

**Die Rolle des IKK/NF- κ B Signalweges bei der Myelinisierung,
De- und Remyelinisierung des zentralen Nervensystems**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

JENNI RAASCH

aus München

Göttingen 2008

D7

Referent: Prof. Dr. T. Pieler

Korreferent: Prof. Dr. W. Engel

Tag der mündlichen Prüfung:

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Marco Prinz, der mir die Möglichkeit zur Bearbeitung dieses Dissertationsthemas gegeben, und mich dabei fachlich und wissenschaftlich wertvoll unterstützt hat.

Für das Interesse am Fortgang meiner Arbeit und für wissenschaftliche Anregungen danke ich Herrn Prof. Dr. W. Brück.

Bei Herrn Prof. Dr. T. Pieler bedanke ich mich für die bereitwillige Betreuung dieser Arbeit seitens der Biologischen Fakultät. Herrn Prof. Dr. W. Engel danke ich für die Bereitschaft, das Korreferat für diese Arbeit zu übernehmen.

Prof. M. Pasparakis und Dr. Geert van Loo danke ich für ihre wissenschaftliche Unterstützung und ihre Gastfreundschaft während meines Aufenthaltes am EMBL in Monterotondo.

Für eine tolle Zusammenarbeit und stete Hilfsbereitschaft danke ich meinen Kollegen aus der Prinzen-Gruppe, Karina, Angela, Dr. Mildner und Dr. Schmidt. Bei Euch und all den anderen Doktoranden der Neuropathologie, besonders Angelika, Tommy, Christiane, Jörg, Wiebke, Tobi, Enrique und Amke möchte ich mich für die angenehme Atmosphäre während, zwischen und nach der Arbeit, sowie für wissenschaftliche und unwissenschaftliche ;) Diskussion bedanken.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Neuropathologie danke ich für vielfältige wissenschaftliche und technische Hilfestellung. Insbesondere möchte ich hier Dr. Doron Merkler, Olga Kowatsch, Doris Bode, Brigitte Maruschak und Dorothea Hause-Reitner erwähnen.

Mein spezieller Dank geht an Hendrik für seine Unterstützung und Geduld, sowie an meine Eltern, ohne die ich soweit nicht gekommen wäre.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 ABSTRACT	2
3 EINLEITUNG	3
3.1 Multiple Sklerose.....	3
3.2 Die Multiple Sklerose im Tiermodell.....	5
3.3 Der NF-κB Signalweg.....	6
3.3.1 Regulation des IKK/NF- κ B Signalweges.....	8
3.3.2 Aktivierung des IKK/NF- κ B Signalweges	9
3.4 Biologische Funktionen des IKK/NF-κB Signalweges.....	11
3.5 Funktionen des IKK/NF-κB Signalweges im Zentralnervensystem.....	13
4 ZIELSETZUNG	15
5 MATERIAL UND METHODEN	16
5.1 Material.....	16
5.1.1 Chemikalien	16
5.1.2 Zellkulturmedien und –bestandteile	17
5.1.3 Nukleotide und Primer.....	17
5.1.4 Pharmaka und Narkotika.....	18
5.1.5 Antikörper.....	18
5.1.6 Zytokine.....	19
5.1.7 Enzyme	19
5.2 Zellkultur	20
5.2.1 Gewinnung primärer Gehirnzellen	20
5.2.1.1 <i>Mikrogliazellen</i>	20
5.2.1.2 <i>Oligodendrozyten</i>	21
5.2.1.3 <i>Astrozyten</i>	22
5.2.2 Stimulation der Zellen	22

5.2.3	Immunzytochemie	22
5.3	Molekularbiologische Methoden	24
5.3.1	Genotypisierung durch PCR	24
5.3.1.1	<i>Isolation genomischer DNA.....</i>	<i>24</i>
5.3.1.2	<i>Polymerase-Kettenreaktion.....</i>	<i>24</i>
5.3.1.3	<i>Gelelektrophorese.....</i>	<i>26</i>
5.3.2	RNA Quantifizierung durch RTQ-PCR	26
5.3.2.1	<i>RNA-Isolation.....</i>	<i>26</i>
5.3.2.2	<i>Reverse Transkription.....</i>	<i>27</i>
5.3.2.3	<i>Quantitative Realtime-PCR.....</i>	<i>28</i>
5.3.3	Expressionsbestimmung durch Western Blot	30
5.3.3.1	<i>Proteinisolation.....</i>	<i>30</i>
5.3.3.2	<i>Western Blot.....</i>	<i>31</i>
5.4	Tierexperimentelle Methoden	33
5.4.1	Toxische Demyelinisierung durch Cuprizon.....	33
5.4.2	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis.....	34
5.4.3	Lysolecithin-induzierte Demyelinisierung	35
5.4.4	Perfusion und Präparation der Mäuse	36
5.5	Histologie.....	37
5.5.1	Paraffineinbettung	37
5.5.2	Immunhistochemische Färbungen	37
5.5.3	Immunfluoreszenzfärbung.....	38
5.5.4	XGal-Färbung.....	38
5.5.5	Auswertung der Histologie	39
5.5.5.1	<i>Auswertung der EAE-Läsionen.....</i>	<i>39</i>
5.5.5.2	<i>Klassifizierung der Cuprizon-induzierten Demyelinisierung.....</i>	<i>39</i>
5.6	Elektronenmikroskopie	40
5.6.1	Aralditeinbettung	40
5.6.2	Herstellung von Dünnschnittpräparaten.....	40
5.6.3	Elektronenmikroskopische Auswertung	41
6	<u>ERGEBNISSE</u>.....	42
6.1	Charakterisierung der zellspezifischen IKK2-Deletion.....	42
6.1.1	Deletion von IKK2 in ZNS-Zellen	42
6.1.2	Deletion von IKK2 in Oligodendrozyten	44
6.2	Die Rolle von IKK2 bei der Myelinisierung des ZNS.....	46

6.2.1	Unveränderte Entwicklung IKK2-defizienter Oligodendrozyten <i>in vitro</i>	46
6.2.2	Normale physiologische Myelinisierung des ZNS in Abwesenheit von IKK2 in Gehirnzellen	47
6.3	Die Bedeutung von IKK2 im ZNS für die De- und Remyelinisierung	49
6.3.1	Reduzierte toxische Demyelinisierung in Abwesenheit von IKK2 im ZNS	49
6.3.1.1	<i>Geringerer Myelinschaden während der akuten Phase der toxischen Demyelinisierung</i>	49
6.3.1.2	<i>Myelinprotektive Funktion von IKK2 während der chronischen Demyelinisierungsphase</i>	51
6.3.1.3	<i>Inhibierte Zytokininduktion während toxischer Demyelinisierung in Abwesenheit von IKK2 im ZNS</i>	53
6.3.2	Normale Remyelinisierung in Abwesenheit von IKK2 im ZNS	54
6.4	De- und Remyelinisierung in Abwesenheit von IKK2 in Oligodendrozyten	56
6.4.1	Unveränderte toxische Demyelinisierung in Abwesenheit von IKK2 in Oligodendrozyten	56
6.4.2	Normale Remyelinisierung in Abwesenheit oligodendrozytärer IKK2	57
6.4.3	Unveränderte autoimmune Demyelinisierung in Abwesenheit von IKK2 in Oligodendrozyten	60
6.5	Verminderte Zytokinexpression in IKK2-deletierten primären Astrozyten	62
<u>7</u>	<u>DISKUSSION</u>	<u>65</u>
7.1	Myelinisierung im peripheren und zentralen Nervensystem	65
7.2	Funktion des IKK/NF- κ B Signalweges bei der toxischen Demyelinisierung	67
7.3	IKK2 und Mechanismen der Remyelinisierung im ZNS.....	72
7.4	Manipulationsmöglichkeiten im IKK/NF- κ B Signalweg	74
<u>8</u>	<u>LITERATUR</u>	<u>77</u>

Abkürzungsverzeichnis

Bcl-10	B-Zell Lymphom 10 (<i>B-cell lymphoma 10</i>)
BCR	B-Zell Rezeptor (<i>B-cell receptor</i>)
BLNK	B-Zell Linker Protein
β-ME	β-Mercaptoethanol
Btk	Bruton's Tyrosinkinase
CARMA1	Caspase-Rekrutierungs-Domäne enth. Membran-assoziiertes Guanylatkinase Protein 1
CpG	Cytosin-phosphitidyl-guanosin DNA
CNP	2'3'-zyklische-Nukleotid-3'-Phosphohydrolase
Cre	Rekombinase (<i>'causes recombination'</i>)
dMBP	degeneriertes Myelin-basisches Protein
DMEM	Dulbecco Medium (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
ECSIT	evolutionär konserviertes Signalmolekül in Toll Signalwegen (<i>evolutionary conserved signaling intermediate in toll pathways</i>)
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoreszen-5-Isothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GF	Wachstumsfaktor (<i>growth factor</i>)
GFAP	gliales fibrilläres saures Protein (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HBSS	Salzlösung nach Hanks (<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>)
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
IFN	Interferon
IκB	κB Inhibitor
IKK	IκB Kinase
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid (NO) Synthase
IRAK	IL-1 Rezeptor assoziierte Kinase
JNK	Jun N-terminale Kinase
Lck	Lymphozyten-spezifische Tyrosinkinase
loxP	<i>locus of crossingover of P1 phage</i>

LPC	Lysophosphatidylcholin
LPS	Lipopolysaccharid
MAC-3	<i>membrane attack protein</i>
MALT1	Mucosa-assoziiertes Lymphom Translokationsgen 1
MBP	Myelin-basisches Protein
MEKK3	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Kinase Kinase 3
MIP-1 α	Makrophagen inflammatorisches Protein
MMP	Matrix Metalloproteinase
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
MyD88	Myeloider Differenzierungsfaktor 88
NEMO	NF- κ B essentieller Modulator
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
NG2	neuronal-gliales Antigen 2
NGF	Neuronaler Wachstumsfaktor (<i>neural growth factor</i>)
NIK	NF- κ B induzierende Kinase
OPC	Oligodendrozyten-Vorläuferzelle (<i>oligodendrocyte precursor cell</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLL	poly-(L)-Lysin
PLP	Proteolipid-Protein
PNS	Peripheres Nervensystem
Rantes	Reguliert durch Aktivierung, durch normale T-Zellen exprimiert und sekretiert
RHD	Rel Homologie Domäne
RIP1	Rezeptor interagierendes Protein 1
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RTQ-PCR	quantitative Realtime-PCR
TAB1/ 2	Tak1 bindendes Protein
Tak1	TGF β aktivierte Kinase 1

TCR	T-Zell Rezeptor (<i>T-cell receptor</i>)
TGF β	Gewebe Wachstumsfaktor β (<i>tissue growth factor</i>)
TIR	Toll Interleukin-1 Rezeptor
TIRAP	TIR Domäne enthaltendes Adaptor Protein
TLR	Toll Rezeptor (<i>toll like receptor</i>)
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	TNF Rezeptor
TRADD	TNFR-assoziierte Todesdomäne (<i>TNFR associated death domain</i>)
TRAF	TNFR-assoziiierter Faktor
TRIF	TLR-assoziiierter Interferon-induzierender Faktor
VCAM-1	Vaskuläres Zell-Adhäsionsmolekül 1
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Zusammenfassung

In der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit ging es darum, die funktionelle Rolle des klassischen NF- κ B Signalweges bei der Entwicklung (Myelinisierung), Schädigung (Demyelinisierung) und Regeneration (Remyelinisierung) des Myelins im zentralen Nervensystem (ZNS) aufzuklären. De- und Remyelinisierung sind Prozesse, wie sie bei Erkrankungen des Myelins, z.B. bei der Multiplen Sklerose (MS), auftreten.

Die MS ist eine autoimmune Demyelinisierungserkrankung mit heterogenem klinischen, pathologischen und immunologischen Phänotyp. Die meisten Erkenntnisse über die Entstehung der MS beruhen auf dem T-Zell-vermittelten Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE). Die Beteiligung der gehirneigenen Immunzellen (Astrozyten und Mikroglia) sowie der myelinbildenden Oligodendrozyten an der Entstehung der MS ist dagegen noch kaum untersucht.

Der nukleäre Faktor κ B (NF- κ B) ist ein wichtiger Mediator des Immunsystems. Daneben ist er u.a. an zahlreichen Prozessen im ZNS beteiligt, z.B. an der neuronalen Plastizität, dem Überleben von Neuronen und Gliazellen, sowie an autoimmunen Entzündungen des Gehirns. Im peripheren Nervensystem (PNS) ist der Signalweg essentiell für die Myelinbildung durch Schwannzellen. Die Funktion von NF- κ B bei der Myelinisierung des ZNS war bisher ungeklärt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein pathogenetischer Einfluss des klassischen NF- κ B Signalweges via I κ B Kinase 2 (IKK2) auf die Cuprizin-induzierte Oligodendrozytenschädigung identifiziert werden: Die Inhibition des NF- κ B Signalweges durch eine ZNS-spezifische IKK2-Deletion wirkt sich in diesem Modell protektiv auf Oligodendrozyten aus. Bemerkenswerterweise hat eine Oligodendrozyten-spezifische Inhibition der NF- κ B Aktivierung keine Auswirkungen auf die toxische Demyelinisierung. Das bedeutet, dass 1.) in diesen Zellen IKK2 keine pro- oder antiapoptotische Wirkung vermittelt, und 2.) die myelinerhaltende Wirkung der IKK2-Deletion über andere neuroektodermale Zellen vermittelt wird. Bei der Myelinisierung während der Entwicklung und bei der Remyelinisierung nach einem toxisch induzierten Myelinschaden wurde eine essentielle Rolle des klassischen NF- κ B Signalweges in Gehirnzellen ausgeschlossen.

Der Signalweg könnte sich daher als ein vielversprechendes neues Angriffsziel für eine Therapieentwicklung bei der MS und anderen Demyelinisierungserkrankungen des ZNS erweisen.

2 Abstract

The present thesis aimed to elucidate the function of the classical NF- κ B pathway in development (myelination), damage (demyelination) and regeneration (remyelination) of myelin sheaths in the central nervous system (CNS). De- and remyelination are processes as they occur during multiple sclerosis (MS).

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune demyelinating disease with heterogeneous clinical, pathological and immunological phenotype. Most current knowledge about the origin and development of MS relies on the T-cell mediated experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). In contrast, the involvement of the innate immune cells (microglia and astrocytes) and myelin forming glia (oligodendrocytes) of the central nervous system (CNS) in the development of MS is less determined.

The nuclear factor κ B (NF- κ B) is an important mediator of the immune system. In addition, it plays a role in several mechanisms in the CNS such as neural plasticity, survival of neurons and glia and not least autoimmune brain inflammation. Moreover, the pathway is essential for myelin formation in the peripheral nervous system (PNS). Whether NF- κ B activation is also necessary for the myelination of the CNS, was as yet unknown.

The present thesis revealed a pathogenetic influence of the classical NF- κ B pathway via I κ B kinase 2 (IKK2) on cuprizone induced oligodendrocyte degradation: CNS-specific deletion of IKK2 resulting in inhibition of the NF- κ B pathway is protective for oligodendrocytes. Remarkably, oligodendrocytic IKK2 deletion has no impact on toxic demyelination, what means that 1.) IKK2 does not mediate a pro- or antiapoptotic effect in this celltype, and 2.) the protective effect of IKK2 deletion is mediated by other neuroectodermal cells. For myelination during development and after toxic myelin damage an essential function of the classical NF- κ B pathway could be excluded.

This pathway thus could prove to be a promising new therapeutic target in MS and other demyelination diseases of the CNS.

3 Einleitung

3.1 Multiple Sklerose

Eine schnelle Reizweiterleitung in Nervenzellen ist die Grundvoraussetzung für die funktionelle Integration des vertebralen Nervensystems. Myelinbildende Gliazellen, Oligodendrozyten im zentralen Nervensystem (ZNS) und Schwann Zellen im peripheren Nervensystem (PNS), bilden durch Umwickeln der Axone eine Isolationsschicht, welche regelmäßig durch sogenannte Ranvier'sche Schnürringe unterbrochen ist. Nur an diesen Stellen kann eine Membran-Depolarisation stattfinden, woraus eine schnelle saltatorische Reizweiterleitung resultiert. Die Myelinschicht gewährleistet überdies einen schnellen axonalen Transport und wirkt neuroprotektiv (Sherman und Brophy 2005). Ein krankhafter Verlust des Myelins im ZNS oder PNS durch Entmarkung (Demyelinisierung) bringt meist auch eine axonale Degeneration mit sich und äußert sich in schwerwiegenden neurologischen Symptomen.

