym in der Plasmamembran verankert, und sechs Aminosäuren bilden den cytoplasmatischen Teil [69] (Abbildung 1).

Im letzten Jahrzehnt konnten durch mehrere Arbeitsgruppen mit Hilfe der Kristallstrukturen von DP IV wichtige Erkenntnisse bezüglich der molekularen Funktionsweise dieses multifunktionellen Proteins gewonnen werden. So konnten Engel et al. [62] durch Bestimmung der 1,8 Å-Kristallstruktur der DP IV von Schweine-Nieren zeigen, dass zwei mögliche Wege in das aktive Zentrum des Enzyms existieren, zum einen durch einen Tunnel mit β-Propeller-Domäne, zum anderen durch eine Seitenöffnung, die aufgrund ihrer Größe Zugang für helikale Substrate ermöglicht. Darüber hinaus postulierte diese Gruppe, dass Dimerisation für die Architektur des katalytischen Zentrums nicht notwendig sei, jedoch andererseits vermutlich die Rezeptor-Ligand-Affinität verstärke und in der Folge zu verbesserter Signaltransduktion in Zellen führe [62]. Kurz zuvor, 2002, beschrieben Rasmussen et al. [186] die Kristallstruktur der

extrazellulären Region löslicher humaner DP IV im Komplex mit dem Inhibitor Valin-Pyrolidin und konnten mit ihrer Arbeit unteranderem Hinweise für die Aufklärung der Lokalisation des aktiven Zentrums (Kavität zwischen einer α/β -Hydrolase-Domäne und einer β -Propeller Domäne) und den Weg des Substrats zum aktiven Zentrum liefern. Die hohe Substratspezifität erklärten Aertgeerts et al. [2] mit der Funktion eines Glutaminsäure-Motivs sowie einer hydrophoben und optimal für die Interaktion mit Alanin und Prolin beschaffenen S1-Untereinheit, die sie mithilfe der Kristallstruktur freier DP IV im Komplex mit einem physiologischen Substrat, Neuropeptid Y, darstellen konnten.

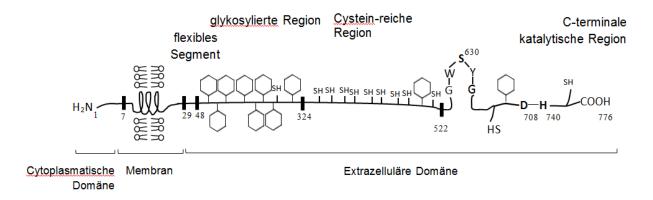


Abbildung 1: Schematische Darstellung von CD26 und struktureller Hauptmerkmale (nach Mentlein [155])

Bedeutende Erkenntnisse lieferten Ansorge et al. [9] 2011 mit der Aufklärung von Struktur und molekularen Mechanismen von DP IV, indem sie zeigten, dass in einer 20 Å vom aktiven Zentrum entfernten Vorkammer eine spezielle Bindungsstelle (central pore binding site, CPBS) existiert, die entscheidend den Ein- und Auslass von Substraten zum aktiven Zentrum reguliert. Diese stellt vermutlich über autosterische Modulation der DP IV den Hauptakteur in der Beeinflussung zellulärer Funktionen dar [9].

Die Ergebnisse dieser Arbeiten liefern wichtige Erkenntnisse und Ansatzpunkte zur Synthese maßgeschneiderter DP IV-Inhibitoren, von denen die Wirkungen zweier Vertreter in der vorliegenden Dissertation gezeigt werden sollen.

1.1.1.2. Expressionsmuster und Funktionen der DP IV

Dipeptidylpeptidase IV zeigt im Organismus eine ausgesprochen weite Verbreitung und lässt sich auf Zellen unterschiedlicher Gewebe finden. Mittels Immunhistologie konnte das Enzym beispielsweise auf intrahepatischen Gallengangszellen, Fibrozyten, Azinusepithelzellen der Ohrspeicheldrüse, Inselzellen des Pankreas, in Nebenniere und Prostata, aber in besonderer Weise auch in der Lunge sowie mit großer Aktivität auf Epithelzellen der proximalen

Nierentubuli und in der intestinalen Bürstensaummembran nachgewiesen werden [92; 154; 73; 210]. Neben der membrangebundenen existiert eine lösliche DP IV-Form im Blut und in anderen flüssigen Kompartimenten [103; 58], die proteolytisch von Zelloberflächen entfernt wurde und deren Hauptaufgabe im Plasma die Prozessierung von endokrinen Peptiden ist [8]. Lange Zeit wurde angenommen, dass lösliche DP IV sich funktionell nicht von der auf Zelloberflächen verankerten unterscheidet [103], was jedoch durch neuere Erkenntnisse aus Untersuchungen zu Struktur und Bindungsverhalten sowie überraschend inkonsistenten Ergebnissen aus Versuchen mit unterschiedlichen DP IV-Inhibitoren zuletzt in Frage gestellt wurde [8].

Im Immunsystem findet sich DP IV auf T-Zellen, B-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und wird insbesondere auf aktivierten T-Zellen vermehrt exprimiert [69]. So konnte gezeigt werden, dass unter Einfluss mitogener bzw. anti-CD3-Antikörper-Stimulation oder T-Zell-Stimulation durch IL-2 die DP IV-Expression erhöht ist [207; 187]. Diese aktivierungsabhängige Regulation steht im Kontrast zur konstitutiven Expression auf Zellen peripherer solider Organe, was DP IV einerseits zu einem Aktivitätsmarker für T-Zellen [63] und andererseits zu einer Zielstruktur für synthetische Inhibitoren macht.

Die DP IV zeichnet sich durch eine hohe Substratspezifität aus und katalysiert als Exopeptidase die Hydrolyse von Dipeptiden vom N-Terminus, wenn sich in der zweiten Position (P₁) die Aminosäuren Prolin, Alanin oder Hydroxyprolin befinden [255; 154] (Abbildung 2). Insbesondere die Anwesenheit von Prolin als hoch konserviertes Element in vielen Peptiden und Proteinen begründet deren konformatorische Restriktion und die damit einhergehende Bedeutung bezüglich der Aktivitätsregulation dieser Moleküle [242]. Im Zusammenspiel mit der neben DP IV überschaubaren Anzahl bekannter Enzyme, die solche mit Prolin benachbarten Peptidbindungen hydrolisieren können, ist dies ein System mit großer Relevanz für die Regulation vieler biologischer Prozesse [242].

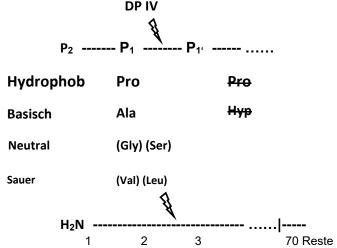


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Charakteristika durch DP IV gespaltener Substrate (nach Mentlein [154])

Natürliche Substrate, deren Aktivität mittels Veränderung ihrer Rezeptor-Spezifität durch DP IV gesteuert werden, sind beispielsweise Neuropeptid Y [155] und Substanz P [4], die Chemokine RANTES (Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted) [171], Eotaxin [228] und MDC (macrophage-derived chemokine) [183]. Inaktiviert werden etwa GRF (growth hormone-releasing factor) [28] und die mit insulinotroper Wirkung am Glukosemetabolismus beteiligten Peptide GIP (glucose-dependent insulintropic polypeptide) und GLP-1 (glucagon-like peptide 1) [117]. Durch medikamentöse DP IV-Inhibierung kann eine Inaktivierung von GIP und GLP-1 derart vermindert werden, dass ihr physiologischer Inkretin-Effekt verlängert und der Glukosespiegel im Blut erniedrigt wird [174]. Dieses Konzept wird in der Therapie des Diabetes mellitus Typ II seit 2007 in Deutschland mit der Arzneimittelgruppe der Gliptine angewandt.

1.1.1.3. Rolle der DP IV im Immunsystem und DP IV-verwandte Enzyme

Deutliche Hinweise für eine Beteiligung der DP IV in Immunprozessen ergaben *in vitro* und *in vivo*-Untersuchungen zu Transplantatabstoßung und Autoimmunprozessen. Beispielhaft wurden Experimente anhand zweier Transplantationsmodelle für Herz und Lunge in Ratten durchgeführt: Korom et al. [124] konnten so erstmals zeigen, dass die Hemmung der DP IV mittels synthetischem Inhibitor die akute Abstoßung nach Herztransplantation in Ratten aufhob und zu längerem Überleben nach Transplantation führte. Diese Beobachtungen gingen *in vitro* mit einer stark abgeschwächten Antwort zytotoxischer T-Zellen, die bereits länger als Hauptverursacher der akuten Abstoßungsreaktion identifiziert worden sind, einher. 2009 demonstrierten Zhai et al. [262] in einem Lungentransplantationsmodel in Ratten zum einen, dass durch Einsatz eines DPIV-Inhibitors signifikant seltenere und weniger schwere Manifestationen von primären Transplantatdysfunktionen auftraten und zum anderen das Potential zur Erholung nach ausgedehnter Ischämie. Die Transplantate waren für diese Zwecke zuvor mit einem DP IV-Inhibitor perfundiert worden [262]. In weiteren *in vivo*-Studien konnten etwa Tanaka et al. [231; 232] bereits 1997/1998 die Effekte der DP IV-Inhibition auf Autoimmunerkrankungen mittels zweier Arthritis-Rattenmodelle zeigen.

Sehr umfangreiche Untersuchungen bezüglich der Rolle von DP IV in der Immunregulation wurden außerdem anhand des Mausmodells der Multiplen Sklerose, der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), durchgeführt, welches auch Grundlage der *in vivo*-Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ist. Ein Prinzip zur Untersuchung von Funktionen und den zugrundeliegenden molekularen Mechanismen von Enzymen besteht darin, Auswirkungen auf zelluläre Funktionen unter Einfluss von Inhibitoren zu untersuchen. Steinbrecher et al. [223; 224] demonstrierten mittels Einsatzes des nicht-spezifischen, synthetischen DP IV-Inhibitors Lys[Z(NO₂)]-pyrrolidid durch intraperitoneale Applikation dessen therapeutisches Potenzial anhand der Linderung klinischer Symptome der durch adoptiven Transfer induzierten EAE

sowie eine Verminderung histopathologischer Zeichen im ZNS. Dieser Effekt zeigte sich für Behandlungsansätze, die sowohl unter präventiver als auch therapeutischer Intention durchgeführt worden waren [224]. Beobachtet wurde außerdem eine Zunahme des antiinflammatorischen Zytokins Transforming Growth Factor-β1 (TGF-β1) in Rückenmark und Plasma therapierter Tiere im Vergleich zu Kontrollen sowie die Tatsache, dass in in vitro-Experimenten die T-Zell-Proliferation sowie die Konzentration des proinflammatorischen TNF- α vermindert waren [224]. Zusätzlich wurde in weiteren Arbeiten durch Reinhold et al. beleget, dass unter DP IV-Hemmung mittels Lys[Z(NO₂)]-pyrrolidid und Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid auch eine Verminderung der DNS-Synthese in folgenden Zellsystemen auftrat: Pokeweed Mitogen (PWM)- und Phytohemagglutinin (PHA)-stimulierten humanen T-Zellen und mononukleären Zellen (MNZ) [187], in mitogen-stimulierten murinen Splenozyten und Thymozyten [188] sowie in Myelin-basisches Protein (MBP)-spezifischen CD4+-T-Zell-Klonen von Patienten mit multipler Sklerose, die eine starke Expression von DP IV aufwiesen [194]. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich unter Verwendung von murinen MBP-spezifischen T-Zell-Klonen [223]. Die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wichtige Akteure in der Pathogenese und zur Aufrechterhaltung von Autoimmunprozessen, wurde dabei in vitro durch die Inhibitoren konzentrationsabhängig reduziert, was sich für IL-2, IL-10, IL-12 und IFN-γ bei mitogen-stimulierten humanen T-Zellen und MNZ, für IL-2, IL-6 und IL-10 bei mitogen-stimulierten murinen Splenozyten und Thymozyten sowie für IFN- γ , TNF- α und IL-4 bei MBP-spezifischen T-Zell-Klonen nachweisen ließ [195]. Demgegenüber waren Konzentrationen des antiinflammatorischen TGF-β1 in Kulturüberständen von PWM-stimulierten MNZ und gereinigten T-Zellen unter Inhibitor-Wirkung drei- bis vierfach erhöht [187]. Und auch auf Ebene der mRNA war in Anwesenheit von Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid eine Zunahme von TGF-β1 zu verzeichnen [108]. Dieses Zytokin ist für antiproliferative Wirkung auf Immunzellen und seine erhebliche Rolle seine Entzündungsprozessen bekannt [131; 97], was den Schluss nahelegt, dass die Hemmung von Zellproliferation und Synthese proinflammatorischer Zytokine zumindest teilweise TGF-β1vermittelt ist. Untermauert wurde diese These durch die Aufhebung der DP IV-Inhibitorvermittelten DNS-Synthese-Hemmung in humanen T-Zellen und MNZ mittels eines neutralisierenden anti-TGF-β1-Antikörpers [187; 224]. Wichtig ist darüber hinaus zu erwähnen, dass die antiinflammatorischen Wirkungen der DP IV-Inhibitoren Lys[Z(NO2)]-pyrrolidid und Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid nicht auf Verarmung an Lymphozyten oder Zelltoxizität beruht; denn autoreaktive T-Zellen, die in der Lage sind die EAE zu übertragen, konnten aus Mäusen zurückgewonnen werden, die nach Gabe enzephalithogener T-Zellen mit Lys[Z(NO2)]-pyrrolidid behandelt worden waren [224]. Außerdem entwickelten Tiere erneut Symptome der EAE Wochen nachdem die Therapie mit Lys[Z(NO₂)]-pyrrolidid beendet worden war [224].

Im Immunsystem spielen neben DP IV weitere Vertreter aus der Familie der Post-Prolin Dipeptidyl Aminopeptidasen eine Rolle in der Regulation von T-Zell-Funktionen: So zu nennen Fibroblasten-Aktivierungs-Protein (FAP), Dipeptidylpeptidase 8 (DP8) und Dipeptidylpeptidase 9 (DP9), die zur DP IV-Genfamilie zählen sowie Dipeptidylpeptidase II (DP II) [1; 193; 209; 82]. Sie sind DP IV-aktivitäts- und/oder -strukturhomolog und haben an Aufmerksamkeit gewonnen, da eine Mitwirkung dieser Enzyme, speziell DP8 und DP9, an den Effekten durch sogenannte nicht-selektive DP IV-Inhibitoren vermutet wird [129; 193]. Überraschende Untersuchungsergebnisse ließen Zweifel an der alleinigen Wirkungsvermittlung durch DP IV-Inhibition aufkommen; zudem wurde die Annahme bestärkt, dass die Hemmung der cytosolischen Enzyme DP8 und DP9 stärker an der Wirkung beteiligt sein müssen als bisher bekannt [8]. So wurde gezeigt, dass die immunsuppressive Wirkung der für den Angriff am aktiven Zentrum von DP IV "zugeschnittenen", sogenannten selektiven Inhibitoren, schwächer ist, als die der nicht-selektiven DP IV-Inhibitoren und interessanterweise auch schwächer als die der selektiven DP8/DP9-Inhibitoren [8]. Weitere Fragen wurden durch Ergebnisse aus Versuchen mit DP IV-KO-Mäusen (C57BL/6) aufgeworfen, die zeigten, dass das Fehlen von DP IV keinen immunsuppressiven Phänotyp zur Folge hatte und DP IV-Expression für das Auftreten von Autoimmunität nicht essentiell war [181; 244]. Des Weiteren zeigten Splenozyten von DP IV-KO-Mäusen unter Einfluss nicht-selektiver DP IV-Inhibitoren einen mit Wildtyp-Splenozyten vergleichbaren Umfang an Reduktion der DNS-Synthese, was auch interessanterweise für einen selektiven DP8/DP9-Inhibitor zutraf [193]. Auch dieser reduzierte die DNS-Synthese mitogen-stimulierter Splenozyten von DP IV-KO- und Wildtypmäusen in vergleichbarem Umfang, was die Annahme unterstrich, dass neben DP IV weitere Zielstrukturen für die Inhibitor-vermittelte Modulation der Zell-Funktionen und die immunsuppressiven Effekte verantwortlich sein müssen, wie etwa die cytosolischen DP8 und DP9 [193]. Dagegen führten Bank et al. [16] 2011 an, dass der selektive DP8/DP9-Inhibitor allo-Ile-Isoindolin und der nichtselektive Inhibitor Lys[Z(NO2)]-pyrrolidid Plasmamembranen nicht leicht passieren und ihre Zielstrukturen daher nur in nicht-signifikanten Mengen erreichen können. Sie fanden, dass DP 8 und DP 9, für die eine rein cytosolische Lokalisation angenommen wurde, in geringem Umfang auch auf Zelloberflächen von Immunzellen exprimiert werden und insbesondere auch Hinweise für das Vorkommen dieser Enzyme auf der Oberfläche der Splenozyten von DP IV-KO-Mäusen [16].

Mit Entdeckung der sogenannten "central pore binding site" (CPBS) in der Nähe des aktiven Zentrums als entscheidende regulatorische Struktur von DP IV, gelangen Ansorge et al. [8] 2011 wichtige Erkenntnisse hinsichtlich Funktionen und molekularer Mechanismen. Mithilfe der Kenntnisse über die CPBS konnten erstmals plausible Erklärungen für widersprüchliche Ergebnisse aus Experimenten und für unaufgeklärte Funktionen angeboten werden. So waren auffällige Diskrepanzen bezüglich der Wirkung auf Glukoseregulation und Immunmodulation

unter Einfluss potenter, selektiver DP IV-Antagonisten festgestellt worden: Starke Glukoseregulierende Inhibitoren wie Sitagliptin oder Ile-Thiazolidid zeigten schwache antiproliferative Wirkungen, während stark immunwirksame Substanzen nur schwache Effekte auf die Glukoseregulation ausübten [8]. Es wurde herausgefunden, dass potente immunsuppressiv wirkende Inhibitoren mit allen drei der am häufigsten an der Interaktion mit Liganden und Substraten beteiligten Aminosäuren der CPBS stark interagierten, während beispielsweise schwach immunmodulierendes Sitagliptin dort nicht band, sondern ein anderes Motiv innerhalb der zentralen Pore bevorzugte, was die Bedeutung der CPBS als wichtige regulatorische Einheit unterstreicht [8]. Zudem stellte die Arbeitsgruppe fest, dass sogenannte selektive DP8-und DP9-Inhibitoren ebenfalls stark mit der CPBS von DP IV interagieren und die angenommene Selektivität dieser Inhibitoren damit lediglich für das aktive Zentrum gilt [8].

Des Weiteren wurden strukturelle Unterschiede zwischen der löslichen und der membrangebundenen Form von DP IV beschrieben. Membrangebundene DP IV ist räumlich eng in eine Vielzahl anderer Zelloberflächenproteinen, inklusive DP IV selbst, eingebunden, so dass die Möglichkeit für Substrate durch die große Seitenöffnung zum aktiven Zentrum zu gelangen stark limitiert ist und vermutlich nur der Weg über die zentrale Pore genutzt werden kann [8]. Dies steht im Gegensatz zur löslichen und für den Glukosemetabolismus entscheidenden Form der DP IV mit freiem Zugang zur Seitenöffnung und damit auch zum aktiven Zentrum, so dass insgesamt angenommen werden muss, dass freie und membrangebundene Form unterschiedliche Eingänge für Substrate/Liganden sowie möglicherweise insgesamt unterschiedliche enzymatische Funktionen aufweisen [8].

Zusammenfassend ist Dipeptidylpeptidase IV ein wesentlicher Akteur in der Regulation von Immunprozessen und direkt in die Pathomechanismen chronischer Entzündungen und Autoimmunität involviert. Gleichzeitig macht dies DP IV zu einer relevanten Zielstruktur für therapeutische Ansätze verschiedenster (entzündlicher) Erkrankungen, wie etwa der Multiplen Sklerose. Für diese konnte gezeigt werden, dass auf myelin-reaktiven T-Zell-Linien von MS-Patienten zum einen DP IV exprimiert wird und zum anderen diese Patienten einen erhöhten medianen Anteil DP IV-positiver-Zellen an CD4+-Zellen aufwiesen [105; 50].

Aufgrund bisheriger positiver Ergebnisse bezüglich der DP IV-Hemmung aus *in vivo*- und *in vitro*-Experimenten und trotz einiger offener Fragen hinsichtlich Funktion, molekularer Mechanismen und Regulation der DP IV, ist die Hemmung dieses Enzyms als Therapiekonzept bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen und in der Transplantationsmedizin denkbar. Im ersten Teil dieser Arbeit sollten neuartige Substanzen untersucht werde, die als kombinierte Dipeptidylpeptidase IV- und Aminopeptidase N (APN)-Hemmer zur Therapie autoimmuner Prozesse entworfen wurden. Dieses Konzept trägt den Namen "Peptidase-targeted Immunoregulation" (PETIR™).

1.1.2. Aminopeptidase N (APN, CD 13)

1.1.2.1. Struktur der APN

Die Aminopeptidase N (APN, EC 3.4.11.2) ist wie die Dipeptidylpeptidase IV ein Ektoenzym mit Exopeptidasefunktion und ist identisch mit dem Zelloberflächenantigen CD13. Es besitzt eine Genlänge von 35 kb mit 20 Exons und ist auf dem langen Arm von Chromosom 15 lokalisiert (15q25 - q26) [196]. Strukturell wird die APN zu den Typ II-Transmembranproteinen gezählt und formiert sich auf Zelloberflächen über nicht-kovalente Bindung zum Homodimer mit einer relativen Molekularmasse von 160 kDa pro Untereinheit [196]. Die APN verfügt über ein kurzes intrazelluläres Ende (acht bis zehn Aminosäuren des N-Terminus), einen Transmembran-Anker, einen kurzen extrazellulären Stiel und eine große Ektodomäne [38]. Chen et al. [38] beschrieben 2012 anhand der 1,85Å-Kristallstruktur die Ektodomäne von Schweine-APN (pAPN), die eine hohe genetische Sequenzidentität zur humanen Form aufweist, als Seepferdchen-förmig und aus einer Kopf-, Seiten-, Schwanz- und einer Körperdomäne mit Zinkbindendem aktiven Zentrum bestehend. Aktives Zentrum und Peptidbindungstelle der pAPN sind besonders gut für Peptide und Liganden zugänglich, da sie in zwei großen Höhlen liegen, die weite Öffnungen auf drei Seiten aufweisen, was ein einzigartiges Merkmal im Vergleich zu anderen Metalloenzymen der M1-Familie darstellt [38].

1.1.2.2. Expressionsmuster und Funktionen der APN

Die Aminopeptidase N weist eine weite Verteilung im Organismus auf und findet sich in der Leber, im Bürstensaum von Nieren- und Dünndarmepithelzellen sowie in der Plazenta in besonders hoher Aktivität [196]. Als Metalloexopeptidase spaltet die APN natürliche Substrate wie Zytokine, immunmodulatorische und vasoaktive Peptide sowie Neuropeptid-Hormone [196]. Die Vielfalt der durch APN prozessierten Peptide macht das Enzym zu einem Modulator eines breiten Spektrums biologischer Funktionen, mit Auswirkungen auf Schmerzempfinden, Stimmungs- und Blutdruckregulation, Angiogenese und weiterer physiologischer Prozesse [38]. Aminopeptidase N katalysiert die Entfernung unsubstituierter Aminosäuren bevorzugt mit neutralen, aber auch basischen oder sauren Seitenketten vom N-Terminus von Peptiden und Amiden oder Arylamidderivaten von Aminosäuren [211; 196; 135]. Peptidbindungen, denen die Aminosäure Prolin vorausgeht, sind APN-resistent [196]. Als natürliche Substrate werden kleine Peptide größeren Proteinen vorgezogen, wobei jedoch die katalytische Effektivität für Oligogegenüber Dipeptiden größer ist [211]. Neben der Enzymfunktion werden der APN die Beteiligung an der Regulation von Signaltransduktion durch Interaktion mit Neprilysin (NEP, CD10) und Rezeptorfunktion für Coronaviren zugeschrieben [211].

Nicht zuletzt ist die APN in ausgeprägter Weise im hämatopoetischen System vertreten, in dem das Molekül vornehmlich auf Zellen der myelo-monozytären Linie und den Vorläufern dieser

Zellen in allen Differenzierungsstadien sowie auf leukämischen Blasten der akuten myeloischen [84] und akuten lymphatischen Leukämie [218] nachweisbar ist und APN zu einem diagnostischen Marker dieser Erkrankungen macht.

1.1.2.3. Rolle der APN im Immunsystem

Die Aminopeptidase N wird im Gegensatz zur DP IV auf ruhenden reifen T-Zellen nicht exprimiert, ist jedoch auf aktivierten und T-Zellen am Ort der Entzündung nachweisebar [192; 137]. Lendeckel et al. [137] demonstrierten dies mittels Stimulation humaner T-Zellen durch Mitogene, IL-2 und anti-CD3-Antikörpern und nachfolgend zunehmender Mengen an APN-mRNA sowie starker Steigerung der APN-Expression auf T-Zellen. Auf T- und B-Zellen frühester Differenzierungsstadien ist die APN jedoch im Gegensatz zu reifen Zellen bereits primär nachweisbar, bevor diese im Verlauf der Zellreifung APN-negativ werden [222].

Anhand von Untersuchungen unter Einsatz unterschiedlicher APN-Inhibitoren wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass dieses Enzym unter anderem durch Degradation von Zytokinen und anderen immunologisch relevanten Peptiden immunmodulierend wirkt und Leukozytenfunktionen beeinflusst [192]. Neben der enzymatischen Spaltung von immunmodulierenden Zytokinen gaben andere Untersuchungen Anlass zu der Annahme, dass APN auch an der Zelloberflächen-Prozessierung von Antigenen beteiligt ist, indem sie aus Haupthistokompatibilitätskomplex Typ II (MHC II)-Molekülen überstehende Peptide beschneidet [130].

Experimente zur Untersuchung von Funktionen der APN wurden unter anderem mit den spezifischen Inhibitoren Actinonin und Probestin durchgeführt. Diese sind in der Lage dosisabhängig die DNS-Synthese und die Freisetzung von proinflammatorischem IL-1β und IL-2 stimulierter T-Zellen und MNZ zu vermindern sowie die TGF-β1-Expression dieser Zellen zu induzieren [137; 128; 96; 192]. Des Weiteren demonstrierten Reinhold et al. [192], dass dieselben APN-Inhibitoren *in vivo* wirksam sind und die Symptome der EAE in SJL/J-Mäusen lindern, was APN zu einem potentiellen Kandidaten für zielgerichtete pharmakologische Therapieansätze macht.

Insgesamt ist die Relevanz der APN im Immunsystem, insbesondere die Beteiligung in Entzündung und Autoimmunität, unbestritten. Besonders betont werden muss die deutliche antiinflammatorische Wirkung, die sich durch die gezielte Hemmung dieses Enzyms sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* erzielen lässt. Dennoch bedürfen vor allem die nicht-enzymatischen Funktionen der APN, die im Immunsystem für Ektopeptidasen belegt sind, wie Mitwirkung an Signaltransduktion und Rezeptorfunktion hinsichtlich ihrer Wirkmechanismen und Interaktionen mit ko-lokalisierten Peptidasen weiterer Aufklärungsarbeit.

1.1.3. Duale Inhibitoren von Dipeptidylpeptidase IV und Aminopeptidase N: "Peptidasetargeted Immunoregulation" (PETIR™)

Die Ektopeptidasen Dipeptidylpeptidase IV und Aminopeptidase N sind seit längerem als Regulatoren vieler biologischer Prozesse und als wichtige Modulatoren des Immunsystems bekannt. Regulation und Funktionen beider Enzyme sind in den vergangenen Jahren eingehend untersucht und beschrieben worden, jedoch bisher nicht umfänglich aufgeklärt und verstanden. Wichtige Erkenntnisse wurden dabei aus Experimenten mit unterschiedlichen spezifischen und unspezifischen DP IV- und APN-Inhibitoren gesammelt, deren *in vitro*- und *in vivo*-Wirkungen eingangs beschrieben worden sind. Die Behandlung von Zellen des Immunsystems mit Inhibitoren von DP IV und APN führt zu einer Verminderung der Immunantwort *in vitro* und *in vivo*, die hauptsächlich durch Verringerung der Lymphozytenproliferation, reduzierte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine sowie Induktion des antiinflammatorischen TGF-β1 vermittelt wird [137; 192; 188; 187; 194; 108; 224; 195; 7; 15]. Bedeutsam ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass den DP IV- und APN-vermittelten Funktionen zum Teil unterschiedliche Mechanismen und Signalwege zugrunde liegen, und DP IV- und APN-Inhibitoren unterschiedliche T-Zell-Populationen beeinflussen [7; 190; 17; 137].

Naheliegend war deshalb zu untersuchen, ob die immunmodulierenden Wirkungen der bisher einzeln eingesetzten DP IV- und APN-Inhibitoren durch den kombinierten Einsatz, das heißt, je ein DP IV- und zusätzlich ein APN-Inhibitor, verstärkt werden können. In mehreren Versuchen konnte so demonstriert werden, dass diese kombinierte DP IV-/ APN-Inhibition in der Lage war, die DNS-Synthese von PHA- oder PWM-stimulierten humanen MNZ und T-Zellen zu reduzieren und dies darüber hinaus in größerem Umfang als unter separatem Einsatz der jeweiligen Einzelsubstanzen [192; 191; 190]. Dieser Synergismus durch duale Inhibition wurde auch für die Reduktion der DNS-Synthese PWM-stimulierter Splenozyten von C57BL/6-Mäusen sowie für die reduzierte Freisetzung von proinflammatorischem IL-17 aus stimulierten humanen MNZ, T-Zellen und Maus-Splenozyten gezeigt [190]. Die Wirkung auf die Induktion von TGF-β1 war dabei additiv für die Kombination von Lys[Z(NO₂)]-pyrrolidid und Actinonin und superadditiv für Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid und Actinonin [192]. Überlegen war die kombinierte DP IV-/APN-Inhibition mit Lys[Z(NO₂)]-pyrrolidid und Actinonin auch im Mausmodell der Colitis durch stärkere Reduktion der Symptome [15].

Der nächste Schritt auf Basis dieser Ergebnisse war die Entwicklung von Substanzen, die in der Lage sind, in Form einer einzigen Substanz simultan sowohl DP IV als auch APN zu hemmen. Die *IMTM GmbH*, Magdeburg, hat erstmalig solche Substanzen unter dem Konzept "Peptidasetargeted Immunoregulation" (PETIR™) hergestellt und in Kooperation mit dem *Institut für Molekulare und Klinische Immunologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg* deren Wirkung untersucht [7; 15]. Ein besonderes strukturelles und funktionelles Merkmal dieser Inhibitoren ist die Kombination je eines DP IV- und APN-bindenden Motivs, die über

Disulfidbrücken kovalent verbunden sind [7]. Die Lösung dieser Bindung durch reduktive Spaltung oder Kontakt mit vitalen Zellen führt anschließend zur Freisetzung zweier aktiver Inhibitoren mit Spezifität für DP IV und APN [7].

In dieser Arbeit sollten zwei weitere duale DP IV-/ APN-Inhibitoren des PETIR™-Konzepts, PETIR-001 und PETIR-004, hinsichtlich ihrer antiinflammatorischen Wirkung *in vitro* und *in vivo* am Mausmodell der Multiplen Sklerose, der EAE, einer T-Zell-vermittelten entzündlichen Erkrankung des zentralen Nervensystems, untersucht werden [215; 214; 213; 8]. In ersten vorausgegangenen Experimenten waren für PETIR-001 bereits positive Ergebnisse zu verzeichnen: Es zeigte sich, dass PETIR-001 in der Lage ist, die Proliferation stimulierter humaner T-Zellen dosisabhängig zu reduzieren, die Symptome der EAE in SJL/J-Mäusen nach intraperitonealer und insbesondere auch nach peroraler Applikation zu lindern sowie die Anzahl entzündlicher Läsionen im ZNS zu supprimieren [189]. Diese ersten Ergebnisse aus diesen PETIR-001-Untersuchungen liefern weitere starke Hinweise für die mögliche Eignung von PETIR™ als neues Therapiekonzept für chronische entzündliche und autoimmune Erkrankungen.

1.2. Bedeutung von Minocyclin und A-Ring-aromatisierten Acetylminocyclinen im Immunsystem und für Erkrankungen des zentralen Nervensystems

1.2.1. Minocyclin: Pharmakologische Charakteristika und therapeutischer Einsatz

Minocyclin ist ein semi-synthetisches Tetracyclinderivat und wird klinisch neben den anderen relevanten Vertretern der Tetracyclingruppe, Doxycyclin, Tetracyclin und dem auch zur Gruppe der Glycylcycline gerechneten Tigecyclin, als bakteriostatisch wirksames Breitbandantibiotikum gegen zahlreiche grampositive und gramnegative Bakterien, mit besonders guter Wirksamkeit gegen intrazelluläre Erreger eingesetzt [164]. Die Substanz wurde 1967 als Arzneimittel eingeführt und kommt aktuell zur Behandlung von Infektionen im HNO-Bereich und der Atemwege, des Urogenital- und Gastrointestinaltrakts sowie anderer infektiöser Erkrankungen wie Borreliose und Listeriose zum Einsatz. Zusätzlich zum antibakteriellen Effekt wirkt Minocyclin antiinflammatorisch und ist in der Lage, in Talg enthaltende Fettsäuren zu reduzieren, was Minocyclin zu einem geeigneten Therapeutikum für Hauterkrankungen wie der mittelschweren bis schweren Akne vulgaris [100; 81] und der Rosazea macht [257]. Vorteilhaft bei der Therapie dieser chronischen Erkrankungen ist eine geringe Tendenz zur Entwicklung von Resistenzen [257].

Hinsichtlich der Pharmakokinetik zeichnet sich Minocyclin durch eine nahezu vollständige Resorption aus dem Darm aus [164]. Jedoch kann durch die gleichzeitige Aufnahme insbesondere von Milch und Eisen, aber auch sonstiger Nahrung die enterale Resorption signifikant herabgesetzt und damit die für die Wirkung relevante Bioverfügbarkeit reduziert werden [140]. Die maximale Serumkonzentration von Minocyclin wird ohne hemmende Einflüsse ein bis vier Stunden nach Aufnahme erreicht [27], während die relativ lange Halbwertszeit von 12 bis 24 Stunden vermutlich unter anderem auf einen enterohepatischen Kreislauf [164], aber auch auf die hohe Lipophilie zurückzuführen ist. Letztere ist neben den bereits genannten Faktoren Löslichkeit und Permeabilität für die Aufnahme und Verteilung von Stoffen im Organismus entscheidend und führt im Falle von Minocyclin durch Abwanderung in Gewebe und Fettgewebe bei Menschen zu einem großen Verteilungsvolumen von 80 bis 150 l [203]. Die gute Lipophilie (zehnfach größer verglichen mit Tetracyclin und fünffach größer als Doxycyclin [53]) wird durch Modifikation der Ausgangsstruktur Tetracyclin mittels Substitution einer Dimethylaminogruppe an C7 und dem Entfernen der hydrophilen C6-Hydroxylgruppe erreicht, deren Folge die erleichterte Passage Minocyclins durch Membranen und insbesondere auch durch die Blut-Hirn-Schranke ist [81; 203]. Letzt genannter Punkt ist besonders in den Fokus des Interesses getreten, nachdem herausgefunden wurde, dass Minocyclin nicht nur antibiotische und antiinflammatorische Wirkungen besitzt, sondern auch neuroprotektive Effekte vermittelt und in der Lage ist, positive Wirkungen auf verschiedene neurologische Erkrankungen und andere Störungen des zentralen Nervensystems auszuüben, wie etwa Multiple Sklerose

(MS), Morbus Parkinson und Morbus Huntington sowie nach cerebraler Ischämie und Rückenmarksverletzungen [259; 260; 257; 27].