Die Multiple Sklerose (MS) ist bei Kaukasiern die häufigste entzündliche Entmarkungserkrankung. Sie beruht auf einer autoimmunen Zerstörung des Myelins im ZNS. In Deutschland sind rund 0,15% der Bevölkerung von dieser Krankheit betroffen, die typischerweise zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr auftritt und Frauen etwa doppelt so häufig wie Männer befällt (Hein und Hopfenmuller 2000). Die MS-typischen Läsionen ('Plaques') sind durch eine Schädigung von myelinisierenden Oligodendrozyten in der weißen Substanz des ZNS gekennzeichnet, seltener treten Plaques in der grauen Substanz auf. In den betroffenen Bereichen findet man eine unterschiedlich stark ausgeprägte axonale Degeneration und eine Gliose. Die Einwanderung von Leukozyten in die Plaques wird durch eine geschädigte Blut-Hirn-Schranke ermöglicht, welche bei MS-Patienten das Immunprivileg des ZNS aufhebt (Frohman *et al.*, 2006). Die MS Plaques weisen eine heterogene Pathologie auf, was auf vielfältige pathogene Ursachen der Krankheit schließen lässt (Lucchinetti *et al.*, 2000; Lucchinetti *et al.*, 1996).

Je nach Lokalisation der Plaques im Gehirn und Ausprägung der neuronalen Schädigung können die neurologischen Symptome der MS vielfältig und weitreichend sein. Häufig treten z.B. Sehstörungen, Empfindungsstörungen, Paresen der Extremitäten, spastische Tonuserhöhungen der Muskulatur, Sprachstörungen oder

psychische Auffälligkeiten auf. Je nach Art und Häufigkeit des Auftretens der Symptome werden vier Verlaufsformen der MS unterschieden: ein Verlauf in Schüben (*relapsing-remitting* MS), ein primär chronisch-progredienter Verlauf (*primary-progressive* MS), ein sekundär chronisch-progredienter Verlauf nach anfänglich schubförmiger Phase (*secondary-progressive* MS) und ein progredient schubförmiger Verlauf (*progressive-relapsing* MS) (Lublin und Reingold 1996).

Als Ursachen für die MS werden unter anderem Umweltfaktoren wie Ernährung, Luftverschmutzung durch Industrialisierung und Infektionen diskutiert (Sotgiu *et al.*, 2004). Zudem liegt eine genetische Prädisposition vor, wie das erhöhte Erkrankungsrisiko bei Blutsverwandten von MS Patienten zeigt (Dessa *et al.*, 2001; Willer *et al.*, 2003). So ist schon seit langem die genetische Assoziation der MS mit der humanen Leukozyten-Antigen (HLA) Region bekannt (Jersild *et al.*, 1972). Dennoch konnte bisher nur ein MS-spezifisches HLA Antigen gesichert identifiziert werden (Rubio *et al.*, 2007). Außerhalb der HLA Region wurde kürzlich IL7R, welches die Interleukin (IL)-7-Rezeptor-Alpha-Kette codiert, als Risikogen für MS entdeckt (Gregory *et al.*, 2007; Lundmark *et al.*, 2007).

Die Pathogenese der MS ist ebenfalls nicht vollständig geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass der Auslöser der Krankheit eine Aktivierung von naiven CD4⁺ T-Zellen in der Peripherie durch aus dem ZNS stammende Antigene oder durch kreuzreaktive Fremdanigene ist (de Vos *et al.*, 2002; Talbot *et al.*, 1996; Wucherpfennig und Strominger 1995). Unter pathologischen Bedingungen können derart aktivierte T-Zellen in das ZNS gelangen (Hickey 1991). Hier erkennen peripher aktivierte T-Zellen ihr spezifisches (Auto-)Antigen, welches von lokalen glialen Antigen präsentierenden Zellen (APC) oder dendritischen Zellen über MHCII Moleküle präsentiert wird (Bo *et al.*, 1994; Karman *et al.*, 2004). Aktivierte myelinspezifische CD4⁺ Th1 und Th17 Effektorzellen rekrutieren durch Freisetzung proinflammatorischer Cytokine, wie Interferon (IFN) γ und Tumor Nekrose Faktor (TNF), und Chemokine unspezifische inflammatorische Zellen sowie spezifische Antikörper-bildende B-Zellen (Merrill 1992; Nikbin *et al.*, 2007; Teleshova *et al.*, 2002; Tzartos *et al.*, 2008). Im Verlauf der MS werden nicht nur CD4⁺ sondern auch zytotoxische CD8⁺ T-Zellen aktiviert, welche über MHCI präsentierte Myelinantigene erkennen und die Oligodendrozyten direkt schädigen (Crawford *et al.*, 2004; Zang *et al.*, 2004). Die verursachte Myelinzerstörung führt zur Freisetzung neuer potentieller Autoantigene. Aufgrund der klinischen und pathologischen Heterogenität ist jedoch davon auszugehen, dass neben der T-Zell vermittelten Autoimmunität weitere Prozesse

unabhängig von einer peripheren Immunantwort die Entstehung von MS induzieren können (Lucchinetti *et al.*, 2000).

3.2 Die Multiple Sklerose im Tiermodell

Die Multiple Sklerose ist eine Krankheit mit einem heterogenen klinischen, pathologischen und immunologischen Phänotyp. Es existieren verschiedene Mausmodelle, die zum Verständnis bestimmter Teilaspekte dieser Krankheit beitragen können.

Das wichtigste immunologische Tiermodell für die MS ist die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE). Sie beruht auf der aktiven Immunisierung von Mäusen mit ZNS Gewebe, Myelin oder Myelinproteinen wie MBP (Myelin-basisches Protein), MOG (Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein) oder PLP (Proteolipid-Protein) bzw. synthetischen Peptiden. Jedes dieser Antigene ist geeignet eine primär T-Zell medierte adaptive Immunantwort, resultierend in einer Inflammation und Demyelinisierung im ZNS, hervorzurufen, wobei als einziges Myelin-Autoantigen MOG zusätzlich eine humorale Immunantwort verursacht (Gold *et al.*, 2006). Durch die EAE konnten einige wichtige Erkenntnisse zur Entstehung der T-Zell vermittelten autoimmunen Inflammation bei der Multiplen Sklerose gewonnen werden (Langrish *et al.*, 2005).

Eine Möglichkeit, spezifisch Demyelinisierungsprozesse, unabhängig von einer primären peripheren Immunantwort, zu untersuchen, bieten toxische Demyelinisierungsmodelle. Diese haben zudem den Vorteil, einen lokal begrenzten und reversiblen Gewebeschaden zu verursachen, wodurch sie die experimentelle Untersuchung einer spontanen Remyelinisierung ermöglichen. Der Prozess der Remyelinisierung beruht auf der Bildung einer neuen Myelinschicht um unbeschädigte Axone durch aus Oligodendrozytenvorläuferzellen (*oligodendrocyte precursor cells*, OPCs) ausdifferenzierte Oligodendrozyten und ist in unterschiedlichem Maße auch in MS-Läsionen zu finden. Der Kupfer-Chelator Cuprizin, welcher Mäusen oral im Futter verabreicht werden kann, verursacht eine massive Demyelinisierung im Gehirn, welche im Corpus Callosum besonders ausgeprägt ist. Ob die demyelinisierende Wirkung von Cuprizin auf einen reduzierten Kupferhaushalt in den betroffenen Zellen zurückzuführen ist, ist umstritten. Primär bewirkt Cuprizin die Apoptose von Oligodendrozyten und dadurch eine Degeneration des Myelins. Die Demyelinisierung

ist begleitet von einer starken Gliose durch proliferierende Astrozyten und Mikroglia. Nach Absetzen der Cuprizonverfütterung kommt es durch Proliferation und Ausreifung von OPCs zu einer spontanen, nach wenigen Wochen vollständigen, Remyelinisierung der Axone (Matsushima und Morell 2001).

Ein weiteres toxisches Modell zum Studium der De- und Remyelinisierung im ZNS ist die lokale stereotaktische Injektion von Lysolecithin (Lysophosphatidylcholin, LPC) in das murine Rückenmark. LPC verursacht bereits wenige Stunden nach Injektion eine lokale Demyelinisierungsläsion. Innerhalb weniger Tage kommt es zu einer Aktivierung von T-Zellen und neutrophilen Granulozyten und konsekutiv zur Rekrutierung und Aktivierung von Mikroglia und Makrophagen, welche das abgebaute Myelin phagozytieren (Ousman und David 2000). Wenige Tage nach der Lysolecithin-Injektion beginnt eine spontane Remyelinisierung, welche auf der Proliferation und Reifung von OPCs beruht und schon zwei Wochen nach Injektion größtenteils abgeschlossen ist (Larsen *et al.*, 2003).

3.3 Der NF- κ B Signalweg

Unter den bekannten krankheitsassoziierten Signalwegen und Transkriptionsfaktoren nimmt der klassische NF- κ B (Nukleärer Faktor κ B) Signalweg aufgrund seiner schnellen Aktivierung und seiner einzigartigen Regulation und Variabilität eine Sonderstellung ein. NF- κ B wurde zuerst 1986 von Sen und Baltimore als für die Immunglobulinsynthese essentieller Transkriptionsfaktor in Lymphozyten beschrieben. Inzwischen weiß man, dass der Faktor in Säugetieren ubiquitär exprimiert wird: der klassische NF- κ B Signalweg spielt eine bedeutende Rolle im Immunsystem und bei der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose (siehe 3.4), übt aber auch wichtige Funktionen im ZNS aus (siehe 3.5). In MS-Läsionen wurde eine Aktivierung des Signalweges in unterschiedlichen Zelltypen beobachtet, welche Rolle dieser hier spielt ist jedoch unbekannt (Bonetti *et al.*, 1999).

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B stellt ein Dimer aus Proteinen der NF- κ B/Rel Familie dar, welche fünf strukturell verwandte Mitglieder enthält: NF- κ B1 (p50 und sein Vorläufer p105), NF- κ B2 (p52 und sein Vorläufer p100), c-Rel, RelA (p65) und RelB. Diese Proteine haben eine hochkonservierte Rel Homologiedomäne (RHD), welche für die Dimerisierung sowie die Bindung des Dimers an die DNA bzw. an den Inhibitor I κ B

verantwortlich ist (Ghosh *et al.*, 1998; Siebenlist *et al.*, 1994). Am häufigsten tritt NF- κ B als p50:p65 Heterodimer auf.

Der entscheidende Schritt in der Aktivierung des klassischen (kanonischen) NF- κ B Signalweges (Abb. 3.1) ist die Degradation des Inhibitors I κ B, welche die Translokation des NF- κ B Dimers in den Zellkern ermöglicht. Die Degradation von I κ B wird durch seine Phosphorylierung an zwei spezifischen Serinresten in der N-terminalen regulatorischen Region eingeleitet (DiDonato *et al.*, 1996). Der Phosphorylierung folgt eine schnelle Polyubiquitinierung, resultierend in der Degradation des Proteins im 26S-Proteasom (Alkalay *et al.*, 1995; DiDonato *et al.*, 1995). Die I κ B Degradation induziert zudem die Phosphorylierung von p65, welche eine Voraussetzung für die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B im Zellkern ist (Zhong *et al.*, 1998; Zhong *et al.*, 2002). Verantwortlich für die Phosphorylierung des I κ B ist der I κ B Kinase (IKK) Komplex, welcher aus den zwei katalytischen Untereinheiten IKK1 (IKK α) und IKK2 (IKK β), sowie zwei regulatorischen NEMO (IKK γ) Untereinheiten besteht (DiDonato *et al.*, 1997; Mercurio *et al.*, 1997; Rothwarf *et al.*, 1998; Zandi *et al.*, 1997). Die Kinasen IKK1 und IKK2 enthalten neben ihrer katalytischen Domäne mehrere Proteininteraktionsmotive, welche für die Dimerisierung der beiden Kinasen und die intrinsische Aktivierung der Kinasedomäne wichtig sind. Die Stimulation der katalytischen Untereinheiten erfolgt durch (Auto-) Phosphorylierung in ihrer Aktivierungsregion. Für die Phosphorylierung von I κ B ist nur die Aktivierung von IKK2 essentiell (Delhase *et al.*, 1999; Ling *et al.*, 1998). Wenngleich NEMO keine eigene katalytische Domäne enthält, ist es für die Aktivierung des IKK Komplexes unverzichtbar (Rothwarf *et al.*, 1998). Eine wichtige Aufgabe von NEMO ist es, mittels der C-terminalen Zinkfinger-Domäne den IKK Komplex an die entsprechenden IKK2 aktivierenden Kinasen zu rekrutieren (vgl. 3.3.2.).

Unabhängig vom klassischen oder kanonischen IKK/NF- κ B Signalweg existiert ein alternativer Signalweg, welcher auf der Phosphorylierung von IKK1 Homodimeren durch die NF- κ B induzierende Kinase (NIK) beruht. Phosphoryliertes IKK1 induziert die Prozessierung von NF- κ B2 (p52) und ist wichtig für die Reifung von B-Zellen (Senftleben *et al.*, 2001).

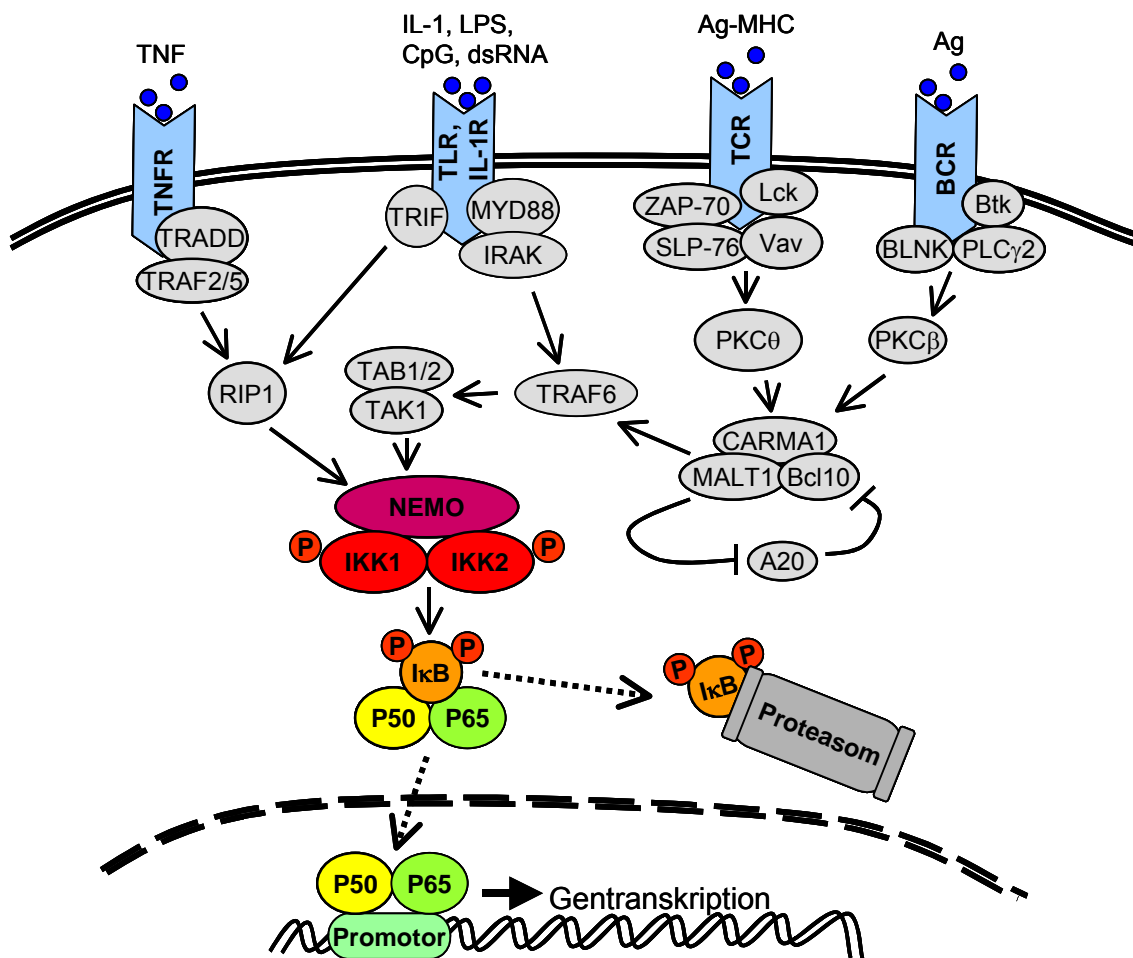


Abb. 3.1: Der kanonische IKK/NF-κB Signalweg und seine wichtigsten Aktivierungswege. (Adaptiert nach: Wallchart NF-κB Signalling Pathways, Alexis® Biochemicals, San Diego, CA, USA)

3.3.1 Regulation des IKK/NF-κB Signalweges

Der wichtigste Schritt in der Aktivierung des NF-κB Signalweges ist die Phosphorylierung von IκB durch IKK, welche die Degradation des Inhibitors einleitet. Von IκB sind vier Formen bekannt, IκBα, IκBβ, IκBε und IκBγ, sowie ein IκB-ähnliches Protein, Bcl-3 (Ghosh *et al.*, 1998). Daneben enthalten jedoch auch die Rel Vorläuferproteine p105 (Vorläufer von p50) und p100 (Vorläufer von p52) an ihrem C-terminus eine IκB-ähnliche Domäne. Diese bilden Heterodimere mit RelA, RelB oder c-Rel, die nicht in den Nukleus translokieren können (Mercurio *et al.*, 1993; Naumann *et al.*, 1993; Rice *et al.*, 1992). Erst die Prozessierung der Vorläuferproteine zu p50 bzw.

p52 und proteasomale Degradation initiiert die Aktivierung des Dimers (Orion *et al.*, 1995; Palombella *et al.*, 1994). Eine unterschiedliche Affinität der κ B Inhibitoren gegenüber den verschiedenen NF- κ B Dimeren führt zu einer zusätzlichen Variabilität des Signalweges. So ist I κ B α hoch affin für p50 haltige Dimere, I κ B β und I κ B ϵ blockieren Dimere, welche RelA und c-Rel enthalten (Senftleben und Karin 2002). Dabei verursacht eine erhöhte Expression von I κ B α und I κ B β , welche durch den NF- κ B Signalweg induziert wird, die Terminierung des Signalweges: Das neu synthetisierte freie I κ B α kann im Zellkern durch Bindung an NF- κ B dessen Dissoziation von der DNA und Rücktransport in das Zytoplasma fördern (Arenzana-Seisdedos *et al.*, 1997).

Darüber hinaus wird der NF- κ B Signalweg auf Ebene der Rel Proteine selbst reguliert: nur Dimere, welche RelA oder c-Rel enthalten, enthalten transkriptionelle Aktivierungsdomänen, während andere Dimere wie p50 Homodimere durch ihre kompetitive Bindung an NF- κ B Bindungsstellen eine transkriptionelle Repression bewirken (Udalova *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2002).

Einige Aktivierungsschritte im NF- κ B Signalweg, wie die Degradation von I κ B und die Prozessierung von p50 und p52, aber auch die Kinase attraktive Funktion NEMOs, beruhen auf einer Polyubiquitinierung. Diese Prozesse werden durch die NF- κ B-medierte Expression deubiquitinierender Proteine wie A20 und CYLD negativ reguliert (Liu *et al.*, 2005).

3.3.2 Aktivierung des IKK/NF- κ B Signalweges

Zahlreiche Signalwege führen zur Aktivierung des IKK Komplexes und der dadurch induzierten transkriptionellen Aktivität von NF- κ B. Die besonderen Regulationsmechanismen des NF- κ B Signalweges auf unterschiedlichen Ebenen machen die Wirkung dieser Aktivierungssignale sehr variabel. Zu den wichtigsten und am besten untersuchten Signalwegen, welche IKK aktivieren, gehören der TNF Signalweg, der Interleukin (IL)-1 β und *Toll like* Rezeptor (TLR) Signalweg und die Aktivierung über den T-Zell- und B-Zell-Rezeptor.

Der TNF Signalweg ist aufgrund seiner sowohl pro- als auch antiapoptotischen Wirkungsweise wichtig für die Balance des Zellüberlebens. Die proapoptotische Wirkung von TNF α wird durch die Induktion der Caspase-Kinase und Aktivierung der

Jun N-terminalen Kinase (JNK) vermittelt, während die gleichzeitige Aktivierung von NF- κ B antiapoptotisch wirkt (Kucharczak *et al.*, 2003). Über NF- κ B induziert TNF α die Expression antiapoptotischer Gene wie CIAP1/2 und Bcl-XL (Kucharczak *et al.*, 2003). Zusätzlich inhibiert NF- κ B z.B. durch die Expression von XIAP den JNK Signalweg (Tang *et al.*, 2001).

Die Rezeptoren der TNF Rezeptor (TNFR) Familie haben keine intrinsische enzymatische Aktivität, sondern rekrutieren nach der Stimulation durch TNF α über ihren zytoplasmatischen Anteil intrazelluläre Adaptermoleküle wie die TNFR-assozierte Todesdomäne (TRADD) und die TNFR-assozierten Faktoren (TRAF). Für die TNF α -induzierte Aktivierung des NF- κ B Signalweges sind insbesondere TRAF2 und TRAF5 von Bedeutung (Tada *et al.*, 2001). TRAF2 rekrutiert durch die konsekutive Bindung der Serin/Threonin Kinase RIP1 (Rezeptor interagierendes Protein 1) und der IKK Untereinheit NEMO den IKK Komplex an den TNFR Signalproteinkomplex (Wu *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2000). Durch RIP1 wird zudem die TGF β (tissue growth factor β) aktivierte Kinase Tak1 rekrutiert, welche in Interaktion mit MEKK3 (Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase 3) schließlich die Aktivierung von IKK2 induziert (Blonska *et al.*, 2005).

Die Rolle des IKK/NF- κ B Signalweges bei der angeborenen Immunantwort wird über den TLR Signalweg vermittelt. TLRs erkennen Pathogen-assozierte mikrobielle Strukturen wie Lipopolysaccharid (LPS), doppelsträngige RNA und CpG (Cytosinphosphitydyl-Guanosin)-DNA. Alle bekannten TLRs können den IKK/NF- κ B Signalweg aktivieren.

Ebenso wie der Interleukin (IL)-1 Rezeptor enthalten die TLRs eine Toll-IL-1R (TIR) Domäne, welche mit den TIR Domänen cytosolischer Adapter-Proteine interagieren (Werts *et al.*, 2006). Der myeloide Differenzierungsfaktor 88 (MyD88) wird von den meisten TLRs sowie dem IL-1 Rezeptor als Adapter für Serin/Threonin Kinasen der IRAK Familie verwendet (Medzhitov *et al.*, 1998; Muzio *et al.*, 1997). Die Aktivierung von IRAK ist Voraussetzung für die Rekrutierung von TRAF6 (Cao *et al.*, 1996; Lomaga *et al.*, 1999; Qian *et al.*, 2001). Als Adaptern zwischen TRAF6 und IKK wurden unterschiedliche Proteine vorgeschlagen, auf der einen Seite ein Komplex aus Tak1 und den assoziierten Faktoren TAB1 und TAB2 (Takaesu *et al.*, 2001), auf der anderen Seite ECSIT (Kopp *et al.*, 1999). Alternativ zu MyD88 dient im Falle des TLR3 und TLR4 der TLR-assozierte IFN-induzierende Faktor TRIF als Adaptormolekül, welches den NF- κ B Signalweg in Abhängigkeit von RIP1 aktiviert (Meylan *et al.*, 2004; Oshiumi *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2003).

Im Rahmen der adaptiven Immunantwort kann der NF- κ B Signalweg durch den T-Zell-Rezeptor (*T-cell receptor*, TCR) bzw. B-Zell-Rezeptor (*B-cell receptor*, BCR) aktiviert werden und induziert die Proliferation von Lymphozyten und ihre Ausreifung zu Effektorzellen.

Nach der Antigen (Ag)-Erkennung durch den TCR kommt es durch Rekrutierung verschiedener Tyrosinkinasen, Adapterproteine und Signalmoleküle zur Bildung der „immunologischen Synapse“. Für die Induktion des IKK/NF- κ B Signalweges spielen hier die Kinasen Lck und ZAP-70, sowie die Adaptermoleküle SLP-76 und Vav eine Rolle (Costello *et al.*, 1999; Herndon *et al.*, 2001). Über das Signalmolekül Vav wird die Proteinkinase PKC θ rekrutiert, welche über CARMA1 den Apoptose-Regulator Bcl-10 aktiviert (Dienz *et al.*, 2000; McAllister-Lucas *et al.*, 2001; Villalba *et al.*, 2000). In B-Zellen wird durch die Tyrosinkinase Btk, die Phospholipase PLC γ und das Adapterprotein BLNK die Kinase PKC β rekrutiert, welche, entsprechend PKC θ in T-Zellen, Bcl-10 aktiviert (Bajpai *et al.*, 2000; Petro und Khan 2001; Su *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2001). Die Aktivierung von Bcl-10 und dessen Interaktion mit der Protease MALT1 ist sowohl für die TCR- als auch die BCR-induzierte IKK/NF- κ B Aktivierung unerlässlich (Jost *et al.*, 2007; Lucas *et al.*, 2001; Ruland *et al.*, 2001). MALT1 aktiviert einerseits TRAF6, ähnlich wie im TLR Signalweg resultierend in der Aktivierung des IKK-Komplexes (Sun *et al.*, 2004), zusätzlich spaltet MALT1 den NF- κ B Inhibitor A20 und verstärkt dadurch seine eigene Aktivierung (Coornaert *et al.*, 2008; Rebeaud *et al.*, 2008; Stilo *et al.*, 2008).

3.4 Biologische Funktionen des IKK/NF- κ B Signalweges

Wie bereits erwähnt, wurde eine Aktivierung des NF- κ B Signalweges erstmals 1986 in Lymphozyten beobachtet (Sen und Baltimore 1986). Inzwischen ist bekannt, dass der Signalweg in unterschiedlichen Zelltypen aktiviert wird und an vielfältigen Prozessen beteiligt ist. Neben seiner wichtigen Funktion im Immunsystem ist er insbesondere bedeutend für die Regulation des Zellzyklus und die Entscheidung zwischen Zellüberleben und Zelltod. NF- κ B fällt dabei oft eine duale Rolle zu, abhängig von Aktivierungsmechanismus und -dauer, Zelltyp und Umgebung.

Eine Infektion durch pathogene Mikroorganismen leitet die Aktivierung des NF- κ B Signalweges über die TLRs ein, resultierend in der Induktion zahlreicher Cytokine (z.B. TNF α , IL-1 und IL-6), Chemokine (z.B. MIP-1 α und Rantes) und Adhäsionsmoleküle

(z.B. E-Selektin und VCAM-1), welche die Migration von Immunzellen zur Infektionsstelle regulieren (Beinke und Ley 2004). Grumont *et al.* fanden in NF- κ B1 *knockout* Mäusen eine gestörte B-Zell-Proliferation aufgrund einer erhöhten Apoptoserate und einer Blockade des Zellteilungszyklus (Grumont *et al.*, 1998). Daneben weisen auch die CD4⁺ T-Zellen dieser Mäuse einen Proliferationsdefekt auf (Artis *et al.*, 2003). Die Cytokinantwort NF- κ B1-deletierter Makrophagen ist dysreguliert (Bohuslav *et al.*, 1998; Kanters *et al.*, 2004). Dabei ist der Effekt der NF- κ B1-Defizienz auf die Funktion der hämatopoetischen Zellen jedoch dual: während die defizienten Mäuse für einige mikrobielle Infektionen wie *L. monocytogenes* und *S. pneumoniae* anfälliger sind, entwickeln sie gegen andere Krankheiten, wie z.B. den murinen Enzephalomyokarditis-Virus, Resistenzen (Sha *et al.*, 1995).

NF- κ B schützt Zellen vor TNF-induzierter oder durch DNA-Schäden eingeleiteter Apoptose, indem es die Expression vieler antiapoptotischer Gene steuert. Die Entscheidung zwischen Zellüberleben und Apoptose wird dabei streng reguliert. So kann in Lymphozyten sowohl eine zu niedrige, als auch eine zu hohe Expression von NF- κ B Zielgenen zum Zelltod führen (Goudeau *et al.*, 2003). Unter bestimmten Bedingungen kann der IKK/NF- κ B Signalweg durch seine antiapoptotische Wirkung die Entstehung von Tumoren unterstützen. Eine anhaltende Aktivierung von NF- κ B kann zudem die Expression bestimmter Proto-Onkogene wie c-myc und Zyklin D1 einleiten (Duyao *et al.*, 1990; Guttridge *et al.*, 1999). Zusätzlich steuert der Signalweg die Expression von vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) und Matrix-Metalloproteinasen (MMP), welche die Fähigkeit von Tumoren zur Metastasierung verbessern (Farina *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2000). So wurde z.B. in Mammakarzinomen und beim Morbus Hodgkin eine gesteigerte NF- κ B Expression in den Tumorzellen als Ursache für die erhöhte Proliferation der Zellen identifiziert (Bargou *et al.*, 1997; Sovak *et al.*, 1997). NF- κ B wird deshalb klassischerweise als Tumor-Promotor angesehen, doch zeigen neuere Arbeiten, dass der Signalweg auch eine gegenteilige Wirkung haben kann. In humanen epidermalen Zellen reguliert NF- κ B das Zellwachstum negativ, und eine Disruption des IKK/NF- κ B Signalweges kann sogar epidermale Tumoren hervorrufen (Dajee *et al.*, 2003). Ebenso macht die Inhibition des IKK/NF- κ B Signalweges in Hepatozyten Mäuse empfänglicher für Leberkarzinome (Luedde *et al.*, 2007; Maeda *et al.*, 2005).

3.5 Funktionen des IKK/NF- κ B Signalweges im Zentralnervensystem

In den letzten Jahren wurden neben der immunmodulatorischen Funktion des IKK/NF- κ B Signalweges zahlreiche Aufgaben des Transkriptionsfaktors im ZNS identifiziert. Wie im peripheren System kann in ZNS-Zellen der IKK/NF- κ B Signalweg durch Zytokin-Stimulation, LPS, oxidativen Stress und andere Stimuli aktiviert werden. Neben der Regulation des Zellzyklus erfüllen diese Stimuli hier spezifischere Aufgaben, wie z.B. die Regulation der synaptischen Plastizität durch TNF α (Albensi und Mattson 2000; Beattie *et al.*, 2002). Zusätzlich induzieren gehirnspezifische Faktoren wie Neurotrophine und verschiedene Neurotransmitter die NF- κ B Aktivierung (Memet 2006). In Neuronen wirkt NF- κ B nicht nur als Transkriptionsfaktor, sondern steuert auch die Signaltransduktion von den Synapsen zum Nukleus durch retrograden Transport in den Axonen (Wellmann *et al.*, 2001).

Während der neuronalen Entwicklung hat NF- κ B eine neuroprotektive Funktion. Eine komplette Disruption des Signalweges in IKK1^{-/-}IKK2^{-/-} Mäusen verhindert durch eine erhöhte Apoptoserate im Neuroepithel die Schließung des Neuralrohrs und beendet die embryonale Entwicklung im Stadium E12,5. Auch in anderen Regionen wie dem Rückenmark und den dorsalen Wurzelganglien findet in der Frühentwicklung der deletierten Mäuse vermehrt Apoptose statt (Li *et al.*, 2000). Zudem ist der IKK/NF- κ B Signalweg an der Regulation der durch den Neuronalen Wachstumsfaktor (*neural growth factor*, NGF) induzierten neuronalen Differenzierung beteiligt (Azoitei *et al.*, 2005). In adulten Neuronen kann NF- κ B entweder den Zelltod oder das Zellüberleben fördern. So wird der neuronale Zelltod nach globaler Ischämie durch den IKK/NF- κ B Signalweg eingeleitet (Herrmann *et al.*, 2005; Nurmi *et al.*, 2004). In Neuronen des basalen Vorderhirns dagegen übt NF- κ B als Antwort auf exzitotoxischen Stress eine neuroprotektive Wirkung aus (Fridmacher *et al.*, 2003). In sensorischen Zellen des auditorischen Systems, welche durch Alter, Lärm und Krankheiten degenerieren, wirkt sich NF- κ B ebenfalls protektiv aus (Jiang *et al.*, 2005; Masuda *et al.*, 2006).

Die immunregulatorischen Zellen des ZNS sind Astrozyten und Mikroglia. Der IKK/NF- κ B Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung dieser glialen Zellen, resultierend in der Produktion vieler wichtiger proinflammatorischer und chemoattraktiver Mediatoren (Kaltschmidt *et al.*, 2005). Combs *et al.* (2001) beobachteten in β -Amyloid Plaques, wie sie beim Morbus Alzheimer auftreten, dass die Aktivierung des mikroglialen IKK/NF- κ B Signalweges, vermittelt durch die

induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS) und die Expression von $\text{TNF}\alpha$, neuronale Apoptose einleiten kann (Combs *et al.*, 2001). Auf dopaminerge Neurone dagegen, deren Zelltod charakteristisch für die Parkinson Krankheit ist, hat die NF- κ B-Aktivierung in Mikrogliazellen eine protektive Wirkung (Xing *et al.*, 2007). Eine neuroprotektive Wirkung durch mikrogliale NF- κ B-Aktivierung konnte auch bei Natrium-Nitroprussid (SNP)-induzierter Neurodegeneration in Mäusen nachgewiesen werden (Simard und Rivest 2007). Die Inhibition von NF- κ B in Astrozyten führt zu einem neuroprotektiven Effekt nach induziertem Rückenmarksschaden (Brambilla *et al.*, 2005).