Abbildung 3: Strukturformel Minocyclins

Hinsichtlich der Aufnahme Minocyclins in das ZNS konnte in Studien mit Ratten gezeigt werden, dass die Konzentration der Substanz im Gehirn vier Stunden nach Applikation etwa 35 % der Plasmakonzentration erreichte [45]. Aufgrund des linearen Zusammenhangs zwischen den Konzentrationen von Minocyclin in Plasma und Gehirn, ist ein Transport der Substanz durch die Blut-Hirn-Schranke mittels passiver Diffusion anzunehmen [45]. Nach oraler Minocyclin-Applikation wurden Liquorkonzentrationen von 25 bis 30 % verglichen mit denen im Plasma ermittelt, was diese Substanz gegenüber den bisher verfügbaren Derivaten hinsichtlich der Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, überlegen macht [45; 30]. Einschränkend gaben die Autoren Colovic et al. [45] an, dass in den Nagetierstudien keine Bestimmung des Grads der Plasmaeiweißbindung (PEB) der Tetracycline erfolgte und das ermittelte Gehirn-Plasma-Verhältnis möglicherweise nicht die wahre Verteilung widerspiegelt, sondern die ermittelte Aufnahme der ungebundenen Substanzen in das Gehirn auf Basis der absoluten Plasmakonzentrationen möglicherweise unterschätzt worden ist. Die PEB für Minocyclin im Menschen liegt bei etwa 70 bis 80 % [45].

Tetracycline werden partiell biotransformiert und biliär sowie renal ausgeschieden [164]. Die renale Clearance hängt zwar linear von der Nierenfunktion ab, die Eliminationsrate ist aber praktisch von dieser unabhängig, weil nur 9 bis 19 % der absorbierten Substanz unverändert über den Urin ausgeschieden werden [216].

Minocyclin ist generell gut verträglich und wird auch bei Langzeitanwendung in der höchsten empfohlenen Dosierung von 200 mg pro Tag als sicher eingestuft [41; 227]. Dennoch sind unerwünschte Arzneimittelwirkungen bekannt, wie zum Beispiel die Einlagerung der Substanz in kollagenreiche Gewebe wie Knochen und Zähne mit der Folge von Störungen des Knochenwachstums, Schmelzhypoplasie und Gelbfärbung der Zähne, die der Eigenschaft der Chelatbildung mit mehrwertigen Kationen (Calcium) geschuldet ist [134; 81; 164]. Des Weiteren wurden Photodermatosen und selten Fetteinlagerung in die Leber mit Azotämie und Azidose

beschrieben, ebenfalls selten Blutbildveränderungen und Angioödem [134]. Aufmerksamkeit haben Beobachtungen von Autoimmunphänomenen unter der Therapie mit Minocyclin erregt: El-Hallak et al. [60] berichteten beispielsweise von Minocyclin-induzierter Autoimmunität bei Kindern in Form von Polyathralgien und Polyarthritis. Weitere Studien bestätigten diese Beobachtungen und erwähnten des Weiteren Fälle von Autoimmunhepatitis sowie Lungen- und Hautbeteiligung [162; 237; 61]. Bei diesen Patienten wurden häufig antinukleäre Antikörper (ANA), perinukleäre ANCA (pANCA) und Antikörper gegen Myeloperoxidase (MPO) nachgewiesen, wie sie bei anderen Autoimmunerkrankungen, insbesondere einigen Kollagenosen typischerweise gefunden werden [162].

1.2.2. Immunmodulation und Neuroprotektion sowie Einfluss Minocyclins auf die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis und Multiple Sklerose

Seit den 90er Jahren gewinnt Minocyclin zunehmend an Interesse in der Behandlung von Erkrankungen des zentralen Nervensystems, nachdem in zahlreichen Experimenten und Studien günstige Effekte durch alleinigen oder kombinierten Einsatz mit weiteren Substanzen, insbesondere auch bei Patienten mit MS und deren Tiermodell, der EAE, beobachtet werden konnten [34; 180; 41; 77; 146; 201; 39; 157; 156]. Mehrere Arbeitsgruppen demonstrierten, dass Minocyclin antiinflammatorische, immunmodulierende und neuroprotektive Effekte ausübt, die zusätzlich zur ursprünglich beabsichtigten antibiotischen Hauptwirkung zum Tragen kommen [41; 34; 165; 180; 147; 261; 5].

Die antiinflammatorischen Wirkungen Minocyclins sind zum einen auf die Beeinflussung von Lymphozytenproliferation und deren Funktion, etwa durch reduzierte Sekretion proinflammatorischer Zytokine zurückzuführen [120]. Zum anderen werden Matrix-Metalloproteasen (MMP) und Mikroglia, wichtige Akteure in der MS-Pathogenese, durch Minocyclin in ihrer Funktion beeinflusst [80; 34]. Für die nachgewiesene Neuroprotektion durch Minocyclin werden nicht zuletzt die Induktion antiapoptotischer Signalwege und eine Verminderung der Glutamat-Exzitotoxizität vermutet [258]. Auch direkte antioxidative Effekte werden für die erwähnten Wirkungen verantwortlich gemacht [125] und eine Induktion von MCPIP1-Protein, das als Modulator inflammatorischer Reaktionen und Neuroprotektion verantwortlich gemacht wird [106].

Die positiven Effekte Minocyclins auf entzündliche und degenerative Erkrankungen des zentralen Nervensystems sind vielfach untersucht und bestätigt worden. Ein besonders häufig verwendetes Tiermodell der in Menschen auftretenden Multiplen Sklerose ist die EAE, deren Symptome in verschiedenen Ratten- und Mäusestämmen durch die präventive oder therapeutische Behandlung mit Minocyclin reduziert werden konnten: Popovic et al. [180]

zeigten dies anhand der chronischen schubförmig-remittierenden sowie der letalen Form der EAE in Dark Augouti-Ratten nach intraperitonealer Minocyclin-Applikation. Ebenfalls profitierten C57BL/6-Mäuse mit schwerer oder milder chronischer, nicht-remittierender EAE [34] sowie Dark Augouti- und Sprague-Dawley-Ratten mit biphasischer EAE [168; 167] von i.p.-appliziertem Minocyclin. Nessler et al. [165] machten die interessante Beobachtung, dass die Wirkung von oral appliziertem Minocyclin gegenüber dem intraperitonealen Weg schwächer in Bezug auf die Reduktion der Symptome von durch adoptiven Transfer ausgelöster EAE in Mäusen war und stellten die Hypothese auf, dass dieser Effekt auf eine Stress-induzierte Immunsuppression durch intraperitoneale Applikation zurückzuführen sein könnte [41]. Des Weiteren wurde herausgefunden, dass eine zusätzlich zur systemischen Minocyclin-Gabe durchgeführte lokale intracerebrale Applikation hoher Dosen vorteilhaft gegenüber der alleinigen intraperitonealen Gabe ist, was zu der Annahme führte, dass die Exposition neuraler Zellen mit Minocyclin in hohen Konzentrationen eine wichtige Voraussetzung für den Effekt der Neuroprotektion darstellt [251].

Neben EAE-Experimenten wurden in den letzten Jahren klinische Studien zur Minocyclin-Wirkung an MS-Patienten durchgeführt, die vor allem Aufklärung zur Wirksamkeit und Verträglichkeit des Präparats ermöglichen sollten. Dabei wurde in mehreren kleinen Studien (je zehn Patienten) demonstriert, dass sowohl die Schubrate der schubförmig-remittierenden MS (RRMS), als auch die durchschnittliche Anzahl kontrastmittelaufnehmender cerebraler Läsionen im MRT reduziert und die lokale Hirnatrophie nach oraler Einnahme von zweimal 100 mg Minocyclin pro Tag verlangsamt werden konnten [157; 261; 264; 41]. In einer dreijährigen Behandlungsperiode war Minocyclin insgesamt gut verträglich, es traten bei den Probanden weder klinisch signifikante Abnormitäten noch anhaltende Veränderungen von Laborparametern auf [41]. Positive Ergebnisse bezüglich der Minocyclin-Wirkung erzielten Metz et al. 2009 [156] darüber hinaus anhand einer multizentrischen, doppel-blinden und Placebo-kontrollierten Phase II-Studie an 44 Patienten mit RRMS in Kanada, in der der Effekt von zweimal 100 mg Minocyclin täglich als Add-on-Therapie zusätzlich zur täglichen einmaligen subkutanen Gabe von 20 mg Glatirameracetat (GA), einem Standardmedikament in der Therapie der RRMS, untersucht worden war. Die Auswertung erbrachte Vorteile für die Kombinationstherapie in Bezug auf Reduktion von MRT-Läsionen und Schubrisiko und zeigte, dass diese Therapieoption insgesamt sicher und gut verträglich war [156].

In weiteren EAE-Experimenten unter Einsatz von oral oder intraperitoneal appliziertem Minocyclin plus IFN-β, GA, Prednison oder Methylprednisolon waren die Kombinationstherapien hinsichtlich des Krankheitsverlaufs, der MRT- oder der histopathologischen Befunde den jeweiligen Monotherapien teils signifikant überlegen [76; 75; 39; 42; 41].

Zusammenfassend ist Minocyclin eine Substanz, die sich durch sehr gute Resorption und gute ZNS-Gängigkeit nach oraler Applikation auszeichnet. Sie wird seit vielen Jahren als Chemotherapeutikum gegen infektiöse Erreger eingesetzt, ist nebenwirkungsarm, kostengünstig und bietet sich zur Kombinationstherapie mit anderen, bereits in der MS-Therapie erprobten und routinemäßig eingesetzten Arzneimitteln an, was die Reduzierung der Dosen und potentieller Nebenwirkungen der Substanzen ermöglicht [41]. Der Einsatz von Minocyclin stellt in der Therapie der MS aufgrund der beschriebenen immunmodulierenden und neuroprotektiven Effekte, die sowohl *in vitro*, in der EAE, aber auch in klinischen Studien an Patienten mit MS demonstriert werden konnten, einen möglichen Ansatz dar.

1.2.3. Pentaacetylcyclin, ein A-Ring-aromatisiertes Acetylminocyclin

Auf der Basis bisher bekannter und bestätigter Wirkungen des zur Gruppe der Tetracycline zählenden Minocyclins auf inflammatorische und degenerative Prozesse des zentralen Nervensystems wurden durch Lorenz et al., *Institut für Biochemie und Zellbiologie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg* [177], zur Erweiterung der Einsatzmöglichkeiten dieser Substanz Derivate des Minocyclins, so genannte A-Ring-aromatisierte Acetylminocycline entwickelt. Gemeinsam ist diesen Verbindungen die Leitstruktur des Minocyclins und die ihnen zugeschriebene Wirksamkeit für die Behandlung von durch oxidativen Stress und/ oder mitochondrialer Schädigung vermittelten neurodegenerativen Erkrankungen [176]. Unter der Patentnummer WO 2009/012741 A1 wird ein durch die Arbeitsgruppe erfundenes Verfahren zur Synthese dieser Substanzen, inklusive der des Pentaacetylcyclins aufgeführt. Dieses soll zum einen für industrielle Maßstäbe geeignet und von geringem Aufwand sein [177]. Zum anderen werden durch die chemischen Modifikationen Minocyclins insbesondere zwei Ziele verfolgt: 1) Optimierung der Pharmakokinetik durch Umsetzung des Prodrug-Konzepts und 2) Aufhebung der antibiotischen Aktivität zur Vermeidung eines Selektionsdrucks als Grundlage von Antibiotikaresistenzen [177].

Prodrugs sind Stoffe, die erst nach Metabolisierung im Organismus in pharmakologisch vollständig wirksame Substanzen umgewandelt werden. Die Applikation der Prodrug-Form wird unter anderem zur Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften einer Substanz verwendet [164]. So kann beispielsweise durch eine größere Lipophilie und damit häufig größere Permeabilität eine bessere Resorption und Bioverfügbarkeit eines Stoffes erreicht werden [164].

Abbildung 4: Strukturformel Pentaacetylcyclins

Pentaacetylcyclin verfügt verglichen mit Minocyclin über fünf Acetyl-Gruppen, die als apolare Schutzgruppen die hydrophile Amino- und die vier Hydroxyl-Gruppen maskieren [177]. Diese Substituenten führen zu einer erhöhten Wechselwirkung bei geringerer Abstoßung der Substanz mit Membranlipiden und ermöglichen ihr so eine erleichterte Diffusion in Gewebe und Zellen und insbesondere auch die vereinfachte Passage durch die Blut-Hirn-Schranke [177]. Am Zielort angelangt, spalten unspezifische Esterasen die Acetyl-Gruppen des Prodrugs Pentaacetylcyclin ab und setzen schließlich die pharmakologisch wirksame Substanz, A-Ringaromatisiertes Minocyclin frei, das zwar neuroprotektive, aber keine antibiotische Aktivität aufweist [177]. Die fehlende bakteriostatische Wirkung Pentaacetylcyclins gegenüber Minocyclin wurde unter Verwendung des Plattendiffusionstestes und ausbleibender Wachstumshemmung eines E. coli-Stammes belegt [177]. Die Prüfung der zell- respektive neuroprotektiven Wirkeigenschaften erbrachte für Pentaacetylcyclin verglichen mit Minocyclin bereits bei niedrigeren Dosen einen Schutzeffekt gegenüber Wasserstoffperoxid-induzierten Schäden von Astrozyten und Mitochondrien (ab 1,0 μM Pentaacetylcyclin beziehungsweise 25μM Minocyclin), was einen weiteren Vorteil dieser Substanz darstellt [177].

Aufgrund der Wirkeigenschaften und der bisher experimentell erhobenen Daten stellt der Einsatz Pentaacetylcyclins einen interessanten Ansatz zur Prävention und Therapie von T-Zellvermittelten Erkrankungen und Störungen wie Allergien, Autoimmunerkrankungen und Transplantatabstoßungsreaktionen dar. In dieser Arbeit werden die Effekte Pentaacetylcyclins auf Immunfunktionen genauer charakterisiert und insbesondere auch hinsichtlich einer potentiellen Überlegenheit gegenüber der Leitsubstanz Minocyclin auf der Basis von *in vitro*-und *in vivo*-Experimenten untersucht.

1.3. Multiple Sklerose

1.3.1. Epidemiologie

Multiple Sklerose (MS) ist eine immunvermittelte neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) mit einer Prävalenz von 191 auf 100.000 und einer Inzidenz von 7,3 auf 100.000 Menschen unter der weißen US-Bevölkerung [110; 149]. Weltweit sind etwa 1 bis 2,5 Million Menschen, in Deutschland etwa 122.000 [205] von dieser, der häufigsten demyelinisierenden Erkrankung betroffen.

Die globale geographische Verteilung der Erkrankung ist ausgesprochen inhomogen. So zeigen sich die höchsten Prävalenzraten im überwiegend von Weißen bewohnten Westeuropa und Nordamerika, während die niedrigsten Raten - vorbehaltlich geringer Anzahl an Studien - in den Regionen Mittlerer Osten, Asien und Afrika [121] zu verzeichnen sind. Differenziert betrachtet werden muss der allgemein akzeptierte Breitengradeffekt bezüglich der MS-Verteilung. So analysierten Koch-Henriksen und Soelberg Sørensen [121] Daten zur Prävalenz und Inzidenz der MS und fanden heraus, dass lediglich für die südliche Hemisphäre eine Inzidenzzunahme mit zunehmendem Breitengrad vorliegt. Ein für den Breitengradeffekt wahrscheinlich mitverantwortlicher Faktor stellt die Exposition mit ultravioletter Strahlung dar. Die Inzidenzzunahme bei Frauen deutet zudem auf den Einfluss von populationsbezogenen Umweltfaktoren auf das MS-Risiko hin. In den letzten Jahrzehnten trat eine stärkere Lebensstilveränderung bei Frauen hinsichtlich Nikotinkonsum, Geburtenkontrolle und die späte Geburt von Kindern auf [121].

Familiäre Häufungen der MS und ein vom Verwandtschaftsgrad abhängiges Erkrankungsrisiko deuten zudem auf die Beteiligung genetischer Faktoren hin [205]. Dabei ist die MS keine klassische Erbkrankheit, jedoch wird auf der Grundlage von Kopplungsanalysen und Assoziationsstudien sowie der Tatsache relativ niedriger Konkordanzraten (26 % für monozygote Zwillinge gegenüber ca. 3,5 % für dizygote Zwillinge und Geschwister) eine polygenetische Vererbung angenommen [205]. Bereits in den 70er Jahren wurde eine Assoziation zwischen MS und MHC-Allelen (DR15 und DQ6) identifiziert [170; 47].

In Migrationsstudien konnte nachgewiesen werden, dass Menschen nach Migration das Erkrankungsrisiko des Gastlands annehmen, wenn diese bis kurz vor der Pubertät stattfand, woraus sich schließen lässt, dass hauptsächlich die ersten beiden Lebensjahrzehnte maßgeblich für das zukünftige Risiko sind, an MS zu erkranken [127; 74]. Die für die Erkrankungsentstehung verantwortlichen Prozesse finden demnach bereits Jahre vor der Manifestation statt.

Besonderes Augenmerk hinsichtlich Umweltfaktoren in der Pathogenese der MS wird auf infektiöse Erkrankungen gelegt. Während widersprüchliche Ergebnisse zu Assoziationen zwischen Erkrankungen wie Masern, Mumps und Röteln sowie den Erregern Humanes Herpesvirus Typ 6 (HHV-6) oder Chlamydia pneumoniae und der Entstehung einer MS

gesammelt wurden, ist insbesondere das Epstein-Barr-Virus (EBV) als infektiöses Agens in den Fokus des Interesses gerückt [205]. Verschiedene Arbeitsgruppen fanden einen starken Zusammenhang zwischen EBV-Infektionen und MS: Cepok et al. [37] identifizierten als Epitope bei den zwei häufigsten MS-spezifischen Reaktionen Peptidsequenzen aus EBV-Proteinen (BRRF2 und EBNA-1), die in latent infizierten Zellen vorkommen. Eine immunologische Kreuzreaktion mit ZNS-Antigenen könnte schließlich mitursächlich im Rahmen der Pathogenese sein. Zahlreiche weitere Feststellungen unterstützen die EBV-Hypothese, so zum Beispiel: a) Starke und konsistente Assoziation zwischen EBV-Serumpositivität und MS [12], b) höhere EBV-Serumtiter in MS-Patienten im Vergleich zu Gesunden [37], c) positive Korrelation zwischen der Höhe des EBV-Antikörper-Titers und des MS-Risikos [139], d) Kinder, die eine MS entwickeln zeigen eine höhere Immunantwort auf EBV, jedoch nicht auf andere virale Pathogene [6], e) erhöhte EBV-DNS-Level in MS-Patienten während eines Schubes [67]. Insgesamt wird das Risiko einer MS-Erkrankung am ehesten aus der Kombination verschiedener Umweltfaktoren und einem genetischen Hintergrund bestimmt.

1.3.2. Immunpathogenese der MS

Auch nach langjährigen intensiven Forschungsbemühungen sind die Pathomechanismen der MS noch nicht vollständig aufgeklärt. Nach heutigem Kenntnisstand handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems, bei der die Selbsttoleranz gegenüber Autoantigenen des ZNS' verloren gegangen ist [118]. Im Rahmen der Immunpathogenese werden im peripheren Blut zunächst autoreaktive T-Zellen, vermutlich durch den Mechanismus des molekularen Mimikry, bei dem gegen Fremdantigene z. B. viraler oder bakterieller Herkunft gebildete T-Zellen mit Epitopen ähnlicher Sequenz von Selbst-Antigenen kreuzreagieren, gebildet [163; 249; 225]. Kritisch und für einen progressiven Verlauf möglicherweise maßgeblich begünstigend wirkt sich die Diversifikation des autoreaktiven T-Zell-Repertoires auf der Basis des sogenannten "determination spreading" (oder "epitope spreading") aus: Lehmann et al. [133] zeigten, dass nach Induktion einer EAE in Mäusen mittels Immunisierung ausschließlich gegen selektive Peptide (Ac1-11) des Myelin basic protein (MBP) während einer chronischen EAE auch weitere Peptidsequenzen des MBP immunogen wurden und Zell-Proliferation auslösten. Die Prävention einer solchen zweiten "Immunisierungswelle" gegen Autoantigene stellt damit einen therapeutischen Ansatz dar [72; 133].

Neben dem molekularen Mimikry wird auch die T-Zell-Aktivierung in cervikalen Lymphknoten durch dort präsentierte Myelin-Antigene und die Mitwirkung von Superantigenen postuliert, aber ebenfalls angemerkt, dass auch ein Versagen immunologischer Toleranzmechanismen statt einer vermehrten Bildung autoreaktiver T-Zellen in Erwägung gezogen werden muss [46; 225]. Es folgt die Migration der autoreaktiven T-Zellen durch die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS (vgl. Abbildung 5). Dieser Vorgang wird durch mindestens drei Faktoren begünstigt: 1) Interaktion

zwischen Adhäsionsmolekülen, insbesondere die für die Leukozyten-Extravasation interagierenden very late activation antigen-4 (VLA-4), auf der Oberfläche von aktivierten Leukozyten gehäuft vorkommend, und vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), das auf kapillären Endothelzellen exprimiert wird 2) Abbau extrazellulärer Matrix und Basalmembranen sowie Zytokin-Aktivierung durch Matrix-Metalloproteasen zum Beispiel MMP-9 und 3) Chemokine, die an entsprechende Rezeptoren auf zirkulierenden Leukozyten binden und die Rekrutierung und Migration in das ZNS determinieren [46].

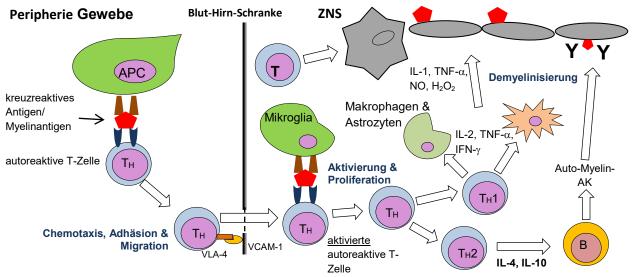


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Immunpathogenese der MS (nach Kleinschnitz et al. [118], Mecha et al. [151], Pezzutto et al. [178])

Im ZNS angelangt erfolgt die Reaktivierung der myelin-spezifischen CD4+-T-Zellen, wenn diesen Myelin-Antigene auf MHC-Klasse II-Molekülen von APCs (Mikroglia-Zellen und perivaskulärer Makrophagen) präsentiert werden [212; 46]. Aus der Aktivierung resultiert die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie etwa IFN- γ , TNF- α und IL-2, die zur Schädigung der Blut-Hirn-Schranke beitragen und durch Chemotaxis weitere Entzündungszellen in das ZNS rekrutieren [46]. Im Verlauf treten entzündliche Demyelinisierung und axonale Schäden auf, die Grundlagen neurologischer Beeinträchtigungen sind.

Unter den CD4+-T-Zellen werden insbesondere den Subpopulationen Th1 und Th17 und den für sie jeweils typischen Zytokinprofilen in der Immunpathogenese der MS wichtige Rollen zugeschrieben. Neben dem für die MS bekannten Th1-/Th2-Ungleichgewicht zu Gunsten des Th1-Wegs mit Überwiegen der Zytokine IFN- γ und IL-2 gewinnen Th17-Zellen und ihre Zytokine IL-17, IL-21 und IL-22 als Regulatoren der Inflammation und Effektoren der MS-Immunpathogenese Bedeutung [234; 51]. Experimentell wurde die Induktion zur Differenzierung muriner naiver T-Zellen in Th17-Zellen durch IL-6 und TGF- β belegt [55; 21; 102]. IL-23 ist essentiell für die Aufrechterhaltung und/ oder Expansion muriner Th17-Zellen [55], IL-1 β und

TNF- α verstärken deren Entwicklung [116; 229], wohingegen IFN- γ aus Th1-Zellen und IL-4 als typisches Th2-Zytokin die Th17-Differenzierung hemmen [173].

IL-17 wirkt direkt auf die Blut-Hirn-Schranke, indem durch Bindung an den endothelialen IL-17-Rezeptor eine Verminderung der Tight-Junction-Protein-Expression erreicht und die Migration von Entzündungszellen in das ZNS begünstigt werden [115]. Das Zytokin besitzt pleiotrope Wirkungen auf Gewebe- und Immunzellen, mobilisiert neutrophile Granulozyten, induziert multiple Chemokine und Zytokine [55] und ist an der Abwehr bakterieller und fungaler Erreger beteiligt [99; 43]. Für IL-21, ebenfalls ein Th17-assoziiertes Zytokin, werden unter anderem ein positiver autokriner Einfluss auf die Th17-Entwicklung [55] sowie eine starke proliferative Wirkung auf B-Zellen, Förderung von Isotypen-Switch und Plasmazell-Differenzierung angenommen [65].

Untersuchungen an MS-Patienten und im EAE-Modell unterstützen die Annahme, dass Th17-Zellen an der Immunpathogenese maßgeblich beteiligt sind. So ließen sich erhöhte IL-17-Expressionen in Blut, Liquor und Hirngewebe von MS-Patienten nachweisen [241; 13], und Zellen, die IL-17 exprimierten, konnten die Blut-Hirn-Schranke überwinden und sammelten sich im Hirn-Gewebe an [114]. Während des akuten Schubes einer schubweise-remittierenden MS waren höhere Th17-Zellzahlen im Liquor nachweisbar als in der Phase einer Remission [32]. Inwiefern die Endprodukte, insbesondere Zytokine, myelin-spezifischer T-Zellen die kritischen Akteure in der Entstehung von Inflammation und Enzephalopathie verantwortlich sind, ist offen. Es wird postuliert, dass stattdessen vielmehr die Th1- und Th17-Zellen definierenden und aufwärts gelegenen Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren die Hauptinitiatoren von Autoimmunität und Neuroinflammation darstellen [143]. Zu dieser Annahme führten Experimente mit IFN-γ- und IL-17-defizienten Mäusen (durch knock out oder neutralisierende Antikörper), in denen dennoch eine EAE induzierbar war [66; 145; 86]. Charakteristisch und obligatorisch in der Th1-Zell-Differenzierung ist der Transkriptionsfaktor T-bet, während Th17-Zellen auf RORyt angewiesen sind [102], jedoch auch T-bet exprimieren. Als das am ehesten kritische, von T-bet in Th17-Zellen regulierte Gen könnte das des IL-23-Rezeptors sein [78; 143]. IL-23 ist wiederum unverzichtbar für die Expansion muriner Th17-Zellen [21] und induziert die Expression wichtiger Faktoren für Th17-Effektor-Funktionen, unter anderem den Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) [59]. IL-23-defiziente Mäuse entwickeln keine EAE [52; 220]. Gerade die Rolle von T-bet jedoch wird in letzter Zeit aufgrund teils widersprüchlicher Untersuchungsergebnisse sehr kontrovers diskutiert. Während T-bet exprimierende Th17-Zellen, die in Abwesenheit von TGF-β mit IL-6 stimuliert werden in der Lage sind, nach Transfer in Mäusen eine EAE auszulösen [254], fassten Spath et. al [221] neuere Ergebnisse zusammen, die belegen, dass T-bet nicht der angenommene obligatorische Transkriptionsfaktor in autoimmun ausgelöster Neuroinflammation darstellt, Krankheitstransfer mit Zellen aus in vitro-Bedingungen unter IL-23-Einfluss in Abwesenheit von

T-bet möglich ist. Es wird deshalb insgesamt davon ausgegangen, dass weitere Transkriptionswege, bzw. ihre Kombination zur Induktion von Neuroinflammation notwendig sind, aber auch Fehler bei der Übertragung von *in vitro*-behandelter Zellen nicht auszuschließen sind [221].

Die Komplexität der Beziehungen in Differenzierung und Effektorpotenzial zwischen den an der Pathogenese mutmaßlich entscheidend beteiligten T-Helferzellen wird durch die Tatsache erweitert, dass unter günstigen Einflüssen, wie der Art des umgebenen Zytokinmilieus in Mäusen und Menschen eine Konversion von CD4+CD25+Foxp3+-regulatorischen T-Zellen (Treg) mit bekanntem antiinflammatorischem Potenzial in proinflammatorische Th17-Zellen möglich ist [3; 250; 122; 172]. Das Gleichgewicht zwischen den funktionell antagonistisch agierenden Tregs und Th17-Zellen wird in Mäusen dabei vor allem durch den Einfluss von IL-6 [253], im Menschen dagegen bei größerer IL-6-Resistenz hauptsächlich IL-1-abhängig in Richtung Th17 verschoben [122; 265; 3]. Für die Differenzierung beider Zelltypen ist TGF-β, ein stark antiinflammatorisches Zytokin, notwendig [21]. Während in Mäusen unter alleinigem TGFβ-Einfluss Foxp3 induziert und Selbsttoleranz aufrechterhalten wird, hat IL-6, das durch Zellen des angeborenen Immunsystems zum Beispiel bei Infektionen produziert wird, eine Suppression der TGF-β-induzierten Tregs mit Auslösung einer inflammatorischen T-Zell-Antwort zur Folge [21; 253]. Interessanterweise wurden darüber hinaus sogar Foxp3+IL-17+-Zellen nachgewiesen, deren Rolle man sich damit erklärt, dass diese in der Abwehr von mikrobiellen Erregern und gleichzeitig als Regulatoren der Inflammation und Autoimmunität fungieren [243]. Ein möglicher Ansatz zur Therapie von Autoimmunität könnten Treg-basierte Verfahren darstellen. Gerade in inflammatorischen Läsionen, die vorrangig durch lokale IL-17-Produktion getragen sind, konnten durch Tregs jedoch nur geringe positive Effekte festgestellt werden, zudem überraschenderweise eine Zunahme der IL-17-Produktion [142; 51].

Trotz noch nicht abschließend aufgeklärter Rolle von IL-17 und widersprüchlicher Untersuchungsergebnissen liegen dennoch Hinweise für die Mitverantwortung von Th17-assoziierten Zytokinen in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen vor, so dass in dieser Arbeit Auswirkungen der DP IV-/ APN-Inhibitoren sowie Minocyclin und Pentaacetylcyclin auf die IL-17-Synthese muriner Splenozyten nach therapeutischen Applikationen untersucht werden sollten.

Es existieren zahlreiche Hinweise, dass neben CD4+-T-Helferzellen auch die Population der zytotoxischen CD8+T-Zellen entscheidend zu Neuroinflammation und -degeneration beiträgt: In Mäusen wurde nachgewiesen, dass myelin-spezifische CD8+-Zellen nach Transfer in gesunde Tiere (adoptive transfer) eine EAE auslösen konnten [101], in großer Zahl in inflammatorischen Läsionen des ZNS' zu finden sind [217; 14; 46] und hinsichtlich ihrer Anzahl in Läsionen mit

dem Ausmaß axonalen Schadens, an dem sie durch Angriff an Neuronen unmittelbar mitbeteiligt sind, [152; 46] korrelieren [26]. Rivera-Quiñones et. al [198] konnten in einem Modell der MS ("Theilers Virus-Model") in β_2 -Mikroglubulin-defizienten Mäusen indirekt zeigen, dass MHC I-Komplex-restringierte CD8+-T-Zellen für die Auslösung axonalen Schadens im Rückenmark wesentlich beteiligt sind, da diese Tiere trotz Demyelinisierung keine neurologischen Auffälligkeiten zeigten.

Seit langem ist außerdem bekannt, dass abnorme Mechanismen der humoralen Immunabwehr für die Pathogenese der MS mitverantwortlich sind. Begründet wird diese These unter anderem mit dem Nachweis von oligoklonalen IgG-Banden (OB) im Liquor von MS-Patienten [144] und einer intrathekalen Ig-Synthese [107; 169]. OB können in der Mehrzahl aller MS-Patienten im Liquor, in den allermeisten Fällen jedoch nicht im Serum nachgewiesen werden [141]. Ein Charakteristikum der Erkrankung ist die klonale Expansion von B-Zellen und die positive Selektion basierend auf ihrer Spezifität gegenüber präsentierten ZNS-Antigenen [184]. Unter anhaltender Antigenstimulation tritt eine starke Zell-Proliferation mit der Folge einer spezifischen B-Zell-Immunantwort auf. Darüber hinaus wurden B-Zellen und Plasmazellen in MS-Läsionen [182; 64] sowie höhere Konzentrationen von Autoantikörpern gegen Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) im Hirn-Parenchym verglichen mit Liquor und Serum von MS-Patienten nachgewiesen, was einen Hinweis für die lokale Produktion und deren Bedeutung in der autoantikörper-vermittelten Pathogenese darstellt [169]. Nach bisherigem Stand existiert jedoch nicht ein einzelnes spezifisches Antigen, sondern eine Vielzahl möglicher Kandidaten für die Krankheitsentstehung mitverantwortlicher Autoantigene, die weiterer Aufklärung und einer Korrelation mit klinischen MS-Symptomen, -Bildgebung und histomorphologischen Befunden bedürfen [95]. Weitere substantielle Hinweise für die Beteiligung fehlgeleiteter humoraler Immunabwehr ergaben sich aus Experimenten mit Einsatz der monoklonalen Anti-CD20-Antikörper Rituximab und Ocrelizumab unter denen es zu einer effektiven Depletion von naiven B-Zellen und B-Gedächtniszellen sowie einer Reduktion inflammatorischer cerebraler Läsionen und Besserung klinischer Symptome kam [91; 94].

Initiiert durch die genannten immunologischen Prozesse und weitere noch nicht bekannte Einflüsse werden über eine Kaskade Demyelinisierung und axonale Schäden verursacht [93; 225]. Axonale Dysfunktionen treten bereits in sehr frühen Stadien bei Patienten mit CIS auf [199] und stellen das pathologische Korrelat für irreversible neurologische Beeinträchtigungen dar [239]. Myelinisierung scheint einen protektiven Einfluss auf Axone zu vermitteln, da sich in remyelinisierten MS-Plaques signifikant weniger axonale Läsionen verglichen mit inaktiven jedoch nicht-remyelinisierten Plaques zeigten [57; 123]. Nikic et al. [166] widerlegten 2011 jedoch, dass entzündliche Demyelinisierung zwingend Voraussetzung für die schädigende Wirkung auf Axone ist und demonstrierten fokale intraaxonale mitochondriale Pathologien als

bleibt, die erste ultrastrukturelle Zeichen der Schäden. Letztlich unklar Neuroinflammation Ursache oder sekundärer Effekt der Neurodegeneration darstellt [151]. Interessanterweise wirkt im progressiven Stadium der MS eine antiinflammatorische Medikation nur eingeschränkt, was als starker Hinweis für neurodegenerative Aktivität in Abwesenheit von Entzündung gewertet wird [151] und möglicherweise in erste Linie auf einen Mangel von neurotrophischen Faktoren aus Myelin und Oligodendrozyten zurückzuführen ist [123]. In aktiven MS-Läsionen mit akuter Demyelinisierung jedoch korrelieren Entzündung und das Ausmaß axonaler Durchtrennung, so dass hier spezifische zelluläre und humorale immunologische Reaktionen sowie Mediatoren inklusive reaktive Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) als Akteure der Schädigungen angenommen werden [72; 112; 46; 166]. In dieser Arbeit werden daher Substanzen auf ihre in vivo und in vitro-Wirkungen untersucht, die möglicherweise durch Hemmung von Inflammation und/ oder Neurodegeneration potenziell als Therapeutika für Erkrankungen wie der MS geeignet sein können.

1.3.3. Symptome, klinischer Verlauf und Diagnostik der MS

MS-Patienten können unter einer Vielzahl von Symptomen leiden, die in Intensität und Dauer variieren. Sie treten isoliert oder in Kombination, anfallsartig oder im Zuge einer stetigen Progression auf und umfassen je nach betroffenen ZNS-Regionen motorische und sensorische Funktionen wie muskuläre Schwäche, schmerzhafte Spastizität, Ataxie, Koordinationsschwäche, Parästhesien, Wärme-Intoleranz und neuropathische Schmerzen [48; 160]. Häufige Beeinträchtigungen sind außerdem Sehstörungen mit Diplopie, Oszillopsie und Sehverlust, des Weiteren Schwindel, Nystagmus, Fatigue und Blasendysfunktion sowie kognitive Einschränkungen und emotionale Labilität mit Depression [48]. Unterschieden werden vier Haupttypen klinischer Verläufe: 1) schubförmig-remittierende MS (relapsing-remitting MS, RRMS), 2) primär-progrediente MS (primary-progressive MS, PPMS), 3) sekundär progrediente MS (secondary-progressive MS, SPMS) und 4) progredient-schubförmige MS (progressiverelapsing MS, PRMS) [160]. Von diesen Typen wird die RRMS mit 80-85 % initial diagnostiziert [160]. Gemeinsamkeit sind langjährige Verläufe über Jahrzehnte; die Lebenserwartung ist im Mittel um 5-10 Jahre reduziert [31]. Im Verlauf der Zeit gelangen ungefähr 65 % der Patienten in eine sekundäre progrediente Phase, während ca. 20 % bereits zu Beginn progrediente Verläufe nehmen [48]. Erstmanifestation ist häufig ein so genanntes subakutes, klinisch isoliertes Syndrom des Hirnstammes, Sehnervs oder Rückenmarks (CIS) [159]. Die Diagnose MS wird in erster Linie klinisch gestellt und basiert vereinfacht ausgedrückt auf dem Nachweisprinzip von Disseminierung der MS-Läsionen in örtlichem und zeitlichem Kontext sowie dem Ausschluss von Differentialdiagnosen [160]. Die zuletzt 2010 revidierten McDonald-Kriterien sind weit verbreitete und akzeptierte Hilfsmittel in der Diagnosestellung und beinhalten neben klinischen

Parametern die Magnetresonanz-Bildgebung (MRT) und Untersuchungen des Liquor cerebrospinalis zum Entzündungsnachweis [179; 79]. Die klinische Objektivierung neurologischer Beeinträchtigung erfolgt anhand der EDSS-Leistungsskala (Expanded Disability Status Scale) nach Kurztke [126], die sich an Fähigkeiten des täglichen Lebens orientiert.