Oligodendrozyten sind im ZNS verantwortlich für die Myelinisierung von Axonen. Auch in diesem glialen Zelltyp hat NF- κ B antagonistische Eigenschaften. Einerseits löst die Aktivierung des Signalweges die Ausreifung von OPCs aus und schützt die Zellen vor TNF induziertem Zelltod (Hamanoue *et al.*, 2004; Nicholas *et al.*, 2001), andererseits vermittelt die NF- κ B-Aktivierung in Oligodendrozyten deren durch reaktive Sauerstoff-Derivate (ROS) induzierte Apoptose (Vollgraf *et al.*, 1999).

4 Zielsetzung

Die Aktivierung des klassischen IKK/NF- κ B Signalweges spielt eine zentrale Rolle bei der Myelinisierung des PNS (Nickols *et al.*, 2003). Bei der Ausdifferenzierung von Vorläuferzellen zu Oligodendrozyten wurde auch im ZNS eine Aktivierung des Signalweges beobachtet und die Expression des Myelinproteins MBP ist zumindest *in vitro* NF- κ B mediiert (Huang *et al.*, 2002; Nicholas *et al.*, 2001). Ob der IKK/NF- κ B Signalweg auch *in vivo* im ZNS eine essentielle Rolle spielt ist jedoch bisher ungeklärt.

Der IKK/NF- κ B Signalweg hat auch eine wichtige regulatorische Funktion für Immunregulation und den Ablauf von Entzündungsprozessen innerhalb des ZNS. In der EAE ist die Induktion von NF- κ B essentiell für die primäre T-Zell-Aktivierung, welche den Myelinschaden in diesem Modell verursacht (Hilliard *et al.*, 1999). Für eine konsistente T-Zell-Aktivierung im ZNS ist die NF- κ B vermittelte VCam-1-Expression in Astrozyten wichtig (van Loo *et al.*, 2006). In MS-Läsionen wurde eine Aktivierung des Signalweges jedoch nicht nur in Immunzellen sondern auch in Oligodendrozyten beobachtet (Bonetti *et al.*, 1999). Der IKK/NF- κ B Signalweg als wichtiger Regulator von Zellüberleben versus Apoptose könnte hier sowohl bei der Demyelinisierung als auch bei der Remyelinisierung von Axonen eine Rolle spielen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, mögliche Funktionen des hirneigenen IKK/NF- κ B Signalweges

- 1.) bei der physiologischen **Myelinisierung** während der Entwicklung des ZNS,
- 2.) bei der pathologischen **Demyelinisierung** (Verlust des Myelins), sowie
- 3.) bei der **Remyelinisierung** (Regeneration)

herauszuarbeiten. Zu diesem Zweck sollen oligodendrozytär bzw. hirnspezifisch IKK2-deletierte Mäuse verwendet werden. Die De- und Remyelinisierung sollen mittels reversibler toxischer Modelle untersucht werden.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien

Acrylamid/Bis	Roth, Karlsruhe
Ammonium Persulfat (APS)	Bio-Rad, München
Araldit	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ascorbinsäure	Sigma, München
Azur II	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Sigma, München
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau	Bio-Rad, München
Chlodronat	Calbiochem, La Jolla, USA
Cuprizon	Sigma, München
D+ Galaktose	Sigma, München
Diethylether	Sigma, München
Di-Natriumtetraborat-10-hydrat (Borax)	Merck, Darmstadt
Dimethyl-tetrahydropterin (DMPH4)	Aldrich Chem., Milwaukee
Entwickler	Tetenal, Norderstedt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Filmfixierlösung	Tetenal, Norderstedt
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt
Glutathion	Sigma, München
Glycerin	Plusone, Pharmacia Biotech, Freiburg
Glycin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Inkomplettes Freundsches Adjuvans (IFA)	Sigma, München
Isopropanol	Applichem, Darmstadt
Lysolecithin (LPC)	Sigma, München
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Monostralblau (Copper(II) phthalocyanine)	Sigma, München
Osmium-Tetroxid (OsO ₄)	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
poly-L-lysine (PLL)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Sigma, München
Sodiumdeoxycholate	Sigma, München
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad, München
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, München
Tween	Merck, Darmstadt
T3 Hormon	Sigma, München

5.1.2 Zellkulturmedien und –bestandteile

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum, FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	Invitrogen, Karlsruhe
Insulin	Sigma (I-5500)
N1 medium supplement	Sigma (N-6530)
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Pferdeserum (Normal Horse Serum, NHS)	Invitrogen, Karlsruhe

5.1.3 Nukleotide und Primer

dNTPs	Peqlab, Erlangen
Oligo p(dT) ₁₅	Roche Diagnostics, Mannheim
PCR-Primer	MWG-Biotech, Ebersberg

5.1.4 Pharmaka und Narkotika

Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer, Leverkusen
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt
Diethylether	Sigma-Aldrich, Steinheim
Inkomplettes Freundsches Adjuvans (IFA)	Sigma, München
Ketamin	Inresa, Freiburg
Pertussistoxin (PTX)	List laboratories, Campbell, USA
Xylazin 2% (Rompun)	Riemser, Greifswald
Xylocain Gel 2% (Lidocain)	Astrazeneca, Wedel

5.1.5 Antikörper

α -Aktin-IgG (monoklonal, Maus)	Chemicon, Temecula, CA, USA
α -dMBP (polyklonal, Kaninchen)	Chemicon, Temecula, CA, USA
α -GFAP (polyklonal, Kaninchen)	Dako, Hamburg
α -IKK2-IgG (monoklonal, Maus)	Imgenex, San Diego, CA, USA
α -MAC-3-IgG (monoklonal, Ratte)	BD Biosciences, Heidelberg
α -Maus-IgG Peroxidase-konjugiert (Ziege)	Sigma, München
α -Maus-IgG Cy2/Cy3-konjugiert (Ziege)	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
α -NF- κ B p65 (polyklonal, Kaninchen)	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg
α -NG2 (polyklonal, Kaninchen)	Chemicon, Temecula, CA, USA
α -Phospho-NF- κ B p65 (polykl., Kaninchen)	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg
α -PLP (monoklonal, Maus)	Biozol, Eching
α -Kaninchen biotinyliert (Esel)	Amersham Biosciences, Piscataway, USA
α -Kaninchen-IgG Cy2/Cy3-konjugiert (Ziege)	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Isolektin-B4 FITC-konjugiert	Vector Laboratories, Burlingame, USA

5.1.6 Zytokine

LPS	Sigma, München
TNF α	R&D Systems, Wiesbaden

5.1.7 Enzyme

Complete™ protease inhibitors	Roche Diagnostics, Mannheim
DNAse I	Roche Diagnostics, Mannheim
Proteinase K	Roche Diagnostics, Mannheim
RNAse Inhibitor RNasin®	Promega, Madison, USA
Reverse Transkriptase SuperScript™ 1	Invitrogen, Karlsruhe
SYBR® Green Fluorescein Mix	Abgene, Epsom, UK
Taq Polymerase	Promega, Mannheim
Trypsin (0,25%)	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin

5.2 Zellkultur

Puffer und Medien für die Zellkultur

PBS: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄

Medium: DMEM, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

Differenzierungsmedium: DMEM, 500 ng/ml DMPH₄, 50 ng/ml Ascorbinsäure, 2,5 µg/ml Glutathion, 1% N1 Mediumzusatz, 5 µg/ml Insulin, 2 ng/ml T3 Hormon, 0,1% BSA, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 7,5 µg/ml D+Galaktose

5.2.1 Gewinnung primärer Gehirnzellen

Mischkulturen primärer Gehirnzellen wurden aus neugeborenen Mäusen (postnataler Tag P0 bis P3) gewonnen. Die Gehirne wurden zunächst im Ganzen präpariert und einzeln in *Hanks Balanced Salt Solution* (HBSS) überführt. Die Meningen wurden nun vollständig entfernt. Es folgte ein fünfminütiger Trypsinverdau. Der Verdau wurde mit serumhaltigem Medium (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM, mit 10% fötalem Kälberserum, FCS) abgestoppt und die Gehirne mit Medium gewaschen. Anschließend wurden die Gehirne durch Triturieren mit einer Pasteurpipette (WU Mainz) mechanisch zerkleinert. Die Zellen jeweils eines Gehirns, resuspendiert in 5 ml Medium, wurden dann in poly-(L)-Lysin (PLL)-beschichtete 25 cm² Kulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht) ausgesät und in einem Cellstar Brutschrank (Nunc, Wiesbaden) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde am folgenden Tag und danach alle zwei bis vier Tage durchgeführt.

Die auf diese Weise entstehende Mischkultur besteht im Wesentlichen aus einer konfluenten Schicht aus Astrozyten, auf welcher Mikroglia und Oligodendrozyten wachsen. Die Isolation der einzelnen Zelltypen aus dieser Mischkultur, wie im Folgenden beschrieben, wird durch die unterschiedliche Adhäsionsfähigkeit der Zellen ermöglicht.

5.2.1.1 Mikrogliazellen

Zur Gewinnung von Mikrogliazellen wurde zunächst deren Proliferation induziert. Dazu wurde nach fünf Tagen Mischkultur ein Drittel des Mediums durch Mediumüberstand

kultivierter L929 Mausfibroblasten (freundlich zur Verfügung gestellt von Dr. Uwe Hanisch, Institut für Neuropathologie) ersetzt, welcher den Wachstumsfaktor GM-CSF (Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) enthält. Nach vier Tagen wurden die Mikrogliazellen, als am wenigsten adhäsive Zellen der Kultur, durch einstündiges Schütteln bei 130 Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*, rpm) und 37°C auf einem IKA® KS 260 control Zellkulturschüttler (IKA®, Staufen) abgelöst. Das Medium mit den Zellen wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt, Nümbrecht) überführt und 10 min bei 800 rpm und 4°C in einer Eppendorf 5810R Zentrifuge (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium ohne L929-Überstand aufgenommen. Die Zellen wurden in einer Neubauer-Kammer gezählt und dann in mit PLL beschichteten Kulturplatten (Greiner Bio-One Frickenhausen) bzw. Deckgläsern (Menzel Gläser, Braunschweig) ausgesät.

Für Zellfärbungen wurden 2×10^5 Zellen auf 15 mm Deckgläsern ausgesät, für RNA- oder Proteingewinnung 5×10^5 Zellen in 6 well-Kulturplatten. Die Zellen wurden vor der Weiterverwendung zwei Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

5.2.1.2 Oligodendrozyten

OPCs sind weniger adhäsiv als Astrozyten aber adhäsiver als Mikroglia und können durch sequentielles Schütteln isoliert werden. So wurden zunächst die Mikrogliazellen durch einstündiges Schütteln bei 180 rpm vollständig abgelöst und die verbleibenden Zellen mehrfach mit PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) gewaschen. Nach Zugabe von frischem DMEM mit 10% FCS wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, um durch Sättigung des Mediums mit CO₂ eine Unterversorgung der Zellen während der weiteren Prozedur zu verhindern. Anschließend wurden die OPCs abgelöst, indem die Kulturen drei Stunden bei 250 rpm und 37°C geschüttelt wurden. Das Medium mit den Zellen wurde über ein 40 µm Zellsieb (Becton Dickinson, Heidelberg) in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und 6 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Differenzierungsmedium aufgenommen und die Zellzahl in einer Neubauer-Kammer bestimmt. Es wurden jeweils 2×10^4 Zellen auf mit PLL beschichtete 10 mm Deckgläser bzw. 2×10^5 Zellen in mit PLL beschichtete 6 well-Kulturplatten ausgesät. Die Zellen wurden drei bis vier Tage bei 37°C und 5% CO₂ differenziert. Anschließend wurden sie entweder mit 4% Paraformaldehyd (PFA; 10 min bei 4°C) fixiert, oder zur Gewinnung von RNA oder Protein verwendet.

5.2.1.3 Astrozyten

Astrozyten sind in hohem Maße adhäsive Zellen. Um reine Astrozytenkulturen zu erhalten wurde dem Kulturmedium für zwei Tage 20 µg/ml Chlodronat zugegeben, welches ein Zellgift für Mikrogliazellen ist. Danach wurden die Mischkulturen über Nacht bei 250 rpm und 37°C geschüttelt, um alle auf den Astrozyten wachsenden Zellen abzulösen. Die Astrozyten wurden dann mehrfach mit PBS gewaschen und anschließend durch einen 5-10 minütigen Trypsin/EDTA-Verdau bei 37°C und 5% CO₂ abgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von serumhaltigem Medium (DMEM mit 10% FCS) abgestoppt. Die Zellen wurden in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 800 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Medium aufgenommen und die Zellzahl in einer Neubauer-Kammer bestimmt. Jeweils 10⁵ Zellen wurden auf unbeschichtete 15 mm Deckgläser ausgesät, bzw. 3x10⁵ Zellen in 6 well-Kulturplatten. Die Zellen wurden vor der Weiterverwendung zwei Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

5.2.2 Stimulation der Zellen

Zur Aktivierung des NF-κB Signalweges in Mikrogliazellen und Astrozyten wurden diese mit LPS als Ligand des TLR4 sowie mit TNF α stimuliert.

Es wurden jeweils 10 µg/ml LPS bzw. 10 ng/ml TNF α in DMEM mit 10% FCS eingesetzt, als Negativ-Kontrolle wurden Zellen mit Medium inkubiert. Für den Nachweis der p65-Translokation wurden auf Deckgläsern ausgesäte Zellen für 30 min stimuliert, anschließend mit 4% PFA 10 min bei 4°C fixiert und dann immunzytochemisch gefärbt. Für den Nachweis der durch die Aktivierung induzierten Zytokin-Produktion wurden in 6 well-Platten kultivierte Zellen für vier Stunden stimuliert, anschließend wurde RNA für eine Realtime-PCR isoliert. Die Stimulation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator.

5.2.3 Immunzytochemie

Die mit PFA fixierten Zellen wurden zunächst dreimal mit PBS gewaschen und dann 15 min bei Raumtemperatur (RT) mit 0,1% Triton X100 und 10% FCS in PBS inkubiert. Triton ist ein Detergenz, welches die Permeabilität der Zellen für die Antikörper erhöht,

das fötale Kälberserum dient zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen. Die in Tabelle 1 aufgeführten Primärantikörper wurden in 10% FCS in PBS verdünnt, jeweils 80 µl pro 10 mm Deckglas bzw. 150 µl pro 15 mm Deckglas zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Tab. 1: Verdünnung und Spezifität der Primärantikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Spezifität
α-CNP (monoklonal, Maus)	1:200	diff. Oligodendrozyten
α-GFAP (polykl., Kaninchen)	1:1000	Astrozyten
α-MBP (polykl., Kaninchen)	1:2000	Myelin
α-NG2 (polykl., Kaninchen)	1:200	Oligodendrozytenvorläufer
α-P65 (polykl., Kaninchen)	1:500	NF-κB Untereinheit P65

Die Zellen wurden dreimal in PBS gewaschen. Die Sekundärantikörper α-Kaninchen bzw. α-Maus, gekoppelt mit jeweils einem der Fluoreszenzfarbstoffe Cy2 oder Cy3, wurden 1:200 in 10% FCS in PBS verdünnt und die Zellen damit 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert, gefolgt von einem erneuten Waschen der Zellen. Bei Doppelfärbungen wurden die Primärantikörper zusammen eingesetzt, während die Inkubation mit den Sekundärantikörpern sequentiell erfolgte. Mikrogliazellen wurden anschließend noch mit dem Fluorescein-5-Isothiocyanat (FITC)-gekoppelten Farbstoff Isolektin-B4 gefärbt: dieser wird 1:200 in PBS verdünnt, die Inkubationszeit beträgt 2 Std. bei RT. Alle Zellen wurden zuletzt noch 10 min bei RT mit DAPI, 1:10.000 in PBS, inkubiert, welches zur Identifikation der Zellkerne das Chromatin blau-fluoreszierend färbt. Nach einem Waschschrift in H₂O wurden die Zellen mit Fluoromount (Dako, Hamburg) Eindeckmedium eingedeckelt.

Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus, Hamburg) und der Software Cell (Cell Analysis Inc., Chicago, IL, USA).

5.3 Molekularbiologische Methoden

5.3.1 Genotypisierung durch PCR

Bei Zuchtmäusen wurden im Alter von 3-4 Wochen Ohrbiopsien, bei den für die Primärkulturen verwendeten Neugeborenen während der Präparation Schwanzbiopsien entnommen. Die daraus isolierte DNA wurde zur Genotypisierung durch eine Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) amplifiziert.

5.3.1.1 Isolation genomischer DNA

Puffer für die Isolation genomischer DNA

Lysispuffer: 100 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0,2% SDS, pH 8,5

Die Biopsien wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) mit 3 mg/ml Proteinase K in 500 µl Lysispuffer 2 Std. bei 37°C und 900 rpm in einem Heizschüttler (Eppendorf) verdaut. Nach vollständiger Auflösung des Gewebes wurde es fünf Minuten in einer Eppendorf 5415R Zentrifuge bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand mit der gelösten DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und vorsichtiges Schütteln wurde die DNA gefällt. Nach einer weiteren fünfminütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde das DNA-Pellet einmal mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in 100 µl doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) gelöst.

5.3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR beruht auf der enzymatischen Amplifikation einer bestimmten Gensequenz. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer und die Länge der entstehenden Fragmente sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Die PCR wurde in einem 25 µl Reaktionsansatz aus den folgenden Bestandteilen durchgeführt:

1x	Reaktionspuffer mit Glycin
1,5 mM	MgCl ₂
0,25 mM	dNTPs
25 pmol	Primer sense/antisense (s. Tab. 2)
0,5 U/µl	Taq Polymerase
2,0 µl	genomische DNA
ad 25 µl	ddH ₂ O

Folgendes Temperaturprogramm in einem Biometra T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen) wurde für die PCR verwendet, wobei die Annealing-Temperatur für die IKK2 loxP-Primer 60°C und für die MOGCre- und NestinCre-Primer 58°C betrug:

1. 3 min Denaturierung bei 94°C
2. 30 sec Denaturierung bei 94°C
3. 30 sec Anlagerung (Annealing) bei 58°C/60°C
4. 30 sec Elongation bei 72°C
5. Wiederholung von Schritt 2.-4. 34x
6. 5 min Elongation bei 72°C

Tab. 2: Primer für die PCR zur Genotypisierung

Zielgen	Primer	Fragmentlänge
IKK2 loxP	s: 5'-GTT CAG AGG TTC AGT CCA TTA TC-3'	wt: 436 bp
	as1: 5'-TAG CCT GCA AGA GAC AAT ACG-3'	IKK2 ^{fl.} : 533 bp
	as2: 5'-TCC TCT CCT CGT CAT CCT TCG-3'	IKK2 ^{del.} : 652 bp
MOGCre	s: 5'-CTT CTT GGA GGA AAG GGA CAT G-3'	Cre+: 500 bp
	as: 5'-CAT CAG CTA CAC CAG AGA CGG AAA TC-3'	
NestinCre	s: 5'-CGC TTC CGC TGG GTC ACT GTC G-3'	Cre+: 300 bp
	as: 5'-TCG TTG CAT CGA CCG GTA ATG CAG GC-3'	

Die Amplifikate wurden anschließend durch Gelelektrophorese nachgewiesen.

5.3.1.3 Gelelektrophorese

Laufpuffer für die Gelelektrophorese

10x TBE: 900 mM Tris-Borat, 20 mM EDTA

Gelelektrophorese ermöglicht die genaue Größenbestimmung linearer DNA-Fragmente aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Diese Methode diente zum Nachweis entstandener PCR-Amplifikate.

Zur Herstellung 1,5%iger Agarosegele wurde die entsprechende Menge des Trägermaterials Agarose, eines Galaktosepolymers, in Tris-Borat (TBE)-Laufpuffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Zur Färbung der DNA wurde dem Gel anschließend 0,6 µg/ml des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid zugegeben, bevor es in einen Gelschlitten mit Kamm gegeben wurde. Die Elektrophorese erfolgte nach Erhärten des Gels in einer mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer. Zusätzlich zur DNA wurde auf das Gel ein Längenstandard (Fermentas, St. Leon-Rot) aufgetragen, anhand dessen die Größenbestimmung erfolgte. An die Kammer wurde eine Spannung von 10 V/cm angelegt bis die DNA eine zur Auftrennung ausreichende Distanz gewandert war.

Die Detektion der DNA-Ethidiumbromid-Komplexe im Gel erfolgte mittels UV-Licht und einem Gel-Dokumentationssystem (Bio-Rad, München).

5.3.2 RNA Quantifizierung durch RTQ-PCR

Zur Bestimmung der Zytokinexpression durch quantitative Realtime-PCR (RTQ-PCR) wurde aus Gehirnhomogenaten Cuprizon-behandelter Mäuse sowie aus *in vitro* stimulierten Mikrogliazellen und Astrozyten RNA isoliert und durch reverse Transkription in DNA (*copy*DNA, cDNA) umgeschrieben.

5.3.2.1 RNA-Isolation

Zur Herstellung eines Gehirnhomogenates wurde die Maus zunächst durch Genickdislokation getötet und das Gehirn entnommen. Mit Hilfe eines Binokulars wurde die von der Behandlung am stärksten betroffene Region, das Corpus callosum mittels

eines Skalpell isoliert. Dieses Gewebstück wurde in RLT-Puffer (Qiagen, Hilden) mit 1% β -Mercaptoethanol (β -ME) überführt und mit einem Ultra Turax® Homogenisator (IKA®, Staufen) zerkleinert. Das Produkt wurde anschließend mit einer QiaShredder-Säule (Qiagen) durch zweiminütige Zentrifugation bei 13.000 rpm noch weiter homogenisiert. Homogenate aus Zellkulturen wurden hergestellt, indem die Zellen mit 350 μ l RLT-Puffer mit 1% β -ME direkt in der Kulturschale lysiert wurden, gefolgt von einer Homogenisierung mit einer QiaShredder-Säule.

Die RNA-Isolation aus den Homogenaten erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Anleitung.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte in einem Biophotometer (Eppendorf, Hamburg) bei einer Absorption von 260 nm (A_{260}). Der Quotient aus den Wellenlängen 260/280 gibt Auskunft über die erzielte Reinheit der RNA.

5.3.2.2 Reverse Transkription

Vor der Transkription der RNA wurde zunächst ein DNA-Verdau durchgeführt, um Verunreinigungen durch genomische DNA zu eliminieren. Dieser Verdau erfolgte 30 min bei 37°C in folgendem Ansatz (Reaktionsansatz I):

1x	Reaktionspuffer
40 U	RNAse-Inhibitor RNasin®
10 U	DNase I
1 μ g	RNA
ad 14 μ l	RNAse-freies Wasser

Zur Deaktivierung der DNase wurde der Ansatz anschließend für 10 min auf 70°C erhitzt.

Es folgte die reverse Transkription für 60 min bei 37°C mit folgenden Bestandteilen:

14 µl	Reaktionsansatz I
1x	Reaktionspuffer
0,13 nmol	Oligo p(dT) ₁₅ -Primer
125 µM	dNTPs
10 mM	DTT
400 U	Superscript™ RTase

Die Reverse Transkriptase (RTase) wurde nach der Reaktion für 10 min bei 95°C deaktiviert, das Volumen wurde mit ddH₂O auf 70 µl aufgefüllt. Für die quantitative Realtime-PCR (RTQ-PCR) wurden jeweils 2,5 µl dieses Ansatzes eingesetzt.

5.3.2.3 Quantitative Realtime-PCR

Die RTQ-PCR beruht wie die PCR auf dem Prinzip der DNA-Amplifikation. Zusätzlich ermöglicht sie durch den Einsatz des interkalierenden Farbstoffes SYBR® Green, mittels Messung der proportional zur Zunahme der PCR-Produkte steigenden Fluoreszenz, eine Quantifizierung der DNA.

Der Reaktionsansatz der RTQ-PCR enthält folgende Bestandteile:

1x	SYBR™ Green
10 pmol	Primer s/as (Tab.3)
2,5 µl	cDNA
ad 25 µl	ddH ₂ O

Es wurden spezifische Primer für die Zytokine TNF α und IL-1 β , die Chemokine CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α) und CXCL10 (IP-10) verwendet sowie für Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), welches als Bezugsgen für die Quantifizierung verwendet wurde. Alle Primer waren so gewählt, dass sie in unterschiedlichen Exons lagen: Eventuell noch enthaltene genomische DNA wird so aufgrund ihrer Länge unter dem verwendeten Temperaturprotokoll nicht amplifiziert. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tab. 3: Primer für die quantitative Realtime-PCR

Zielgen	Primersequenz	Primer-effizienz
CCL2	s: 5'-TCT GGG CCT GCT GTT CAC C-3'	96,4%
	as: 5'-TTG GGA TCA TCT TGC TGG TG-3'	
CCL3	s: 5'-CAC CAC TGC CCT TGC TGT T-3'	63,0%
	as: 5'-AGG AGA AGC AGC AGG CAG TC-3'	
CXCL10	s: 5'-TGC TGG GTC TGA GTG GGA CT-3'	86,6%
	as: 5'-CCC TAT GGC CCT CAT TCT CAC-3'	
GAPDH	s: 5'-TCC TGC ACC ACC AAC TGC TTA GCC-3'	96,0%
	as: 5'-GTT CAG CTC TGG GAT GAC CTT GCC-3'	
IL-1 β	s: 5'-ACA AGA GCT TCA GGC AGG CAG TA-3'	80,0%
	as: 5'-ATA TGG GTC CGA CAG CAC GAG-3'	
TNF α	s: 5'-CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A-3'	73,0%
	as: 5'-TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC-3'	

Die Amplifikation und Fluoreszenzmessung wurde in einem iQTM5 I-cycler (Bio-Rad, München) nach folgendem Temperaturprogramm durchgeführt, wobei die Annealing-Temperatur für die Zytokin- und GAPDH-Primer 58°C und für die Chemokin-Primer 63,8°C betrug:

1. 15 min Denaturierung bei 94°C
 2. 30 sec Denaturierung bei 94°C
 3. 35 sec Anlagerung (Annealing) bei 58°C/ 63,8°C
 4. 30 sec Elongation bei 72°C
 5. 20 sec Fluoreszenzmessung
- Wiederholung von Schritt 2.-5. 49x
6. 30 sec Denaturierung bei 94°C
 7. 10 sec Schmelzkurve 55-94°C in 0,5° Schritten (80x)
 8. Abkühlung auf 19°C

Die im Anschluss an die Realtime-PCR erstellte Schmelzkurve gab Aufschluss über die Qualität der verwendeten cDNA. Die Auswertung der Realtime-PCR erfolgte nach Pfaffl (Pfaffl 2001). Die statistische Signifikanz wurde mittels einem Student T-Test bestimmt. Als signifikant wurde ein p-Wert von p<0,05 betrachtet.

5.3.3 Expressionsbestimmung durch Western Blot

Zur Bestimmung der IKK2-Expression in WT und IKK2-deletierten Mäusen wurde Protein aus unterschiedlichen Gehirnregionen sowie aus primären Gehirnzellen isoliert und ein Western Blot mit einem IKK2-spezifischen Antikörper durchgeführt.

5.3.3.1 Proteinisolation

Puffer für die Proteinisolation

Gehirn-Homogenisierungspuffer: 20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0,5% Triton X-100 5 mM NaN₃, 1 Tablette/ 50 ml Complete™ Protease Inhibitoren, pH 7,3

RIPA-Puffer: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% Sodiumdeoxycholate, 0,1% SDS, 1 Tablette / 50 ml Complete™ Protease Inhibitoren, pH 7,4

Zur Proteinisolation aus Gehirngewebe wurden die Mäuse zunächst durch Genickdislokation getötet und das Gehirn wurde freipräpariert. Um Protein aus dem Gesamtgehirn zu gewinnen wurde eine komplette Hemisphäre eingesetzt. Zusätzlich wurden aus der zweiten Hemisphäre einzelne Regionen, der Kortex sowie die subkortikale weiße Substanz, unter dem Binokular herauspräpariert. Jedes dieser Gewebstücke wurde gewogen und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zu maximal 50 mg Gewebe jeweils das neunfache Gewicht Homogenisierungspuffer zugegeben. Das Gewebe wurde mit einer Pistille unter Eiskühlung homogenisiert und anschließend 10 min bei 4500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Aus primären Gehirnzellen wurde eine Proteinisolation mit RIPA-Puffer durchgeführt. Dazu wurden 70 µl RIPA-Puffer direkt auf die Kulturschalen gegeben, die Zellen wurden mit einem Zellschaber (Sarstedt, Nümbrecht) abgeschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Sie wurden dann 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Konzentrationsbestimmung der gewonnenen Proteinhomogenate erfolgte durch einen BCA-Assay mittels des Pierce BCA Protein Assay Kits nach Anleitung. Die Homogenate wurden dann in Stickstoff weggefroren und bei -80°C aufbewahrt.

5.3.3.2 Western Blot

Puffer für Western Blot

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris, pH 8,8

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris, pH 6,8

4x Probenpuffer: 50 mM Tris, 6% SDS, 30% Glycerin, 0,02% Bromphenolblau, 10% β -ME, pH 6,8

Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,5% SDS

Blockpuffer: 5% BSA in PBS

Waschpuffer: 0,5% Tween in PBS

Transferpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,5% Methanol

Strippuffer: 62,5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 100 mM β -ME, pH 6,8

Beim Western Blot werden Proteine zuerst durch Elektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und dann auf eine Trägermembran übertragen. Auf dieser Membran immobilisiert können dann distinkte Proteinbanden durch Immundetektion nachgewiesen werden. Mit dieser Methode wurde die Cre-vermittelte Deletion von IKK2 in unterschiedlichen Gehirnregionen und unterschiedlichen Zelltypen untersucht.

Die Proteine in den verwendeten Homogenaten wurden zunächst in einem β -ME enthaltenden Probenpuffer 5 min bei 99°C denaturiert, um sie für die spätere Immundetektion zugänglich zu machen. Der Probenpuffer enthielt zusätzlich Bromphenolblau um die Laufgeschwindigkeit auf dem Trenngel kontrollieren zu können, sowie Glycerin um die Dichte für die Auftragung auf das Acrylamidgel zu erhöhen. Beim Trenngel handelte es sich um ein 10%iges Acrylamidgel mit dem Detergenz SDS zur Proteindenaturierung. Acrylamid bildet in Anwesenheit freier Radikale lange Polymere die durch Bisacrylamid vernetzt werden. Zusätzlich wurde über das Trenngel ein 4%iges Sammelgel gegossen, um durch ein schnelles Einwandern der Proteine ins Gel eine bessere Bandenschärfe zu erreichen.

Die Zusammensetzung der Gele war folgende:

10% bzw. 4%	entgastes Acrylamid/Bis (29:1)
1x	Gelpuffer
0,1%	SDS
ad 10 ml	ddH ₂ O
0,05%	Ammonium Persulfat (APS)
0,05%	TEMED

APS als Radikalbildner und TEMED als Katalysator der Polymerisierung wurden jeweils zuletzt zugegeben, um die Reaktion zu starten. Das Sammelgel wurde gegossen, wenn das Trenngel vollständig polymerisiert war.

Es wurden jeweils 40 µg Protein aus den Gehirnhomogenaten bzw 20 µg Protein aus den Zellhomogenaten auf das Gel aufgetragen, zusammen mit einem Proteinstandard (Bio-Rad, München) zur Größenbestimmung. An das Gel wurde zunächst für 10 min eine Spannung von 10 V/cm angelegt, zur Einwanderung der Proteine durch das Sammelgel. Zur Auftrennung der Proteinbanden im Trenngel wurde für weitere 60 min die Spannung auf 20 V/cm erhöht.

Nach der Auftrennung der Banden folgte deren Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran. Es wurde die Methode der halbtrockenen Übertragung (*"semi-dry blot"*) in einem Trans-Blot[®] SD Blotter (Bio-Rad) verwendet: zwischen zwei Elektroden wurden das Gel und die Membran zwischen zwei Schichten des als Ionenreservoir dienenden in Transferpuffer getränkten Filterpapiers gestapelt. Anschließend wurde für 40 min eine Spannung von 10 V senkrecht an den Stapel angelegt.

Die Membran wurde kurz in PBS waschen und dann für 60 min bei RT in Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für die Immundetektion zu blocken. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper α -IKK2-IgG (monoklonal, Maus), 1:1000 verdünnt in Waschpuffer, über Nacht bei 4°C. Die Membran wurde dreimal 5 min in Waschpuffer gewaschen und dann 30 min bei RT mit dem Peroxidase (POD)-konjugierten Sekundärantikörper α -Maus-POD, 1:40.000 in Waschpuffer verdünnt, inkubiert. Die Substratreaktion erfolgte mit dem ECL[™] (*enhanced chemiluminescence*) Detektionskit (Sigma, München) nach Anleitung. Die Exposition der Filme (Kodak, Stuttgart) erfolgte unter visueller Kontrolle 4-8 min.

Als Ladekontrolle wurde auf der Membran anschließend noch das Strukturprotein Aktin, ein Zytoskelett-Bestandteil welcher in allen Zelltypen exprimiert wird, nachgewiesen. Zu diesem Zweck wurde nach der erfolgreichen Detektion des ECL-Signals die Membran dreimal 10 min in Waschpuffer gewaschen. Durch 30-minütige Inkubation in Strippuffer bei 58°C wurden nun die gebundenen Antikörper wieder abgelöst. Nach erneutem Waschen und Blocken der Membran wurde sie mit Maus α -Aktin (1:500 in Waschpuffer verdünnt) zwei Std. bei RT inkubiert. Die Detektion erfolgte wie bereits beschrieben.