1.3.4. Medikamentöse Therapie

Eine Heilung der MS ist bis heute nicht möglich. Das Ziel der symptomatischen Therapie besteht in einer Verbesserung der Lebensqualität mit Senkung von Schubfrequenz und intensität sowie Vermeidung dauerhafter körperlicher Beeinträchtigungen durch Hemmung der Erkrankungsaktivität [79]. In den letzten Jahren wurden neben bereits seit Jahren eingesetzten Substanzen einige neue Präparate bzw. ältere Präparate mit neuer Indikation zur MS-Behandlung zugelassen. Die zum Einsatz kommenden Therapeutika gehören den unterschiedlichsten Substanzklassen an und weisen ebenso verschiedene Wirkmechanismen auf. Bereits in den 1970er Jahren eingesetzt wurden Beta-Interferone (IFN-β1a und IFNβ1b), natürliche Zytokine mit antiviraler Aktivität und immunmodulatorischer Funktion, die sich als wirksam in der Behandlung der RRMS erweisen [79]. Der frühe Einsatz dieser Substanzen reduziert die Schubrate, die Entwicklung von Hirn-Läsionen [56; 104] und möglicherweise auch die fortschreitende Behinderung [200]. Postuliert wird die Wirkungsvermittlung über Hemmung der T-Zell-Aktivität und -Proliferation, Apoptose autoreaktiver T-Zellen, Induktion regulatorischer T-Zellen, Hemmung von Leukozytenmigration durch die Blut-Hirn-Schranke, Zytokinmodulation und antivirale Aktivität [56]. Nachteilig neben zahlreichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen bei der Behandlung mit Beta-Interferonen ist das gelegentliche Auftreten neutralisierender Antikörper, die die Wirksamkeit der Therapie herabsetzen können, wenngleich der Langzeiteffekt diesbezüglich noch unklar ist [20].

Ebenfalls lange im Einsatz ist das synthetische Oligopeptid Glatirameracetat (Copolymer-1), das wie Beta-Interferone Mittel der ersten Wahl bei der RRMS ist [197]. Es besteht aus den vier randomisiert angeordneten, am häufigsten in MBP vorkommenden Aminosäuren (L-Glutaminsäure, L-Alanin, L-Tyrosin und L-Lysin) und wird wegen eines günstigeren Nebenwirkungsprofils häufig bei Unverträglichkeiten gegenüber IFN-β angewendet [79]. Unterschiede in der klinischen Wirksamkeit konnten in einer großen klinischen Studie nicht festgestellt werden [158]. Wirkmechanismen sind vermutlich Erzeugung von Anergie oder Toleranz myelin-reaktiver Lymphozyten [206].

Ein weiteres in den USA als Erstlinientherapie (in Europa derzeit second-line) zugelassenes Präparat ist Fingolimod (FTY720), das erste oral applizierbare "disease-modifying drug". Der aktive Metabolit ist ein Sphingosin-1-Phosphat-(S1P)-Rezeptor-Agonist und entfaltet seine Wirkung durch Lymphozyten-Sequestrierung in sekundären lymphatischen Organen, in dessen

Folge eine Infiltration autoreaktiver Lymphozyten in die Peripherie, insbesondere das ZNS, reduziert wird [208]. Fingolimod überwindet die Blut-Hirn-Schranke und schwächt möglicherweise direkt vor Ort neuropathologische Prozesse [208]. Das Medikament ist gut verträglich und war in der TRANSFORMS-Studie [44] gegenüber intramuskulär appliziertem IFN-β1a bezüglich Schubfrequenz und MRT-Endpunkten überlegen.

Als Therapeutika der zweiten Wahl kommen bei Therapieversagen oder Intoleranz gegenüber den genannten Medikamenten Mitoxantron, ein synthetisches, antineoplastisches Anthrazendionderivat, das über eine Topoisomerasehemmung die T- und B-Zell-Aktivität hemmt, oder Natalizumab, ein speziell für die MS-Therapie entwickelter monoklonaler Antikörper, der das Leukozyten-Integrin α 4 und damit die Lymphozytenmigration durch die Blut-Hirn-Schranke begrenzt, zum Einsatz [197].

Bei weiterhin fehlender Symptomkontrolle unter Erst- und Zweitlinienregimen stehen weitere medikamentöse Optionen (und Therapieeskalationen) zur Verfügung oder befinden sich zur Prüfung in klinischen Studien. Aus der Gruppe monoklonaler Antikörper 1) Alemtuzumab, ein monoklonaler Anti-CD52-Antikörper, ursprünglich indiziert zur Therapie der chronisch lymphatischen Leukämie (B-CLL) [79] (inzwischen erfolgte 2012 in Europa die Rücknahme der Indikation B-CLL für das Präparat zu Gunsten der MS), 2) Daclizumab, ein monoklonaler humanisierter IgG₁-Antikörper gegen die CD25-α-Untereinheit des IL-2-Rezeptors aktivierter Lymphozyten [79] und 3) Ocrelizumab, ein humanisierter monoklonaler Anti-CD20-Antikörper mit B-Zell-depletierender Wirkung, speziell für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen entwickelt und gut wirksam bei RRMS [113]. 4) Rituximab, ein erfolgreich in der Hämatologie und Onkologie sowie als Reservemittel bei Rheumatoider Arthritis (RA) eingesetztes Präparat [113] mit guter Wirkung auf Schubfrequenz und inflammatorische Hirn-Läsionen [91]. Nebenwirkungen der immunsuppressiven Antikörpertherapien sind erhöhte Anfälligkeit für Infektionen einschließlich schwerer Herpes simplex-Infektionen und die progressive multifokale Leukenzephalopathie (PML) durch das JC-Virus unter Rituximab [70] und Natalizumab [202].

Seit 2013 in der EU neu zugelassen sind das für die RRMS wirksame und gut verträgliche Dimetyl-Fumarat (BG-12), dessen antiinflammatorischen und zytoprotektiven Effekte zumindest teilweise durch den nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2)-Pathway vermittelt werden sollen [71] sowie Teriflunomid, der aktive Metabolit des Leflunomid, einem älteren immunmodulatorischen Präparat, das unter anderem über die Hemmung der Pyrimidin-de novo-Synthese zytostatische Effekte auf B- und T-Zellen ausübt und bisher in der RA-Therapie eingesetzt wird [54].

Eine weitere in der klinischen Erprobung fortgeschrittene, jedoch noch nicht zugelassene Substanz ist Laquinimod, eine oral wirksame, synthetische, niedermolekulare Verbindung

("small molecule"), mit immunsuppressiver Wirkung unter anderem über eine Treg- und TGF-β-Induktion vermittelt [252]. Darüber hinaus kommen einige für die Behandlung anderer Erkrankungen, nicht jedoch für die MS zugelassene Substanzen ("off-label use") mit antineoplastischer und/ oder immunsuppressiver Wirkung zum Einsatz. Eine Cochrane-Analyse 2013 [68] kam bei nicht überzeugender Wirksamkeit von als "off-label" verwendeten intravenösen Immunglobulinen (IVIG), Cyclophosphamid und Langzeitsteroiden zu nachteiligen Ergebnissen bezüglich Nutzen und Risiko. Zum Arsenal der "off-label-Medikation" schließlich zählen der Vollständigkeit halber noch die Immunsuppressiva Mycophenolat mofetil, Cladribin, Azathioprin und Methotrexat [79].

Die Therapie des akuten Schubes besteht laut deutscher Leitlinie 2012 [88] nach wie vor aus einer Glukosteroid-Hochdosisgabe in Form von Kurzinfusionen von 500-1000 mg Methylprednisolon über drei bis fünf Tage als morgendliche Einzeldosis mit der Option auf Ausdehnung auf bis zu 10 Tage ggf. begleitend mit einer Dosiserhöhung oder Einleitung einer Ultrahochdosistherapie bei Refraktärität mit z.B. 5 x 2000 mg/d über 5 Tage.

1.4. Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)

Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist ein weit verbreitetes und das am besten akzeptierte Tiermodell der MS, auf dessen Grundlage weitreichende Erkenntnisse der Pathogenese gesammelt und zahlreiche Therapieansätze entwickelt wurden [161]. Die Bezeichnung "EAE" ist dabei ein Überbegriff für verschiedene Autoimmunmodelle des ZNS' in Wirbeltieren, wobei Mäuse und Ratten die am häufigsten verwendeten Tierspezies darstellen [185]. Die Initiierung der Erkrankung kann durch Transfer enzephalithogener T-Zellen oder durch aktive Immunisierung mittels Proteinen oder Peptiden wie Proteolipidprotein (PLP), Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) oder Myelin-basischem Protein (MBP) vorgenommen werden [185]. Der Phänotyp hängt dabei vom verwendeten Antigen und dem genetischen Hintergrund der verwendeten Tierspezies und Tierstammes ab [161]. Die Immunisierung mit PLP₁₃₉₋₁₅₁ in SJL/J-Mäusen, das in dieser Arbeit verwendete Modell, führt zur Ausbildung einer schubweise-remittierenden EAE-Form [240; 247], während der Einsatz von MOG₃₅₋₅₅ in C57BL6/J-Mäusen eine chronisch-progrediente Form initiiert [236]. Durch Zugabe von Adjuvanzien wie Freundschem-Adjuvanz (CFA) und Pertussis-Toxin während der Immunisierung wird eine höhere Erkrankungsrate und Zunahme der Immunantwort mit stärker ausgeprägten Symptomen erreicht [161]. Während der Entwicklung einer schubweise remittierenden EAE mit PLP₁₃₉₋₁₅₁ tritt (wie bei der MS) ein "epitope spreading" mit T-Zell-Reaktivität gegen weitere ZNS-Antigene auf [150]. Nach Bildung autoreaktiver T-Zellen sammeln sich diese in der Milz bevor sie in das ZNS migrieren und nach Reaktivierung die inflammatorische Kaskade mit Neurodegeneration in Gang setzen [49]. In ZNS-drainierenden

cervikalen und lumbalen Lymphknoten sowie der Milz konnten APC mit ZNS-Antigenen aus Zelldetritus nachgewiesen werden [245]. In diesem Kompartiment werden weitere autoreaktive T-Zellen generiert, die eine Aufrechterhaltung und Exazerbation der Autoimmunprozesse begünstigen [49]. Ähnlich zur MS sind im Verlauf Schäden der weißen Substanz mit perivaskulären und meningealen entzündlichen Infiltraten, Demyelinisierung und Gliose zu verzeichnen [49]. Die Modellerkrankung ist klinisch durch eine aufsteigende Paralyse der Muskulatur mit Beginn des Schwanzes, gefolgt von Hinter- und Vorderläufen charakterisiert; der Grad der Erkrankung wird mittels einer 5-Punkteskala erfasst [185].

Trotz gewisser Übereinstimmungen molekularer und zellulärer Pathomechanismen und klinischer Verläufe zwischen EAE und MS, handelt es sich bei der EAE um eine Modellerkrankung, welche die MS des Menschen in Komplexität und Details nicht exakt abbildet, jedoch zur Erforschung von Pathogenese und Therapien aufgrund des Fehlens besserer Alternativen nützlich ist und weltweit Verwendung findet. Die EAE wird künstlich in gesunden Tieren unter pathogenarmen Laborbedingungen erzeugt, wobei eine Übereinkunft, welches der von Tierspezies, Tierstamm, Antigen und Immunisierungsprotokoll abhängigen EAE-Modellen verwendet werden soll, nicht besteht [111]. Etliche medikamentöse Therapieansätze, die sich in der EAE als vielversprechend zeigten, scheiterten in klinischen Studien wegen fehlender Reproduzierbarkeit, sei es durch nicht-signifikante oder fehlende Wirksamkeit, Nebenwirkungen/ Toxizität oder Exazerbation der MS, was die vorhandene "immunologische Distanz" zwischen Nagetieren und Menschen unterstreicht [161; 111; 119].

Zielstellung 29

2. Zielstellung der Arbeit

beantworten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zum einen die zwei dualen Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV und Aminopeptidase N, PETIR-001 und PETIR-004 ("Peptidase-targeted Immunoregulation" (PETIR™)) sowie zum anderen zwei Tetracyclinderivate Minocyclin und das A-Ring-aromatisierte Acetylminocyclin Pentaacetylcyclin, hinsichtlich ihrer antiinflammatorischen Wirkung in Autoimmunprozessen zu untersuchen.

Dazu wurden einerseits *in vitro*-Untersuchungen an unstimulierten und stimulierten murinen Splenozyten durchgeführt, um zu demonstrieren, dass die Substanzen beider Klassen durch Einfluss auf DNS-Synthese und Zytokinproduktion antiinflammatorische Wirkungen vermitteln. Andererseits wurden diese Substanzen im Rahmen von *in* vivo-Experimenten im Mausmodell der Multiplen Sklerose, der EAE, eingesetzt, um die Frage nach therapeutischer Wirksamkeit zu

Anhand histopathologischer Untersuchungen muriner Rückenmarksschnitte EAE-erkrankter Tiere sollten zudem die Auswirkungen auf inflammatorische ZNS-Läsionen durch therapeutischen Einsatz der Substanzen gezeigt werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Reagenzien

³H-Thymidin ACK-Puffer

AIM-V-Medium

Beta-Mercaptoethanol (BME) CellTiter-Blue Cell Viability Assay

DMSO

Formaldehyd, 10%-PBS gepuffert

Komplettes Freundsches Adjuvanz (CFA)

Minocyclin

monoklonaler Anti-Mouse CD3e-Antikörper murine IFN- γ -, IL-2-, IL-17-, TGF- β 1-ELISA

Natriumcitrat, 0,105 M

Olivenöl PBS

Pentaacetylcyclin Pertussis-Toxin

PETIR-001 PETIR-004

Pokeweed-Mitogen (PWM)

Proteolipidproteinpeptid (PLP₁₃₉₋₁₅₁)

Rapsöl

RPMI 1640 Zellkulturmedium

Triton X-100, 20 %

Trypanblau

MP Biomedicals GmbH, Eschwege

0,15 M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA,

pH 7,2

Invitrogen, Eggenstein Merck, Darmstadt Promega, Mannheim

Merck Chemicals GmbH, Schwalbach Zentralapotheke, Universitätsklinikum

Magdeburg

Sigma-Aldrich, Taufkirchen Sigma-Aldrich, Taufkirchen eBioscience, Frankfurt R&D Systems, Wiesbaden BD Biosciences, Heidelberg K-Classic, Kaufland, Neckarsulm

Biochrom AG, Berlin

ReseaChem GmbH, Burgdorf, Schweiz List Biological Laboratories, Campbell, CA,

USA

IMTM GmbH, Magdeburg IMTM GmbH, Magdeburg Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Dr. J. Faust, Martin-Luther-Universität Halle-

Wittenberg

K-Classic, Kaufland, Neckarsulm

Biochrom AG, Berlin Sigma-Aldrich, Taufkirchen Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.1.2. Verbrauchsmaterial

24-Kammer-Mikrotiterplatten 96-Kammer-Mikrotiterplatten Combitips Plus, 1, 5 und 10 ml Einwegpipetten 10 und 25 ml Einwegspritzen steril, 2, 5 und 10 ml

Eppendorf-Röhrchen

Insulin-Einwegspritzen Omnifix 40 Solo, 1 ml Konische Zentrifugenröhrchen 15 und 50 ml

Nylon-Zellsieb, 70 µM

Pipettenspitzen

Zellkulturschalen 35 x 10 mm

Glasspritzen 5 ml Dreiwegehahn Corning Life Sciences, NY, USA Corning Life Sciences, NY, USA

Eppendorf AG, Hamburg

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

BD Biosciences, Heidelberg Eppendorf AG, Hamburg

B. Braun Melsungen AG, Melsungen Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen Falcon, BD Biosciences, Heidelberg

Carl Roth GmbH, Karlsruhe BD Biosciences, Heidelberg Poulten & Graf, Wertheim

B. Braun Melsungen AG, Melsungen

3.1.3. **Geräte**

Accu-jet-Pipettierhilfe

Färbe-Automat Shandon Varistain 24-4 Fixvolumen-Mikroliter-Pipetten, Reference Incubator Forma Scientific Steri-Cult 200

Inotech Cell-Harvester

Inversmikroskop Motic AE 20

Microbeta Liquid Scintillation Counter

Microplate Reader MR5000 Microplate Reader Safire Mikrotom SM2000R

Multipette Plus

Neubauer Zählkammer

Pipetman Classic

Schüttler MS 1

Sicherheitswerkbank Klasse II, Steril Grad A/

B3

Thermomixer compact Tischzentrifuge 5415 D

Tischzentrifuge Multifuge 1 S-R

Brand GmbH + Co. KG, Wertheim

Thermo Electron Corporation, Waltham, USA

Eppendorf AG, Hamburg Labotect, Göttingen Wallac, Turku, Finnland

Motic, Wetzlar

Wallac, Turku, Finnland Dynatech, Rückersdorf

Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz Leica Microsystems Nussloch GmbH,

Nussloch

Eppendorf AG, Hamburg

Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda

Königshofen

Gilson International B.V, Den Haag,

Niederlande

IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen The Baker Company, Stanford, ME, USA

Eppendorf AG, Hamburg Eppendorf AG, Hamburg

Kendro Laboratory Products, Hanau

3.1.4. Versuchstiere

SJL/J-Mäuse, weiblich

Janvier, Saint Berthevin, Frankreich

3.2. Methoden

3.2.1. Isolierung muriner Splenozyten und Lymphozyten aus regionalen Lymphknoten

Zur Isolierung von Immunzellen aus Milzen und Lymphknoten wurden Mäuse mittels CO₂ getötet, anschließend die Organe unter aseptischen Bedingungen entnommen und in RPMI-Medium überführt. Nach Trennung der Zellen von gröberen Gewebebestandteilen durch ein Nylon-Zellsieb (70 µM Porengröße) erfolgte zweimaliges Waschen in AIM-V-Medium (mit 5·10⁻⁵ M BME) mit einer zwischenzeitlich durchgeführten fünfminütigen Hämolyse in 500 µI ACK-Puffer bei Raumtemperatur nach der ersten Zentrifugation. Im nächsten Schritt wurden die Zellen gezählt und die Zellzahl für die Kultur auf 1·10⁶ Zellen/ml eingestellt.

3.2.2. Messung der DNS-Synthese mitogen- und anti-CD3-stimulierter Splenozyten

Murine Splenozyten wurden in An- und Abwesenheit der Mitogene PWM (1 μ g/ml) oder anti-Maus-CD3e-AK (1 μ g/ml) in 96-Kammer-Rundbodenplatten kultiviert. Jede Kammer enthielt 100.000 Splenozyten in 100 μ l Kulturmedium (AIM-V mit 5·10⁻⁵ M BME).

Zur Beurteilung des Einflusses der kombinierten DP IV-/ APN-Inhibitoren PETIR-001 und PETIR-004 sowie von Minocyclin und Pentaacetylcyclin auf die DNS-Synthese der Maus-Splenozyten, wurden die Zellen zusammen mit unterschiedlichen Konzentrationen der vier Substanzen bei 37 °C und 5 % CO₂-Luftgehalt für zunächst 48 Stunden inkubiert. Nach Zugabe von ³H-Thymidin (0,2 µCi/Vertiefung) folgten weitere 16 Stunden Inkubation und schließlich das Ernten der Zellen mithilfe des Inotech Cell-Harvesters sowie die Bestimmung des Ausmaßes des Radioisotopeneinbaus mit dem Microbeta Liquid Scintillation Counter.

Als 100 % wurden die Kulturen in den Kammern gewertet, welche mitogen-stimuliert, jedoch in Abwesenheit der DP IV-/ APN-Inhibitoren oder der Tetracyclinderivate inkubiert worden waren.

3.2.3. Messung der Zellvitalität

Der CellTiter-Blue® Cell Viability Assay erlaubt Aussagen über die Zellvitalität in Zellkulturen zu treffen. Er ist sowohl für Proliferations- als auch für Zytotoxizitätsbestimmungen verwendbar und wird in diesem Fall eingesetzt, etwaige negative Auswirkungen auf die Vitalität der in Anwesenheit mit den zu untersuchenden Substanzen kultivierten Splenozyten zu ermitteln.

Eingesetzt wurden 96-Kammer-Flachbodenplatten, die pro Kammer 100.000 Splenozyten in 100 μl AlM-V-Medium (mit 5·10⁻⁵ M BME) enthielten. Als Mitogene dienten, ebenso wie bei den Ansätzen zur DNS-Synthese-Bestimmung PWM (1 μg/ml) sowie anti-Maus-CD3e-AK (1 μg/ml). Den Kammern wurden 10 μl der zu testenden Substanz in steigenden Konzentrationen zugesetzt. Kulturen, die als Kontrollen dienten und das Vitalitätsniveau 100% repräsentierten, wurden ohne PETIR-001, PETIR-004 oder den Tetracyclinderivaten inkubiert.

Nach 16 Stunden Inkubation bei 37 °C und unter 5 % CO_2 wurde jede Kammer mit 20 μ l der CellTiter-Blue®-Reagenz versehen, gefolgt von vier weiteren Stunden Inkubation. Während metabolisch aktive Zellen den Farbstoff Resazurin in das fluoreszierende Resorufin umwandelten, blieb dieser Prozess bei sterbenden und toten Zellen aus. Es folgte die spektrophotometrische Messung mit dem Microplate Reader Safire bei λ = 570 nm.

3.2.4. Herstellung von Zellkulturüberständen zur Bestimmung der Zytokinfreisetzung

Zur Messung der Zytokinsekretion aus Maus-Splenozyten wurden Kulturen in 24-Kammer-Platten angesetzt. Jede der Kammern enthielt $1\cdot10^6$ Zellen in 1 ml AlM-V-Kulturmedium (mit $5\cdot10^{-5}$ M BME), die mittels PWM (1 µg/ml) mitogen stimuliert wurden. Nach Zugabe der zu untersuchenden Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen erfolgte die Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 für 48 Stunden. Anschließend wurden die Kulturüberstände abgenommen,

zentrifugiert (3000 x g für 2 min) und vor Verwendung zur Zytokinbestimmung bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.5. Gewinnung von Plasmen aus Vollblutproben von SJL/J-Mäusen zur Zytokinbestimmung

Die Entnahme des Blutes erfolgte dabei durch Punktion des Herzens mittels 29 G, $\frac{1}{2}$ "-Kanüle und einer zuvor mit Natriumcitrat gespülten 1 ml Safety Syringe. Hierzu wurden die Mäuse zuvor mittels CO_2 getötet und unmittelbar im Anschluss der Thorax eröffnet. Das gewonnene Vollblut wurde in 1,5 ml Röhrchen, die 50 μ l 0,105 M Natriumcitrat zur Antikoagulation enthielten, überführt und für zehn Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Es folgte eine erneute zehnminütige Zentrifugation der erzeugten Überstände nach Überführung in neue citratfreie Röhrchen bei nun 1500 x g und anschließend die Lagerung der Überstände in wiederum neuen Röhrchen zur späteren Zytokinbestimmung bei -20 °C.

3.2.6. Quantitative Bestimmung von murinem IFN-γ, IL-2, IL-17 und TGF-β1 mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Für die Bestimmung der Zytokinkonzentration in Kulturüberständen PWM-stimulierter muriner Splenozyten und Blutplasmen in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen der DP IV-/APN-Inhibitoren sowie Minocyclins und Pentaacetylcyclins kamen kommerziell erhältliche ELISA-Kits (murine IFN- γ -, IL-2-, IL-17- und TGF- β 1-ELISA) zum Einsatz. Die Versuchsdurchführung erfolgte entsprechend der Gebrauchsanweisung des jeweiligen Kits.

Bei dem den Assays zugrundeliegenden "Sandwich-Prinzip" wird nach Zugabe der Probe das zu bestimmende Antigen von einem auf der Mikrotiterplatte vorhandenen monoklonalen Antikörper gebunden. Nach Zugabe eines weiteren gegen das Antigen gerichteten Antikörpers, welcher bei allen hier verwendeten Kits mit Meerrettichperoxidase gekoppelt war, wurden Wasserstoffperoxid und das Chromogen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin als Substrate hinzugegeben. Die resultierende Farbintensität der Probe korreliert mit dem Ausmaß der Antigen-Antikörper-Bindung und folglich mit der Antigenkonzentration. Eine Eichkurve, aus den Messwerten von Standard-Antigenkonzentrationen erstellt, ermöglicht letztlich die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen. Die Bestimmung der TGF-β1-Konzentrationen erforderte zuvor das Umwandeln des latenten, nicht immunreaktiven TGF-β1 in die aktive Form. Nur diese wird von den Antikörpern des Kits gebunden und somit gemessen. Zur Aktivierung von TGF-β1 in thrombozytenfreien murinen Plasmen wurden 10 μl 20% Triton X-100 mit 170 μl PBS versetzt

und anschließend 20 μ l Plasma zugefügt und gut vermischt. Dieses Gemisch wurde unter kontinuierlichem Schütteln mittels Thermomixer für fünf Minuten auf 80 °C erhitzt und nachfolgend kurz auf Eis abgekühlt bevor 50 μ l dieser Proben mit nun aktiviertem TGF- β 1 für den ELISA eingesetzt werden konnten.

3.2.7. *In vivo*- Experimente unter Verwendung der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) in SJL/J-Mäusen

3.2.7.1. Versuchstiere

Weibliche, 10-14 Wochen alte SJL/J-Mäuse (*Janvier*, Saint Berthevin, Frankreich) dienten als Versuchstiere für die *in vivo*-Experimente. Die Mäuse wurden in Gruppen zu je fünf Tieren unter pathogenarmen Bedingungen bei zwölfstündigem Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Standarddiät für alle Tiere bestand aus Leitungswasser und Pelletfutter ad libitum.

Die Tierversuche wurden von der staatlichen Behörde genehmigt (Genehmigungsnummern: PETIR™ 42502-2-930 UniMD; Pentaacetylcyclin 42502-2-1086 UniMD) und entsprechend der geltenden Vorschriften durchgeführt. Mäuse mit einem EAE-Grad größer/ gleich 3 oder stark eingeschränktem Allgemeinzustand wurden euthanasiert.

3.2.7.2. Induktion der EAE

Die Induktion der EAE an SJL/J-Mäusen erfolgte mittels PLP₁₃₉₋₁₅₁-Peptid und resultierte in einer schubweise-remittierenden EAE-Form. Die Tiere erhielten einmalig je 200 µg PLP₁₃₉₋₁₅₁-Peptid in einer 1:1-Emulsion, bestehend aus dem in PBS gelösten Peptid (steril) und kompletten Freundschen Adjuvans (CFA), an den Flanken, auf vier Stellen verteilt, subkutan injiziert.

Komplettes Freundsches Adjuvans enthält im Gegensatz zur inkompletten Form Mycobacterium butyricum, das eine ausgeprägte und für die EAE notwendige Th1-Immunantwort erzeugt.

Für eine standardisierte EAE-Induktion mit einer höheren Erkrankungswahrscheinlichkeit (Erkrankungsrate 70 - 90 %) wurde zusätzlich Pertussis-Toxin am Tag der Immunisierung sowie am zweiten Tag nach Immunisierung in einer Dosis von 200 ng intraperitoneal appliziert [219; 238]. Pertussis-Toxin zeichnet sich ebenso wie CFA durch die Begünstigung einer Th1-Immunantwort aus, kommt hier jedoch in erster Linie wegen seiner die Blut-Hirn-Schranke "öffnenden" Wirkung zum Einsatz. Ein Effekt, der die Transmigration von T-Lymphozyten in das ZNS fördert und vorwiegend durch Histamin-induzierte erhöhte mikrovaskuläre Durchlässigkeit erklärt wird [256; 89].

3.2.7.3. Therapeutische Applikationen

Zur Untersuchung des Einflusses der kombinierten DP IV-/ APN-Inhibitoren PETIR-001 und PETIR-004 sowie Minocyclins und Pentaacetylcyclins auf den klinischen Verlauf der EAE wurden die entsprechenden Substanzen je fünf Mäusen pro Gruppe über einen Zeitraum von neun oder zehn Tagen verabreicht. Die Applikationen begannen überwiegend am 13. oder 14. Tag nach Immunisierung zum oder kurz vor dem Zeitpunkt größter Symptomausprägung. Ein Teil der Tiere erhielt die Substanzen per intraperitonealer Injektion. PETIR-001 kam dabei in Dosen von 10 und 50 µg, PETIR-004 mit 100 µg, Minocyclin und Pentaacetylcyclin mit je 100 µg pro Tier pro Tag zum Einsatz. Kontrolltieren wurden entsprechende Mengen der Trägerlösung PBS injiziert.

Zusätzlich wurde die Wirkung auf klinische Symptome an weiteren Gruppen nach peroraler Applikation untersucht. Die Substanzen wurden zu diesem Zweck in DMSO gelöst und in Olivenöl (PETIR™) bzw. Rapsöl (Minocyclin/ Pentaacetylcyclin) verdünnt. Die hier eingesetzten Wirkstoffdosen betrugen für PETIR-001 und PETIR-004 je 50 oder 100 μg (entsprechend 25 oder 50 μl), für Minocyclin und Pentaacetylcyclin 100 μg (50 μl) pro Tier pro Tag. Kontrolltiere erhielten entsprechende Mengen einer DMSO-Öl-Lösung.

3.2.7.4. Evaluation des EAE-Erkankungsgrades

Acht Tage nach Immunisierung begann die tägliche klinische Untersuchung der Mäuse. Die Ergebnisse dieser Einzeluntersuchungen bezüglich des EAE-Schweregrades wurden anhand einer Punkteskala festgestellt und ergaben den Krankheitsverlauf. Die Graduierungen der Lähmungserscheinungen sind im Folgenden dargestellt:

Tabelle 1 : Graduierung der EAE

EAE-Grad	Klinisches Bild
0,0	Keine Symptome, von einem gesunden Tier nicht zu unterscheiden
0,5	Partieller Tonusverlust des Schwanzes, kein Kräuseln der Schwanzspitze möglich
1,0	Kompletter Tonusverlust des Schwanzes; am proximalen Ende gefasst, kann der Schwanz nicht mehr angehoben werden
1,5	Tonusverlust des Schwanzes und verlangsamtes Aufrichten aus Rückenlage
2,0	Kein Aufrichten aus Rückenlage möglich
2,5	Zusätzlich Watschelgang oder Nachziehen einer hinteren Extremität ohne Plegie
3,0	Plegie der hinteren Extremitäten, Fortbewegung nur mittels der vorderen Extremitäten, deutlicher Gewichtsverlust
3,5	Zusätzlich beginnende Parese der vorderen Extremitäten
4,0	Schwere Parese mindestens einer vorderen Extremität
5,0	Moribund oder tot

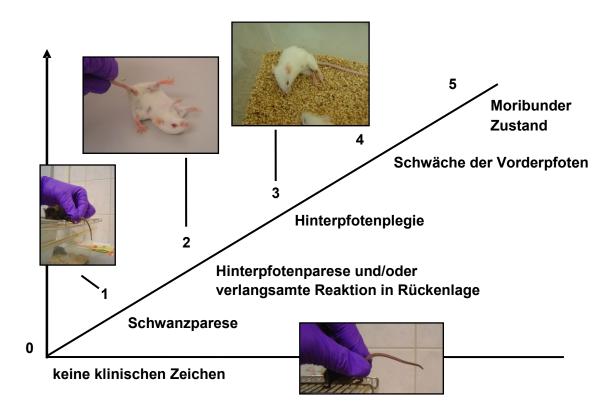


Abbildung 6: EAE-Graduierung nach klinischen Symptomen

3.2.8. Histopathologie des ZNS an EAE-erkrankter SJL/J-Mäuse

Zur Untersuchung krankheitsbedingter inflammatorischer Infiltrate im Rückenmark wurden SJL/J-Mäuse 19 bzw. 20 Tage nach Induktion der PLP₁₃₉₋₁₅₁-induzierten EAE während der aktiven Erkrankung und nach i.p. bzw. oraler Therapie mit oder ohne PETIR-001, PETIR-004, Minocyclin oder Pentaacetylcyclin getötet. Das Rückenmark wurde entnommen und für mindestens 24 Stunden in 4 % Formaldeydlösung fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Mittels Mikrotom wurden ca. 5 µm dünne Längs- und Querschnitte von Zervikal, Thorakal- und Lumbalmark angefertigt, auf einem beschichteten Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 60 °C getrocknet. Die Präparate mit wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die Gesamtzahl der entzündlichen Infiltrate in den Thorakal- und Lumbal-Rückenmarkabschnitten der jeweiligen Mäuse wurde verblindet ermittelt.

3.2.9. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und grafische Darstellung der experimentell gewonnen Daten erfolgte mittels Origin 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) und Microsoft Excel 2003 und 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA). In den Abbildungen sind, wenn nicht anders angegeben, arithmetische Mittel und Standardfehler der Mittelwerte (SEM) dargestellt. Die Ermittlung statistischer Signifikanz erfolgte für die EAE-Experimente mithilfe des nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Die Daten der übrigen Experimente wurden mit dem One-Way-ANOVA-Test statistisch ausgewertet. Das Signifikanzniveau wurde, wenn nicht anders angegeben, auf p < 0,05 festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1. Die dualen DP IV-/ APN-Inhibitoren PETIR-001 und PETIR-004: *In vitro- und in vivo-*Experimente

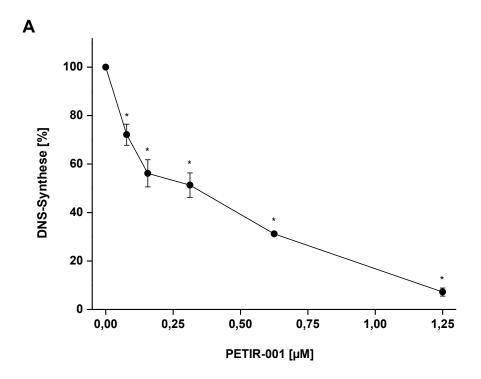
4.1.1. Einfluss der dualen DP IV-/ APN-Inhibitoren PETIR-001 und PETIR-004 auf die DNS-Synthese und die Vitalität mitogen- und anti-CD3-stimulierter SJL/J-Maus-Splenozyten

Die Ektoenzyme Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) und Aminopeptidase N (APN) spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen. Sie werden verstärkt auf aktivierten T-Zellen exprimiert und stellen damit einen Angriffspunkt für immunmodulatorische Substanzen dar, die einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität dieser Enzyme ausüben. Während in der Vergangenheit die Verminderung der DNS-Synthese sowohl unter jeweils alleinigem Einsatz von DP IV-Inhibitoren wie etwa Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid (I49) und APN-Inhibitoren wie Actinonin, als auch unter simultaner Verwendung beider Inhibitorklassen bereits umfassend durch unsere Arbeitsgruppe beschrieben worden ist [187; 188; 194; 224; 195; 191; 190], sollte in dieser Arbeit unter anderem geklärt werden, welchen Einfluss kombinierte Inhibitoren auf die Proliferation muriner T-Zellen ausüben.

Zu diesem Zweck wurden Zellkulturen zu Beginn der Inkubation die Inhibitoren PETIR-001 oder PETIR-004 in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Parallel zur Messung der DNS-Synthese wurde in zusätzlichen Experimenten die Vitalität der Zellen unter denselben Inhibitorkonzentrationen überprüft, um zelltoxische Effekte auszuschließen.

Bei Versuchen mit PETIR-001 zeigte sich für Zellkulturen, die mit Pokeweed-Mitogen stimuliert worden waren, bereits bei sehr geringen Konzentrationen von 0,078 μM eine signifikante Verminderung der DNS-Synthese. Eine DNS-Syntheserate von nur noch 50 % (IC₅₀) verglichen zu Kontrollkulturen ohne PETIR-001, lag bei einer Konzentration von 0,34 μM vor (Abb. 7 A). Die Vitalität der Zellen war in diesem Bereich mit 88 bis 90 % verglichen zu Kontrollkulturen nur gering beeinträchtigt und toxische Wirkungen durch den Inhibitor somit für die ausgeprägte Hemmung der DNS-Synthese nicht ausschlaggebend (Abb. 7 B).