5.4 Tierexperimentelle Methoden

In dieser Arbeit wurden transgene Mäuse der Linien IKK2floxed NestinCre (IKNC) und IKK2floxed MOGCre (IKMC) zur Zucht und für die nachfolgenden Tierexperimente verwendet. Als negative Kontrolltiere wurden in allen Versuchen Cre negative Wurfgeschwister eingesetzt. Diese Tierlinien wurden freundlicherweise von Prof. Manolis Pasparakis (Institut für Genetik, Universität Köln) zur Verfügung gestellt.

Die Mäuse wurden in Gruppen zu vier bzw. acht Tieren in Macrolon Typ 2 bzw Typ 3 Käfigen unter konstanter Temperatur und Luftfeuchtigkeit in einem Tag-/Nachtrhythmus von jeweils zwölf Stunden gehalten. Die Tiere wurden täglich mit Trockenfutter und Wasser versorgt.

Es wurden drei unterschiedliche Tiermodelle für die Demyelinisierung bzw. Remyelinisierung im Zentralnervensystem (ZNS) angewendet: die Cuprizin- und die Lysolecithin- induzierte toxische Demyelinisierung sowie die EAE. Alle Versuche sind in Tierversuchsanträgen beinhaltet, die von der Bezirksregierung Braunschweig genehmigt wurden.

5.4.1 Toxische Demyelinisierung durch Cuprizin

Durch Fütterung von jungen Mäusen mit dem Kupferchelator Cuprizin wird nach fünf Wochen eine reversible toxische Demyelinisierung im Gehirn verursacht, die in der Region des Corpus Callosum besonders ausgeprägt ist.

Gruppen von 8-10 Wochen alten weiblichen Mäusen der Linien IKK2floxed, IKK2floxed NestinCre (IKNC) und IKK2floxed MOGiCre (IKMC) wurden täglich mit 0,2% Cuprizin,

welches dem üblichen Maustrockenfutter beigemischt wurde, gefüttert. Diese Behandlung wurde nach fünf Wochen (akute Demyelinisierung) bzw. nach zehn Wochen (chronische Demyelinisierung) abgebrochen und die Mäuse durch Genickdislokation getötet. Eine dritte Gruppe von Mäusen wurde fünf Wochen mit Cuprizon gefüttert und dann weitere fünf Wochen ohne Cuprizon gehalten, bevor sie getötet wurden, um die Remyelinisierung zu untersuchen. Anschließend wurden die Gehirne der Mäuse entnommen und in 4% PFA (für Histologie) bzw. in 2% PFA und 3% Glutaraldehyd (GA; für Elektronenmikroskopie) fixiert. Die Cuprizonfütterung der Mäuse fand in Kooperation mit Dr. Geert van Loo und Prof. Manolis Pasparakis am EMBL in Monterotondo (Italien) statt.

5.4.2 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Die EAE als immunmediertes Demyelinisierungsmodell wird durch eine Immunisierung von Mäusen mit einem synthetischen Myelin-Peptid eingeleitet. Dieses wird in einer Emulsion mit komplettem Freund'schen Adjuvanz (*complete Freund's adjuvans*, CFA) verabreicht, welches für die Induktion der Autoimmunreaktion nötig ist. Die gleichzeitige Gabe von Pertussistoxin (PTX) sorgt für die nötige Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke für die periphär aktivierten Immunzellen. Die durch die Immunisierung verursachte Demyelinisierung im Rückenmark der Mäuse zeigt sich äußerlich durch Lähmungserscheinungen in den Extremitäten (Tabelle 8).

In dieser Arbeit wurde eine Immunisierung von 8-10 Wochen alten, weiblichen IKK2floxed und IKK2floxed MOG^{iCre} Mäusen mit einem synthetischen MOG₃₅₋₅₅-Peptid (Institut für Medizinische Immunologie, Charité, Berlin) durchgeführt. Pro Maus wurden in einem 200 µl Gesamtvolumen 200 µg MOG und 100 µl CFA (*complete Freund's adjuvance*: inkomplettes Freund'sches Adjuvanz mit 10 mg/ml *M.tuberculosis*) in PBS durch wiederholtes Sonifizieren mit einem Sonopuls[®] Ultraschallgerät (Bandelin Electronic, Berlin) emulgiert. Die MOG-Emulsion wurde unter Äthernarkose subkutan, jeweils 50 µl in jede Flanke der Maus, verabreicht. Jede Maus erhielt am Tag der Immunisierung und 48 Std. danach zusätzlich jeweils 300 ng PTX, in 300 µl PBS gelöst, intraperitoneal injiziert.

Der Allgemeinzustand der Mäuse und ihr Gewicht wurden während des gesamten Versuches kontrolliert und dokumentiert. Ab dem zehnten Tag nach Immunisierung wurden die Mäuse zusätzlich täglich auf Lähmungserscheinungen untersucht. Der Schweregrad der Lähmung wurde nach dem in Tabelle 4 aufgeführten Score

klassifiziert, um den Krankheitsverlauf zu dokumentieren. Der Versuch wurde am Tag 31 abgebrochen und die Mäuse für eine histologische Auswertung mit 4% PFA perfundiert.

Tab. 4: Klassifizierung der Lähmungserscheinungen während der EAE

0	keine Lähmungserscheinungen
0,5	partielle Schwanzlähmung
1,0	vollständige Schwanzlähmung
1,5	Maus dreht sich noch selbstständig in aufrechte Position
2,0	Maus dreht sich nicht selbstständig in aufrechte Position
2,5	einseitige Lähmung in den Hinterbeinen
3,0	beidseitige Lähmung in den Hinterbeinen
3,5	einseitige Lähmung in den Vorderbeinen
4,0	vollständige Lähmung der Extremitäten: Abruchkriterium

5.4.3 Lysolecithin-induzierte Demyelinisierung

Die einmalige stereotaktische Applikation von LPC in das Rückenmark adulter Mäuse verursacht eine schnelle und lokal begrenzte toxische Demyelinisierung von Axonen nach bereits vier Tagen. Diese wird nicht von äußeren Symptomen begleitet und ist reversibel: nach zwei Wochen sind die Axone in der betroffenen Region wieder größtenteils remyelinisiert.

Die LPC-Injektion wurde an zehn Wochen alten IKK2floxed und IKNC Mäusen von Dr. Doron Merkler durchgeführt. Die Mäuse wurden dazu durch Verabreichung von 100 mg/kg Körpergewicht Ketamin und 20 mg/kg Körpergewicht Xylazin in Narkose versetzt. Nach Rasur und Desinfektion wurde die Haut am Rücken durch einen Sagittalschnitt eröffnet, und unter zusätzlicher lokaler Anästhesie mit Lidokainsalbe eine Laminektomie im Bereich des thorakalen Wirbels T10 durchgeführt. Mithilfe eines Stereotakten wurde langsam 1 µl einer 2 mg/ml Lösung von LPC in sterilem PBS im ventralen Bereich des Rückenmarks injiziert. Die LPC-Lösung enthielt zusätzlich 0,1% Monostralblau zur späteren Lokalisierung der Injektionsstelle. Anschließend wurden an der Operationsstelle der Muskel und die Oberhaut durch eine Einzelknopfnah mit einem Ethilon 4-0 bzw. 6-0 Faden (Ethicon, Norderstedt) wieder verschlossen. Die

Mäuse wurden bis zum Aufwachen aus der Narkose auf eine 37°C warmen Heizplatte plaziert, um eine Auskühlung zu verhindern.

Der Allgemeinzustand und das Gewicht der Mäuse wurden täglich kontrolliert. Nach vier (Demyelinisierung) bzw. 14 Tagen (Remyelinisierung) wurden die Mäuse mit 2% PFA und 3% GA perfundiert. Die Region der Injektion wurde aus dem Rückenmark präpariert und zwei Tage in 2% PFA/3% GA nachfixiert.

5.4.4 Perfusion und Präparation der Mäuse

Bei der Perfusion wird der Blutkreislauf der Tiere zuerst mit PBS gespült und dann mit einem Fixativ. Durch dieses Verfahren wird das Gewebe optimal erhalten. Unbehandelte, MOG-immunisierte und LPC-behandelte Mäuse wurden für die Immunhistologie mit 4% PFA bzw. für die Elektronenmikroskopie mit 2% PFA/3% GA perfundiert.

Die Mäuse wurden mit 250 µl einer 14%igen Chloralhydratlösung narkotisiert. Nach Reflexverlust wurde der Thorax geöffnet und eine transkardiale Perfusion durchgeführt. Um eine konstante Durchlaufgeschwindigkeit zu garantieren, wurde eine Ismatec® Schlauchpumpe (IDEX Corporation, Northbrook, USA) verwendet.

Für die Histologie der Rückenmäcker MOG-immunisierter Tiere wurde jeweils das komplette Rückenmark entnommen, nachfixiert und durch transversale Schnitte in mehrere Teile geteilt für die Einbettung in Paraffin. Für die Histologie von Gehirnen wurde das Gesamtgehirn präpariert und für die Paraffineinbettung bzw. Kryoeinbettung durch Transversalschnitte in vier Teile geteilt. Die Rückenmäcker der LPC-behandelten Mäuse wurden für die Einbettung in Araldit in der Injektionsstelle transversal geschnitten. Für die Elektronenmikroskopie des Corpus callosum wurde zuerst das Gehirn freigelegt, dann jede Hemisphere frontal in Scheiben geschnitten, und das Corpus callosum für die Einbettung so präpariert, dass die Schnittfläche sagittal, also senkrecht zu den verlaufenden Axonen, liegt.

5.5 Histologie

5.5.1 Paraffineinbettung

Die Gehirne und Rückenmäcker für die immunhistochemischen Färbungen wurden nach mehrtägiger Fixierung in 4% PFA mit H₂O gespült und in einem Einbettautomaten (Leica, Wetzlar) durch ein aufsteigende Alkoholreihe dehydriert, danach in Xylol und schließlich in 60°C heißes flüssiges Paraffin überführt. Abschließend wurden auf einer Heizplatte bei 60°C die Gewebeteile in einer Paraffinkapsel ausgerichtet und mit flüssigem Paraffin ausgegossen. Zuletzt wurden die Formen zum Aushärten auf eine 4°C kalte Kühlplatte transferiert.

5.5.2 Immunhistochemische Färbungen

Zur histologischen Auswertung der EAE- und Cuprizin-Läsionen wurden auf 0,1-1 µm dünnen Paraffinschnitten eine Hämalaun-Eosin Färbung für die Morphologie, eine Luxol Fast Blue-Periodic Acid Schiff (LFB-PAS)-Färbung der weißen Substanz und Immunfärbungen zur Identifizierung verschiedener Zelltypen und der NF-κB Untereinheit p65 gemacht (Antikörper und deren Spezifität s. Tab. 5).

Tab. 5: Antikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Spezifität
α-dMBP (polyklonal, Kaninchen)	degradiertes Myelin-basisches Protein
α-GFAP (polyklonal, Kaninchen)	Astrozyten
α-MAC3 (Ratte)	Mikroglia/ Makrophagen
α-PLP (monoklonal, Maus)	Myelin
α-phospho-p65 (polykl., Kaninchen)	phosphorylierte NF-κB Untereinheit p65

Die Herstellung der Paraffinschnitte und die o.g. Färbungen wurden vom technischen Personal des Institutes für Neuropathologie durchgeführt.

5.5.3 Immunfluoreszenzfärbung

Puffer für die Immunfluoreszenzfärbung

Blockpuffer: 0,5% Triton X-100, 10% FCS in PBS

Für die Immunfluoreszenzfärbung NG2 (neuronal-gliales Antigen 2)-positiver OPCs wurden 30 µm dicke schwimmende frontale Kryoschnitte (Gefrierschnitte) von Gehirnen Cuprizon-behandelter Tiere verwendet. Die Gehirne wurden vorher in 4% PFA fixiert und durch zweitägige Inkubation in einer 30% Sukrose-Lösung kryogeschützt. Die Schnitte wurden vom technischen Personal des Institutes für Neuropathologie hergestellt.

Die Schnitte wurden nach dem Auftauen zunächst dreimal 10 min in einer Petrischale mit PBS gewaschen. Nachdem die Sukrose vollständig entfernt war, wurden sie zur Permeabilisierung und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 30 min in Blockpuffer inkubiert. Der Primärantikörper α -NG2 (polyklonal, Kaninchen) wurde 1:200 in Blockpuffer verdünnt und die Schnitte damit über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgte die 60 minütige Inkubation mit dem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper α -Kaninchen-Cy3, der ebenfalls 1:200 in Blockpuffer verdünnt wurde. Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte 15 min bei RT mit DAPI, 1:10.000 in Blockpuffer verdünnt, gegengefärbt. Zuletzt wurden die Schnitte noch einmal in PBS gewaschen, auf Objektträger aufgezogen und mit Fluoromount (Dako, Hamburg) eingedeckelt.

Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus, Hamburg).

5.5.4 XGal-Färbung

Eine XGal-Färbung wurde verwendet, um die β -Galaktosidase (LacZ)-Expression in MOG Cre exprimierenden Rosa26-Reportermäusen (R26R-Mäuse; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) nachzuweisen. XGal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) ist ein artifizielles, chromogenes Substrat, welches durch die β -Galaktosidase in Laktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl gespalten wird. 5-Brom-4-chlor-indoxyl wird durch den Sauerstoff in der Luft zu dem tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert.

Die Färbung wurde auf 20 µm frontalen Kryoschnitten mit einem β-Galaktosidase Reporter gen Färbekit (Sigma-Aldrich, Steinheim) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Inkubation mit der Färbelösung erfolgte über Nacht im Dunkeln bei 37°C. Die Schnitte wurden anschließend mit Immu-Mount Eindeckmedium (ThermoScientific, Pittsburgh, USA) eingedeckelt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

5.5.5 Auswertung der Histologie

5.5.5.1 Auswertung der EAE-Läsionen

Zur Auswertung der EAE-Läsionen im Rückenmark wurden lichtmikroskopisch die drei am stärksten demyelinisierten Querschnitte ausgewählt. Mithilfe der Software Analysis (Cell Analysis Inc., Chicago, IL, USA) wurden in LFB-PAS gefärbten Schnitten die Fläche des Rückenmarkschnittes sowie der weißen Substanz gemessen, ebenso wie die Fläche der Läsionen. Daraus wurde der Grad der Demyelinisierung bestimmt, berechnet aus dem Quotient demyelinisierte Fläche/weiße Substanz. Um das Ausmaß der Makrophagen-Infiltration und des Myelinabbaus zu bestimmen wurden die MAC-3 (*membrane attack complex 3*; Mikroglia-/Makrophagenmarker) bzw. dMBP (degeneriertes Myelin-basisches Protein) positiven Zellen gezählt. Zellzahlen wurden auf die Gesamtfläche des Rückenmarkquerschnittes bezogen. Die statistische Signifikanz wurde mittels einem Student T-Test bestimmt. Als signifikant wurde ein p-Wert von $p < 0,05$ betrachtet.

5.5.5.2 Klassifizierung der Cuprizon-induzierten Demyelinisierung

Um die Cuprizon-induzierte Demyelinisierung im Corpus callosum (cc) zu klassifizieren, wurde ein Bewertungsscore verwendet, der von 0 (0% demyelinisierte Fläche im cc) bis 3 (100% demyelinisierte Fläche im cc) reicht. Es wurden dazu LFB-PAS gefärbte frontale Gehirnschnitte auf Höhe des rostralen Diencephalons verwendet. Die Klassifizierung erfolgte durch zwei unabhängige geblindete Personen. Die infiltrierenden Zellen wurden lichtmikroskopisch in 40 facher Vergrößerung mit einem Zählgitter ausgezählt. Dabei wurden in der MAC-3 und in der GFAP (*glial fibrillary acidic protein*; Astrozytenmarker) Färbung je drei Gesichtsfelder von der

Mitte des Corpus callosums ausgehend nach lateral ausgewertet. Die statistische Signifikanz wurde mittels einem Student T-Test bestimmt. Als signifikant wurde ein p-Wert von $p < 0,05$ betrachtet.

5.6 Elektronenmikroskopie

5.6.1 Aralditeinbettung

Um Dünnschnittpräparate für die Elektronenmikroskopie anfertigen zu können, wurden die Rückenmäcker und Gehirnstücke in das Kunstharz Araldit eingebettet.