Ähnliche Resultate ließen sich für Zellkulturen konstatieren, deren Proliferation mittels anti-CD3-AK stimuliert worden waren. Hier führten PETIR-001-Konzentrationen ab 0,16 μM zur signifikanten Hemmung der DNS-Synthese *in vitro* (Abb. 8 A). Der IC₅₀ - Wert betrug in diesem Stimulationssystem 0,81 μM.



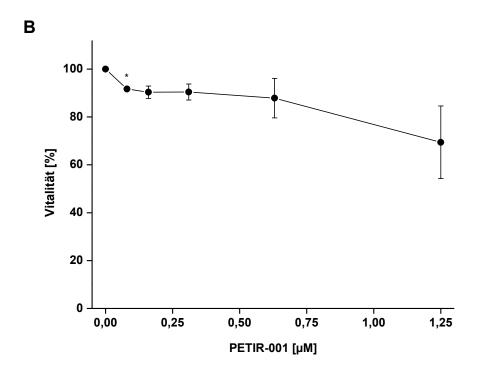
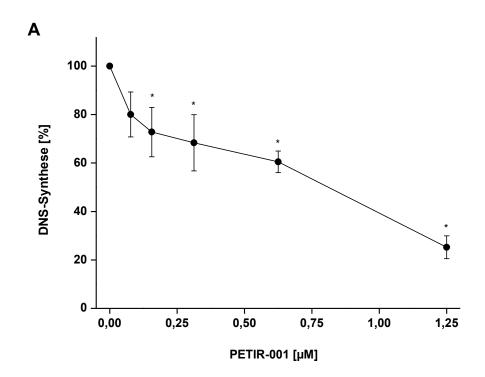


Abbildung 7: Einfluss des DP IV-/ APN-Inhibitors PETIR-001 auf die DNS-Synthese (A) und die Vitalität (B) PWM-stimulierter SJL/J-Maus-Splenozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von vier (A) bzw. drei (B) unabhängigen Experimenten. DNS-Synthese: 100 % entspricht 23468 \pm 4316,9 cpm; IC₅₀ 0,34 μ M. * = p < 0,05 (ANOVA).



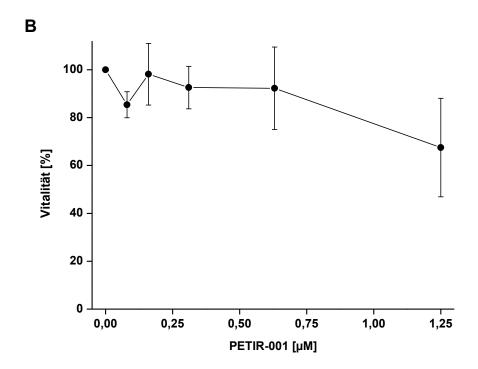
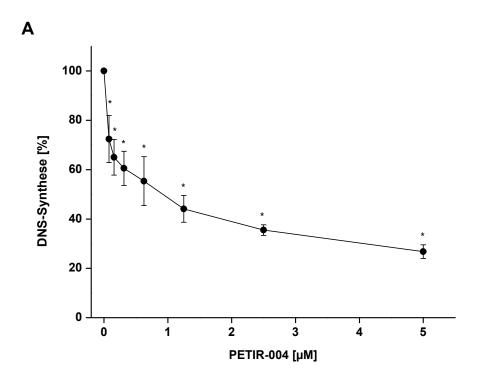


Abbildung 8: Einfluss des DP IV-/ APN-Inhibitors PETIR-001 auf die DNS-Synthese (A) und die Vitalität (B) anti-CD3-stimulierter SJL/J-Maus-Splenozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von vier (A) bzw. drei (B) unabhängigen Experimenten. DNS-Synthese: 100 % entspricht 27087,3 \pm 11198,2 cpm; IC₅₀ 0,81 μ M. * = p < 0,05 (ANOVA).

Für den zweiten in dieser Arbeit untersuchten kombinierten DP IV-/ APN-Inhibitor PETIR-004 wurde ebenfalls die Wirkung auf die DNS-Synthese und Zellvitalität untersucht.

Bei PWM-stimulierten Zellkulturen nahm die DNS-Synthese konzentrationsabhängig ab und zeigte bereits ab einer Konzentration von 0,078 µM PETIR-004 eine signifikante Reduktion. Eine 50-prozentige Hemmung wurde mit einer Konzentration von 0,93 µM erreicht (Abb. 9 A). Eine weitere Hemmung der DNS-Synthese bei steigender Inhibitorkonzentration ging dabei, wie aus den Ergebnissen der Vitalitätsteste deutlich wird, nicht mit einer maßgeblichen Zellschädigung einher. Stattdessen lagen die Werte für alle verwendeten Konzentrationen oberhalb von 92 % im Vergleich zu Kontrollkulturen, die ohne PETIR-004 inkubiert worden waren (Abb. 9 B).

Auch anti-CD3-Antikörper-stimulierte Splenozyten wurden durch PETIR-004 konzentrationsabhängig in ihrer DNS-Synthese gehemmt, ohne dass es hier zu einer signifikanten Zellschädigung kam (Abb. 10 A, B). Wie bei den PWM-stimulierten Zellen war die Proliferation ab PETIR-004-Konzentrationen von 0,078 µM signifikant vermindert, während eine 50-prozentige Hemmung bei einer Konzentration von 2,04 µM zu verzeichnen war.



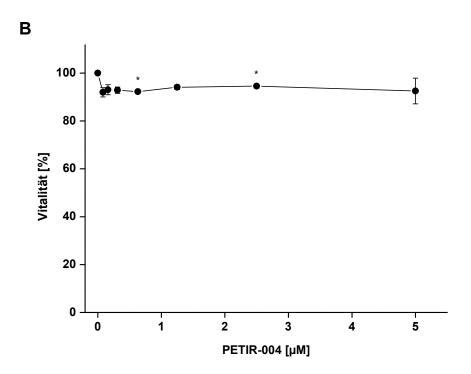
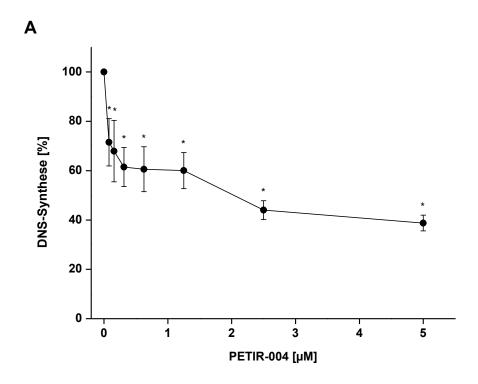


Abbildung 9: Einfluss des DP IV-/ APN-Inhibitors PETIR-004 auf die DNS-Synthese (A) und die Vitalität (B) PWM-stimulierter SJL/J-Maus-Splenozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von vier (A) bzw. drei (B) unabhängigen Experimenten. DNS-Synthese: 100 % entspricht 19655,6 \pm 5884,4 cpm; IC₅₀ 0,93 μ M. * = p < 0,05 (ANOVA).



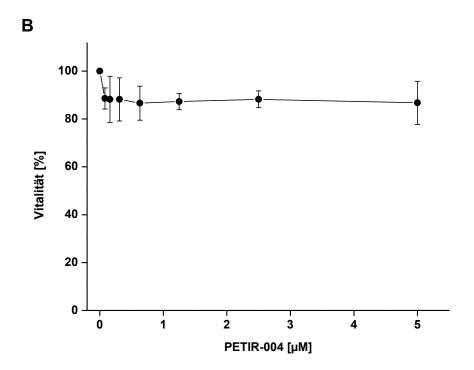


Abbildung 10: Einfluss des DP IV-/APN-Inhibitors PETIR-004 auf die DNS-Synthese (A) und die Vitalität (B) anti-CD3-stimulierter SJL/J-Maus-Splenozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von vier (A) bzw. drei (B) unabhängigen Experimenten. DNS-Synthese: 100 % entspricht 39161 \pm 13241 cpm; IC₅₀ 2,04 μ M. * = p < 0,05 (ANOVA).

4.1.2. Einfluss der kombinierten DP IV-/ APN-Inhibitoren PETIR-001 und PETIR-004 auf die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IFN-γ, IL-2 und IL-17 mitogenstimulierter SJL/J-Maus-Splenozyten

In der Immunpathogenese der EAE spielen die Th1- und Th17-Immunreaktionen und ihre Zytokinprofile eine entscheidende Rolle. Um zu überprüfen, inwieweit PETIR-001 und PETIR-004 Einfluss auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus Th1- und Th17-Zellen besitzen, wurden die Konzentrationen von IFN- γ , IL-2 und IL-17 in Kulturüberständen von mit PETIR-001 oder PETIR-004 inkubierten Splenozyten mittels ELISA quantitativ erfasst. Bevor die Kulturüberstände abgenommen wurden, waren PWM-stimulierte Zellen gesunder SJL/J-Mäuse in An- und Abwesenheit der Inhibitoren für 48 Stunden inkubiert worden.

4.1.2.1. IFN-γ

Nach einer 48-stündigen Inkubation PWM-stimulierter Splenozyten zeigte sich eine signifikante konzentrationsabhängige Hemmung der IFN- γ -Produktion. Wie vermutet, lagen die Konzentrationen des proinflammatorischen IFN- γ in den Kulturüberständen umso niedriger, je höhere PETIR-001-Konzentrationen eingesetzt wurden. Eine signifikante Reduktion konnte bereits mit einer PETIR-001-Konzentration von 0,63 μ M (hier nicht dargestellt) erzielt werden (Abb. 11 A).

Ebenfalls konnte für PETIR-004 eine konzentrationsabhängige Verminderung der IFN-γ-Produktion nachgewiesen werden, die bei 10 μM signifikant war und verglichen mit PETIR-001 etwas weniger ausgeprägt zum Tragen kommt (Abb. 11 B).

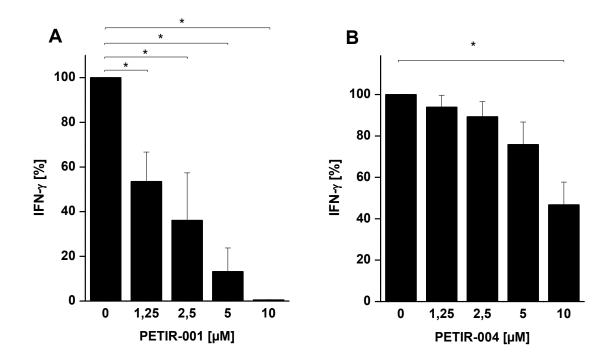


Abbildung 11: IFN- γ -Produktion PWM-stimulierter Splenozyten von SJL/J-Mäusen nach 48-stündiger Inkubation mit den DP IV-/ APN-Inhibitoren PETIR-001 (A) und PETIR-004 (B) in verschiedenen Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von vier (A) und sechs (B) Experimenten. PETIR-001 (A): 100 % entspricht 1965,1 ± 149,2 pg/ml (PWM-stimuliert ohne PETIR-001), unstimuliert: 3,6 ± 2,1 pg/ml (nicht dargestellt). PETIR-004 (B): 100 % entspricht 1886,5 ± 184,9 pg/ml (PWM-stimuliert ohne PETIR-004), unstimuliert: 4,8 ± 2,6 pg/ml (nicht dargestellt). * = p < 0,05 (ANOVA).

4.1.2.2. IL-2

Wie aus Abb. 12 A hervorgeht, war für das auf T-Lymphozyten stark aktivierend wirkende Zytokin IL-2 ebenfalls eine konzentrationsabhängige Verminderung der Produktion in Kulturüberständen unter PETIR-001 festzustellen. Signifikante Werte zeigten sich dabei bereits ab 0,63 μ M PETIR-001, während bei 2,5 μ M die IL-2-Konzentrationen bei etwa 65 % der für Kontrollen ohne Einsatz des Inhibitors gemessenen Werte lagen.

Auch PETIR-004 hemmte die IL-2-Produktion in konzentrationsabhängiger Weise. Bei Kulturüberständen von Zellkulturen, die mit 2,5 μ M oder höheren PETIR-004-Konzentrationen inkubiert worden waren, ergaben sich signifikante Verminderungen. Die IL-2-Konzentrationen lagen bei 2,5 μ M PETIR-004 bei 79 % und fielen bis 10 μ M auf 50 % der im Vergleich zu Kontrollen erreichten IL-2-Konzentrationen ab (Abb. 12 B).

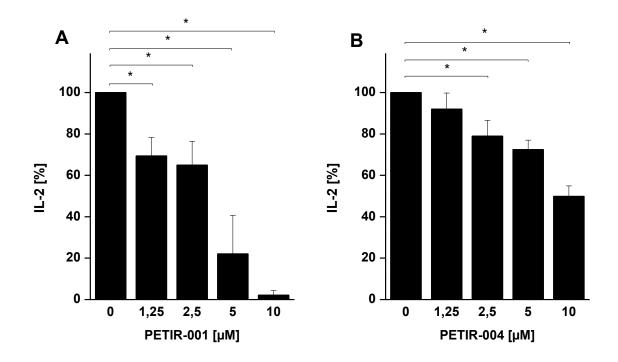


Abbildung 12: IL-2-Produktion PWM-stimulierter Splenozyten von SJL/J-Mäusen nach 48-stündiger Inkubation mit den DP IV-/APN-Inhibitoren PETIR-001 (A) und PETIR-004 (B) in verschiedenen Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von vier (A) und sechs (B) Experimenten. 100 % entspricht 391,3 \pm 109,4 pg/ml (PWM-stimuliert ohne PETIR-001 oder PETIR-004), unstimuliert: 10,1 \pm 9,6 pg/ml (nicht dargestellt). * = p < 0,05 (ANOVA).

4.1.2.3. IL-17

Messungen der IL-17-Konzentrationen in Kulturüberständen mitogenstimulierter Splenozyten ergaben, wie bereits für IFN- γ und IL-2 gezeigt, eine Verminderung unter Einfluss steigender PETIR-001- und PETIR-004-Konzentrationen. Der Einsatz beider Inhibitoren führte bei Konzentrationen ab 1,25 μ M zu einer signifikant verminderten IL-17-Produktion. Bei dieser Konzentration betrugen die Reduktion 29,6 % bei PETIR-001 sowie 24,2 % bei PETIR-004 und erreichte schließlich für die größte eingesetzte PETIR-001-Konzentration von 5 μ M eine Reduktion um 76,2 %, für die größte eingesetzte PETIR-004-Konzentration von 10 μ M um 71,9% (Abb. 13 A, B).

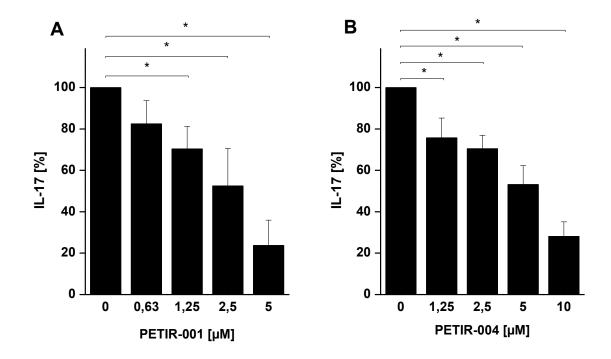


Abbildung 13: IL-17-Produktion PWM-stimulierter Splenozyten von SJL/J-Mäusen nach 48-stündiger Inkubation mit den DP IV-/APN-Inhibitoren PETIR-001 (A) und PETIR-004 (B) in verschiedenen Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von vier (A) und sechs (B) Experimenten. PETIR-001 (A): 100% entspricht 469,7 \pm 134,2 pg/ml (PWM-stimuliert ohne PETIR-001), unstimuliert: 1,5 \pm 1,0 pg/ml (nicht dargestellt). PETIR-004 (B): 100% entspricht 423,2 \pm 142,1 pg/ml (PWM-stimuliert ohne PETIR-004), unstimuliert: 2,0 \pm 1,3 pg/ml (nicht dargestellt). * = p < 0,05 (ANOVA).

4.1.3. Einfluss von PETIR-001 und PETIR-004 auf die klinischen Symptome der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) in SJL/J-Mäusen

4.1.3.1. Intraperitoneale PETIR-001-Applikation

Für die Untersuchung der Wirkung von PETIR-001 auf den Krankheitsverlauf der EAE wurden 15 weibliche SJL/J-Mäuse zeitgleich mit PLP $_{139-151}$ immunisiert. Fünf dieser Tiere bildeten die erste Interventionsgruppe, ihnen wurde 10 μ g PETIR-001 pro Tier pro Tag intraperitoneal verabreicht. Die fünf Tiere der zweiten Interventionsgruppe erhielten je 50 μ g PETIR-001 pro Tag. Als Trägerlösung dienten jeweils 100 μ l PBS. Die restlichen fünf Tiere repräsentierten die Kontrollgruppe, ihnen wurden äquivalente Volumina PBS pro Tier pro Tag intraperitoneal injiziert. Die Applikationen fanden für alle Tiere täglich über einen Zeitraum von Tag 15 bis 24 nach Immunisierung statt.

In Abb. 14 sind die klinischen Verläufe der EAE der beiden mit PETIR-001 behandelten Interventionsgruppen und der Kontrollgruppe dargestellt. Die EAE-Erkrankungsgrade aller Mäuse wurden täglich bewertet und ergaben für die einzelnen Gruppen gemittelt die Erkrankungsverläufe, die für einen Zeitraum von 90 Tagen erhoben wurden. Dabei zeigte sich, dass PETIR-001 in der Lage ist, die Symptome der aktiven EAE in Mäusen deutlich zu lindern. Bereits am vierten Tag nach Therapiebeginn (Tag 19 nach Immunisierung) lagen die mittleren Erkrankungsgrade beider mit PETIR-001 behandelten Gruppen erstmals signifikant unter dem Niveau der Kontrollgruppe. Diese Tiere wiesen auch im weiteren Beobachtungsverlauf beinahe durchgehend geringer ausgeprägte Symptome auf als die Kontrolltiere, was sich in den durchschnittlichen EAE-Erkrankungsgraden über 90 Tage entsprechend widerspiegelt: So erreichten die mit 10 μg behandelten Tiere einen EAE-Score von 1,03 ± 0,09, der deutlich niedriger als der für Kontrollen mit 1,86 ± 0,08 lag. Der kumulative Zeitraum signifikant verminderter neurologischer Beeinträchtigungen betrug 18 Tage.

Einen noch stärkeren positiven Einfluss im Sinne einer längerfristigen Remission konnte in Tieren gezeigt werden, die 50 μ g PETIR-001 i.p. erhalten hatten. Hier betrug der mittlere EAE-Grad 0,5 \pm 0,04 (Kontrolle 1,86 \pm 0,08) und war kumulativ über 50 Tage statistisch signifikant vermindert (vgl. Tab. 1).

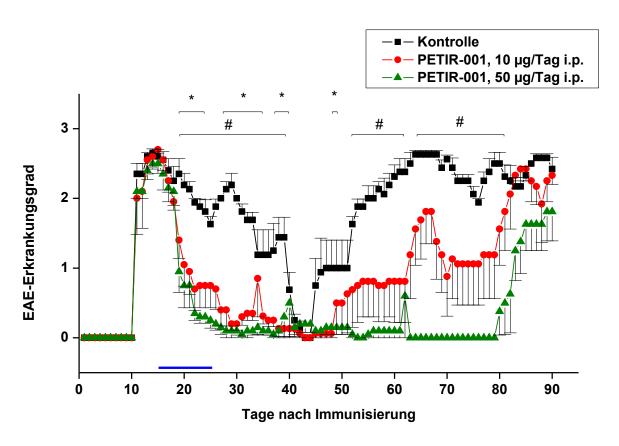


Abbildung 14: Krankheitsverlauf der EAE in weiblichen SJL/J-Mäusen nach therapeutischer i.p.-PETIR-001-Gabe. Therapiezeitraum Tag 15 bis 24, dargestellt durch den blauen Balken; Quadrate: Kontrolle (PBS) ohne PETIR-001, Kreise: 10 μ g PETIR-001/Tier/Tag, Dreiecke: 50 μ g PETIR-001/Tag/Tier. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von je fünf Tieren pro Gruppe. * (10 μ g/d) und # (50 μ g/d) kennzeichnen signifikanter Unterschiede zu Kontrollen, p < 0,05 (Mann-Whitney U-Test).

Tabelle 1: Vergleich der EAE-Erkrankungsgrade weiblicher SJL/J-Mäuse (je n = 5) nach Gabe von 10 μ g oder 50 μ g PETIR-001 i.p. pro Tag von Tag 15 bis 24 und Kontrollen. Beobachtungszeitraum 90 Tage, * = p < 0,05, # = Mittelwerte ± SEM.

	Erstmalig signifikant verminderter EAE- Erkrankungsgrad*	Kumulative Dauer signifikanter Symptomlinderung*	Durchschnittlicher maximaler Erkrankungsgrad#
Kontrolle	-	-	1,86 ± 0,08
PETIR-001, 10 μg, i.p.	Tag 19	18 Tage	1,03 ± 0,09
PETIR-001, 50 μg, i.p.	Tag 19	50 Tage	0,50 ± 0,04

4.1.3.2. Perorale PETIR-001-Applikation

Neben der intraperitonealen Injektion als parenteralem Applikationsweg sollte auch die Wirksamkeit von PETIR-001 auf den Verlauf der EAE nach peroraler Gabe untersucht werden. Dazu wurden, ähnlich zu den Experimenten der i.p.-Gabe, zwei Interventions- und eine Kontrollgruppe gebildet, die aus je fünf Mäusen bestanden. Alle Tiere wurden zeitgleich mit PLP₁₃₉₋₁₅₁ immunisiert und entwickelten Symptome der EAE. Mäuse der ersten Interventionsgruppe erhielten je 50 µg PETIR-001 in 25 µl Olivenöl gelöst täglich ab Tag 14

nach Immunisierung über einen Zeitraum von neun Tagen peroral verabreicht. Tiere der zweiten Gruppe erhielten auf demselben Weg und im selben Zeitraum je 100 μg (in 50 μl Öl) pro Tag. Kontrolltiere bekamen lediglich 50 μl Olivenöl ohne PETIR-001. Wie aus Abb. 15 hervorgeht, mildert PETIR-001 peroral verabreicht den Krankheitsverlauf der EAE in SJL/J-Mäusen sowohl in den Dosen von 50 μg als auch 100 μg pro Tag. Mäuse, die mit 100 μg pro Tag behandelt worden waren, zeigten dabei einen signifikant niedrigeren EAE-Grad über die Dauer von insgesamt 11 Tagen verglichen mit Kontrolltieren.

Die Gegenüberstellung der über den Beobachtungszeitraum von 48 Tagen gemittelten EAE-Grade verdeutlicht den Unterschied zwischen den Tieren der 100 μ g-Gruppe und der Kontrollgruppe: Mit PETIR-001 behandelte Mäuse wiesen im Durchschnitt einen Krankheitsgrad von 0,69 \pm 0,1 auf, Kontrolltiere hingegen von 1,38 \pm 0,11. Auch der durchschnittliche EAE-Erkrankungsgrad der Tiere der 50 μ g-Gruppe war gegenüber Kontrollen mit 0,92 \pm 0,09 vermindert, was auf eine Wirkung des peroral applizierten PETIR-001 hindeutete. Signifikante Unterschiede lagen in dieser Gruppe hier jedoch nicht vor.

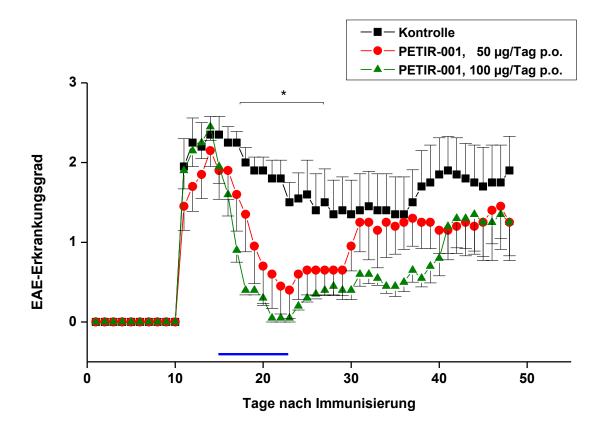


Abbildung 15: Krankheitsverlauf der EAE in weiblichen SJL/J-Mäusen nach therapeutischer p.o.-PETIR-001-Gabe. Therapiezeitraum Tag 14 bis 22, dargestellt durch den blauen Balken; Quadrate: Kontrolle (50 μ l Olivenöl) ohne PETIR-001, Kreise: 50 μ g PETIR-001/Tier/Tag, Dreiecke: 100 μ g PETIR-001/Tag/Tier. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von je fünf Tieren pro Gruppe. * = p < 0,05 für 100 μ g-Gruppe (Mann-Whitney U-Test)

Tabelle 2: Vergleich der EAE-Erkrankungsgrade weiblicher SJL/J-Mäuse (je n = 5) nach Gabe von 50 oder 100 μ g PETIR-001 p.o. pro Tag von Tag 14 bis 22 und Kontrollen. Beobachtungszeitraum 48 Tage, * = p < 0,05, # = Mittelwerte \pm SEM, n. s. = nicht signifikant

	Erstmalig signifikant verminderter EAE- Erkrankungsgrad*	Kumulative Dauer signifikanter Symptomlinderung*	Durchschnittlicher maximaler Erkrankungsgrad [#]
Kontrolle	-	-	1,38 ± 0,11
PETIR-001, 50 μg, p.o.	n. s.	-	0.92 ± 0.09
PETIR-001, 100 μg, p.o.	Tag 17	11 Tage	$0,69 \pm 0,1$

4.1.3.3. Intraperitoneale PETIR-004-Applikation

Um die Wirkung von intraperitoneal appliziertem PETIR-004 auf die EAE zu untersuchen, wurde nach EAE-Induktion bei fünf von zehn Mäusen mit Beginn des ersten Krankheitsschubs mit therapeutischen PETIR-004-i.p.-Applikationen begonnen. Diese bestanden aus 100 μ g (100 μ l) PETIR-004 pro Tier pro Tag und fanden über den Zeitraum von Tag 13 bis 22 nach Immunisierung statt. Die restlichen fünf Tiere bildeten die Kontrollgruppe und bekamen 100 μ l Olivenöl über denselben Zeitraum injiziert.

Abb. 16 zeigt eine deutliche, bereits am ersten Tag nach Therapiebeginn zu beobachtende Reduktion der EAE-Symptome unter PETIR-004-Einfluss gegenüber Kontrollen. In den Folgetagen war eine kurzzeitige, beinahe vollständige Remission nach dem ersten Schub zu verzeichnen, die deutlich ausgeprägter war und etwa sechs Tage früher einsetzte, als die für den Krankheitsverlauf typische Remission der Kontrollpopulation. Für den 104-tägigen Beobachtungszeitraum waren neurologische Symptome insgesamt an 75 Tagen milder ausgeprägt als bei Kontrolltieren ohne PETIR-004, von denen acht Tage als statistisch signifikant anzusehen waren.

Wie auch aus Tab. 3 hervorgeht, milderte i.p.-appliziertes PETIR-004 den Verlauf der EAE und führte zu einem niedrigeren durchschnittlichen EAE-Erkrankungsgrad von $1,45 \pm 0,08$ verglichen mit Kontrollen ($1,93 \pm 0,04$), was unter anderem auch auf eine zweite partielle Remission ab Tag 48 zurückzuführen ist, die bei der Kontrollgruppe ausblieb.

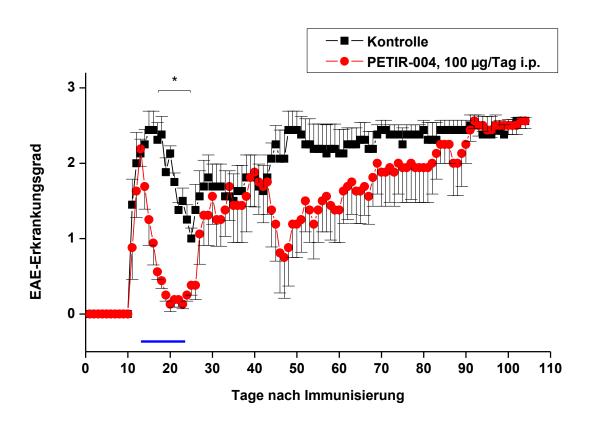


Abbildung 16: Krankheitsverlauf der EAE in weiblichen SJL/J-Mäusen nach therapeutischer i.p.-PETIR-004-Gabe. Therapiezeitraum Tag 13 bis 22, dargestellt durch den blauen Balken; Quadrate: Kontrolle (Olivenöl) ohne PETIR-001, Kreise: 100 μ g PETIR-004/Tier/Tag. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von je fünf Tieren pro Gruppe. * = p < 0,05 (Mann-Whitney U-Test).

Tabelle 3: Vergleich der EAE-Erkrankungsgrade weiblicher SJL/J-Mäuse (je n = 5) nach Gabe von 100 μ g PETIR-004 i.p. pro Tag von Tag 13 bis 22 und Kontrollen. Beobachtungszeitraum 104 Tage, * = p < 0.05, # = Mittelwerte ± SEM.

	Erstmalig signifikant verminderter EAE- Erkrankungsgrad*	Kumulative Dauer signifikanter Symptomlinderung*	Durchschnittlicher maximaler Erkrankungsgrad#
Kontrolle	-	-	1,93 ± 0,04
PETIR-004, 100 μg, i.p.	Tag 17	8 Tage	1,45 ± 0,08

4.1.3.4. Perorale PETIR-004-Applikation

Nachdem die therapeutische Wirksamkeit von PETIR-004 nach intraperitonealer Gabe an SJL/J-Mäusen gezeigt werden konnte, sollte diese Substanz auch hinsichtlich der Wirksamkeit auf die Symptome der EAE nach peroraler Gabe untersucht werden.

Auch für diese Experimente wurde der Enzym-Inhibitor für die therapeutische Gabe in Olivenöl gelöst und fünf Tieren nach EAE-Induktion täglich in einer Dosis von 50 µg über die Tage 14 bis 22 nach Immunisierung verabreicht.

Verglichen mit den Kontrolltieren, die nur Olivenöl erhalten hatten, zeigten sich für Tiere, die mit 50 μ g PETIR-004 (in 25 μ l Öl) behandelt worden waren, signifikant verminderte EAE-Erkrankungsgrade erstmals ab Tag 18 für die Dauer von sieben Tagen (Abb. 17). Durchschnittlich lagen die Werte über den gesamten Beobachtungszeitraum von 48 Tagen für die Interventionsgruppe mit einem EAE-Grad von 1,05 \pm 0,12 unter dem Niveau der Kontrollgruppe mit 1,38 \pm 0,11 (Tab. 4).

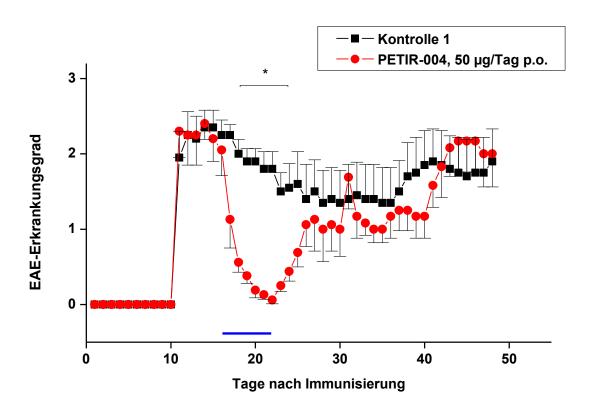


Abbildung 17: Krankheitsverlauf der EAE in weiblichen SJL/J-Mäusen nach therapeutischer p.o.-PETIR-004-Gabe: Therapiezeitraum Tag 14 und 22, dargestellt durch den blauen Balken; Quadrate: Kontrolle (Olivenöl) ohne PETIR-004, Kreise: 50 μ g PETIR-004/Tier/Tag. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von je fünf Tieren pro Gruppe. * = p < 0,05 (Mann-Whitney U-Test).

Zusätzlich hierzu wurde in einem weiteren Experiment mit einer gesonderten Kontrollgruppe, die Olivenöl erhalten hatte, PETIR-004 in einer Dosis von 100 µg (in 50 µl Öl) p.o. bei fünf Mäusen eingesetzt. Die Applikationen erfolgten zu diesem Zweck an den Tagen 13 bis 22 sowie abweichend von den vorherigen Versuchen zusätzlich ein weiteres Mal im zweiten

Erkrankungsschub von Tag 40 bis 46, um zu untersuchen, ob PETIR-004 in der Lage ist, auch weitere Schübe bei erneuter Gabe zu reduzieren.

Wie Abb. 18 zeigt, führte die PETIR-004-Gabe von 100 μg pro Tag zu Beginn des ersten Schubs auch in diesem Versuchsansatz zu einer raschen und ausgeprägten Linderung der EAE-Symptome erkrankter Mäuse. Auf diese Remissionsphase folgte ein zweiter, im Vergleich zu Kontrolltieren weniger starker Schub, in dem ein zweiter Therapieversuch unternommen wurde (Tage 40 bis 46). In Folge dieser erneuten PETIR-004-Gabe waren die EAE-Symptome abermals deutlich regredient, während nicht behandelte Tiere im selben Zeitraum einen Erkrankungsprogress zeigten. Im 104-tägigen Beobachtungszeitraum lagen signifikant verminderte EAE-Grade gegenüber Kontrolltieren über eine Dauer von insgesamt 15 Tagen sowie ein niedrigerer durchschnittlicher EAE-Grad von 1,03 \pm 0,05 vor (Kontrolle: 1,93 \pm 0,08) (Tab. 4).

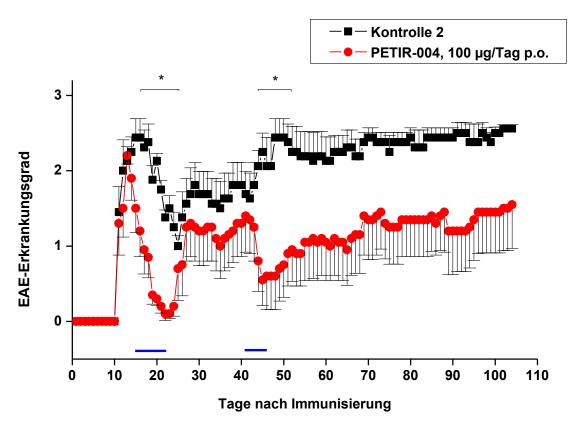


Abbildung 18: Krankheitsverlauf der EAE in weiblichen SJL/J-Mäusen nach therapeutischer p.o.-PETIR-004-Gabe: Therapiezeiträume zwischen Tag 13 und 22 sowie Tag 40 und 46, dargestellt durch die blauen Balken; Quadrate: Kontrolle (Olivenöl) ohne PETIR-004, Kreise: 100 µg PETIR-004/Tier/Tag. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von je fünf Tieren pro Gruppe. * = p < 0,05 (Mann-Whitney U-Test).

Tabelle 4: Vergleich der EAE-Erkrankungsgrade von weiblichen SJL/J-Mäusen (je n = 5) nach Gabe von 50 μ g p.o. pro Tag von Tag 14 bis 22 oder 100 μ g PETIR-004 pro Tag von Tag 13 bis 22 und von zwei gesonderten Kontrollgruppen. Beobachtungszeitraum 48 Tage (50 μ g) bzw. 104 Tage (100 μ g), * = p < 0,05, # = Mittelwerte ± SEM.

	Therapie- zeitraum	Erstmalig signifikant verminderter Erkrankungsgrad*	Kumulative Dauer signifikanter Symptomlinderung*	Durchschnittlicher maximaler Erkrankungsgrad#
Kontrolle 1	Tage 14- 22	-	-	1,38 ± 0,11
PETIR-004, 50 μg, p.o.	Tage 14- 22	Tag 18	7 Tage	1,05 ± 0,12
Kontrolle 2	Tage 13- 22 und 40- 46	-	-	1,93 ± 0,08
PETIR-004, 100 μg, p.o.	Tage 13- 22 und 40- 46	Tag 16	15 Tage	1,03 ± 0,05

4.1.4. Histopathologische Untersuchungen zum Einfluss von PETIR-001 und PETIR-004 auf Immunzellinfiltrate im Rückenmark EAE-erkrankter SJL/J-Mäuse

Zur Analyse der krankheitsbedingten Immunzellinfiltrate im ZNS nach Induktion der EAE mittels PLP₁₃₉₋₁₅₁ und i.p./p.o.-Gabe PETIR-001 oder PETIR-004 wurden SJL/J-Mäuse (n = 4 pro Gruppe) getötet und die Rückenmarke entnommen. Nach Fixierung und Färbung mit Hämatoxylin/ Eosin erfolgte die Untersuchung der Schnitte mit Auszählung der Immunzellinfiltrate. Wie in Abb. 19 dargestellt konnten nach jeweiliger Applikation der einen oder anderen Substanz weniger inflammatorische Infiltrate im ZNS identifiziert werden. Diese Befunde waren statistisch signifikant (ANOVA).

Es bestand eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der Immunzellinfiltrate in den Rückenmarken und den EAE-Erkrankungsgraden (in den Abbildungen nicht dargestellt).

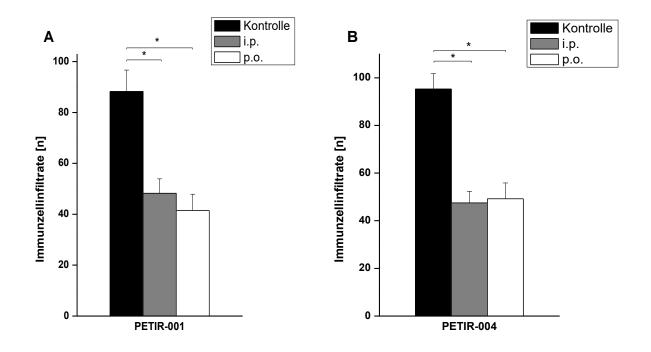


Abbildung 19: Anzahl entzündlicher Immmunzellinfiltrate im Rückenmark weiblicher SJL/J-Mäuse (n = 4) nach EAE-Induktion und nach therapeutischer i.p.- oder p.o.-PETIR-001- (A) oder -PETIR-004-Gabe (B): Therapiezeiträume zwischen Tag 12 und 16 nach EAE-Induktion, PETIR-001 50 μ g /Tier/ Tag p.o. oder i.p., PETIR-004 100 μ g /Tier/ Tag p.o. oder 100 μ g i.p., Kontrolle Olivenöl 50 μ l/ Tier / Tag. Analyse am Tag 19 nach EAE-Induktion. * = p < 0,05 (ANOVA).

4.1.5. Einfluss von PETIR-001 und PETIR-004 auf die Konzentration von latentem TGF- β 1 in Plasmen von Mäusen mit EAE

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die Konzentration von latentem TGF- $\beta1$ in Plasmen von Mäusen, die nach Einleitung der EAE therapeutische Injektionen des reversiblen DP IV-Inhibitors Lys[Z(NO₂)]-pyrrolidide (I40) erhielten, erhöht war [188; 187]. Diese Plasmen stammten von den Tieren, die auch mit einem deutlichen Rückgang der EAE-Symptome auf die I40-Gaben reagierten, so dass davon auszugehen ist, dass die Induktion des TGF- $\beta1$ wesentlich an der antiinflammatorischen Wirkung der DP IV-Inhibitoren beteiligt ist, was durch weitere Versuche erhärtet werden konnte [224].

Um zu überprüfen, inwieweit PETIR-001 und PETIR-004 Einfluss auf die TGF- β 1-Konzentration in EAE-Plasmen nehmen, wurden die Plasmen von Mäusen nach Induktion der EAE mit bzw. ohne PETIR-Therapie gewonnen und die Konzentrationen von latentem TGF- β 1 mittels ELISA quantitativ erfasst. Die PETIR-Gaben erfolgten dazu in den Tagen 12 bis 16, die Gewinnung der Plasmen am Tag 19 nach Immunisierung.

Wie aus Abb. 20 ersichtlich, waren TGF-β1-Plasmaspiegel in mit PETIR-001 p.o. behandelten Tieren verglichen mit Kontrolltieren signifikant höher. Überraschenderweise traf dies jedoch nicht für Mäuse zu, die PETIR-001 i.p. verabreicht bekommen hatten. Ein ähnlicher Trend (nicht signifikant) war für PETIR-004 zu verzeichnen.

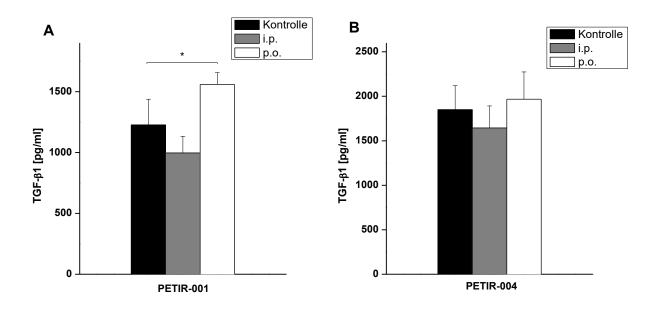


Abbildung 20: Konzentration des latenten TGF- β 1 in Plasmen von SJL/J-Mäusen (n = 4) nach EAE-Induktion und therapeutischer Gabe von PETIR-001 (A) und PETIR-004 (B) i.p. und p.o. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von vier Experimenten. * = p < 0,05 (ANOVA).

4.2. Minocyclin und Pentaacetylcyclin: In vitro- und in vivo-Experimente

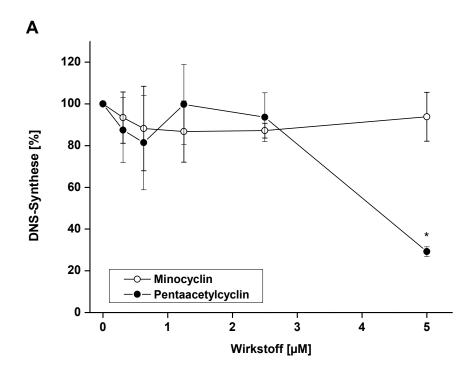
4.2.1. Einfluss der Tetracyclinderivate Minocyclin und Pentaacetylcyclin auf die DNS-Synthese und Vitalität mitogen- und anti-CD3-stimulierter SJL/J-Maus-Splenozyten

Neben der Substanzgruppe der dualen DP IV-/APN-Inhibitoren sollten in dieser Arbeit zwei weitere Substanzen aus der Gruppe der Tetracycline untersucht werden: Minocyclin und das A-Ring-aromatisierte Acetylminocyclin Pentaacetylcyclin. Von Minocyclin ist bereits länger bekannt, dass es antiinflammatorische und neuroprotektive Wirkungen besitzt [180; 147; 33]. Modifikation der Minocyclin-Leitstruktur chemischen und Erfindung sollte Pentaacetylcyclins eine größere Bioverfügbarkeit und die Erweiterung Einsatzspektrums bei aufgehobener antibiotischer Wirkung erzielt werden.

Nachfolgend wurden die Wirkungen Minocyclins und Pentaacetylcyclins in Bezug auf Proliferation und Vitalität muriner Splenozyten untersucht. Hierzu wurden Zellkulturen zu Beginn der Inkubation Minocyclin oder Pentaacetylcyclin in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Parallel zur Messung der DNS-Synthese wurde in zusätzlichen Experimenten die Vitalität der Zellen unter den verschiedenen eingesetzten Konzentrationen überprüft, um zelltoxische Effekte auszuschließen.

Wie in Abb. 21 A dargestellt, konnte für PWM-stimulierte Zellkulturen, die mit Minocyclin inkubiert worden waren, eine geringe, jedoch statistisch nicht signifikante Verminderung der DNS-Synthese festgestellt werden. Für Pentaacetylcyclin war zwischen 2,5 μ M und 5,0 μ M eine ausgeprägte Hemmung der DNS-Synthese zu verzeichnen, die bis 5,0 μ M auf 29,2 % gesunken war (IC₅₀ 4,2 μ M). Die in separaten Experimenten ermittelte Zellvitalität (Abb. 21 B) war in Konzentrationen bis 5,0 μ M kaum beeinträchtigt und lag hier bei über 92 % für Minocyclin und bei ca. 90 % für Pentaacetylcyclin.

Bei Zellkulturen, die anti-CD3-stimuliert worden waren, ergaben sich für verschiedene Minocyclin-Konzentrationen keine signifikanten Verminderungen der DNS-Synthese bis 5 μ M (Abb. 22 A). Pentaacetylcyclin verursachte bei Konzentrationen von 0,63 und 1,25 μ M überraschenderweise eine Proliferationszunahme der T-Zellen von etwa 20 %, bevor es ab etwa 2,5 μ M zu einer signifikanten Abnahme auf bis zu 42 % bei 5,0 μ M kam. Die Zellvitalitäten war für Minocyclin bei 5,0 μ M mit 90 % und für Pentaacetylcyclin mit 82 % leicht vermindert (Abb. 22 B).



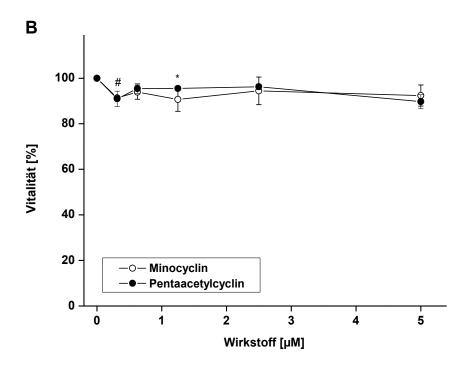
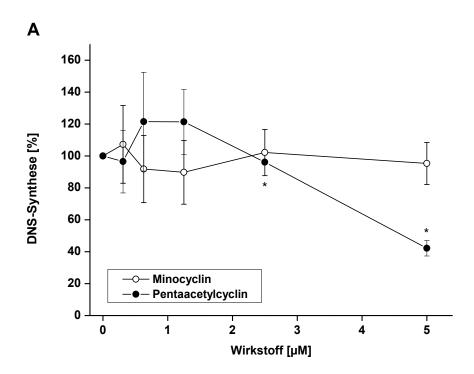


Abbildung 21: Einfluss Minocyclins und Pentaacetylcyclins auf die DNS-Synthese (A) und die Vitalität (B) PWM-stimulierter SJL/J-Maus-Splenozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von vier (A) bzw. drei (B) unabhängigen Experimenten. DNS-Synthese: 100 % entspricht 12483,8 ± 6789,5 cpm für Minocyclin, 33897,2 ± 4138,7 cpm für Pentaacetylcyclin; IC $_{50}$ (Pentaacetylcyclin) 4,2 μ M. # (Minocyclin) und * (Pentaacetylcyclin) kennzeichnen signifikante Unterschiede zu Kontrollkulturen, p < 0,05 (ANOVA).



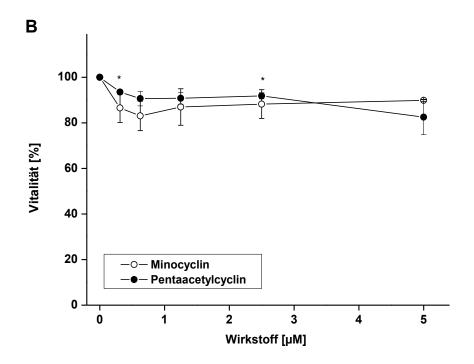


Abbildung 22: Einfluss Minocyclins und Pentaacetylcyclins auf die DNS-Synthese (A) und die Vitalität (B) anti-CD3-stimulierter SJL/J-Maus-Splenozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von vier (A) bzw. drei (B) unabhängigen Experimenten. DNS-Synthese: 100 % entspricht 24112,4 \pm 12083,8 cpm für Minocyclin, 55514,9 \pm 7862,7 cpm für Pentaacetylcyclin; IC50 (Pentaacetylcyclin) 4,6 μ M. # (Minocyclin) und * (Pentaacetylcyclin) kennzeichnen signifikante Unterschiede zu Kontrollkulturen, p < 0,05 (ANOVA).

4.2.2. Einfluss Minocyclins und Pentaacetylcyclins auf die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IFN-γ, IL-2 und IL-17 mitogen-stimulierter SJL/J-Maus-Splenozyten

Um zu überprüfen, ob und wie stark verglichen mit Minocyclin der hemmende Einfluss Pentaacetylcyclins auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine ist, wurden die Konzentrationen von IFN-γ, IL-2 und IL-17 in Kulturüberständen von mit Minocyclin oder Pentaacetylcyclin inkubierten Splenozyten mittels ELISA quantitativ erfasst. Ähnlich zu den PETIR-Experimenten wurden PWM-stimulierte Splenozyten gesunder SJL/J-Mäuse für 48 Stunden mit einem der beiden Tetracyclinderivate inkubiert, bevor die Kulturüberstände abgenommen wurden.

Wie aus Abb. 23 hervorgeht, gingen die IFN- γ -Spiegel in Kulturüberständen unter Einfluss von Pentaacetylcyclin konzentrationsabhängig zurück. Bei 10 μ M Pentaacetylcyclin war nur 12 % der IFN- γ -Konzentration verglichen mit Kontrollen festzustellen. Minocyclin hatte bis 10 μ M keinen Einfluss auf die IFN- γ -Produktion.

Wie in Abb. 24 zu beobachten, war bei niedrigen Pentaacetylcyclin-Konzentrationen ein zunächst überraschender Anstieg der IL-2-Konzentrationen zu verzeichnen, bis bei 10 μ M Pentaacetylcyclin eine signifikante Hemmung vorlag. Minocyclin senkte, bis 10 μ M eingesetzt, die IL-2-Produktion nicht.

Ähnlich wie IFN- γ verhielt sich das proinflammatorische Zytokin IL-17 in Kulturüberständen nach Inkubation mit unterschiedlichen Pentaacetylcyclin-Konzentrationen. Pentaacetylcyclin senkte IL-17 konzentrationsabhängig auf bis zu 30 % bei 5 μ M verglichen mit Kontrollen ohne Pentaacetylcyclin. Minocyclin bewirkte im selben Konzentrationsbereich keine IL-17-Reduktion (Abb. 25).

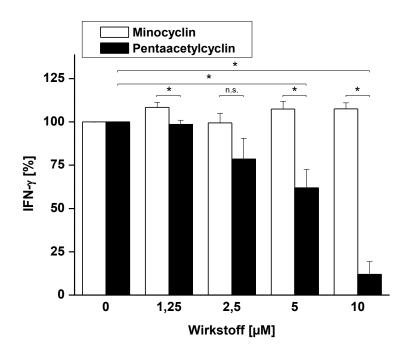


Abbildung 23: IFN- γ -Produktion PWM-stimulierter Splenozyten von SJL/J-Mäusen (n = 4) nach 48-stündiger Inkubation mit Minocyclin oder Pentaacetylcyclin in verschiedenen Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von je vier Experimenten. 100 % entspricht 2149,25 ± 113,4 pg/ml (PWM-stimuliert ohne Minocyclin oder Pentaacetylcyclin), unstimuliert: 6,5 ± 3,8 pg/ml (nicht dargestellt). * = p < 0,05, n.s. = nicht signifikant (ANOVA).

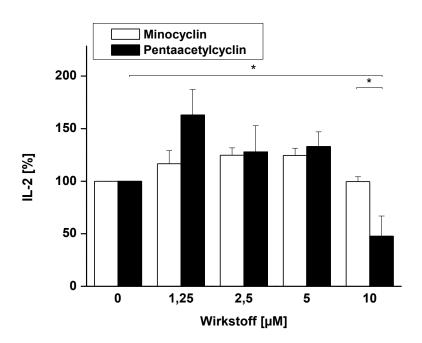


Abbildung 24: IL-2-Produktion PWM-stimulierter Splenozyten von SJL/J-Mäusen (n = 4) nach 48-stündiger Inkubation mit Minocyclin und Pentaacetylcyclin in verschiedenen Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von je vier Experimenten. 100 % entspricht 321,38 \pm 118,52 pg/ml (PWM-stimuliert ohne Minocyclin oder Pentaacetylcyclin), unstimuliert: 0,9 \pm 0,9 pg/ml (nicht dargestellt). * = p < 0,05 (ANOVA).

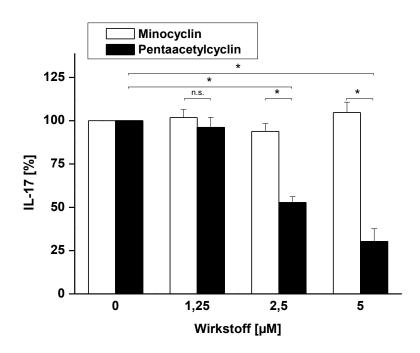


Abbildung 25: IL-17-Produktion PWM-stimulierter Splenozyten von SJL/J-Mäusen (n = 4) nach 48-stündiger Inkubation mit Minocyclin und Pentaacetylcyclin in verschiedenen Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von je vier Experimenten. 100 % entspricht $521,73 \pm 204,84$ pg/ml (PWM-stimuliert ohne Minocyclin oder Pentaacetylcyclin), unstimuliert: $0,85 \pm 0,51$ pg/ml (nicht dargestellt). * = p < 0,05, n.s. = nicht signifikant (ANOVA).

4.2.3. In vivo-Untersuchungen zum Einfluss Minocyclins und Pentaacetylcyclins auf die klinischen Symptome der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) in SJL/J-Mäusen nach therapeutischer intraperitonealer und peroraler Applikation

4.2.3.1. Intraperitoneale Applikation

Für die Untersuchung der Wirkung von Minocyclin und Pentaacetylcyclin auf den Krankheitsverlauf der EAE wurden 15 weibliche SJL/J-Mäuse mit PLP₁₃₉₋₁₅₁ immunisiert. Für die Versuche mit intraperitonealer Applikation wurden jeweils fünf Tieren entweder 100 μg Minocyclin oder Pentaacetylcyclin täglich i.p. injiziert. Fünf weitere Tiere bildeten die Kontrollgruppe und bekamen in äquivalenten Volumina 100 μg Rapsöl pro Tier pro Tag i.p. verabreicht. Der Therapiezeitraum erstreckte sich von Tag 12 bis 20 nach Immunisierung.

Wie aus Abb. 26 ersichtlich, sind beide Substanzen, Minocyclin und Pentaacetylcyclin, in der Lage, die Symptome der EAE signifikant zu reduzieren. Im direkten Vergleich zeigte sich, dass während des Therapiezeitraums mit Pentaacetylcyclin nicht nur eine bessere Wirksamkeit zu verzeichnen war, sondern diese signifikante Remission auch etwa einen Tage früher einsetzte.

Wie Tab. 5 zeigt, lagen die EAE-Erkrankungsgrade nach therapeutischer i.p.-Pentaacetylcyclin-Gabe im gesamten Beobachtungszeitrum von 54 Tagen mit $1,34\pm0,46$ im Mittel niedriger als bei Minocyclin mit $1,51\pm0,5$ und $2,1\pm0,31$ für die Kontrollgruppe. Signifikante Symptomlinderungen verglichen mit Kontrollen traten dabei über drei Tage bei Minocyclin und sechs Tage bei Pentaacetylcyclin auf.

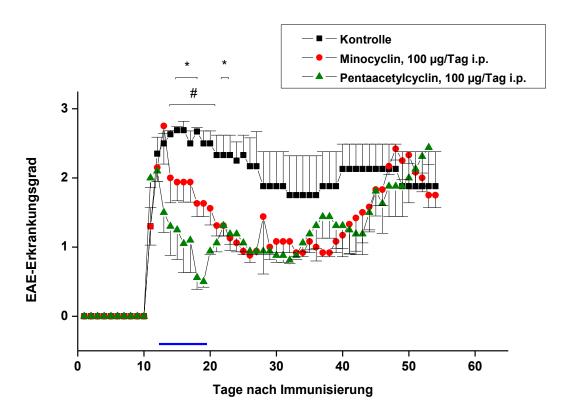


Abbildung 26: Krankheitsverlauf der EAE in weiblichen SJL/J-Mäusen nach therapeutischer i.p.-Gabe von Minocyclin oder Pentaacetylcyclin. Therapiezeiträume zwischen Tag 12 bis 20, dargestellt durch die blauen Balken; Kreise 100 μ g Minocyclin/Tier/Tag, Dreiecke: 100 μ g Pentaacetylcyclin/Tag/Tier. Quadrate: Kontrolle mit Rapsöl. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von je fünf Tieren pro Gruppe. * (Minocyclin), # (Pentaacetylcyclin) = p < 0,05 (Mann-Whitney U-Test).

Tabelle 5: Vergleich der EAE-Erkrankungsgrade in weiblichen SJL/J-Mäusen (je n = 5) nach Gabe von 100 μ g Minocyclin oder 100 μ g Pentaacetylcyclin i.p. und Kontrollen. Beobachtungszeitraum 54 Tage, * = p < 0.05, # = Mittelwerte \pm SEM.

	Erstmalig signifikant verminderter EAE- Erkrankungsgrad*	Kumulative Dauer signifikanter Symptomlinderung*	Durchschnittlicher maximaler Erkrankungsgrad [#]
Kontrolle	-	-	2,1 ± 0,31
Minocyclin, 100 μg, i.p.	Tag 15	3 Tage	1,51 ± 0,5
Pentaacetylcyclin, 100 μg, i.p.	Tag 14	6 Tage	1,34 ± 0,46

4.2.3.2. Perorale Applikation

Ähnlich war das Prozedere für die Versuche mit peroraler Gabe: Je fünf Tiere erhielten 100 µg Minocyclin oder Pentaacetylcyclin, weitere fünf dienten als Kontrollen. Therapeutische p.o.-Applikationen fanden täglich im Zeitraum von Tag 14 bis 22 nach Immunisierung statt.

Abb. 27 verdeutlicht, dass auch durch die perorale Applikation ein positiver Einfluss auf die Schwere der EAE-Erkrankungsgrade ausgeübt werden kann: Beide Tetracyclinderivate schwächten den ersten EAE-Schub im Vergleich zu Kontrollen deutlich ab und zeigten über den Beobachtungszeitraum von 45 Tagen niedrigere durchschnittliche Erkrankungsgrade. Wie bereits bei parenteraler Applikation zu verzeichnen, trat die durch peroral appliziertes Pentaacetylcyclin induzierte signifikante EAE-Reduktion eher auf und dauerte länger an, was aus Abb. 26 und Tab. 6 hervorgeht.

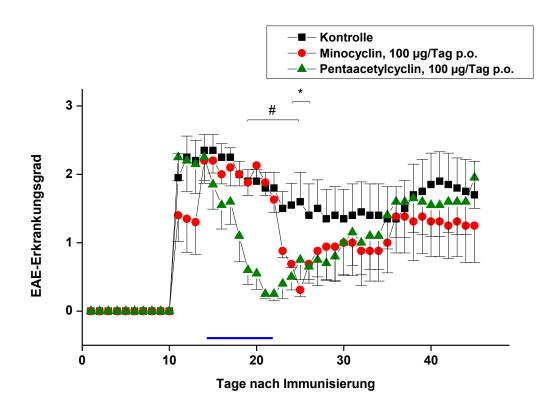


Abbildung 27: Krankheitsverlauf der EAE in weiblichen SJL/J-Mäusen nach therapeutischer p.o.-Gabe von Minocyclin oder Pentaacetylcyclin. Therapiezeiträume zwischen Tag 14 bis 22, dargestellt durch die blauen Balken; Kreise: 100 µg Minocyclin/Tier/Tag, Dreiecke: 100 µg Pentaacetylcyclin/Tag/Tier. Quadrate: Kontrolle mit Rapsöl. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von je fünf Tieren pro Gruppe. * (Minocyclin), # (Pentaacetylcyclin) = p < 0,05 (Mann-Whitney U-Test).

Tabelle 6: Vergleich der EAE-Erkrankungsgrade in weiblichen SJL/J-Mäusen (je n = 5) nach Gabe von 100 μ g Minocyclin oder 100 μ g Pentaacetylcyclin p.o. und Kontrollen. Beobachtungszeitraum 45 Tage, * = p < 0.05, # = Mittelwerte \pm SEM.

	Erstmalig signifikant verminderter EAE- Erkrankungsgrad*	Kumulative Dauer signifikanter Symptomlinderung*	Durchschnittlicher maximaler Erkrankungsgrad [#]
Kontrolle	-	-	1,74 ± 0,32
Minocyclin, 100 μg, p.o.	Tag 24	3 Tage	1,33 ± 0,5
Pentaacetylcyclin, 100 μg, p.o.	Tag 19	7 Tage	1,26 ± 0,58

4.2.4. Histopathologische Untersuchungen zum Einfluss von Minocyclin und Pentaacetylcyclin auf Immunzellinfiltrate im Rückenmark EAE-erkrankter SJL/J-Mäuse

Ähnlich zu den Untersuchungen der PETIR-Substanzen wurden SJL/J-Mäusen nach EAE-Induktion und Therapie mit Minocyclin oder Pentaacetylcyclin (i.p. oder p.o.) getötet und nach Präparation die Immunzellinfiltrate im Rückenmark der Tiere dokumentiert.

Abb. 28 fasst diese Ergebnisse zusammen. Statistisch signifikante Unterschiede der Immunzellinfiltrate zur Kontrolle lagen nach peroraler Pentaacetylcyclin-Gabe vor. Für den parenteralen Applikationsweg und die Minocyclin-Gruppen waren die Infiltrate ebenfalls, jedoch nicht signifikant reduziert.

Es bestand eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der Immunzellinfiltrate in den Rückenmarken und den EAE-Erkrankungsgraden (in den Abbildungen nicht dargestellt).

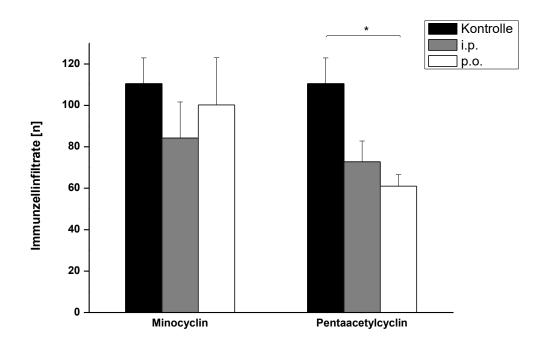


Abbildung 28: Anzahl entzündlicher Immmunzellinfiltrate im Rückenmark weiblicher SJL/J-Mäuse (n= 4) nach EAE-Induktion und nach therapeutischer i.p.- oder p.o.-Minocyclin- oder -Pentaacetylcyclin-Gabe: Therapiezeiträume zwischen Tag 13 und 17 nach EAE-Induktion, Minocyclin und Pentaacetylcyclin je 100 μ g /Tier/ Tag p.o. oder i.p., Kontrolle PBS 100 μ l/ Tier /Tag, Analyse am Tag 20 nach EAE-Induktion. * = p < 0,05 (ANOVA).

4.2.5. Einfluss von Minocyclin und Pentaacetylcyclin auf TGF-β1-Konzentrationen in EAE-Mausplasmen

Um zu prüfen, ob der Einfluss Pentaacetylcyclins auf die Konzentration des antiinflammatorischen Zytokins TGF- $\beta1$ in EAE-Plasmen größer ist als der des Minocyclins, wurden Plasmen von Mäusen mit EAE nach Minocyclin- oder Pentaacetylcyclin-Therapie gewonnen und die TGF- $\beta1$ -Konzentrationen mittels ELISA gemessen. Die Therapie fand in den Tagen 13 bis 17 nach Immunisierung statt, die Gewinnung der Plasmen an Tag 20.

Aus Abb. 29 geht hervor, dass Plasmaspiegel des latenten TGF- β 1 nach Therapie mit jeweils einem der Tetracyclinderivate in Mäusen mit EAE höher lagen als in Kontrollen. So waren die TGF- β 1-Plasma-Konzentrationen nach i.p.-Pentaacetylcyclin-Therapie mit 5644 ± 1269 pg/ml etwa doppelt so hoch als bei Kontrollen (2829 ± 891 pg/ml), jedoch niedriger als bei Therapie mit Minocyclin (6718 ± 1691 pg/ml). Nach peroraler Gabe mit Pentaacetylcyclin betrug die TGF- β 1-Plasmakonzentration 6184 ± 2372 pg/ml und war damit höher als bei Minocyclin (3928 ± 977 pg/ml) und Kontrollen (2829 ± 891pg/ml), ohne dabei signifikante Werte zu erreichen.

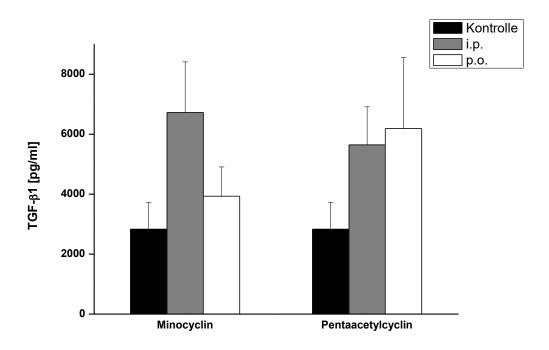


Abbildung 29: Konzentration von latentem TGF-β1 in Plasmen von SJL/J-Mäusen (n = 4) nach EAE-Induktion und intraperitonealer und peroraler Gabe von Minocyclin oder Pentaacetylcyclin. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von vier Experimenten.

5. Diskussion

Die Multiple Sklerose, eine autoimmunvermittelte inflammatorische, demyelinisierende und neurodegenerative Erkrankungen des zentralen Nervensystems, geht mit teils schweren körperlichen - nicht selten auch psychischen - Beeinträchtigungen und einem hohen Leidensdruck einher, deren Folgen und Therapie beträchtliche medizinische Herausforderungen darstellen und nicht zuletzt auch sozioökonomisch bedeutsam sind. Eine Heilung der MS ist bis dato nicht möglich; die Therapieansätze zielen auf Symptomkontrolle ab. Die bisher verfügbaren Arzneimittel werden überwiegend parenteral appliziert, so dass die Entwicklung oraler Substanzen erstrebenswert ist. In den letzten Jahren wurden zahlreiche neue Substanz entwickelt und erprobt, von denen es wegen häufig problematischer Nutzen-Risiko-Verhältnisse nur eine kleine Zahl zur Zulassung geschafft hat. Etliche Substanzen kommen daher ohne Zulassung probatorisch zum Einsatz (off-label). Weitere Bemühungen zur Entwicklung wirksamer und gut verträglicher Medikamente sind daher erforderlich. In dieser Arbeit wurden die in vitro- und in vivo-Wirkungen auf Autoimmunität des zentralen Nervensystems von Substanzen zweier unterschiedlicher Klassen untersucht: 1) Die dualen DP IV-/ APN-Inhibitoren PETIR-001 und PETIR-004 sowie 2) Minocyclin und das A-Ring-aromatisierte Acetylminocyclin Pentaacetylcyclin.

Die im ersten Teil der Arbeit untersuchten Substanzen PETIR-001 und PETIR-004 sind Bestandteile des neuartigen therapeutischen Konzepts "Peptidase-targeted Immunoregulation" (PETIR™) [7]. Es handelt sich um duale Inhibitoren der enzymatischen Funktionen von DP IV und APN, die durch Ansorge und Mitarbeiter der IMTM GmbH Magdeburg zur Therapie chronisch entzündlicher und autoimmuner Erkrankungen konzipiert und hergestellt wurden. Die zellulären Enzyme DP IV und APN sind als immunpharmakologische Ziele in den Fokus des Interesses gerückt, da sie wichtige regulative Funktionen im Immunsystem ausüben [69; 153; 196]. Die Expression von DP IV im hämatopoetischen System ist abhängig von der Zellaktivität; sie ist auf ruhenden und aktivierten T-Zellen sowie auf aktivierten B- und NK-Zellen zu finden [19; 69; 108]. Zur Untersuchung von Funktionen und den zugrunde liegenden molekularen Mechanismen kamen vielfach die reversiblen, nicht-selektiven DP IV-Inhibitoren Lys[Z(NO2)]pyrrolidid, -piperidid und -thiazolidid zur Anwendung [7; 187; 188; 194; 224; 195]. Funktionelle Folgen dieser DP IV-Inhibition werden sowohl durch Induktion von MAP Kinase p38 im ruhenden Zustand, als auch durch Hemmung des Ras-Signalwegs über MEK1/2-Erk1/2, Hemmung von AKT (Protein kinase B) und mTOR (mammalian target of rapamycin) vermittelt [7; 108]. Die Beeinflussung dieser Signalwege ist letztlich mit einer Kontrolle des Zellzyklus' in Übergang von der G₁- in die S-Phase assoziiert [7]. Mittels Einsatz von spezifischen APN-Inhibitoren (Actinonin und Probestin) wurden in der Vergangenheit die Funktionen der APN in vitro und in vivo untersucht [137; 128; 96; 192]. Den Effekten der Enzymhemmung auf T-Zell-

Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion, wie Reduktion proinflammatorischer Zytokine und Beeinflussung von Lymphozytendifferenzierung und -funktion [192) liegt dabei eine starke Induktion von Wnt-5a und daraus resultierend die Hemmung von GSK-3β sowie die Aktivierung des Catenin/LEF/TCF-Signalwegs zugrunde [136; 7]. Hinsichtlich der Wirkungsvermittlung durch APN-Inhibition konnte interessanterweise demonstriert werden, dass eine Aktivierung von CD4+CD25+-regulatorischen natürlichen T-Zellen (Treg) stattfindet [17]. Diese nehmen bekanntermaßen eine kritische Rolle in der Aufrechterhaltung von immunologischer Selbst-Toleranz und in der negativen Kontrolle physiologischer und pathologischer Immunantworten ein [204]. Auffällig für diese natürlichen regulatorischen T-Zellen, die den Transkriptionsfaktor Foxp3 exprimieren, war zusätzlich, dass diese ebenfalls APN exprimierten und im Vergleich zu anderen T-Zell-Arten besonders hohe Mengen APN-mRNA enthielten sowie im Gegensatz zu diesen darüber hinaus ein aktivierungsabhängiger Rückgang von APN und APN-mRNA zu verzeichnen war [35; 7].

Das in dieser Arbeit auf seine Wirksamkeit zu überprüfende Konzept der Verwendung einer einzelnen Substanz zur simultanen Inhibition zweier Enzyme basiert unter anderem auf Grundlage der nicht-redundanten Funktionen der DP IV und der APN im Immunsystem und der Entdeckung, dass der gleichzeitige Einsatz je eines DP IV- und APN-Inhibitors stärker wirksam in Bezug auf Proliferationshemmung von T-Zellen und MNZ ist und den Schweregrad der EAE deutlicher reduziert als die Verwendung einer einzigen Inhibitorklasse [7; 192; 191; 190]. Für die Stimulation des stark antiinflammatorisch wirksamen TGF-β1 waren bereits additive und superadditive Effekte durch simultanen DP IV- und APN-Inhibitor-Einsatz gezeigt worden [192]. Erste Experimente mit dualen DP IV-/ APN-Inhibitoren wie IP12.C6 [15] und IP10.C8 [7] zeigten vielversprechende in vitro- und in vivo-Ergebnisse. Bank et al. [15] konnten 2006 für IP12.C6 zeigen, dass ein solcher dualer DP IV-/ APN-Inhibitor sowohl nach intraperitonealer, als auch peroraler Gabe im Maus-Modell der Colitis wirksam ist und die klinische Manifestation dieser entzündlichen Darmerkrankung vermindert sowie zur Induktion von TGF-β1-mRNA im Colon-Gewebe behandelter Tiere führt. 2009 konnten Ansorge et al. [7] mit dem ersten aktiven dualen Inhibitor, IP10.C8, an humaner Haut psoriatrischer Patienten, die auf AGR129-SCID-Mäuse transplantiert worden war, demonstrieren, dass das PETIR™-Konzept in der Behandlung entzündlicher Hauterkrankungen wirksam ist. Zudem war in vitro eine deutlich reduzierte Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-2, IL-5, IL-6, IL-9, IL-17 und IFN-γ aus PWMstimulierten humanen T-Zellen, die mit IP10.C8 inkubiert worden waren, zu registrieren [7]. Eine Besonderheit dieser Substanzklasse ist ihre Fähigkeit, die immunsuppressiven Wirkungen der CD4+CD25+-regulatorischen T-Zellen zu steigern, was auf die APN-hemmende Komponente der dualen Inhibitoren zurückzuführen ist [7]. Eine Beeinflussung chemotaktischer Effekte konnten durch dualen Angriff an DP IV und APN jedoch nicht festgestellt werden [25].

In der vorliegenden Arbeit wurden die neueren Inhibitoren PETIR-001 und PETIR-004 untersucht. Beide Substanzen waren in der Lage, die DNS-Synthese PWM- oder anti-CD3-stimulierter muriner Splenozyten *in vitro* signifikant zu hemmen. Diese Hemmungen waren jeweils dosisabhängig und für PETIR-001 stärker ausgeprägt [IC₅₀ 0,33 µM für PWM- bzw. 0,81 µM für anti-CD3-Stimulation) als für PETIR-004 (IC₅₀ 0,93 µM für PWM- bzw. 2,0 µM für anti-CD3-Stimulation). Diese Ergebnisse bestätigen Erkenntnisse aus ersten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit PETIR-001 an humanen T-Zellen, bei denen eine dosisabhängige, signifikante Hemmung der DNS-Synthese durch PETIR-001 ohne relevante zytotoxische Effekte gezeigt werden konnte [189].