Die fixierten Gewebestücke wurden zunächst zweimal 5 min in PBS gewaschen, 60 min bei 4°C in 1% Osmium-Tetroxid (OsO_4) nachfixiert und erneut in PBS gespült. Anschließend wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 50-100% Ethanol dehydriert. Dem 70%igen Ethanol wurde zur Kontrastierung des Gewebes 0,5% Uranylacetat zugefügt und die Inkubationszeit von 10 min auf 60 min erhöht. Am Ende der Alkoholreihe wurden die Gewebestücke zweimal 15 min in 100% Ethanol und dann zweimal 10 min in Propylenoxid inkubiert. Bevor die Gewebestücke für 60 min in reines Araldit (Aralditmischung nach GLAUERT und GLAUERT 1958) überführt wurden erfolgte eine jeweils halbstündige Inkubation in einem Araldit-Propylenoxid-Gemisch im Verhältnis 1:1 und dann 2:1. Schließlich wurden die Präparate in vorgetrocknete Flachförmchen mit frischem Araldit überführt und darin ausgerichtet. Die Blöcke wurden zuletzt mindestens 48 Std. bei 60°C getrocknet.

5.6.2 Herstellung von Dünnschnittpräparaten

Die Dünnschnittpräparate wurden an einem Ultracut Schneidegerät (Leica, Wetzlar) hergestellt. Die Aralditblöcke wurden zunächst mit einer Rasierklinge so getrimmt, dass die gewünschte Schnittfläche des Präparates freilag. Dann wurden mit einem Glasmesser schwimmende Schnitte einer Dicke von 300 nm ('Semidünnschnitte') erstellt. Die Semidünnschnitte wurden mithilfe eines Zahnstochers in einen Wassertropfen auf einem Glasobjektträger überführt, und bei 60°C auf einer Heizplatte getrocknet.

Anschließend wurden die Semidünnschnitte mit einer Färbelösung nach Richardson (RICHARDSON *et al.*, 1960) gefärbt:

2 Teile	1% Azur
1 Teil	2% Methylenblau
1 Teil	1% Borax

Die Schnitte wurden dazu, weiterhin bei 60°C, mit der Färbelösung unter Sichtkontrolle so lange inkubiert, bis die Färbelösung am Rand leicht trocknete. Sie wurden dann mit ddH₂O abgespült, getrocknet und mit flüssigem Araldit eingedeckelt.

Die Semidünnschnitte wurden an einem Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg) ausgewertet.

Zur quantitativen Auswertung am Elektronenmikroskop wurden durch das technische Personal des Institutes für Neuropathologie Ultradünnschnitte einer Dicke von 50 nm angefertigt und mit Bleicitrat kontrastiert.

5.6.3 Elektronenmikroskopische Auswertung

Von Ultradünnschnitten des Corpus callosum bzw. Rückenmarks wurden mit einem Zeiss EM10A Elektronenmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen) mit angeschlossener MegaViewIII Digitalkamera (Soft Imaging Systems, Münster) in 25.000 facher (cc) bzw. 16.000 facher (Rückenmark) Vergrößerung 25 Bilder pro Tier in Reihe gemacht. Davon wurden zehn zufällig ausgewählte Bilder für die Auswertung mit der Analysis-Software (Cell Analysis Inc., Chicago, IL, USA) verwendet. Es wurden die Anzahl der myelinisierten und der demyelinisierten Axone sowie deren Quotient bestimmt. Zur Beurteilung der physiologischen Myelinisierung sowie der Remyelinisierung wurden zudem der Axondurchmesser sowie die Myelindicke jedes Axons gemessen und durch Berechnung der G-Ratio zueinander in Bezug gesetzt: Dieser Wert berechnet sich als Quotient aus Axondurchmesser/Faserdurchmesser (Axondurchmesser + zweifache Myelindicke). Es wurden für die Auswertung nur Axone mit einem Mindestdurchmesser von 250 nm berücksichtigt, da kleinere Axone oft ohnehin kein Myelin aufweisen. Die statistische Signifikanz wurde mittels einem Student T-Test bestimmt. Als signifikant wurde ein p-Wert von $p < 0,05$ betrachtet.

6 Ergebnisse

6.1 Charakterisierung der zellspezifischen IKK2-Deletion

Um die Rolle des kanonischen NF- κ B Signalweges bei der Myelinisierung, De- und Remyelinisierung zu untersuchen, wurden Mäuse mit einer zellspezifischen Deletion der I κ B Kinase IKK2 verwendet. Das Ziel der Deletion des IKK2 Genes ist eine funktionelle Unterbrechung des NF- κ B Signalweges: in Abwesenheit der Kinase IKK2 kann keine vollständige Phosphorylierung und anschließende Degradierung von I κ B erfolgen, was die Voraussetzung für die Translokation von NF- κ B in den Zellkern ist. Nur im Zellkern kann NF- κ B seine Funktion als Transkriptionsfaktor aufnehmen.

Die Deletion beruht auf dem Cre/loxP Rekombinationssystem (Gu *et al.*, 1994): Das IKK2-Gen der verwendeten Mäuse wird durch zwei gleichgerichtete loxP (*locus of crossingover of P1 phage*) Sequenzen flankiert, welche als Erkennungsstellen für die Rekombinase Cre (*'causes recombination'*) dienen (Pasparakis *et al.*, 2002). Die Expression der Cre-Rekombinase unter einem zellspezifischen Promotor führt in diesen Mäusen zu einer gezielten Exzision des IKK2 Gens.

6.1.1 Deletion von IKK2 in ZNS-Zellen

Um die Wirkung einer IKK2-Deletion in Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) zu untersuchen, wurden homozygot IKK2-gefloxte (IKK2^{fl/fl}) Mäuse verwendet, welche die Cre Rekombinase unter dem Nestin Promotor exprimieren (van Loo *et al.*, 2006). Dieser Promotor ist spezifisch für Zellen neuroektodermalen Ursprungs, wie für Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten. Die Mäuse werden im Folgenden als 'IKK2^{ZNS KO}' bezeichnet.

Ein Western Blot mit einem für IKK2 spezifischen Antikörper zeigt das Expressionsmuster dieser Mäuse (Abb. 6.1A). Die Cre-negativen Wurfgeschwister (IKK2^{fl/fl} NestinCre⁻, im Folgenden als 'IKK2^{ZNS WT}' bezeichnet), die in sämtlichen Experimenten als Kontrollen dienten, weisen eine deutliche IKK2-Proteinexpression in allen untersuchten Gehirnregionen und Zelltypen auf. Im Kortex, der vor allem aus Neuronen besteht, in der oligodendrozytenreichen subkortikalen weißen Substanz und

in primären Astrozytenkulturen der $IKK^{ZNS\ KO}$ Tiere dagegen ist eine vollständige Deletion des IKK2-Proteins nachweisbar. Primäre Mikrogliazellen aus $IKK^{ZNS\ KO}$ Mäusen hingegen, welche mesodermalen und nicht neuroektodermalen Ursprungs sind, exprimieren eine zu den Kontrolltieren äquivalente Menge an IKK2-Protein.

Eine immunhistochemische Färbung der phosphorylierten NF- κ B Untereinheit p65 auf frontalen Schnitten des Corpus callosum Cuprizin-behandelter $IKK^{ZNS\ KO}$ und $IKK^{ZNS\ WT}$ Tiere zeigt, dass die Kerntranslokation von p65 in IKK2-deletierten Zellen tatsächlich blockiert ist (Abb. 6.1B): Während in Cre-negativen Kontrolltieren phosphoryliertes p65 in vielen der in Reihe angeordneten oligodendrozytären Zellkerne (Pfeile) zu finden ist, findet in IKK2-deletierten Oligodendrozyten (Pfeilspitzen) keine p65-Translokation statt. Zellen, welche anhand ihrer typischen Kernmorphologie als Mikroglia identifizierbar sind (*), sind von der Deletion nicht betroffen.

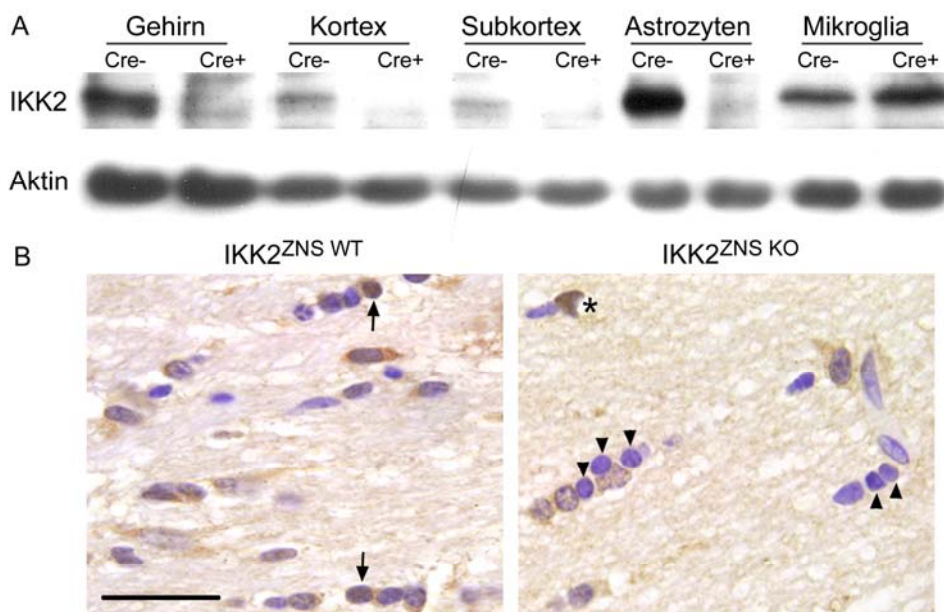


Abb. 6.1: Deletion von IKK2 im Gehirn der $IKK^{ZNS\ KO}$ Mäuse. A) Western Blot von Homogenaten aus Gehirn, Kortex, Subkortex, primären Astrozyten und primären Mikrogliazellen aus $IKK^{ZNS\ KO}$ und $IKK^{ZNS\ WT}$ Tieren. B) phospho-p65 immunhistochemische Färbung (braun) auf frontalen Gehirnschnitten Cuprizin-behandelter Kontroll- und $IKK^{ZNS\ KO}$ Mäuse. Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun (blau). Balken 25 μ m. Pfeile: p65 positive oligodendrozytäre Zellkerne; Pfeilspitzen: p65 negative oligodendrozytäre Zellkerne; *: Mikroglia-Zellkern.

6.1.2 Deletion von IKK2 in Oligodendrozyten

Die IKK2-gefloxten Tiere wurden für diese Arbeit zusätzlich mit Mäusen gekreuzt, welche die Cre-Rekombinase unter dem oligodendrozytenspezifischen MOG-Promotor exprimieren (Buch *et al.*, 2005). Diese Tiere werden im Folgenden als 'IKK2^{MOG KO}' bezeichnet. Als Kontrollen dienten wiederum die Cre-negativen Wurfgeschwister ('IKK2^{MOG WT}'). MOG ist ein spät exprimiertes Myelinprotein, dessen Promotor daher spezifisch für reife, myelinbildende Oligodendrozyten ist.

Zur Untersuchung der Spezifität des Promotors standen MOG-Cre exprimierende Rosa26-Reporterermäuse (R26R) zur Verfügung. Diese Mäuse weisen eine Cre-induzierte β -Galaktosidase (LacZ)-Expression auf. Eine XGal-Färbung auf frontalen Gehirnschnitten dieser Mäuse macht die Spezifität des MOG-Promotors für reife Oligodendrozyten sichtbar: Ein deutlich positives blaues Signal ist spezifisch in Zellen der weißen Substanz zu finden (Abb. 6.2A).

Das IKK2 Proteinexpressionsmuster der IKK2^{MOG KO} Mäuse ist in Abbildung 6.2B dargestellt: Astrozyten und Mikroglia der IKK2^{MOG KO} Mäuse exprimieren die gleiche Menge an IKK2-Protein wie die Cre-negativen Kontrolltiere. In primären IKK2^{MOG KO} Oligodendrozyten hingegen ist die Expression im Vergleich zu den Kontrolltieren stark vermindert. Die Restmenge an IKK2, die in den Homogenaten dennoch nachweisbar ist, liegt im Versuchsprotokoll begründet: primäre Vorläuferzellen wurden *in vitro* kultiviert, wobei keine vollständige Ausdifferenzierung aller Zellen erreicht wird. Von der Deletion sind jedoch nur reife, MOG-exprimierende Oligodendrozyten betroffen.

Eine Immunfärbung auf frontalen Gehirnschnitten von Cuprizin-behandelten IKK2^{MOG KO} Mäusen zeigt, dass die p65-Translokation in den Zellkern spezifisch in den kettenartig angeordneten Zellkernen (Pfeilspitzen) der Oligodendrozyten blockiert ist (Abb. 6.2C).

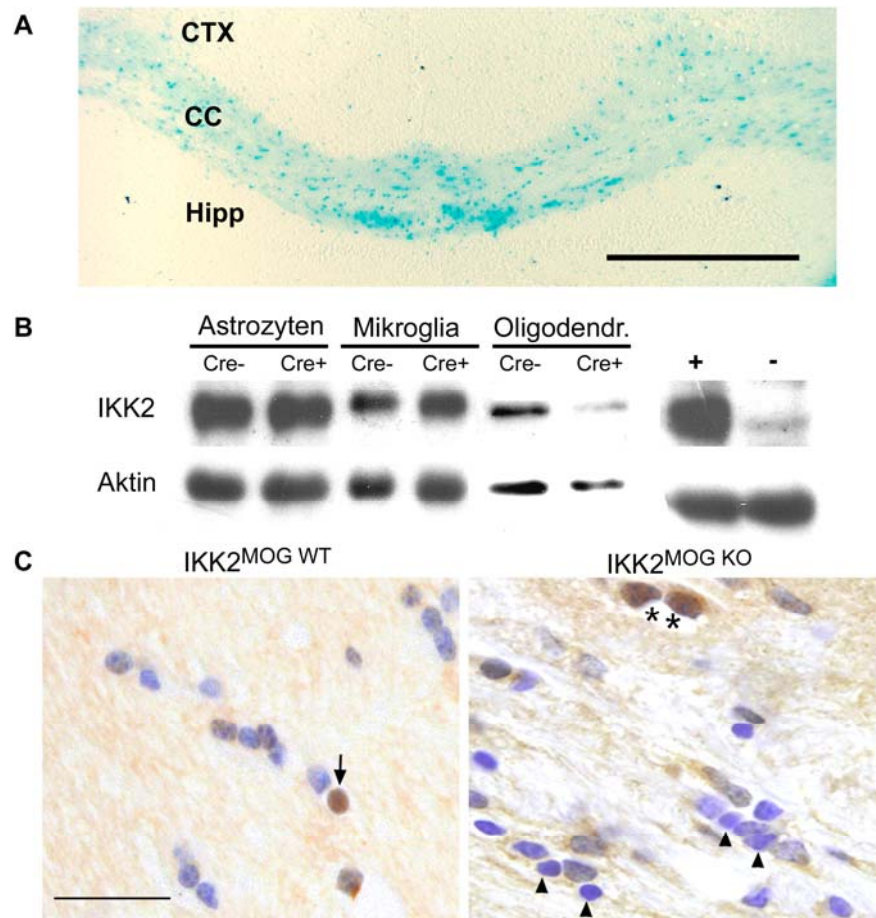


Abb. 6.2: Expression von IKK2 im Gehirn der $IKK2^{MOG\ KO}$ und $IKK2^{MOG\ WT}$ Mäuse. A) XGal-Färbung (blau) auf frontalen Gehirnschnitten von MOGiCre x R26R-Mäusen. CTX = Kortex, CC = Corpus callosum, Hipp = Hippocampus; Balken 500 μ m. B) Western Blot von Zellhomogenaten primärer Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten aus $IKK2^{MOG\ WT}$ und $IKK2^{MOG\ KO}$ Tieren. C) p65 immunhistochemische Färbung (braun) auf frontalen Gehirnschnitten Cuprizone-behandelter Kontroll- und $IKK2^{MOG\ KO}$ Mäuse. Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun (blau). Balken 25 μ m. Pfeile: p65 positive oligodendrozytäre Zellkerne; Pfeilspitzen: p65 negative oligodendrozytäre Zellkerne; *: Mikroglia-Zellkerne.

6.2 Die Rolle von IKK2 bei der Myelinisierung des ZNS

Da laut Literatur NF- κ B eine wichtige Funktion bei der Myelinisierung des sich entwickelnden peripheren Nervensystems (PNS) hat (Nickols *et al.*, 2003), wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst untersucht, ob die Aktivierung des kanonischen NF- κ B Signalweges auch eine Rolle bei der physiologischen Myelinisierung des murinen ZNS spielt. Zu diesem Zweck wurden die Differenzierung und Reifung IKK2-deletierter Oligodendrozyten *in vitro*, sowie die Myelinbildung während der Entwicklung von IKK2^{ZNS KO} Mäusen *in vivo* untersucht.