Bereits in den vergangenen Jahren konnte eine Synthesehemmung von Zytokinen der verschiedenen Th-Helfer-Zell-Klassen (Th1, Th2 und Th17) unter Einsatz nicht-selektiver Inhibitoren der DP IV und APN sowie den dualen DP IV-/ APN-Inhibitor IP10.C8 [10; 7] gezeigt werden. In Einklang mit diesen Untersuchungen stehen die in der vorliegenden Arbeit gesammelten Ergebnisse aus Experimenten zum Einfluss von PETIR-001 und PETIR-004 auf die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IFN-γ, IL-2 und IL-17 mitogen-stimulierter SJL/J-Maus-Splenozyten in Kulturüberständen. Beide Substanzen bewirkten statistisch signifikante und dosisabhängige Reduktionen der jeweiligen Zytokin-Konzentrationen verglichen mit Kontrollen. PETIR-001 zeigte sich, ähnlich wie bereits bei der DNS-Synthese beobachtet, bei gleicher Konzentration etwas stärker wirksam als PETIR-004. Insbesondere Th1- und Th17-Zellen und ihre spezifischen Zytokinprofile gelten als treibende Akteure autoimmunvermittelter Inflammation [23; 83] und stellen einfache therapeutische Ziele dar, so dass die Hemmung dieser zellulären Endprodukte erstrebenswert scheint. Im Fall der Th17-Zellen scheint jedoch nicht das namengebende IL-17 entscheidend für das enzephalithogene Potenzial dieses Effektorzelltyps zu sein, sondern das Th-17-Zytokin IL-23, dass unter anderem eine Induktion von Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) bewirkt [59]. Andererseits existieren kritische Stimmen, die nicht die Zytokine, sondern die aufwärts gelegenen Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren, die diese Zellen definieren, als entscheidend für die Auslösung von Neuroinflammation ansehen [254; 143], da beispielsweise eine EAE in IFN-γ- und IL-17-defizienten Mäusen induzierbar war [66; 145; 86]. Außerdem wird auf Grundlage experimenteller in vitro-Untersuchungen postuliert, dass mehrere mögliche transkriptionelle Wege zur pathologischen Immunreaktion führen können, da etwa der initiale T-Zell-Aktivierungsstatus, entweder IL-12 oder IL-23 getrieben, Einfluss auf die Entwicklung von autoimmun-vermittelter Entzündung besitzt [220]. Wie allgemein üblich ist die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus in vitro-manipulierten Zellen daher mit Vorsicht zu bewerten. Nichtsdestotrotz erlauben Messungen von Zytokin-Spiegeln Aussagen Aktivierungszustand pathogener T-Zellen und letztlich auch Einschätzungen der Wirksamkeit potenzieller Immunpharmaka.

Das in dieser Arbeit den in vivo-Experimenten zugrundeliegende Autoimmunmodell stellte die EAE in SJL/J-Mäusen dar. Für dieses, am meisten akzeptierte Tiermodell der MS wurde die schubweise-remittierende Form nach Induktion mit PLP₁₃₉₋₁₅₁ gewählt. Es bildet die häufigste Verlaufsform der MS am besten ab und fand in den vergangenen Jahren vielfach Einsatz zur Aufklärung von Immunprozessen und Entwicklung von Therapieansätzen, nicht zuletzt auch zur Erforschung der Funktionen von DP IV und APN. Zusammenfassend beeinflusste, wie hier gezeigt werden konnte, der therapeutische intraperitoneale Einsatz der dualen DP IV-/ APN-Inhibitoren PETIR-001 und PETIR-004 den Erkrankungsverlauf von SJL/J-Mäusen günstig. Wie für diesen EAE-Typ charakteristisch, trat auch bei der Kontrollgruppe, die keine der beiden Substanzen erhielt, eine vollständige Remission nach dem ersten Schub auf. Die Interventionsgruppen profitierten jedoch von einer deutlich längeren Remissionsdauer und dem früheren Einsetzten der Symptomlinderung. Der zweite Schub verlief bei PETIR-001behandelten Tieren insgesamt klinisch milder und verzögert. Verglichen mit Kontrollen konnten statistisch signifikant niedrigere durchschnittliche EAE-Erkrankungsgrade und eine reduzierte Schubdauer im jeweiligen Beobachtungszeitraum dokumentiert werden. Außerdem ergaben sich Hinweise für eine Dosisabhängigkeit in der Wirkung der Substanzen. So erreichte etwa die tägliche therapeutische i.p.-Applikation von 50 µg PETIR-001 pro Tier eine kumulative Dauer signifikanter Symptomlinderung von 50 Tagen, während die mit 10 µg behandelte Gruppe 18 Tage erreichte. Bemerkenswerterweise war nach einer ersten, innerhalb der Therapiezeit beginnenden Remission bei PETIR-004-behandelten Tieren eine zweite, wenngleich statistisch nicht signifikante Reduktion der EAE-Erkrankungsgrade etwa ab Tag 44 ohne vorausgehende zweite therapeutische Applikation zu verzeichnen. Überraschend deshalb, weil dies zeitlich mit dem Symptommaximum des zweiten Schubes der Kontrollgruppe einherging. Für diesen Effekt können zum Beispiel pharmakokinetische Besonderheiten oder noch nicht aufgeklärte Wirkmechanismen verantwortlich sein. Es unterstreicht insgesamt das Potential der Substanzen als mögliche Immunpharmaka.

Erstmals konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass neben der parenteralen Applikation auch über die enterale Aufnahme der dualen DP IV-/ APN-Inhibitoren ein positiver klinischer Effekt auf die EAE zu erreichen war. Die orale Gabe von 100 µg PETIR-001 pro Tag über einen Zeitraum von neun Tagen war mit einer statistisch signifikanten Reduktion des EAE-Erkrankungsgrads gegenüber einer Kontrollgruppe verknüpft. Auch in einer niedrigeren Dosierung von 50 µg/d war der EAE-Verlauf milder als bei Tieren ohne PETIR-001, allerdings in nicht-signifikantem Umfang. Ähnlich zur intraperitonealen Therapie waren Unterschiede in der Dosis-Wirkungsbeziehung in der Form festzustellen, dass mit höheren Dosen PETIR-004 behandelte Tiere über einen längeren Zeitraum mildere Symptome zeigten als Tiere, die die Hälfte der Dosis erhielten. Die Wirksamkeit der Substanzen wird weiter dadurch unterstrichen,

indem ein zweiter, sieben-tägiger Therapieversuch mit PETIR-004 in der peroralen 100 μg/d-Gruppe unternommen wurde, der den zweiten Schub signifikant reduzierte.

Basierend Beobachtungen auf diesen wurden die Experimente zusätzlich um histopathologische Untersuchungen von Rückenmarken an EAE erkrankter Mäuse ergänzt, die therapeutische Applikationen von PETIR-001 oder PETIR-004 intraperitoneal oder oral erhalten hatten. Das Resultat war eine statistisch signifikant geringere Anzahl entzündlicher Immunzellinfiltrate im Rückenmark von therapierten gegenüber nicht-therapierten Tieren. Wesentliche Unterschiede bezogen auf die unterschiedlichen Applikationsformen ergaben sich nicht. Die EAE-Erkrankungsgrade korrelierten mit der Anzahl der entzündlichen Läsionen im ZNS. Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit veröffentlichten Ergebnissen, die positive Auswirkungen auf die ZNS-Inflammation in Mäusen durch den Einsatz des reversiblen, kompetitiven DP IV-Inhibitors Lys[Z(NO₂)]-pyrrolidid (I40) zeigten [224].

Die Beeinflussung der enzymatischen Aktivität der Ektopeptidasen DP IV und APN in Form einer simultanen Inhibition mittels einer einzigen Substanz (PETIR™) ist, wie in dem ersten Teil der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, in vitro mit einer Reduktion der T-Zell-Aktivierung und -Funktion verknüpft. So konnte eine Hemmung der T-Zell-Proliferation ohne signifikante zelltoxische Effekte als ein Wirkmechanismus von PETIR™ demonstriert werden. Darüber hinaus unterstreicht der hier gezeigte Nachweis einer verminderten Sekretion proinflammatorischer Zytokine aus Maus-Splenozyten, wie IFN-γ, IL-2 und IL-17 eine Modulation der Aktivität und Funktion von T-Zellen. Vergleichbare Ergebnisse wurden vor einigen Jahren mit dem Inhibitor Lys[$Z(NO_2)$]-pyrrolidid erzielt, der die Sekretion von TNF- α und IFN-γ aus murinen Lymphknotenzellen und IL-2, IL-6 und IL-10 aus Spleno- und Thymozyten supprimierte [188; 224]. Bereits damals wurde geschlussfolgert, dass diese Effekte, zumindest teilweise, auch für die in dieser Arbeit für PETIR™ nachgewiesenen positiven Auswirkungen auf die klinischen Symptome der EAE verantwortlich zu machen sind [224]. Denn es ist bekannt, dass die EAE, wie auch die MS, über CD4+ Th1- und Th17-Zellen vermittelt werden kann [234; 51]. Die diese Zellen charakterisierenden Zytokine sind in erster Linie die genannten IFN-γ und IL-2 sowie IL-17, aber auch IL-21 und IL-22 [234; 90].

Wie in vorausgegangenen Untersuchungen bereits gezeigt wurde, gilt auch die Induktion von latentem TGF- β 1 durch DP IV-/ APN-Hemmung als ein wesentlicher Wirkmechanismus [192; 224; 188; 108]. Proteinen der TGF- β -Familie werden starke immunregulatorische Effekte zugesprochen, die durch Hemmung aktivierter inflammatorischer Prozesse zum Tragen kommen [138]. Es konnte in der Vergangenheit demonstriert werden, dass durch Hemmung der DP IV-Aktivität durch reversible DPIV-Inhibitoren die Sekretion von latentem TFG- β 1 mitogenstimmulierter muriner Immunzellen gesteigert und erhöhte mRNA-Konzentrationen in

Maus-Splenozyten nachweisbar waren [188]. Zudem konnten die Wirkungen der DP IVvermittelten Proliferationshemmung durch anti-TGF-β-AK aufgehoben werden [187]. In dieser Arbeit wurden die Konzentrationen von latentem TGF-β1 in murinen Plasmen nach Induktion der EAE und therapeutischer PETIR-Applikation untersucht. Die Ergebnisse waren diskordant. Allein für oral verabreichtes PETIR-001 lag eine gegenüber Kontrollen statistisch signifikante TGF-β1-Induktion vor, überraschenderweise nicht für i.p. eingesetztes PETIR-001 oder PETIR-004. Möglicherweise sind pharmakokinetische Besonderheiten für diese Beobachtungen verantwortlich. Bekannt ist, dass die gewünschte klinische Wirkung einer Reihe von Pharmaka durch ihre aktiven Metaboliten vermittelt werden, die zuvor etwa mittels CYP450-Isoenzymen der Leber generiert werden (beispielsweise Diazepam, Lovastatin, Tamoxifen und Clopidogrel). Prodrugs werden häufig zur Verbesserung pharmakokinetischer Eigenschaften angewendet, um etwa bestimmte Kompartimente besser zu erreichen [164]. Möglicherweise findet nach enteraler Aufnahme der PETIR-Substanzen im Rahmen der ersten hepatischen Metabolisierung ebenfalls die Synthese eines Metaboliten statt, der zusätzliche Wirkungen ausübt und eine verstärkte TGF-β1-Induktion auslöst. In jüngster Zeit hat auch die Erforschung des gastrointestinalen Mikrobioms an Bedeutung gewonnen, da zahlreiche Arzneimittelinteraktionen mit diesem bekannt sind, wodurch die Wirksamkeit und Toxizität von Substanzen beeinflusst werden [87]. Zwar widerlegt eine fehlende TGF-β1-Steigerung in Maus-Plasmen von intraperitoneal behandelten Tieren keinesfalls die aufgrund diverser Voruntersuchungen anzunehmende Wirkungsvermittlung durch dieses stark antiinflammatorisch wirkende Zytokin, jedoch lässt sich anhand der in dieser Arbeit gezeigten PETIR™-vermittelten in vitro- und in vivo-Effekte durch beide Applikationsformen schlussfolgern, dass neben TGF-β1 andere, bereits diskutierte Wirkmechanismen eine Rolle spielen müssen. Nicht zuletzt ist dabei auch an die CD4+CD25+-regulatorischen natürlichen T-Zellen (Treg) zu denken, von denen bekannt ist, dass sie durch APN-Inhibition aktiviert werden können [17]. Treg nehmen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung von immunologischer Selbst-Toleranz und in der negativen Kontrolle physiologischer und pathologischer Immunantworten ein, was ihren Stellenwert bei Autoimmunprozessen verdeutlicht [204]. Da PETIR™ APN inhibiert, ist daher von einer Treg-Aktivierung auszugehen, ohne dass dies in der vorliegenden Arbeit explizit untersucht wurde. Auffällig für diese, den Transkriptionsfaktor FoxP3 exprimierenden T-Zellen ist außerdem, dass selber **APN** exprimieren zu T-Zell-Arten sie und im Vergleich anderen ein aktivierungsabhängiger Rückgang von APN und APN-mRNA bekannt ist [35; 7].

Insgesamt unterschieden sich die Ergebnisse der *in vivo*-Experimente mit enteraler oder parenterale PETIR™-Applikation nicht wesentlich. Ein statistischer Vergleich der Wirksamkeit der Applikationsformen war jedoch nicht primäres Untersuchungsziel der vorliegenden Arbeit. Es sollte vielmehr die Frage beantwortet werden, ob klinische Wirkungen nach oraler Applikation von PETIR-001 und PETIR-004 nachweisbar sind, was, wie hier ausgeführt wurde,

eindeutig der Fall ist. Zusammen mit den Ergebnissen aus den *in vitro*-Experimenten liegen insgesamt starke Hinweise für die mögliche Eignung von PETIR™ als neues Immuntherapiekonzept für chronisch-entzündliche und autoimmune Erkrankungen vor. Weitere Untersuchungen hinsichtlich der Pharmakodynamik und -kinetik zur Etablierung des PETIR™-Konzepts sind in Zukunft notwendig.

Für den zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkungen der Tetracyclinderivate Minocyclin und Pentaacetylcyclin auf murine Immunzellen in vitro und mithilfe der EAE an Mäusen in vivo untersucht. Bei der letztgenannten Substanz handelt es sich um ein A-Ringaromatisiertes Acetylminocyclin, das von Lorenz et al. [177], Institut für Biochemie und Zellbiologie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, mit dem Ziel der Erweiterung der Einsatzmöglichkeiten der Leitsubstanz Minocyclin entwickelt wurde. Der zur Behandlung bakterieller Infektionen zugelassene Wirkstoff Minocyclin hat deutlich an Interesse gewonnen. weil neben der Wirkung als Antibiotikum zusätzlich antiinflammatorische, immunmodulierende und neuroprotektive Effekte festgestellt wurden [41; 34; 165; 180; 147; 261]. antiinflammatorischen Wirkungen Minocyclins sind dabei auf die Beeinflussung von Lymphozyten-Proliferation und -Funktion zurückzuführen: Kloppenburg et al. [120] zeigten eine Minocyclin-induzierte Hemmung von T-Zell-Proliferation und Produktion der inflammatorischen Zytokine IL-2, IFN- γ und TNF- α in vitro. Weiterhin wurde herausgefunden, dass Tetracycline in der Lage sind, Matrix-Metalloproteasen (MMP) zu inhibieren [80], und dass insbesondere Minocyclin die für die Induktion und Aufrechterhaltung der MS notwendige Transmigration von autoreaktiven T-Zellen in das ZNS durch direkte Hemmung der enzymatischen Aktivität und Produktion von MMPs maßgeblich vermindert [34; 180].

Neben autoreaktiven T-Zellen sind Mikroglia wichtige Akteure in der Pathogenese der MS und werden gleichfalls durch Minocyclin in ihrer Funktion beeinflusst: Zum einen hemmt das Minocyclin die MHC-Klasse-II-Molekül-Expression dieser Zellen, was zur reduzierten Reaktivierung der das ZNS infiltrierten autoreaktiven T-Zellen führt [168]. Zum anderen wird die Aktivierung der Mikroglia insgesamt durch Minocyclin gehemmt [230; 226; 235] und gleichsam deren Produktion von potentiell zell- und myelin-schädlichen Substanzen, wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Stickstoffmonoxid (NO), pro-nerve growth factor (pro-NGF), TNF- α , IL-1 β und Exzitotoxinen reduziert [41; 132].

Der für Minocyclin postulierte neuroprotektive Effekt [258] wird, wie Maier et al. [147] 2007 demonstrieren konnten, unabhängig von der antiinflammatorischen Komponente, sondern vielmehr durch Induktion antiapoptotischer Signalwege und einer Verminderung der Glutamat-Exzitotoxizität vermittelt. Weitere Hinweise, die die Minocyclin-vermittelte Apoptose-Hemmung untermauern, ergaben sich aus Untersuchungen, die zeigten, dass die Substanz Mitochondrien-

Membranen stabilisiert und so die Freisetzung von Cytochrom C, einem starken Stimulus für Caspase 9 und 3, und weiteren Apoptose-induzierenden Caspase-abhängigen und unabhängigen Faktoren in das Cytosol reduziert [257; 266; 246]. Als weitere zur Protektion neuronaler Strukturen und zur Hemmung der MS-Progression beitragende in vitro und in vivo-Mechanismen Minocyclins werden postuliert: Eine direkte antioxidative Wirkung durch Reduktion von Sauerstoff-Radikalen [125; 41] und Reduktion NO-vermittelter neuronaler und axonaler Schädigung [248; 132], die Senkung der Calcium-Konzentration durch Chelat-Bildung und nachfolgende Hemmung der Aktivierung von Calpinen und Erhaltung der axonalen Integrität [226; 41; 257], die Verringerung der Eisenablagerung in der Umgebung von MS-Plaques [85] durch Inhibition von Hämoxygenase-1 (HO-1) [41] mit Auswirkungen auf körperliche Symptome und damit korrelierenden Befunden in der MR-Bildgebung [41; 263] sowie die antibiotische Wirksamkeit gegenüber Chlamydia pneumoniae, einem infektiösen Erreger, der möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese der MS spielt, weil eine Assoziation zwischen Infektion und einem erhöhtem Risiko für MS [175], beziehungsweise der Exazerbation einer bestehenden MS gefunden wurde [36; 41]. Weiterhin ist möglicherweise die Induktion von brain-derived neurotrophic factor (BDNF) und nerve growth factor (NGF) durch Minocyclin, nachgewiesen in Serum, Gehirn und Rückenmark, aber auch in Kulturüberständen von Splenozyten an EAE erkrankter C57BL/6-Mäuse nach Minocyclin-Gabe, ein weiterer Baustein neuroprotektiver Wirkung [40]. Die neurotrophen Faktoren BDNF und NGF stellen essentielle Faktoren in synaptischer Plastizität und neuronaler Reparatur dar [29; 24; 18]. Die Wirkung nach therapeutischem Einsatz dieser Faktoren durch intraperitoneale Gabe wurde bereits erfolgreich in der Therapie der EAE in Mäusen getestet [148; 11].

Durch die chemische Modifikation Minocyclins zu Pentaacetylcyclin mittels Fünfach-Acetylierung werden insbesondere zwei wesentliche Ziele erreicht. Zum einen wird ein Prodrug erzeugt, wodurch die pharmakokinetischen Eigenschaften in dem Sinne beeinflusst werden, dass eine einfachere Passage durch die Blut-Hirn-Schranke erreicht wird. Zum anderen wird die bakteriostatische Wirkung Minocyclins zur Vermeidung von Resistenzentwicklung aufgehoben [177]. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse von *in vitro*-Untersuchungen zum Einfluss von Minocyclin und Pentaacetylcyclin auf die DNS-Synthese stimulierter Immunzellen unterstreichen Erkenntnisse aus Voruntersuchungen an humanen T-Zellen, die im Rahmen des Patentierungsvorhabens von Pentaacetylcyclin gesammelt wurden [176]. Für die hier verwendeten stimulierten murinen Splenozyten konnte eine statistisch signifikante und konzentrationsabhängige Reduktion der Zellproliferation unter Einsatz von Pentaacetylcyclin verzeichnet werden, ohne dass eine relevante Beeinträchtigung der Zellvitalität bei einer bereits deutlich wirksamen Dosierung zwischen 2,5 und 5 μM auftrat. In den hier verwendeten Konzentrationen bis 5 μM wurde durch Minocyclin keine signifikante Verminderung der DNS-Synthese erreicht. Diese Beobachtung deckt sich überwiegend mit bereits veröffentlichten

Daten zur Proliferationshemmung durch Minocyclin. So zeigten Kloppenburg et al. [120], dass für eine Proliferationshemmung auf etwa 40 Prozent, wie sie für Pentaacetylcyclin bei 5,0 µM erreicht war, Minocyclin-Dosen von 12,5 bis 25 µM erforderlich waren. Anders als zu den hier vorgelegten Ergebnissen wurde allerdings bereits eine Hemmung der Proliferation von etwa einem Drittel bei Einsatz von 6,3 µM Minocyclin erzielt. Diese Unterschiede lassen sich mutmaßlich mit den unterschiedlichen Zellenarten erklären. Während Kloppenburg et al. T-Zell-Klone aus Synovia an rheumatoider Arthritis erkrankter Patienten verwendeten, kamen für diese Arbeit murine Splenozyten zum Einsatz. Wie Beobachtungen an humanen T-Zellen zuvor insgesamt Pentaacetylcyclin-Konzentrationen ergaben, waren bereits niedrige proliferationswirksam. Statt jedoch einer beginnenden Proliferationshemmung trat bei anti-CD3stimulierten Splenozyten unter Zusatz von nur 0,63 und 1,25 µM Pentaacetylcyclin überraschenderweise zunächst ein Anstieg der Proliferationsrate auf 120 % im Vergleich zu ausschließlich anti-CD3-stimulierten Kulturen auf. Möglicherweise wird über Pentaacetylcyclin in seiner Prodrug-Form eine andere Wirkung als nach De-Acetylierung vermittelt, oder Pentaacetylcyclin verfügt über mindestens zwei Wirkmechanismen, von denen derjenige, der die Proliferationshemmung vermittelt, erst ab einer bestimmten Konzentration dominiert, während in niedrigeren Konzentrationen eine Induktion der DNS-Synthese abläuft. Falls Pentaacetylcyclin seine antiinflammatorische Wirkung über eine Rezeptor-Liganden-Interaktion ausübt, könnte als dritte spekulative Annahme ein inverser Agonismus in niedriger Dosierung vorliegen.

Pentaacetylcyclin ist nicht nur in der Lage die DNS-Synthese muriner Immunzellen zu reduzieren, sondern auch die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IFN-γ, IL-2 und IL-17 aus diesen Zellen, wie in der vorliegenden Arbeit belegt werden konnte. Diese Reduktion ist insgesamt konzentrationsabhängig. Eine Einschränkung ergab sich durch Nachweis überraschenderweise erhöhter IL-2-Konzentrationen in Kulturüberständen von Maus-Splenozyten unter Einsatz von Pentaacetylcyclin in den Dosierungen 1,25 bis 5 µM. Es liegt nahe, dass ein Zusammenhang zu den oben beschriebenen Proliferationssteigerungen bei ähnlichen Dosierungen des Minocyclin-Derivats besteht. So könnte durch eine initial vermehrte IL-2-Sekretion die DNS-Synthese in T-Zellen stimuliert werden. Aber auch der umgekehrte Weg ist angesichts der Wirkungen von IL-2 nicht auszuschließen. Der beschriebene Effekt trat in identischen Experimenten zur Messung von IFN-γ und IL-17 in Kulturüberständen nicht auf. Stattdessen lag hier eine stetige konzentrationsabhängige Sekretionshemmung vor. Bis zu den eingesetzten Konzentrationen von 10 µM konnte für die Referenzsubstanz Minocyclin kein Einfluss auf die Zytokin-Freisetzung beobachtet werden. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse decken sich zu größten Teilen mit Voruntersuchungen an humanen T-Zellen im Zuge des Patentierungsverfahrens. Eine Ausnahme bildet die fehlende Induktion von IL-2 an humanen Zellen bei niedrigen Pentaacetylcyclin-Konzentrationen.

Die in vitro-Wirksamkeit der beiden Tetracyclinderivate wurde anhand des Schweregrads der EAE in Mäusen untersucht. Sowohl Minocyclin als auch Pentaacetylcyclin sind in der Lage einen signifikanten therapeutischen Effekt auf die Akut-Symptome der EAE auszuüben. Auch in Experimenten lässt sich eine tendenzielle Überlegenheit Pentaacetylcyclins insbesondere hinsichtlich der Remissionsdauer und Schweregrad der Symptome feststellen. Bemerkenswerterweise trifft diese Beobachtung nicht nur auf die Gruppe der i.p.-behandelten, sondern auch auf die Mäuse nach peroraler Therapie zu. Interessant war, dass bei diesen zudem die Latenz nach Pentaacetylcyclin-Applikation bis zum Beginn einer signifikanten Symptomlinderung gegenüber Minocyclin um fünf Tage kürzer war, was insgesamt eine mögliche Eignung als therapeutische Substanz gegen Autoimmunerkrankungen unterstreicht. Passend zu den klinischen Versuchsergebnissen waren geringere Immunzellinfiltraten in Rückenmarken nach Therapie zu verzeichnen. Statistisch signifikant waren die Ergebnisse dabei jedoch lediglich für peroral verabreichtes Pentaacetylcyclin. Warum trotz guter klinischer Wirksamkeit die entzündlichen ZNS-Läsionen vergleichsweise weniger deutlich reduziert wurden, ist nicht sicher zu beantworten. Prinzipiell korrelieren in aktiven MS-Läsionen mit akuter Demyelinisierung Entzündung und Ausmaß axonaler Schädigung [72]. Wie aber seit 2011 bekannt ist, stellt die entzündliche Demyelinisierung keine zwingende Voraussetzung für Axon-Läsionen dar [166]. Möglicherweise dominieren die oben erwähnten neuroprotektiven Effekte der Tetracyclinderivate gegenüber den antiinflammatorischen, was klinisch zwar zur Symptomlinderung führt, sich histomorphologisch im ZNS jedoch bei nur geringer Reduktion inflammatorischer Läsionen noch nicht widerspiegelt. Ferner ist zu bedenken, dass noch nicht abschließend geklärt ist, ob die Neuroinflammation in der MS Ursache oder sekundärer Effekt der Neurodegeneration darstellt [151]. Weitere histologische Untersuchungen des ZNS unter Einsatz Pentaacetylcyclins, auch mit veränderten Untersuchungszeitpunkten, zur Frage, ob die neuroinflammatorische Komponente verzögert abheilt, sind anzustreben.

Angenommen und durch entsprechende Experimente gestützt wird eine Wirkungsvermittlung von DP IV- und APN-Inhibitoren über die Induktion von latentem TGF- β 1, wie oben bereits erläutert wurde [192; 224; 188; 108]. In dieser Arbeit sollte ebenfalls untersucht werden, ob und in welchem Maß eine Konzentrationszunahme dieses antiinflammatorisch wirkenden Zytokins in Mausplasmen an EAE erkrankter Tiere durch den Einsatz von Minocyclin und Pentaacetylcyclin beeinflusst wird. Aufgrund der hier nachgewiesenen, statistisch jedoch nicht signifikanten Konzentrationssteigerungen von TGF- β 1 nach therapeutischer Applikation von Minocyclin und Pentaacetylcyclin ist eine Beteiligung der Wirkungsvermittlung durch diesen Mechanismus möglich. Durch ergänzende Experimente, wie zum Beispiel durch Einsatz von anti-TGF- β -AK könnte dieser Vermutung nachgegangen werden. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Tetracyclinderivaten lagen nicht vor.

Zusammenfassend besitzen sowohl das PETIR™-Konzept, als auch Pentaacetylcyclin, als chemische Variante des Minocyclins wie in der vorliegenden Arbeit dargestellt therapeutisches Potenzial zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Transplantationsreaktionen. Insbesondere konnte hier auch die Wirksamkeit der Substanzen nach oraler Applikation nachgewiesen werden, was vor dem Hintergrund gerade in der MS-Therapie dominierender paraenteral eingesetzter Medikamente von besonderer Bedeutung ist. Hinsichtlich beider in der vorliegenden Arbeit untersuchten Substanzgruppen sollten sich weitere Untersuchungen zukünftig mit Fragen rund um die molekularen Mechanismen und mit Optimierungen des Substanzeinsatzes im Rahmen therapeutischer Anwendungen (Langzeittherapie, Dosis-Wirkungs-Testungen, etc.) beschäftigen.

Zusammenfassung 80

6. Zusammenfassung

Den Ektoenzymen Dipeptidylpeptidase IV (DP IV, EC 3.4.14.5, CD 26) und Aminopeptidase N (APN, EC 3.4.11.2, CD 13) werden wichtige regulatorische Funktionen von Immunprozessen, insbesondere der T-Zell-Aktivierung, und eine wesentliche Beteiligung an den Mechanismen von chronischer Entzündung und Autoimmunprozessen zugschrieben. Mittels synthetischer Inhibitoren der enzymatischen Aktivität von DP IV und APN wird die Proliferation von T-Zellen und die Produktion proinflammatorischer Zytokine supprimiert. Das immunsuppressive Zytokin TGF-β gilt als einer der Hauptakteure in der Wirkungsvermittlung dieser Effekte. Mit der Entwicklung von Peptidase-targeted Immunoregulation (PETIR™) (*IMTM GmbH,* Magdeburg) wurde ein neuartiges Konzept zur dualen DP IV-/APN-Hemmung entwickelt, das einen potentiellen neuen Ansatz in der Therapie von Autoimmunität und chronischer Entzündung, wie etwa der Multiplen Sklerose (MS), darstellt. Trotz eindeutiger Hinweise für die Wirkung der DP IV und APN auf die T-Zell-Funktion, sind die molekularen Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt.

Für Minocyclin, aus der Gruppe der Tetracycline, liegen neben der therapeutisch genutzten antibiotischen Wirkung auch deutliche Hinweise für antiinflammatorische, immunmodulierende und neuroprotektive Effekte vor. Als Wirkungsvermittlung werden eine Beeinflussung von Lymphozytenproliferation und deren Funktion durch reduzierte Sekretion proinflammatorischer Zytokine sowie von Matrix-Metalloproteasen und Mikroglia, wichtige Akteure in der Pathogenese der MS, postuliert. Auch eine Induktion antiapoptotischer Signalwege und eine Verminderung der Glutamat-Exzitotoxizität werden für die Wirkung verantwortlich gemacht. Mit dem neuentwickelten Minocyclin-Derivat Pentaacetylcyclin (Institut für Biochemie Zellbiologie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg) soll eine Optimierung der Pharmakokinetik durch Umsetzung des Prodrug-Konzepts bei aufgehobener antibiotischer Aktivität erreicht werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zum einen die zwei neuentwickelten dualen Inhibitoren der enzymatischen Aktivitäten der DP IV und der APN, PETIR-001 und PETIR-004, und zum anderen die zwei Tetracyclinderivate Minocyclin und das A-Ring-aromatisierte Acetylminocyclin Pentaacetylcyclin hinsichtlich ihrer Wirkung auf Splenozyten der Maus *in vitro* und im Tiermodell der MS, der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), *in vivo* zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PETIR-001 und PETIR-004 in der Lage sind *in vitro* die DNS-Synthese von T-Zellen und die Produktion proinflammatorischer Zytokine muriner Splenozyten zu supprimieren. Der therapeutische Einsatz der Substanzen in EAE-kranken SJL/J-Mäusen bewirkt einen signifikant milderen Krankheitsverlauf verglichen mit

Zusammenfassung 81

Kontrolltieren. Diskordante Ergebnisse ergaben sich in dieser Arbeit zur Induktion des TGF-β1, immunmodulierenden **Zytokins** das bereits in der Vergangenheit als hauptverantwortlich für die antiinflammatorischen Effekte der DP IV-/ APN-Hemmung gemacht wurde. Eine signifikant erhöhte TGF-β1-Konzentration in Plasmen EAE-kranker Mäuse konnte hier lediglich für peroral eingesetztes PETIR-001 festgestellt werden. Mit der therapeutischen Wirksamkeit PETIRs im Tierversuch schließlich korreliert die Anzahl inflammatorischer ZNS-Läsionen in Mäusen mit EAE, was mithilfe histomorphologischer Untersuchungen belegt werden konnte und insgesamt die potentielle Eignung PETIRs als neuen Therapieansatz autoimmuner Prozesse unterstreicht. Weitere Bemühungen zur Aufklärung der den in vitro- und in vivo-Effekten zugrunde liegenden Mechanismen sollten erfolgen.

Ähnliche Ergebnisse wurden in dieser Arbeit für die untersuchten Tetracyclinderivate erhalten. Sowohl Minocyclin als auch Pentaacetylcyclin zeigten eindeutige antiinflammatorische Wirkungen in vitro und in tierexperimentellen Untersuchungen in vivo. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Pentaacetylcyclin in deutlich niedrigeren Konzentrationen als Minocyclin sowohl die T-Zell-Proliferation muriner Splenozyten hemmt, als auch die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IFN-γ und IL-17. Mäuse nach EAE-Induktion Pentaacetylcyclin-Therapie erreichten verglichen mit Minocyclin früher eine Remission, die gleichsam länger andauerte. Besonders zu bemerken ist, dass diese neu entwickelte Substanz auch nach peroraler Applikation in vivo wirksam ist. Auch in dieser Anwendungsform zeigte sich ein milderer Krankheitsverlauf verglichen mit Minocyclin. Mit der positiven in vivo-Wirkung ging eine signifikant verminderte Anzahl inflammatorischer Läsionen im ZNS EAE-kranker Mäuse nach peroralem Pentaacetylcyclin-Einsatz einher. Neben einer regulatorischen Funktion von TGF-β1 ist von weiteren Wirkmechanismen auszugehen, da in dieser Arbeit zwar eine TGF-β1-Induktion in EAE-Plasmen nach Minocyclin- und Pentaacetylcyclin-Applikation vorhanden war, jedoch nicht in signifikantem Ausmaß.

Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen eine antiinflammatorische Wirkung von PETIR-001 und PETIR-004, duale Inhibitoren der DP IV und APN, sowie der Tetracyclinderivate Minocyclin und Pentaacetylcyclin *in vivo* und *in vitro*. Zukünftige Untersuchungen sollten sich anschließen, um die Wirkmechanismen umfassend aufzuklären.

7. Literaturverzeichnis

1. Abbott, C.A.; Yu, D.M.; Woollatt, E.; Sutherland, G.R.; McCaughan, G.W.; Gorrell, M.D. (2000): Cloning, expression and chromosomal localization of a novel human dipeptidyl peptidase (DPP) IV homolog, DPP8. In: *Eur J Biochem* 267 (20), S. 6140–6150.

- 2. Aertgeerts, K. (2004): Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV in complex with a decapeptide reveals details on substrate specificity and tetrahedral intermediate formation. In: *Protein Science* 13 (2), S. 412–421.
- 3. Afzali, B.; Mitchell, P.; Lechler, R.I.; John, S.; Lombardi, G. (2010): Translational Mini-Review Series on Th17 Cells: Induction of interleukin-17 production by regulatory T cells. In: Clinical & Experimental Immunology 159 (2), S. 120–130.
- Ahmad, S.; Wang, L.; Ward, P.E. (1992): Dipeptidyl(amino)peptidase IV and aminopeptidase M metabolize circulating substance P in vivo. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260 (3), S. 1257–1261.
- 5. Alam, M.A.; Subramanyam Rallabandi, V.P.; Roy, P.K. (2016): Systems Biology of Immunomodulation for Post-Stroke Neuroplasticity: Multimodal Implications of Pharmacotherapy and Neurorehabilitation. In: *Frontiers in neurology* 7, S. 94.
- 6. Alotaibi, S. (2004): Epstein-Barr Virus in Pediatric Multiple Sclerosis. In: *JAMA* 291 (15), S. 1875.
- 7. Ansorge, S.; Bank, U.; Heimburg, A.; Helmuth, M.; Koch, G.; Tadje, J.; Lendeckel, U.; Wolke, C.; Neubert, K.; Faust, J.; Fuchs, P.; Reinhold, D.; Thielitz, A.; Täger, M. (2009): Recent insights into the role of dipeptidyl aminopeptidase IV (DPIV) and aminopeptidase N (APN) families in immune functions. In: *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 47 (3).
- 8. Ansorge, S.; Nordhoff, K.; Bank, U.; Heimburg, A.; Julius, H.; Breyer, D.; Thielitz, A.; Reinhold, D.; Täger, M. (2011): Novel aspects of cellular action of dipeptidyl peptidase IV/CD26. In: *Biol. Chem* 392 (3), S. 153–168.
- 9. Ansorge, S.; Nordhoff, K.; Bank, U.; Heimburg, A.; Julius, H.; Breyer, D.; Thielitz, A.; Reinhold, D.; Täger, M. (2011): Novel aspects of cellular action of dipeptidyl peptidase IV/CD26. In: *Biol. Chem* 392 (3), S. 153–168.
- 10. Ansorge, S.; Schon, E.; Kunz, D. (1991): Membrane-bound peptidases of lymphocytes: functional implications. In: *Biomedica biochimica acta* 50 (4-6), S. 799–807.
- 11. Arredondo, L.R.; Deng, C.; Ratts, R.B.; Lovett-Racke, A.E.; Holtzman, D.M.; Racke, M.K. (2001): Role of nerve growth factor in experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *Eur J Immunol* 31 (2), S. 625–633.
- 12. Ascherio, A.; Munch, M. (2000): Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. In: *Epidemiology* 11 (2), S. 220–224.
- 13. Babaloo, Z.; Aliparasti; Babaiea, F.; Almasi, S.; Baradaran, B.; Farhoudi, M. (2015): The role of Th17 cells in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: interleukin-17A and interleukin-17F serum levels. In: *Immunology letters* 164 (2), S. 76–80.
- Babbe, H.; Roers, A.; Waisman, A.; Lassmann, H.; Goebels, N.; Hohlfeld, R.; Friese, M.; Schröder, R.; Deckert, M.; Schmidt, S.; Ravid, R.; Rajewsky, K. (2000): Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. In: J Exp Med 192 (3), S. 393–404.
- 15. Bank, U.; Heimburg, A.; Helmuth, M.; Stefin, S.; Lendeckel, U.; Reinhold, D.; Faust, J.; Fuchs, P.; Sens, B.; Neubert, K.; Täger, M.; Ansorge, S. (2006): Triggering endogenous immunosuppressive mechanisms by combined targeting of Dipeptidyl peptidase IV (DPIV/CD26) and Aminopeptidase N (APN/ CD13) A novel approach for the treatment of inflammatory bowel disease. In: *International Immunopharmacology* 6 (13-14), S. 1925–1934.
- Bank, U.; Heimburg, A.; Wohlfarth, A.; Koch, G.; Nordhoff, K.; Julius, H.; Helmuth, M.; Breyer, D.; Reinhold, D.; Täger, M.; Ansorge, S. (2011): Outside or inside: role of the subcellular localization of DP4-like enzymes for substrate conversion and inhibitor effects. In: *Biol. Chem* 392 (3), S. 169–187.
- 17. Bank, U.; Tadje, J.; Tager, M.; Wolke, C.; Bukowska, A.; Ittenson, A.; Reinhold, D.;

Helmuth, M.; Ansorge, S.; Shakespeare, A.; Vieth, M.; Malfertheiner, P.; Naumann, M.; Lendeckel, U. (2007): Inhibition of alanyl-aminopeptidase on CD4+CD25+ regulatory T-cells enhances expression of FoxP3 and TGF-beta1 and ameliorates acute colitis in mice. In: *Int. J. Mol. Med.* 20 (4), S. 483–492.

- 18. Barde, Y.A.; Edgar, D.; Thoenen, H. (1982): Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. In: *EMBO J* 1 (5), S. 549–553.
- 19. Bauvois, B.; Meester, I. de; Dumont, J.; Rouillard, D.; Bosmans, E. (1999): Constitutive expression of CD26/dipeptidylpeptidase IV on peripheral blood B lymphocytes of patients with B chronic lymphocytic leukaemia. In: *Br J Cancer* 79 (7/8), S. 1042–1048.
- Bertolotto, A.; Malucchi, S.; Sala, A.; Orefice, G.; Carrieri, P.B.; Capobianco, M.; Milano, E.; Melis, F.; Giordana, M.T. (2002): Differential effects of three interferon betas on neutralising antibodies in patients with multiple sclerosis: a follow up study in an independent laboratory. In: *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 73 (2), S. 148–153.
- 21. Bettelli, E.; Carrier, Y.; Gao, W.; Korn, T.; Strom, T.B.; Oukka, M.; Weiner, H.L.; Kuchroo, V.K. (2006): Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. In: *Nature* 441 (7090), S. 235–238.
- 23. Bettelli, E.; Oukka, M.; Kuchroo, V.K. (2007): TH-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. In: *Nat Immunol* 8 (4), S. 345–350.
- 24. Binder, D.K.; Scharfman, H.E. (2004): Mini Review. In: *Growth Factors* 22 (3), S. 123–131
- 25. Biton, A.; Ansorge, S.; Bank, U.; Täger, M.; Reinhold, D.; Brocke, S. (2011): Divergent actions by inhibitors of DP IV and APN family enzymes on CD4+ Teff cell motility and functions. In: *Immunobiology* 216 (12), S. 1295–1301.
- 26. Bitsch, A.; Schuchardt, J.; Bunkowski, S.; Kuhlmann, T.; Bruck, W. (2000): Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. In: *Brain* 123 (Pt 6), S. 1174–1183.
- 27. Blum, D.; Chtarto, A.; Tenenbaum, L.; Brotchi, J.; Levivier, M. (2004): Clinical potential of minocycline for neurodegenerative disorders. In: *Neurobiology of Disease* 17 (3), S. 359–366.
- 28. Bongers, J.; Lambros, T.; Ahmad, M.; Heimer, E.P. (1992): Kinetics of dipeptidyl peptidase IV proteolysis of growth hormone-releasing factor and analogs. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1122 (2), S. 147–153.
- 29. Boutros, T.; Croze, E.; Yong, V.W. (1997): Interferon-beta is a potent promoter of nerve growth factor production by astrocytes. In: *J Neurochem* 69 (3), S. 939–946.
- 30. Brogden, R.N.; Speight, T.M.; Avery, G.S. (1975): Minocycline: A review of its antibacterial and pharmacokinetic properties and therapeutic use. In: *Drugs* 9 (4), S. 251–291.
- 31. Bronnum-Hansen, H. (2004): Trends in survival and cause of death in Danish patients with multiple sclerosis. In: *Brain* 127 (4), S. 844–850.
- 32. Brucklacher-Waldert, V.; Stuerner, K.; Kolster, M.; Wolthausen, J.; Tolosa, E. (2009): Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. In: *Brain* 132 (12), S. 3329–3341.
- 33. Brundula, V.; Rewcastle, N.B.; Metz, L.M.; Bernard, C.C.; Yong, V.W. (2002): Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. In: *Brain* 125 (Pt 6), S. 1297–1308.
- 34. Brundula, V.; Rewcastle, N.B.; Metz, L.M.; Bernard, C.C.; Yong, V.W. (2002): Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. In: *Brain* 125 (Pt 6), S. 1297–1308.
- 35. Bukowska, A.; Tadje, J.; Arndt, M.; Wolke, C.; Kähne, T.; Bartsch, J.; Faust, J.; Neubert, K.; Hashimoto, Y.; Lendeckel, U. (2003): Transcriptional regulation of cytosol and membrane alanyl-aminopeptidase in human T cell subsets. In: *Biol. Chem* 384 (4), S. 657–665.
- 36. Buljevac, D.; Verkooyen, R.P.; Jacobs, B.C.; Hop, W.; van der Zwaan, L.A.; van Doorn, P.A.; Hintzen, R.Q. (2003): Chlamydia pneumoniae and the risk for exacerbation in multiple sclerosis patients. In: *Ann Neurol.* 54 (6), S. 828–831.

37. Cepok, S.; Zhou, D.; Srivastava, R.; Nessler, S.; Stei, S.; Büssow, K.; Sommer, N.; Hemmer, B. (2005): Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. In: *J. Clin. Invest.* 115 (5), S. 1352–1360.

- 38. Chen, L.; Lin, Y.-L.; Peng, G.; Li, F. (2012): Structural basis for multifunctional roles of mammalian aminopeptidase N. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (44), S. 17966–17971.
- 39. Chen, X.; Hu, X.; Zou, Y.; Pi, R.; Liu, M.; Wang, T.; Zheng, X.; Liu, M.; Lin, M.; Liu, P.; Tao, L. (2009): Combined treatment with minocycline and prednisone attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in C57 BL/6 mice. In: *J Neuroimmunol* 210 (1-2), S. 22–29.
- 40. Chen, X.; Ma, L.; Jiang, Y.; Chen, S.; Zhu, C.; Liu, M.; Ma, X.; Zhu, D.; Liu, Y.; Peng, F.; Wang, Q.; Pi, R. (2012): Minocycline up-regulates the expression of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *European Journal of Pharmacology* 686 (1-3), S. 124–129.
- 41. Chen, X.; Ma, X.; Jiang, Y.; Pi, R.; Liu, Y.; Ma, L. (2011): The prospects of minocycline in multiple sclerosis. In: *J Neuroimmunol* 235 (1-2), S. 1–8.
- 42. Chen, X.; Pi, R.; Liu, M.; Ma, X.; Jiang, Y.; Liu, Y.; Mao, X.; Hu, X. (2010): Combination of methylprednisolone and minocycline synergistically improves experimental autoimmune encephalomyelitis in C57 BL/6 mice. In: *J Neuroimmunol* 226 (1-2), S. 104–109.
- 43. Chung, D.R.; Kasper, D.L.; Panzo, R.J.; Chitnis, T.; Grusby, M.J.; Sayegh, M.H.; Tzianabos, A.O.; Chtinis, T. (2003): CD4+ T cells mediate abscess formation in intraabdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. In: *J. Immunol.* 170 (4), S. 1958–1963.
- 44. Cohen, J.A.; Barkhof, F.; Comi, G.; Hartung, H.-P.; Khatri, B.O.; Montalban, X.; Pelletier, J.; Capra, R.; Gallo, P.; Izquierdo, G.; Tiel-Wilck, K.; Vera, A. de; Jin, J.; Stites, T.; Wu, S.; Aradhye, S.; Kappos, L. (2010): Oral Fingolimod or Intramuscular Interferon for Relapsing Multiple Sclerosis. In: *N Engl J Med* 362 (5), S. 402–415.
- 45. Colovic, M.; Caccia, S. (2003): Liquid chromatographic determination of minocycline in brain-to-plasma distribution studies in the rat. In: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 791 (1-2), S. 337–343.
- 46. Comabella, M.; Khoury, S.J. (2012): Immunopathogenesis of multiple sclerosis. In: *Clinical Immunology* 142 (1), S. 2–8.
- 47. Compston, D.A.; Batchelor, J.R.; McDonald, W.I. (1976): B-lymphocyte alloantigens associated with multiple sclerosis. In: *Lancet* 2 (7998), S. 1261–1265.
- 48. Compston, A.; Coles, A. (2008): Multiple sclerosis. In: *Lancet* 372 (9648), S. 1502–1517.
- 49. Constantinescu, C.S.; Farooqi, N.; O'Brien, K.; Gran, B. (2011): Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). In: *Br J Pharmacol* 164 (4), S. 1079–1106.
- 50. Constantinescu, C.S.; Kamoun, M.; Dotti, M.; Farber, R.E.; Galetta, S.L.; Rostami, A. (1995): A longitudinal study of the T cell activation marker CD26 in chronic progressive multiple sclerosis. In: *J. Neurol. Sci.* 130 (2), S. 178–182.
- 51. Crome, S.Q.; Wang, A.Y.; Levings, M.K. (2010): Translational Mini-Review Series on Th17 Cells: Function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. In: *Clinical & Experimental Immunology* 159 (2), S. 109–119.
- 52. Cua, D.J.; Sherlock, J.; Chen, Y.; Murphy, C.A.; Joyce, B.; Seymour, B.; Lucian, L.; To, W.; Kwan, S.; Churakova, T.; Zurawski, S.; Wiekowski, M.; Lira, S.A.; Gorman, D.; Kastelein, R.A.; Sedgwick, J.D. (2003): Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. In: *Nature* 421 (6924), S. 744–748.
- 53. Cunha, B.A.; Garabedian-Buffalo, S.M. (1990): Tetracyclines in urology: Current concepts. In: *Urology* 36 (6), S. 548–556.
- 54. Cutolo, M.; Bolosiu, H.; Perdriset, G. (2013): Efficacy and safety of leflunomide in DMARD-naive patients with early rheumatoid arthritis: comparison of a loading and a fixed-dose regimen. In: *Rheumatology* 52 (6), S. 1132–1140.

55. de Jong, E.; Suddason, T.; Lord, G.M. (2010): Translational Mini-Review Series on Th17 Cells: Development of mouse and human T helper 17 cells. In: *Clinical & Experimental Immunology* 159 (2), S. 148–158.

- 56. Dhib-Jalbut, S.; Marks, S. (2009): Interferon- mechanisms of action in multiple sclerosis. In: *Neurology* 74 (1, Suppl 1), S. 17-24.
- 57. Duncan, I.D. (1996): Glial cell transplantation and remyelination of the central nervous system. In: *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 22 (2), S. 87–100.
- 58. Durinx, C.; Lambeir, A.M.; Bosmans, E.; Falmagne, J.B.; Berghmans, R.; Haemers, A.; Scharpé, S.; Meester, I. de (2000): Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. In: *Eur J Biochem* 267 (17), S. 5608–5613.
- 59. El-Behi, M.; Ciric, B.; Dai, H.; Yan, Y.; Cullimore, M.; Safavi, F.; Zhang, G.-X.; Dittel, B.N.; Rostami, A. (2011): The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1-and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. In: *Nat Immunol* 12 (6), S. 568–575.
- 60. El-Hallak, M.; Giani, T.; Yeniay, B.S.; Jacobs, K.E.; Kim, S.; Sundel, R.P.; Dedeoglu, F. (2008): Chronic minocycline-induced autoimmunity in children. In: *The Journal of Pediatrics* 153 (3), S. 314–319.
- 61. Elkayam, O.; Levartovsky, D.; Brautbar, C.; Yaron, M.; Burke, M.; Vardinon, N.; Caspi, D. (1998): Clinical and immunological study of 7 patients with minocycline-induced autoimmune phenomena. In: *Am. J. Med.* 105 (6), S. 484–487.
- 62. Engel, M.; Hoffmann, T.; Wagner, L.; Wermann, M.; Heiser, U.; Kiefersauer, R.; Huber, R.; Bode, W.; Demuth, H.-U.; Brandstetter, H. (2003): The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (9), S. 5063–5068.
- 63. Enssle, K.H.; Fleischer, B. (1990): Absence of Epstein-Barr virus-specific, HLA class Ilrestricted CD4+ cytotoxic T lymphocytes in infectious mononucleosis. In: *Clin. Exp. Immunol.* 79 (3), S. 409–415.
- 64. Esiri, M.M. (1977): Immunoglobulin-containing cells in multiple-sclerosis plaques. In: *Lancet* 2 (8036), S. 478.
- 65. Ettinger, R.; Sims, G.P.; Fairhurst, A.-M.; Robbins, R.; da Silva, Y.S.; Spolski, R.; Leonard, W.J.; Lipsky, P.E. (2005): IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. In: *J. Immunol.* 175 (12), S. 7867–7879.
- 66. Ferber, I.A.; Brocke, S.; Taylor-Edwards, C.; Ridgway, W.; Dinisco, C.; Steinman, L.; Dalton, D.; Fathman, C.G. (1996): Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). In: *J. Immunol.* 156 (1), S. 5–7.
- 67. Ferrante, P.; Omodeo-Zorini, E.; Zuffolato, M.R.; Mancuso, R.; Caldarelli-Stefano, R.; Puricelli, S.; Mediati, M.; Losciale, L.; Caputo, D. (1997): Human T-cell lymphotropic virus tax and Epstein-Barr virus DNA in peripheral blood of multiple sclerosis patients during acute attack. In: *Acta Neurol. Scand., Suppl.c* 169, S. 79–85.
- 68. Filippini, G.; Del, G.C.; Vacchi, L.; D'Amico, R.; Di Pietrantonj, C.; Beecher, D.; Salanti, G. (2013): Immunomodulators and immunosuppressants for multiple sclerosis. A network meta-analysis. In: *The Cochrane database of systematic reviews* (6).
- 69. Fleischer, B. (1994): CD26: a surface protease involved in T-cell activation. In: *Immunol. Today* 15 (4), S. 180–184.
- 70. Fleischmann, R.M. (2009): Progressive multifocal leukoencephalopathy following rituximab treatment in a patient with rheumatoid arthritis. In: *Arthritis Rheum* 60 (11), S. 3225–3228.
- 71. Fox, R.J.; Kita, M.; Cohan, S.L.; Henson, L.J.; Zambrano, J.; Scannevin, R.H.; O'Gorman, J.; Novas, M.; Dawson, K.T.; Phillips, J.T. (2014): BG-12 (dimethyl fumarate): a review of mechanism of action, efficacy, and safety. In: *Curr Med Res Opin* 30 (2), S. 251–262.
- 72. Frohman, E.M.; Filippi, M.; Stuve, O.; Waxman, S.G.; Corboy, J.; Phillips, J.T.; Lucchinetti, C.; Wilken, J.; Karandikar, N.; Hemmer, B.; Monson, N.; Keyser, J. de;

Hartung, H.; Steinman, L.; Oksenberg, J.R.; Cree, B.A.C.; Hauser, S.; Racke, M.K. (2005): Characterizing the Mechanisms of Progression in Multiple Sclerosis. In: *Arch Neurol* 62 (9), S. 1345.

- 73. Fukasawa, K.M.; Fukasawa, K.; Harada, M. (1978): Dipeptidyl aminopeptidase IV, a glycoprotein from pig kidney. In: *Biochim. Biophys. Acta* 535 (1), S. 161–166.
- 74. Gale, C.R.; Martyn, C.N. (1995): Migrant studies in multiple sclerosis. In: *Progress in Neurobiology* 47 (4-5), S. 425–448.
- 75. Giuliani, F.; Fu, S.A.; Metz, L.M.; Yong, V.W. (2005): Effective combination of minocycline and interferon-beta in a model of multiple sclerosis. In: *J Neuroimmunol* 165 (1-2), S. 83–91.
- 76. Giuliani, F.; Metz, L.M.; Wilson, T.; Fan, Y.; Bar-Or, A.; Yong, V.W. (2005): Additive effect of the combination of glatiramer acetate and minocycline in a model of MS. In: *J Neuroimmunol* 158 (1-2), S. 213–221.
- 77. Giuliani, F.; Metz, L.M.; Wilson, T.; Fan, Y.; Bar-Or, A.; Yong, V.W. (2005): Additive effect of the combination of glatiramer acetate and minocycline in a model of MS. In: *J Neuroimmunol* 158 (1-2), S. 213–221.
- 78. Gocke, A.R.; Cravens, P.D.; Ben, L.-H.; Hussain, R.Z.; Northrop, S.C.; Racke, M.K.; Lovett-Racke, A.E. (2007): T-bet regulates the fate of Th1 and Th17 lymphocytes in autoimmunity. In: *J. Immunol.* 178 (3), S. 1341–1348.
- 79. Goldenberg, M.M. (2012): Multiple sclerosis review. In: P T 37 (3), S. 175–184.
- 80. Golub, L.M.; Lee, H.M.; Ryan, M.E.; Giannobile, W.V.; Payne, J.; Sorsa, T. (1998): Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. In: *Adv. Dent. Res.* 12 (2), S. 12–26.
- 81. Good, M.; Hussey, D. (2003): Minocycline: stain devil? In: *Br J Dermatol* 149 (2), S. 237–239.
- 82. Gorrell, M.D. (2005): Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. In: *Clin Sci (Lond)* 108 (4), S. 277–292.
- 83. Goverman, J. (2009): Autoimmune T cell responses in the central nervous system. In: *Nat Rev Immunol* 9 (6), S. 393–407.
- 84. Griffin, J.D.; Mayer, R.J.; Weinstein, H.J.; Rosenthal, D.S.; Coral, F.S.; Beveridge, R.P.; Schlossman, S.F. (1983): Surface marker analysis of acute myeloblastic leukemia: identification of differentiation-associated phenotypes. In: *Blood* 62 (3), S. 557–563.
- 85. Gutteridge, J.M. (1992): Iron and oxygen radicals in brain. In: Ann Neurol. 32, S. 21.
- 86. Haak, S.; Croxford, A.L.; Kreymborg, K.; Heppner, F.L.; Pouly, S.; Becher, B.; Waisman, A. (2008): IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuro-inflammation in mice. In: *J. Clin. Invest.*, 119 (1), S. 61–69.
- 87. Haiser, H.J.; Turnbaugh, P.J. (2012): Is it time for a metagenomic basis of therapeutics? In: *Science* 336 (6086), S. 1253–1255.
- 88. Diener, H.C.; Weimar, C. (Hrsg.) (2012): Multiple Sklerose, Diagnostik und Therapie. S2e-Leitlinie. Kommission "Leitlinien" der Deutschen Gesellschaft für Neurologie. Stuttgart: Thieme Verlag.
- 89. Hofstetter, H.H.; Shive, C.L.; Forsthuber, T.G. (2002): Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant. Induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169 (1), S. 117–125.
- 90. Harrington, L.E.; Hatton, R.D.; Mangan, P.R.; Turner, H.; Murphy, T.L.; Murphy, K.M.; Weaver, C.T. (2005): Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. In: *Nat Immunol* 6 (11), S. 1123–1132.
- 91. Hauser, S.L.; Waubant, E.; Arnold, D.L.; Vollmer, T.; Antel, J.; Fox, R.J.; Bar-Or, A.; Panzara, M.; Sarkar, N.; Agarwal, S.; Langer-Gould, A.; Smith, C.H. (2008): B-Cell Depletion with Rituximab in Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis. In: *N Engl J Med* 358 (7), S. 676–688.
- 92. Hegen, M.; Niedobitek, G.; Klein, C.E.; Stein, H.; Fleischer, B. (1990): The T cell triggering molecule Tp103 is associated with dipeptidyl aminopeptidase IV activity. In:

- J. Immunol. 144 (8), S. 2908-2914.
- 93. Hickey, W.F.; Hsu, B.L.; Kimura, H. (1991): T-lymphocyte entry into the central nervous system. In: *J. Neurosci. Res* 28 (2), S. 254–260.
- 94. Hauser, S.L.; Bar-Or, A.; Comi, G.; Giovannoni, G.; Hartung, H.-P.; Hemmer, B.; Lublin, F.; Montalban, X.; Rammohan, K.W.; Selmaj, K.; Traboulsee, A.; Wolinsky, J.S.; Arnold, D.L.; Klingelschmitt, G.; Masterman, D.; Fontoura, P.; Belachew, S.; Chin, P.; Mairon, N.; Garren, H.; Kappos, L. (2017): Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. In: *N Engl J Med* 376 (3), S. 221–234.
- 95. Hohlfeld, R.; Dornmair, K.; Meinl, E.; Wekerle, H. (2016): The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 2. CD8+ T cells, B cells, and antibodies in the focus of reverse-translational research. In: *The Lancet Neurology* 15 (3), S. 317–331.
- 96. Hooper, N.M.; Lendeckel, U. (2004): Aminopeptidases in brain and disease. New York, London: Kluwer Academic/Plenum (Proteases in biology and disease, 2).
- 97. Hooper, W.C. (1991): The role of transforming growth factor-beta in hematopoiesis. A review. In: *Leuk. Res.* 15 (4), S. 179–184.
- 98. Hopsu-Havu, V.K.; Glenner, G.G. (1966): A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-β-naphthylamide. In: *Histochemie* 7 (3), S. 197–201.
- 99. Huang, W.; Na, L.; Fidel, P.L.; Schwarzenberger, P. (2004): Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. In: *J. Infect. Dis.* 190 (3), S. 624–631.
- 100. Hubbell, C.G.; Hobbs, E.R.; Rist, T.; White, J.W. (1982): Efficacy of minocycline compared with tetracycline in treatment of acne vulgaris. In: *Arch Dermatol* 118 (12), S. 989–992.
- 101. Huseby, E.S.; Liggitt, D.; Brabb, T.; Schnabel, B.; Ohlén, C.; Goverman, J. (2001): A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. In: *J Exp Med* 194 (5), S. 669–676.
- 102. Ivanov, I.I.; McKenzie, B.S.; Zhou, L.; Tadokoro, C.E.; Lepelley, A.; Lafaille, J.J.; Cua, D.J.; Littman, D.R. (2006): The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. In: *Cell* 126 (6), S. 1121–1133.
- 103. Iwaki-Egawa, S.; Watanabe, Y.; Kikuya, Y.; Fujimoto, Y. (1998): Dipeptidyl peptidase IV from human serum: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. In: *J. Biochem.* 124 (2), S. 428–433.
- 104. Jacobs, L.D.; Beck, R.W.; Simon, J.H.; Kinkel, R.P.; Brownscheidle, C.M.; Murray, T.J.; Simonian, N.A.; Slasor, P.J.; Sandrock, A.W. (2000): Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group. In: N Engl J Med 343 (13), S. 898–904.
- 105. Jensen, J.; Langkilde, A.R.; Fenst, C.; Nicolaisen, M.S.; Roed, H.G.; Christiansen, M.; Sellebjerg, F. (2004): CD4 T cell activation and disease activity at onset of multiple sclerosis. In: *J Neuroimmunol* 149 (1-2), S. 202–209.
- 106. Jin, Z.; Liang, J.; Wang, J.; Kolattukudy, P.E. (2015): MCP-induced protein 1 mediates the minocycline-induced neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion injury in vitro and in vivo. In: *Journal of neuroinflammation* 12, S. 39.
- 107. Kabat, E.A.; Freedman, D.A. (1950): A study of the crystalline albumin, gamma globulin and total protein in the cerebrospinal fluid of 100 cases of multiple sclerosis and in other diseases. In: *Am J Med Sci* 219 (1), S. 55–64.
- 108. Kahne, T.; Lendeckel, U.; Wrenger, S.; Neubert, K.; Ansorge, S.; Reinhold, D. (1999): Dipeptidyl peptidase IV: a cell surface peptidase involved in regulating T cell growth (review). In: *Int. J. Mol. Med.* 4 (1), S. 3–15.
- 109. Kameoka, J.; Tanaka, T.; Nojima, Y.; Schlossman, S.F.; Morimoto, C. (1993): Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. In: *Science* 261 (5120), S. 466–469.
- 110. Kantarci, O.; Wingerchuk, D. (2006): Epidemiology and natural history of multiple sclerosis: new insights. In: *Current Opinion in Neurology* 19 (3), S. 248–254.
- 111. Kap, Y.S.; Laman, J.D.; 't Hart, B.A. (2010): Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Common Marmoset, a Bridge Between Rodent EAE and

Multiple Sclerosis for Immunotherapy Development. In: *J Neuroimmune Pharmacol* 5 (2), S. 220–230.

- 112. Kapoor, R.; Davies, M.; Blaker, P.A.; Hall, S.M.; Smith, K.J. (2003): Blockers of sodium and calcium entry protect axons from nitric oxide-mediated degeneration. In: *Ann Neurol.* 53 (2), S. 174–180.
- 113. Kappos, L.; Li, D.; Calabresi, P.A.; O'Connor, P.; Bar-Or, A.; Barkhof, F.; Yin, M.; Leppert, D.; Glanzman, R.; Tinbergen, J.; Hauser, S.L. (2011): Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. In: *The Lancet* 378 (9805), S. 1779–1787.
- 114. Kebir, H.; Ifergan, I.; Alvarez, J.I.; Bernard, M.; Poirier, J.; Arbour, N.; Duquette, P.; Prat, A. (2009): Preferential recruitment of interferon-γ-expressing T H 17 cells in multiple sclerosis. In: *Ann Neurol.* 66 (3), S. 390–402.
- 115. Kebir, H.; Kreymborg, K.; Ifergan, I.; Dodelet-Devillers, A.; Cayrol, R.; Bernard, M.; Giuliani, F.; Arbour, N.; Becher, B.; Prat, A. (2007): Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. In: *Nat Med* 13 (10), S. 1173–1175.
- 116. Kidoya, H.; Umemura, M.; Kawabe, T.; Matsuzaki, G.; Yahagi, A.; Imamura, R.; Suda, T. (2005): Fas ligand induces cell-autonomous IL-23 production in dendritic cells, a mechanism for Fas ligand-induced IL-17 production. In: *J. Immunol.* 175 (12), S. 8024–8031.
- 117. Kieffer, T.J.; McIntosh, C.H.; Pederson, R.A. (1995): Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. In: *Endocrinology* 136 (8), S. 3585–3596.
- 118. Kleinschnitz, C.; Meuth, S.; Kieseier, B.; Wiendl, H. (2007): Multiple-Sklerose-Update zur Pathophysiologie und neuen immuntherapeutischen Ansätzen. In: *Nervenarzt* 78 (8), S. 883–911.
- 119. Kleinschnitz, C.; Meuth, S.G.; Wiendl, H. (2008): The trials and errors in MS therapy. In: *Int MS J* 15 (3), S. 79–90.
- 120. Kloppenburg, M.; Verweij, C.L.; Miltenburg, A.M.; Verhoeven, A.J.; Daha, M.R.; Dijkmans, B.A.; Breedveld, F.C. (1995): The influence of tetracyclines on T cell activation. In: *Clin. Exp. Immunol.* 102 (3), S. 635–641.
- 121. Koch-Henriksen, N.; Sørensen, P.S. (2010): The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. In: *The Lancet Neurology* 9 (5), S. 520–532.
- 122. Koenen, H.J.P.M.; Smeets, R.L.; Vink, P.M.; van Rijssen, E.; Boots, A.M.H.; Joosten, I. (2008): Human CD25highFoxp3pos regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. In: *Blood* 112 (6), S. 2340–2352.
- 123. Kornek, B.; Storch, M.K.; Weissert, R.; Wallstroem, E.; Stefferl, A.; Olsson, T.; Linington, C.; Schmidbauer, M.; Lassmann, H. (2000): Multiple Sclerosis and Chronic Autoimmune Encephalomyelitis. In: *The American Journal of Pathology* 157 (1), S. 267–276.
- 124. Korom, S.; Meester, I. de; Stadlbauer, T.H.; Chandraker, A.; Schaub, M.; Sayegh, M.H.; Belyaev, A.; Haemers, A.; Scharpé, S.; Kupiec-Weglinski, J.W. (1997): Inhibition of CD26/dipeptidyl peptidase IV activity in vivo prolongs cardiac allograft survival in rat recipients. In: *Transplantation* 63 (10), S. 1495–1500.
- 125. Kraus, R.L.; Pasieczny, R.; Lariosa-Willingham, K.; Turner, M.S.; Jiang, A.; Trauger, J.W. (2005): Antioxidant properties of minocycline: neuroprotection in an oxidative stress assay and direct radical-scavenging activity. In: *J Neurochem* 94 (3), S. 819–827.
- 126. Kurtzke, J.F. (1983): Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). In: *Neurology* 33 (11), S. 1444–1452.
- 127. Kurtzke, J.F. (2000): Multiple sclerosis in time and space--geographic clues to cause. In: *J. Neurovirol.* 6 Suppl 2, S. 40.
- 128. Langner, J.; Ansorge, S. (2002): Ectopeptidases. CD13/aminopeptidase N and CD26/dipeptidylpeptidase IV in medicine and biology. New York: Kluwer Academic/Plenum.
- 129. Lankas, G.R.; Leiting, B.; Roy, R.S.; Eiermann, G.J.; Beconi, M.G.; Biftu, T.; Chan, C.-C.; Edmondson, S.; Feeney, W.P.; He, H.; Ippolito, D.E.; Kim, D.; Lyons, K.A.; Ok, H.O.;

Patel, R.A.; Petrov, A.N.; Pryor, K.A.; Qian, X.; Reigle, L.; Woods, A.; Wu, J.K.; Zaller, D.; Zhang, X.; Zhu, L.; Weber, A.E.; Thornberry, N.A. (2005): Dipeptidyl Peptidase IV Inhibition for the Treatment of Type 2 Diabetes: Potential Importance of Selectivity Over Dipeptidyl Peptidases 8 and 9. In: *Diabetes* 54 (10), S. 2988–2994.

- 130. Larsen, S.L.; Pedersen, L.O.; Buus, S.; Stryhn, A. (1996): T cell responses affected by aminopeptidase N (CD13)-mediated trimming of major histocompatibility complex class II-bound peptides. In: *J Exp Med* 184 (1), S. 183–189.
- 131. Lawrence, D.A. (2001): Latent-TGF-beta: an overview. In: *Mol. Cell. Biochem.* 219 (1-2), S. 163–170.
- 132. Lee, S.M.; Yune, T.Y.; Kim, S.J.; Kim, Y.C.; Oh, Y.J.; Markelonis, G.J.; Oh, T.H. (2004): Minocycline inhibits apoptotic cell death via attenuation of TNF-alpha expression following iNOS/NO induction by lipopolysaccharide in neuron/glia co-cultures. In: *J Neurochem* 91 (3), S. 568–578.
- 133. Lehmann, P.V.; Forsthuber, T.; Miller, A.; Sercarz, E.E. (1992): Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. In: *Nature* 358 (6382), S. 155–157
- 134. Lemmer, B.; Brune, K. (2010): Pharmakotherapie. Klinische Pharmakologie. 14. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag (Springer-Lehrbuch).
- 135. Lendeckel, U.; Arndt, M.; Bukowska, A.; Tadje, J.; Wolke, C.; Kähne, T.; Neubert, K.; Faust, J.; Ittenson, A.; Ansorge, S.; Reinhold, D. (2003): Synergistic action of DPIV and APN in the regulation of T cell function. In: *Adv. Exp. Med. Biol.* 524, S. 123–131.
- 136. Lendeckel, U.; Arndt, M.; Frank, K.; Spiess, A.; Reinhold, D.; Ansorge, S. (2000): Modulation of WNT-5A expression by actinonin: linkage of APN to the WNT-pathway? In: *Adv. Exp. Med. Biol.* 477, S. 35–41.
- 137. Lendeckel, U.; Arndt, M.; Frank, K.; Wex, T.; Ansorge, S. (1999): Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells (review). In: *Int. J. Mol. Med.* 4 (1), S. 17–27.
- 138. Letterio, J.J.; Roberts, A.B. (1998): Regulation of immune responses by TGF-beta. In: *Annu Rev Immunol* 16, S. 137–161.
- 139. Levin, L.I. (2003): Multiple Sclerosis and Epstein-Barr Virus. In: *JAMA* 289 (12), S. 1533.
- 140. Leyden, J.J. (1985): Absorption of minocycline hydrochloride and tetracycline hydrochloride. Effect of food, milk, and iron. In: *J. Am. Acad. Dermatol.* 12 (2 Pt 1), S. 308–312.
- 141. Link, H.; Huang, Y.-M. (2006): Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: An update on methodology and clinical usefulness. In: *J Neuroimmunol* 180 (1-2), S. 17–28.
- 142. Lohr, J.; Knoechel, B.; Wang, J.J.; Villarino, A.V.; Abbas, A.K. (2006): Role of IL-17 and regulatory T lymphocytes in a systemic autoimmune disease. In: *Journal of Experimental Medicine* 203 (13), S. 2785–2791.
- 143. Lovett-Racke, A.E.; Yang, Y.; Racke, M.K. (2011): Th1 versus Th17: Are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Basis of Disease* 1812 (2), S. 246–251.
- 144. Lowenthal, A.; Vansande, M.; Karcher, D. (1960): The differential diagnosis of neurological diseases by fractionating electrophoretically the CSF gamma-globulins. In: *J New Drugs* 6, S. 51–56.
- 145. Lublin, F.D.; Knobler, R.L.; Kalman, B.; Goldhaber, M.; Marini, J.; Perrault, M.; D'Imperio, C.; Joseph, J.; Alkan, S.S.; Korngold, R. (1993): Monoclonal anti-gamma interferon antibodies enhance experimental allergic encephalomyelitis. In: *Autoimmunity* 16 (4), S. 267–274.
- 146. Luccarini, I.; Ballerini, C.; Biagioli, T.; Biamonte, F.; Bellucci, A.; Rosi, M.C.; Grossi, C.; Massacesi, L.; Casamenti, F. (2008): Combined treatment with atorvastatin and minocycline suppresses severity of EAE. In: *Experimental Neurology* 211 (1), S. 214–226
- 147. Maier, K.; Merkler, D.; Gerber, J.; Taheri, N.; Kuhnert, A.V.; Williams, S.K.; Neusch, C.; Bahr, M.; Diem, R. (2007): Multiple neuroprotective mechanisms of minocycline in

- autoimmune CNS inflammation. In: Neurobiology of Disease 25 (3), S. 514-525.
- 148. Makar, T.K.; Trisler, D.; Sura, K.T.; Sultana, S.; Patel, N.; Bever, C.T. (2008): Brain derived neurotrophic factor treatment reduces inflammation and apoptosis in experimental allergic encephalomyelitis. In: *J. Neurol. Sci.* 270 (1-2), S. 70–76.
- 149. Mayr, W.T.; Pittock, S.J.; McClelland, R.L.; Jorgensen, N.W.; Noseworthy, J.H.; Rodriguez, M. (2003): Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Olmsted County, Minnesota, 1985-2000. In: *Neurology* 61 (10), S. 1373–1377.
- 150. McRae, B.L.; Vanderlugt, C.L.; Dal Canto, M.C.; Miller, S.D. (1995): Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *J Exp Med* 182 (1), S. 75–85.
- 151. Mecha, M.; Carrillo-Salinas, F.J.; Mestre, L.; Feliú, A.; Guaza, C. (2013): Viral models of multiple sclerosis: Neurodegeneration and demyelination in mice infected with Theiler's virus. In: *Progress in Neurobiology* 101-102, S. 46–64.
- 152. Medana, I.; Martinic, M.A.; Wekerle, H.; Neumann, H. (2001): Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. In: *The American Journal of Pathology* 159 (3), S. 809–815.
- 153. Meester, I. de; Korom, S.; van Damme, J.; Scharpé, S. (1999): CD26, let it cut or cut it down. In: *Immunol. Today* 20 (8), S. 367–375.
- 154. Mentlein, R. (1999): Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides. In: *Regulatory Peptides* 85 (1), S. 9–24.
- 155. Mentlein, R.; Dahms, P.; Grandt, D.; Kruger, R. (1993): Proteolytic processing of neuropeptide Y and peptide YY by dipeptidyl peptidase IV. In: *Regulatory Peptides* 49 (2), S. 133–144.
- 156. Metz, L.; Li, D.; Traboulsee, A.; Myles, M.; Duquette, P.; Godin, J.; Constantin, M.; Yong, V. (2009): Glatiramer acetate in combination with minocycline in patients with relapsing--remitting multiple sclerosis: results of a Canadian, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. In: *Multiple Sclerosis* 15 (10), S. 1183–1194.
- 157. Metz, L.M.; Zhang, Y.; Yeung, M.; Patry, D.G.; Bell, R.B.; Stoian, C.A.; Yong, V.W.; Patten, S.B.; Duquette, P.; Antel, J.P.; Mitchell, J.R. (2004): Minocycline reduces gadolinium-enhancing magnetic resonance imaging lesions in multiple sclerosis. In: *Ann Neurol.* 55 (5), S. 756.
- 158. Mikol, D.D.; Barkhof, F.; Chang, P.; Coyle, P.K.; Jeffery, D.R.; Schwid, S.R.; Stubinski, B.; Uitdehaag, B.M.J. (2008): Comparison of subcutaneous interferon beta-1a with glatiramer acetate in patients with relapsing multiple sclerosis (the REbif vs Glatiramer Acetate in Relapsing MS Disease [REGARD] study): a multicentre, randomised, parallel, open-label trial. In: *The Lancet Neurology* 7 (10), S. 903–914.
- 159. Miller, D.; Barkhof, F.; Montalban, X.; Thompson, A.; Filippi, M. (2005): Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. In: *The Lancet Neurology* 4 (5), S. 281–288.
- 160. Milo, R.; Miller, A. (2014): Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. In: *Autoimmunity Reviews* 13 (4-5), S. 518–524.
- 161. Mix, E.; Meyer-Rienecker, H.; Hartung, H.-P.; Zettl, U.K. (2010): Animal models of multiple sclerosis—Potentials and limitations. In: *Progress in Neurobiology* 92 (3), S. 386–404.
- 162. Moore, T.L. (2008): Autoimmunity and Minocycline. In: *The Journal of Pediatrics* 153 (3), S. 303–304.
- 163. Münz, C.; Lünemann, J.D.; Getts, M.T.; Miller, S.D. (2009): Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? In: *Nat Rev Immunol* 9 (4), S. 246–258.
- 164. Mutschler, E. (2008): Mutschler Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie; 264 Tabellen. 9. Aufl. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.
- 165. Nessler, S.; Dodel, R.; Bittner, A.; Reuss, S.; Du, Y.; Hemmer, B.; Sommer, N. (2002): Effect of minocycline in experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *Ann Neurol.* 52 (5), S. 689–690.
- 166. Nikic, I.; Merkler, D.; Sorbara, C.; Brinkoetter, M.; Kreutzfeldt, M.; Bareyre, F.M.; Bruck, W.; Bishop, D.; Misgeld, T.; Kerschensteiner, M. (2011): A reversible form of axon

damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. In: *Nature medicine* 17 (4), S. 495–499.

- 167. Nikodemova, M.; Lee, J.; Fabry, Z.; Duncan, I.D. (2010): Minocycline attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in rats by reducing T cell infiltration into the spinal cord. In: *J Neuroimmunol* 219 (1-2), S. 33–37.
- 168. Nikodemova, M.; Watters, J.J.; Jackson, S.J.; Yang, S.K.; Duncan, I.D. (2007): Minocycline down-regulates MHC II expression in microglia and macrophages through inhibition of IRF-1 and protein kinase C (PKC)alpha/betaII. In: *J. Biol. Chem.* 282 (20), S. 15208–15216.
- 169. O'Connor, K.C.; Appel, H.; Bregoli, L.; Call, M.E.; Catz, I.; Chan, J.A.; Moore, N.H.; Warren, K.G.; Wong, S.J.; Hafler, D.A.; Wucherpfennig, K.W. (2005): Antibodies from inflamed central nervous system tissue recognize myelin oligodendrocyte glycoprotein. In: *J Immunol* 175 (3), S. 1974–1982.
- 170. Olerup, O.; Hillert, J. (1991): HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. In: *Tissue Antigens* 38 (1), S. 1–15.
- 171. Oravecz, T.; Pall, M.; Roderiquez, G.; Gorrell, M.D.; Ditto, M.; Nguyen, N.Y.; Boykins, R.; Unsworth, E.; Norcross, M.A. (1997): Regulation of the Receptor Specificity and Function of the Chemokine RANTES (Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted) by Dipeptidyl Peptidase IV (CD26)-mediated Cleavage. In: *Journal of Experimental Medicine* 186 (11), S. 1865–1872.
- 172. Osorio, F.; LeibundGut-Landmann, S.; Lochner, M.; Lahl, K.; Sparwasser, T.; Eberl, G.; Reis e Sousa, C. (2008): DC activated via dectin-1 convert Treg into IL-17 producers. In: *Eur J Immunol* 38 (12), S. 3274–3281.
- 173. Park, H.; Li, Z.; Yang, X.O.; Chang, S.H.; Nurieva, R.; Wang, Y.-H.; Wang, Y.; Hood, L.; Zhu, Z.; Tian, Q.; Dong, C. (2005): A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. In: *Nat Immunol* 6 (11), S. 1133–1141.
- 174. Pauly, R.P.; Rosche, F.; Wermann, M.; McIntosh, C.H.; Pederson, R.A.; Demuth, H.U. (1996): Investigation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide-(1-42) and glucagon-like peptide-1-(7-36) degradation in vitro by dipeptidyl peptidase IV using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. A novel kinetic approach. In: *J. Biol. Chem.* 271 (38), S. 23222–23229.
- 175. Perlmutter, L.J.; Darvish, M. (1983): Possible relationship of Chlamydia to multiple sclerosis. In: *Med. Hypotheses* 12 (2), S. 95–98.
- 176. Kreutzmann, P.; Lorenz, P.; Reinhold, D.; Goihl, A.; Entz, D.; Franz, C.; Schraven, B.; Fischer, K.-D.: Verwendung A-Ring-aromatisierter Acetyl-Minocycline und pharmazeutischer Zubereitungen daraus zur Therapie und Prophylaxe entzündlicher Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Transplantatabstoßungen. Veröffentlichungsnr: EP2659887 A1. 06.11.2013.
- 177. Lorenz, P.; Kreutzmann, P.; Rothe, F.; Martens-Lobenhoffer, J.; Schmidt, H.; Wolf, G.: Method for the synthesis of a-ring aromatized acetyl minocyclines. Veröffentlichungsnr: WO 2009/012741 A1. 29.01.2009.
- 178. Pezzutto, A.; Ulrichs, T.; Burmester, G.-R.; Wirth, J. (op. 2007): Taschenatlas der Immunologie. Grundlagen Labor Klinik. 2., volls. überarb. und aktualisierte Aufl. Stuttgart, New York: Thieme.
- 179. Polman, C.H.; Reingold, S.C.; Banwell, B.; Clanet, M.; Cohen, J.A.; Filippi, M.; Fujihara, K.; Havrdova, E.; Hutchinson, M.; Kappos, L.; Lublin, F.D.; Montalban, X.; O'Connor, P.; Sandberg-Wollheim, M.; Thompson, A.J.; Waubant, E.; Weinshenker, B.; Wolinsky, J.S. (2011): Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. In: *Ann Neurol.* 69 (2), S. 292–302.
- 180. Popovic, N.; Schubart, A.; Goetz, B.D.; Zhang, S.-C.; Linington, C.; Duncan, I.D. (2002): Inhibition of autoimmune encephalomyelitis by a tetracycline. In: *Ann Neurol.* 51 (2), S. 215–223.
- 181. Preller, V.; Gerber, A.; Wrenger, S.; Togni, M.; Marguet, D.; Tadje, J.; Lendeckel, U.; Röcken, C.; Faust, J.; Neubert, K.; Schraven, B.; Martin, R.; Ansorge, S.; Brocke, S.; Reinhold, D. (2007): TGF-beta1-mediated control of central nervous system inflammation and autoimmunity through the inhibitory receptor CD26. In: *J. Immunol.*

- 178 (7), S. 4632-4640.
- 182. Prineas, J.W.; Wright, R.G. (1978): Macrophages, lymphocytes, and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis. In: *Lab. Invest.* 38 (4), S. 409–421.
- 183. Proost, P.; Struyf, S.; Schols, D.; Opdenakker, G.; Sozzani, S.; Allavena, P.; Mantovani, A.; Augustyns, K.; Bal, G.; Haemers, A.; Lambeir, A.M.; Scharpé, S.; van Damme, J.; Meester, I. de (1999): Truncation of macrophage-derived chemokine by CD26/dipeptidyl-peptidase IV beyond its predicted cleavage site affects chemotactic activity and CC chemokine receptor 4 interaction. In: *J. Biol. Chem.* 274 (7), S. 3988–3993.
- 184. Qin, Y.; Duquette, P.; Zhang, Y.; Olek, M.; Da, R.-R.; Richardson, J.; Antel, J.P.; Talbot, P.; Cashman, N.R.; Tourtellotte, W.W.; Wekerle, H.; van den Noort, S. (2003): Intrathecal B-Cell Clonal Expansion, an Early Sign of Humoral Immunity, in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Clinically Isolated Syndrome Suggestive of Multiple Sclerosis. In: Lab Invest 83 (7), S. 1081–1088.
- 185. Rangachari, M.; Kuchroo, V.K. (2013): Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology. In: *Journal of Autoimmunity* 45, S. 31–39.
- 186. Rasmussen, H.B.; Branner, S.; Wiberg, F.C.; Wagtmann, N. (2002): Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV/CD26 in complex with a substrate analog. In: *Nat Struct Biol* 10 (1), S. 19–25.
- 187. Reinhold, D.; Bank, U.; Bühling, F.; Lendeckel, U.; Faust, J.; Neubert, K.; Ansorge, S. (1997): Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor-beta 1 in PWM-stimulated PBMC and T cells. In: *Immunology* 91 (3), S. 354–360.
- 188. Reinhold, D.; Bank, U.; Bühling, F.; Täger, M.; Born, I.; Faust, J.; Neubert, K.; Ansorge, S. (1997): Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) induces secretion of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) in stimulated mouse splenocytes and thymocytes. In: *Immunol. Lett.* 58 (1), S. 29–35.
- 189. Reinhold, D.; Bank, U.; Entz, D.; Goihl, A.; Stoye, D.; Wrenger, S.; Brocke, S.; Thielitz, A.; Stefin, S.; Nordhoff, K.; Heimburg, A.; Täger, M.; Ansorge, S. (2011): PETIR-001, a dual inhibitor of dipeptidyl peptidase IV (DP IV) and aminopeptidase N (APN), ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice. In: *Biol. Chem* 392 (3), S. 233–237.
- 190. Reinhold, D.; Bank, U.; Tager, M.; Ansorge, S.; Wrenger, S.; Thielitz, A.; Lendeckel, U.; Faust, J.; Neubert, K.; Brocke, S. (2008): DP IV/CD26, APN/CD13 and related enzymes as regulators of T cell immunity: implications for experimental encephalomyelitis and multiple sclerosis. In: *Front Biosci* 13, S. 2356–2363.
- 191. Reinhold, D.; Biton, A.; Goihl, A.; Pieper, S.; Lendeckel, U.; Faust, J.; Neubert, K.; Bank, U.; Täger, M.; Ansorge, S.; Brocke, S. (2007): Dual inhibition of dipeptidyl peptidase IV and aminopeptidase N suppresses inflammatory immune responses. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1110, S. 402–409.
- 192. Reinhold, D.; Biton, A.; Pieper, S.; Lendeckel, U.; Faust, J.; Neubert, K.; Bank, U.; Täger, M.; Ansorge, S.; Brocke, S. (2006): Dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) and aminopeptidase N (APN, CD13) as regulators of T cell function and targets of immunotherapy in CNS inflammation. In: *International Immunopharmacology* 6 (13-14), S. 1935–1942.
- 193. Reinhold, D.; Goihl, A.; Wrenger, S.; Reinhold, A.; Kühlmann, U.C.; Faust, J.; Neubert, K.; Thielitz, A.; Brocke, S.; Täger, M.; Ansorge, S.; Bank, U. (2009): Role of dipeptidyl peptidase IV (DP IV)-like enzymes in T lymphocyte activation: investigations in DP IV/CD26-knockout mice. In: *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 47 (3).
- 194. Reinhold, D.; Hemmer, B.; Gran, B.; Born, I.; Faust, J.; Neubert, K.; McFarland, H.F.; Martin, R.; Ansorge, S. (1998): Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV/CD26 suppress activation of human MBP-specific CD4+ T cell clones. In: *J Neuroimmunol* 87 (1-2), S. 203–209.
- 195. Reinhold, D.; Kähne, T.; Steinbrecher, A.; Wrenger, S.; Neubert, K.; Ansorge, S.; Brocke, S. (2002): The role of dipeptidyl peptidase IV (DP IV) enzymatic activity in T cell activation and autoimmunity. In: *Biol. Chem* 383 (7-8), S. 1133–1138.

196. Riemann, D.; Kehlen, A.; Langner, J. (1999): CD13--not just a marker in leukemia typing. In: *Immunol. Today* 20 (2), S. 83–88.

- 197. Río, J.; Comabella, M.; Montalban, X. (2011): Multiple sclerosis: current treatment algorithms. In: *Current Opinion in Neurology* 24 (3), S. 230–237.
- 198. Rivera-Quiñones, C.; Mcgavern, D.; Schmelzer, J.D.; Hunter, S.F.; Low, P.A.; Rodriguez, M. (1998): Absence of neurological deficits following extensive demyelination in a class I-deficient murine model of multiple sclerosis. In: *Nat Med* 4 (2), S. 187–193.
- 199. Rovaris, M.; Gambini, A.; Gallo, A.; Falini, A.; Ghezzi, A.; Benedetti, B.; Sormani, M.P.; Martinelli, V.; Comi, G.; Filippi, M. (2005): Axonal injury in early multiple sclerosis is irreversible and independent of the short-term disease evolution. In: *Neurology* 65 (10), S. 1626–1630.
- 200. Rudick, R.A. (2004): Impact of disease-modifying therapies on brain and spinal cord atrophy in multiple sclerosis. In: *J Neuroimaging* 14 (3 Suppl), S. 54.
- 201. Ruggieri, M.; Pica, C.; Lia, A.; Zimatore, G.B.; Modesto, M.; Di Liddo, E.; Specchio, L.M.; Livrea, P.; Trojano, M.; Avolio, C. (2008): Combination treatment of Glatiramer Acetate and Minocycline affects phenotype expression of blood monocyte-derived dendritic cells in Multiple Sclerosis patients. In: *J Neuroimmunol* 197 (2), S. 140–146.
- 202. Sadiq, S.A.; Puccio, L.M.; Brydon, E.W.A. (2010): JCV detection in multiple sclerosis patients treated with natalizumab. In: *J. Neurol.* 257 (6), S. 954–958.
- 203. Saivin, S.; Houin, G. (1988): Clinical pharmacokinetics of doxycycline and minocycline. In: *Clin Pharmacokinet* 15 (6), S. 355–366.
- 204. Sakaguchi, S.; Ono, M.; Setoguchi, R.; Yagi, H.; Hori, S.; Fehervari, Z.; Shimizu, J.; Takahashi, T.; Nomura, T. (2006): Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. In: *Immunol Rev* 212, S. 8–27.
- 205. Hoffmann, S., Vitzthum, K.; Mache, S.; Spallek, M.; Quarcoo, D.; Groneberg, D.A.; Uibel, S; (2009): Multiple Sklerose: Epidemiologie, Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie. In: *Prakt. Arb.med.* (17), S. 12–18.
- 206. Schmied, M.; Duda, P.W.; Krieger, J.I.; Trollmo, C.; Hafler, D.A. (2003): In vitro evidence that subcutaneous administration of glatiramer acetate induces hyporesponsive T cells in patients with multiple sclerosis. In: *Clin. Immunol.* 106 (3), S. 163–174.
- 207. Schön, E.; Eichmann, E.; Grunow, R.; Jahn, S.; Kiessig, S.T.; Volk, H.D.; Ansorge, S. (1986): Dipeptidyl peptidase IV in human T lymphocytes. An approach to the role of a membrane peptidase in the immune system. In: *Biomed. Biochim. Acta* 45 (11-12), S. 1523–1528.
- 208. Scott, L.J. (2011): Fingolimod. In: CNS Drugs 25 (8), S. 673-698.
- 209. Sedo, A.; Malík, R. (2001): Dipeptidyl peptidase IV-like molecules: homologous proteins or homologous activities? In: *Biochim. Biophys. Acta* 1550 (2), S. 107–116.
- 210. Semenza, G. (1986): Anchoring and biosynthesis of stalked brush border membrane proteins: glycosidases and peptidases of enterocytes and renal tubuli. In: *Annu. Rev. Cell Biol.* 2, S. 255–313.
- 211. Shipp, M.A.; Look, A.T. (1993): Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key! In: *Blood* 82 (4), S. 1052–1070.
- 212. Shrikant, P.; Benveniste, E.N. (1996): The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation. In: *J. Immunol.* 157 (5), S. 1819–1822.
- 213. Ansorge, S.; Bank, U.; Heimburg, A.; Julius, H.; Nordhoff, K.; Taeger, M.: Novel compounds for medical use as peptidase effectors. Angemeldet durch Imtm Gmbh. Veröffentlichungsnr: US 20120028995 A1. 29.01.2012.
- 214. Ansorge, S.; Bank, U.; Heimburg, A.; Julius, H.; Nordhoff, C.; Täger, M.: Dual alanylaminopeptidase and dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. Veröffentlichungsnr: EP 2418196 A1. 15.02.2012.
- 215. Ansorge, S.; Bank, U.; Nordhoff, K.; Täger, M.; Striggow, F.: Dual alanyl aminopeptidase and dipeptidyl peptidase IV inhibitors for functionally influencing different cells and for treating immunological, inflammatory, neuronal and other

- diseases. Veröffentlichungsnr: WO2005034940 A2. 21.04.2005.
- 216. Sklenar, I.; Spring, P.; Dettli, L. (1977): One-dose and multiple-dose kinetics of minocycline in patients with renal disease. In: *Agents Actions* 7 (3), S. 369–377.
- 217. Skulina, C.; Schmidt, S.; Dornmair, K.; Babbe, H.; Roers, A.; Rajewsky, K.; Wekerle, H.; Hohlfeld, R.; Goebels, N. (2004): Multiple sclerosis: Brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (8), S. 2428–2433.
- 218. Sobol, R.E.; Mick, R.; Royston, I.; Davey, F.R.; Ellison, R.R.; Newman, R.; Cuttner, J.; Griffin, J.D.; Collins, H.; Nelson, D.A. (1987): Clinical importance of myeloid antigen expression in adult acute lymphoblastic leukemia. In: *N Engl J Med* 316 (18), S. 1111–1117.
- 219. Spahn, T.W.; Issazadah, S.; Salvin, A.J.; Weiner, H.L. (1999): Decreased severity of myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide 33 35-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in mice with a disrupted TCR delta chain gene. In: *Eur J Immunol* 29 (12), S. 4060–4071.
- 220. Spath, S.; Becher, B. (2013): T-bet or not T-bet: Taking the last bow on the autoimmunity stage. In: *Eur J Immunol* 43 (11), S. 2810–2813.
- 221. Spath, S.; Becher, B. (2013): T-bet or not T-bet: Taking the last bow on the autoimmunity stage. In: *Eur J Immunol* 43 (11), S. 2810–2813.
- 222. Spits, H.; Lanier, L.L.; Phillips, J.H. (1995): Development of human T and natural killer cells. In: *Blood* 85 (10), S. 2654–2670.
- 223. Steinbrecher, A.; Reinhold, D.; Quigley, L.; Gado, A.; Tresser, N.; Izikson, L.; Born, I.; Faust, J.; Neubert, K.; Martin, R.; Ansorge, S.; Brocke, S. (2000): Dipeptidyl peptidase IV in inflammatory CNS disease. In: *Adv. Exp. Med. Biol.* 477, S. 145–153.
- 224. Steinbrecher, A.; Reinhold, D.; Quigley, L.; Gado, A.; Tresser, N.; Izikson, L.; Born, I.; Faust, J.; Neubert, K.; Martin, R.; Ansorge, S.; Brocke, S. (2001): Targeting dipeptidyl peptidase IV (CD26) suppresses autoimmune encephalomyelitis and up-regulates TGF-beta 1 secretion in vivo. In: *J. Immunol.* 166 (3), S. 2041–2048.
- 225. Stinissen, P.; Medaer, R.; Raus, J. (1998): Myelin reactive T cells in the autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis. In: *Multiple Sclerosis* 4 (3), S. 203–211.
- 226. Stirling, D.P.; Khodarahmi, K.; Liu, J.; McPhail, L.T.; McBride, C.B.; Steeves, J.D.; Ramer, M.S.; Tetzlaff, W. (2004): Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury. In: *J. Neurosci.* 24 (9), S. 2182–2190.
- 227. Stone, M.; Fortin, P.R.; Pacheco-Tena, C.; Inman, R.D. (2003): Should tetracycline treatment be used more extensively for rheumatoid arthritis? Metaanalysis demonstrates clinical benefit with reduction in disease activity. In: *J Rheumatol* 30 (10), S. 2112–2122.
- 228. Struyf, S.; Proost, P.; Schols, D.; Clercq, E. de; Opdenakker, G.; Lenaerts, J.P.; Detheux, M.; Parmentier, M.; Meester, I. de; Scharpé, S.; van Damme, J. (1999): CD26/dipeptidyl-peptidase IV down-regulates the eosinophil chemotactic potency, but not the anti-HIV activity of human eotaxin by affecting its interaction with CC chemokine receptor 3. In: *J. Immunol.* 162 (8), S. 4903–4909.
- 229. Sutton, C. (2006): A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. In: *Journal of Experimental Medicine* 203 (7), S. 1685–1691.
- 230. Suzuki, H.; Sugimura, Y.; Iwama, S.; Nobuaki, O.; Nagasaki, H.; Arima, H.; Sawada, M.; Oiso, Y. (2010): Minocycline Prevents Osmotic Demyelination Syndrome by Inhibiting the Activation of Microglia. In: *Journal of the American Society of Nephrology* 21 (12), S. 2090–2098.
- 231. Tanaka, S.; Murakami, T.; Horikawa, H.; Sugiura, M.; Kawashima, K.; Sugita, T. (1997): Suppression of arthritis by the inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. In: *Int. J. Immunopharmacol.* 19 (1), S. 15–24.
- 232. Tanaka, S.; Murakami, T.; Nonaka, N.; Ohnuki, T.; Yamada, M.; Sugita, T. (1998): Anti-arthritic effects of the novel dipeptidyl peptidase IV inhibitors TMC-2A and TSL-225. In: *Immunopharmacology* 40 (1), S. 21–26.

233. Tanaka, T.; Camerini, D.; Seed, B.; Torimoto, Y.; Dang, N.H.; Kameoka, J.; Dahlberg, H.N.; Schlossman, S.F.; Morimoto, C. (1992): Cloning and functional expression of the T cell activation antigen CD26. In: *J. Immunol.* 149 (2), S. 481–486.

- 234. Tesmer, L.A.; Lundy, S.K.; Sarkar, S.; Fox, D.A. (2008): Th17 cells in human disease. In: *Immunol Rev* 223 (1), S. 87–113.
- 235. Tikka, T.M.; Koistinaho, J.E. (2001): Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. In: *J. Immunol.* 166 (12), S. 7527–7533.
- 236. Tompkins, S.M.; Padilla, J.; Dal Canto, M.C.; Ting, J.P.-Y.; van Kaer, L.; Miller, S.D. (2002): De novo central nervous system processing of myelin antigen is required for the initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *J. Immunol.* 168 (8), S. 4173–4183.
- 237. Tournigand, C.; Généreau, T.; Prudent, M.; Diemert, M.C.; Herson, S.; Chosidow, O. (1999): Minocycline-induced clinical and biological lupus-like disease. In: *Lupus* 8 (9), S. 773–774.
- 238. Tran, E.H.; Kuziel, W.A.; Owens, T. (2000): Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice deficient in either the chemokine macrophage inflammatory protein-1alpha or its CCR5 receptor. In: *Eur J Immunol* 30 (5), S. 1410–1415
- 239. Trapp, B.D.; Peterson, J.; Ransohoff, R.M.; Rudick, R.; Mörk, S.; Bö, L. (1998): Axonal Transection in the Lesions of Multiple Sclerosis. In: *N Engl J Med* 338 (5), S. 278–285.
- 240. Tuohy, V.K.; Lu, Z.; Sobel, R.A.; Laursen, R.A.; Lees, M.B. (1989): Identification of an encephalitogenic determinant of myelin proteolipid protein for SJL mice. In: *J. Immunol.* 142 (5), S. 1523–1527.
- 241. Tzartos, J.S.; Friese, M.A.; Craner, M.J.; Palace, J.; Newcombe, J.; Esiri, M.M.; Fugger, L. (2008): Interleukin-17 Production in Central Nervous System-Infiltrating T Cells and Glial Cells Is Associated with Active Disease in Multiple Sclerosis. In: *The American Journal of Pathology* 172 (1), S. 146–155.
- 242. Vanhoof, G.; Goossens, F.; Meester, I. de; Hendriks, D.; Scharpé, S. (1995): Proline motifs in peptides and their biological processing. In: *FASEB J.* 9 (9), S. 736–744.
- 243. Voo, K.S.; Wang, Y.-H.; Santori, F.R.; Boggiano, C.; Arima, K.; Bover, L.; Hanabuchi, S.; Khalili, J.; Marinova, E.; Zheng, B.; Littman, D.R.; Liu, Y.-J. (2009): Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (12), S. 4793–4798.
- 244. Vora, K.A.; Porter, G.; Peng, R.; Cui, Y.; Pryor, K.; Eiermann, G.; Zaller, D.M. (2009): Genetic ablation or pharmacological blockade of dipeptidyl peptidase IV does not impact T cell-dependent immune responses. In: *BMC Immunol* 10 (1), S. 19.
- 245. Vos, A.F. de; van Meurs, M.; Brok, H.P.; Boven, L.A.; Hintzen, R.Q.; van der Valk, P.; Ravid, R.; Rensing, S.; Boon, L.; Hart, B.A. 't; Laman, J.D. (2002): Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. In: *J. Immunol.* 169 (10), S. 5415–5423.
- 246. Wang, J.; Wei, Q.; Wang, C.-Y.; Hill, W.D.; Hess, D.C.; Dong, Z. (2004): Minocycline up-regulates Bcl-2 and protects against cell death in mitochondria. In: *J. Biol. Chem.* 279 (19), S. 19948–19954.
- 247. Whitham, R.H.; Bourdette, D.N.; Hashim, G.A.; Herndon, R.M.; Ilg, R.C.; Vandenbark, A.A.; Offner, H. (1991): Lymphocytes from SJL/J mice immunized with spinal cord respond selectively to a peptide of proteolipid protein and transfer relapsing demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *J. Immunol.* 146 (1), S. 101–107.
- 248. Wilkins, A.; Nikodemova, M.; Compston, A.; Duncan, I.A. (2004): Minocycline attenuates nitric oxide-mediated neuronal and axonal destruction in vitro. In: *NGB* 1 (03).
- 249. Wucherpfennig, K.W.; Strominger, J.L. (1995): Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: Viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. In: *Cell* 80 (5), S. 695–705.
- 250. Xu, L.; Kitani, A.; Fuss, I.; Strober, W. (2007): Cutting edge: regulatory T cells induce

CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. In: *J. Immunol.* 178 (11), S. 6725–6729.

- 251. Xue, M.; Mikliaeva, E.I.; Casha, S.; Zygun, D.; Demchuk, A.; Yong, V.W. (2010): Improving Outcomes of Neuroprotection by Minocycline. In: *The American Journal of Pathology* 176 (3), S. 1193–1202.
- 252. Yang, J.-S.; Xu, L.-Y.; Xiao, B.-G.; Hedlund, G.; Link, H. (2004): Laquinimod (ABR-215062) suppresses the development of experimental autoimmune encephalomyelitis, modulates the Th1/Th2 balance and induces the Th3 cytokine TGF-beta in Lewis rats. In: *J Neuroimmunol* 156 (1-2), S. 3–9.
- 253. Yang, X.O.; Nurieva, R.; Martinez, G.J.; Kang, H.S.; Chung, Y.; Pappu, B.P.; Shah, B.; Chang, S.H.; Schluns, K.S.; Watowich, S.S.; Feng, X.-H.; Jetten, A.M.; Dong, C. (2008): Molecular Antagonism and Plasticity of Regulatory and Inflammatory T Cell Programs. In: *Immunity* 29 (1), S. 44–56.
- 254. Yang, Y.; Weiner, J.; Liu, Y.; Smith, A.J.; Huss, D.J.; Winger, R.; Peng, H.; Cravens, P.D.; Racke, M.K.; Lovett-Racke, A.E. (2009): T-bet is essential for encephalitogenicity of both Th1 and Th17 cells. In: *Journal of Experimental Medicine* 206 (7), S. 1549–1564.
- 255. Yaron, A.; Naider, F. (1993): Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. In: *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28 (1), S. 31–81.
- 256. Yong, T.; Meininger, G.A.; Linthicum, D.S. (1993): Enhancement of histamine-induced vascular leakage by pertussis toxin in SJL/J mice but not BALB/c mice. In: *J Neuroimmunol* 45 (1-2), S. 47–52.
- 257. Yong, V.W.; Wells, J.; Giuliani, F.; Casha, S.; Power, C.; Metz, L.M. (2004): The promise of minocycline in neurology. In: *Lancet Neurol* 3 (12), S. 744–751.
- 258. Yrjanheikki, J.; Keinanen, R.; Pellikka, M.; Hokfelt, T.; Koistinaho, J. (1998): Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (26), S. 15769–15774.
- 259. Yrjanheikki, J.; Keinanen, R.; Pellikka, M.; Hokfelt, T.; Koistinaho, J. (1998): Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (26), S. 15769–15774.
- 260. Yrjanheikki, J.; Tikka, T.; Keinanen, R.; Goldsteins, G.; Chan, P.H.; Koistinaho, J. (1999): A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (23), S. 13496–13500.
- 261. Zabad, R.K.; Metz, L.M.; Todoruk, T.R.; Zhang, Y.; Mitchell, J.R.; Yeung, M.; Patry, D.G.; Bell, R.B.; Yong, V.W. (2007): The clinical response to minocycline in multiple sclerosis is accompanied by beneficial immune changes: a pilot study. In: *Mult. Scler.* 13 (4), S. 517–526.
- 262. Zhai, W.; Jungraithmayr, W.; Meester, I. de; Inci, I.; Augustyns, K.; Arni, S.; Hillinger, S.; Scharpé, S.; Weder, W.; Korom, S. (2009): Primary Graft Dysfunction in Lung Transplantation: The Role of CD26/Dipeptidylpeptidase IV and Vasoactive Intestinal Peptide. In: *Transplantation* 87 (8), S. 1140–1146.
- 263. Zhang, Y.; Metz, L.; Yong, V.; Mitchell, J. (2010): 3T deep gray matter T2 hypointensity correlates with disability over time in stable relapsing–remitting multiple sclerosis: A 3-year pilot study. In: *J. Neurol. Sci.* 297 (1-2), S. 76–81.
- 264. Zhang, Y.; Metz, L.M.; Yong, V.W.; Bell, R.B.; Yeung, M.; Patry, D.G.; Mitchell, J.R. (2008): Pilot study of minocycline in relapsing-remitting multiple sclerosis. In: *Can J Neurol Sci* 35 (2), S. 185–191.
- 265. Zheng, S.G.; Wang, J.; Horwitz, D.A. (2008): Cutting edge: Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF-beta are resistant to Th17 conversion by IL-6. In: *J. Immunol.* 180 (11), S. 7112–7116.
- 266. Zhu, S.; Stavrovskaya, I.G.; Drozda, M.; Kim, B.Y.S.; Ona, V.; Li, M.; Sarang, S.; Liu, A.S.; Hartley, D.M.; Du Wu, C.; Gullans, S.; Ferrante, R.J.; Przedborski, S.; Kristal, B.S.; Friedlander, R.M. (2002): Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. In: *Nature* 417 (6884), S. 74–78.

8. Anhang

8.1. Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. D. Reinhold herzlich für die Überlassung des Promontionsthemas und ganz besonders für die intensive Unterstützung während der experimentellen Phase der Arbeit sowie die Begleitung bis zum Abschluss dieser Dissertation. Stetige Motivation, Ratschläge und Hilfe zu jedem Zeitpunkt der Arbeit und die ausgesprochen menschliche Betreuung sind keine Selbstverständlichkeit.

Herrn Prof. Dr. B. Schraven danke ich für die Möglichkeit zur Promotion an seinem Institut. Bei Herrn Dipl.-Ing. A. Goihl bedanke ich mich sehr für die methodische Untersützung und unkomplizierte Hlilfe im Rahmen der experimentellen Arbeiten im Labor. Die freundliche fachliche Begleitung und zahlreichen methodischen Ratschläge waren für die Arbeit unverzichtbar.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. P. Kreutzmann für die Bereitstellung der Substanzen Minocyclin und Pentaacetylcyclin.

Für ihre hilfreiche technische Assistenz bei der Erstellung histopathologischer Präparate bedanke ich mich sehr herzlich bei Frau M. Lotzing und PD Dr. A. Thielitz. Außerdem gilt mein Dank allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare und Klinische Immunologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg für die freundliche Zusammenarbeit.

Mein abschließender Dank gilt meiner Familie, deren zeitlichen Entbehrungen die Arbeit in dieser Form erst möglich gemacht haben.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

8.2. Liste der Veröffentlichungen

Originalarbeit

Reinhold, D.; Bank, U.; Entz, D.; Goihl, A.; Stoye, D.; Wrenger, S. et al. (2011): PETIR-001, a dual inhibitor of dipeptidyl peptidase IV (DP IV) and aminopeptidase N (APN), ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice. In: Biol. Chem 392 (3), S. 233-237.

Patent

Kreutzmann, P.; Lorenz, P.; Reinhold, D.; Goihl, A.; Entz, D.; Franz, C.; Schraven, B.; Fischer, K.: inventors; Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, assignee. Use of A-ring aromatic acetyl minocycline and pharmaceutical preparations derived from same for treatment and prevention of inflammation, autoimmune disorders and rejection of transplants. European Patent EP2659887 A1. 2012 May 3.

8.3. Erklärung

Ich erkläre, dass ich die an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität

Magdeburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Untersuchungen zur Wirkung von Inhibitoren der enzymatischen Aktivitäten der

Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) und der Aminopeptidase N (APN) sowie der Wirkung der

Tetracyclinderivate Minocyclin und Pentaacetylcyclin auf Immunzellen in vitro und im

Tiermodell der Multiplen Sklerose, der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis

in vivo

im Institut für Molekulare und Klinische Immunologie mit Unterstützung durch Prof. Dr. D.

Reinhold ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine

anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe die Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion

eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner

Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 17.07.2017

Dominik Entz