6.2.1 Unveränderte Entwicklung IKK2-defizienter Oligodendrozyten *in vitro*

Primäre IKK2-deletierte und WT Oligodendrozyten wurden aus neugeborenen IKK2^{ZNS KO} Mäusen und ihren IKK2^{ZNS WT} Wurfgeschwistern gewonnen und dann in Kultur drei Tage lang ausdifferenziert. Diese Zellen wurden anschließend mit unterschiedlichen Entwicklungsmarkern gefärbt: mit Antikörpern gegen NG2 (neuronal-gliales Antigen 2) für Vorläuferzellen, CNP (2'3'-zyklische-Nukleotid-3'-Phosphohydrolase) für differenzierte und MBP (Myelin-basisches Protein) für reife, myelinbildende Oligodendrozyten. Die Abbildung 6.3A zeigt, dass IKK2-deletierte Oligodendrozyten *in vitro* vollständig in der Lage sind zu differenzieren und auszureifen. Die Morphologie der reifen CNP⁺ MBP⁺ Zellen gleicht der IKK2-exprimierender Oligodendrozyten. Die quantitative Auswertung (Abb. 6.3B) verdeutlicht, dass auch der prozentuale Anteil der unter den gegebenen Kulturbedingungen ausgereiften IKK2-deletierten Oligodendrozyten unverändert gegenüber den Kontrollzellen ist.

Der IKK/NF- κ B Signalweg hat somit bei der *in vitro* Differenzierung und Reifung von Oligodendrozyten eine redundante Funktion.

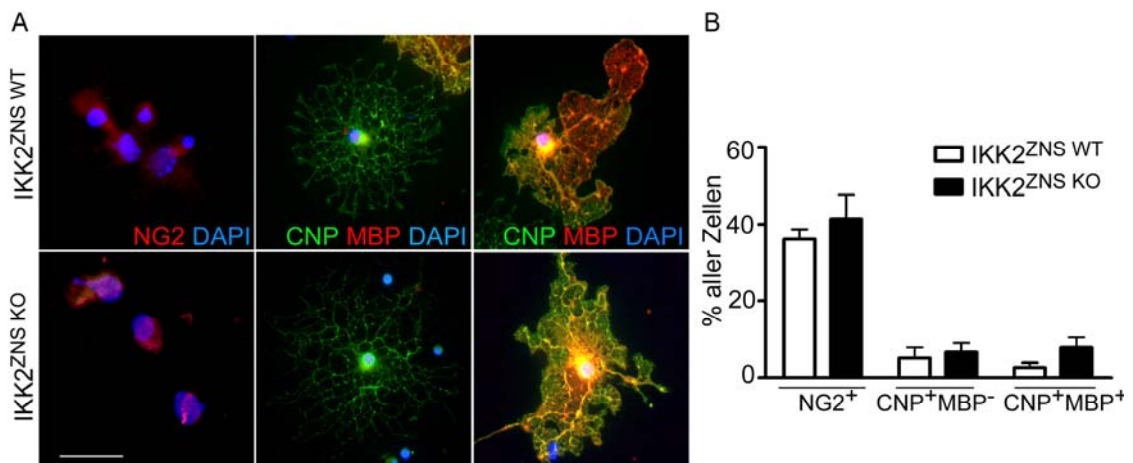


Abb. 6.3: Unveränderte *in vitro* Differenzierung IKK2-deletierter primärer Oligodendrozyten. A) Immunfluoreszenzfärbung von *in vitro* kultivierten, drei Tage differenzierten primären Oligodendrozyten von IKK2^{ZNS KO} und Kontrolltieren (P1). Balken 10 μ m. B) Quantifizierung der Färbung. Ausgezählt wurden sechs Gesichtsfelder in 20facher Vergrößerung. Gezeigt sind repräsentative Daten (Mittelwert \pm SEM) aus drei unabhängigen Versuchen.

6.2.2 Normale physiologische Myelinisierung des ZNS in Abwesenheit von IKK2 in Gehirnzellen

Die Fähigkeit der IKK2^{ZNS KO} Mäuse *in vivo* eine normal Myelinstruktur zu entwickeln, wurde anschließend vergleichend zu IKK2^{ZNS WT} Kontrolltieren immunhistochemisch und elektronenmikroskopisch untersucht.

Abbildung 6.4A zeigt immunhistochemisch Proteolipid Protein (PLP)-gefärbte frontale Gehirnschnitte von adulten IKK2^{ZNS KO} und Kontrollmäusen auf Höhe des rostralen Hippocampus. Diese weisen eine vergleichbar entwickelte Struktur der weißen Substanz auf, was auf eine normale physiologische Myelinisierung der IKK2 deletierten Mäuse im ZNS hinweist.

Um eine genaue Quantifizierung der Myelinbildung während der Entwicklung der Mäuse zu ermöglichen, wurden sagittale Dünnschnitte des Corpus callosum junger (postnataler Tag P21) und adulter Mäuse elektronenmikroskopisch ausgewertet (Abb. 6.4B). Nach drei Wochen sind die Axone in diesem Bereich in den IKK2^{ZNS KO} Tieren zu 29,3% (\pm 2,1% SEM) und in den IKK2^{ZNS WT} Tieren zu 26,0% (\pm 0,1%) myelinisiert. In adulten IKK2^{ZNS KO} Mäusen beträgt der Anteil myelinisierter Axone 72,6% (\pm 2,8%) im Vergleich zu 69,4% (\pm 13,4%) in adulten Kontrolltieren. In beiden

Stadien der Entwicklung ist also der Anteil der myelinisierten Axone im Bereich des Corpus callosum in Abwesenheit von IKK2 in den ZNS-Zellen unverändert. Die G-Ratio, der Quotient aus Axondurchmesser/ Faserdurchmesser, stellt ein Maß für den Grad der Myelinisierung einzelner Axone dar. Sie erreicht im Corpus callosum in gesunden adulten Mäusen einen Wert zwischen 0,75 und 0,85. Die G-Ratio in $IKK2^{ZNS\ ko}$ Mäusen beträgt nach 3 Wochen 0,94 und nach 20 Wochen 0,81 ($\pm 0,01$), im Vergleich zu 0,94 nach drei Wochen und 0,83 ($\pm 0,04$) nach 20 Wochen in den Kontrolltieren.

Zusammenfassend lässt sich *in vivo* kein Unterschied bzgl. der Myelinisierung zwischen $IKK2^{ZNS\ KO}$ Mäusen und ihren Cre-negativen Wurfgeschwistern feststellen. IKK2 weist daher eine redundante Funktion für die physiologische Myelinisierung des ZNS auf.

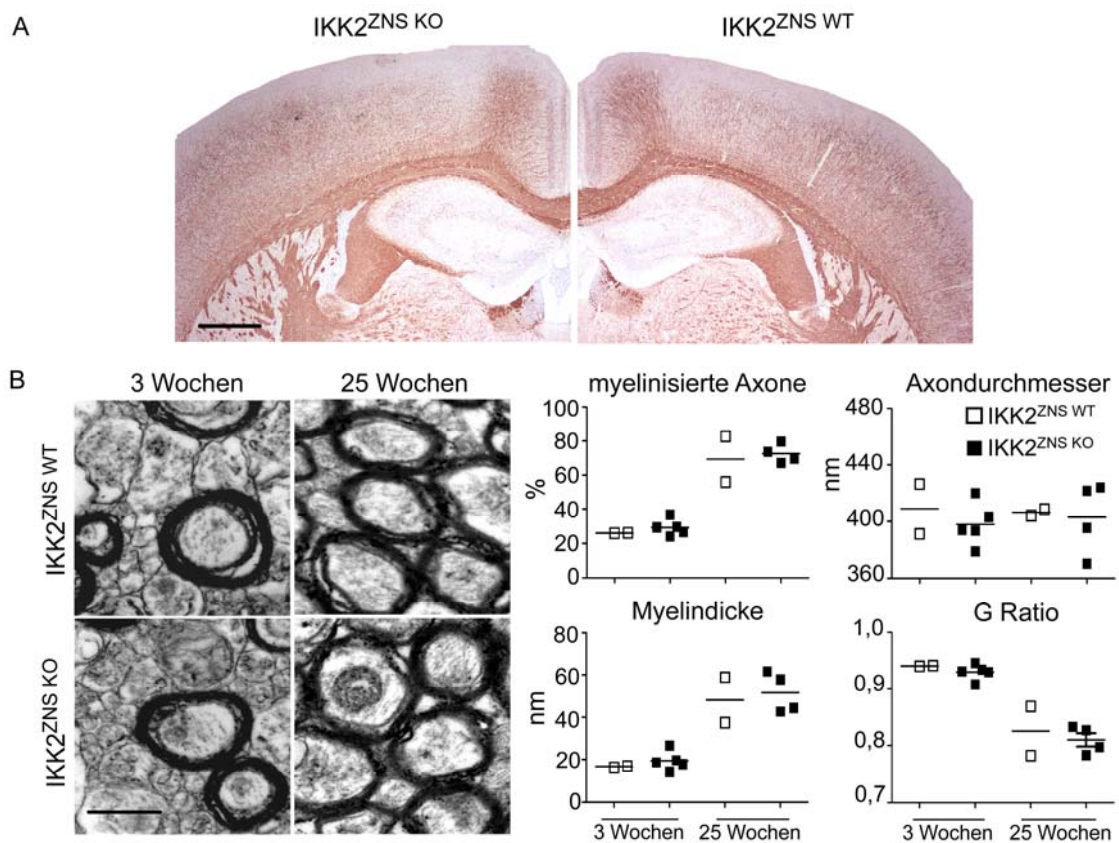


Abb. 6.4: Normale physiologische Myelinisierung des ZNS in Abwesenheit von IKK2. A) Immunhistochemische PLP Färbung (braun) auf frontalen Gehirnschnitten adulter $IKK2^{ZNS}$ – und Kontrollmäuse. Balken 500 μm . B) Elektronenmikroskopische Aufnahmen sagittaler Ultradünnschnitte des corpus callosums 3 Wochen und 25 Wochen alter $IKK2^{ZNS\ ko}$ - und Kontrollmäuse (links). Quantifizierung der Myelindicke, des Axondurchmessers, der G Ratio und des prozentualen Anteils myelinisierter Axone (rechts). Jeder Datenpunkt entspricht dem Durchschnittswert aus mindestens 150 Axonen einer Maus des angegebenen Alters. Berücksichtigt wurden Axone eines Durchmessers größer als 250 nm. Balken 400 nm.

6.3 Die Bedeutung von IKK2 im ZNS für die De- und Remyelinisierung

Um die Bedeutung des NF- κ B Signalweges für eine pathologische Demyelinisierung, wie sie unter anderem bei der Multiplen Sklerose vorkommt, zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Tiermodelle verwendet. Eine reversible toxische Demyelinisierung wurde im Corpus callosum ZNS-spezifisch IKK2-deletierter Mäuse durch Cuprizon oder im Rückenmark durch Lysolecithin induziert. Die entstehenden Läsionen in der Phase der Demyelinisierung bzw. der Grad der spontanen Remyelinisierung wurden histologisch untersucht und quantifiziert.

6.3.1 Reduzierte toxische Demyelinisierung in Abwesenheit von IKK2 im ZNS

Die Fütterung adulter Mäuse mit Cuprizon führt zu einer Demyelinisierung im ZNS, insbesondere in der Region des Corpus callosum. Diese Demyelinisierung beruht auf einem selektiven Absterben von Oligodendrozyten der weißen Substanz und wird von einer starken Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten begleitet. IKK2^{ZNS KO} Mäuse sowie ihre IKK2^{ZNS WT} Wurfgeschwister wurden entweder fünf Wochen (akute Phase der Demyelinisierung) oder zehn Wochen (chronische Phase) täglich mit 0,2% Cuprizon gefüttert.

6.3.1.1 Geringerer Myelinschaden während der akuten Phase der toxischen Demyelinisierung

Abbildung 6.5 zeigt eine Histologie der akuten Phase der Cuprizon-induzierten Demyelinisierung. Die LFB-PAS Färbung des Myelins verdeutlicht, dass die IKK2^{ZNS WT} Mäuse in dieser Phase eine starke Demyelinisierung im Corpus callosum aufweisen. Der Grad dieser Demyelinisierung wurde von zwei unabhängigen geblindeten Untersuchern auf einer Skala von 0 (intaktes Myelin) bis 3 (vollständig demyelinisiert) bewertet. Durchschnittlich erreichen die Mäuse dabei einen Demyelinisierungsgrad von 2,1 (\pm 0,2). Diese starke Demyelinisierung geht mit einer ausgeprägten Gliose durch MAC-3-positive Mikrogliazellen ($1564 \pm 188,8$ Zellen/mm²) und GFAP-positive Astrozyten ($472,0 \pm 24,9$ Zellen/mm²) einher. Die Demyelinisierung in den IKK2^{ZNS KO} Mäusen dagegen ist erheblich vermindert. Sie erreichen nur einen

Demyelinisierungsgrad von $1,0 (\pm 0,1)$, welcher signifikant ($p < 0,005$) von dem der Kontrollmäuse abweicht. Dieser prägnante Unterschied spiegelt sich auch in einer deutlich schwächeren Gliose wieder: nur durchschnittlich $218,7 (\pm 35)$ infiltrierende MAC3^+ Mikroglia/ mm^2 und $98,7 (\pm 20,2)$ GFAP^+ Astrozyten/ mm^2 sind in den Läsionen dieser Mäuse zu finden. Dieser Unterschied ist hoch signifikant ($p < 0,001$).

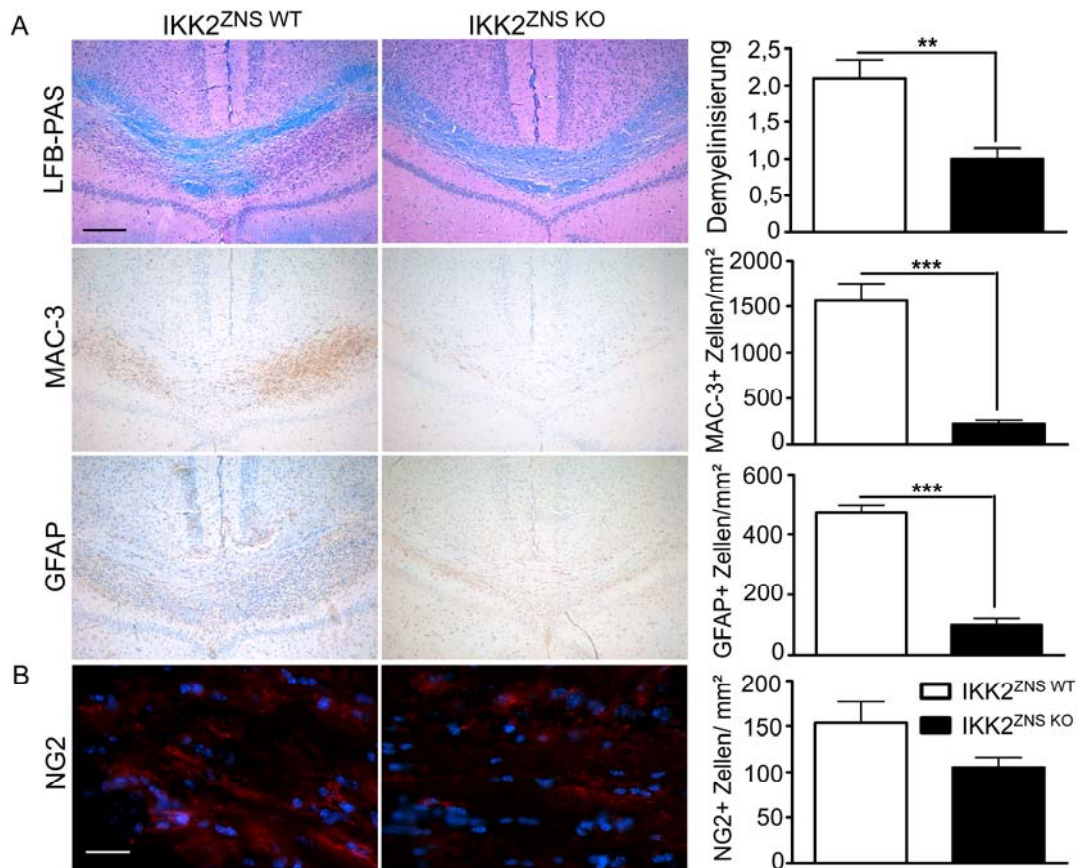


Abb. 6.5: Geringere Demyelinisierung und Gliose während der akuten Demyelinisierung in $\text{IKK2}^{\text{ZNS KO}}$ Mäusen. A) Immunhistochemische Färbung für MAC-3 (braun) bzw. GFAP (braun) und Luxolfastblue (LFB)-Färbung (blau) auf frontalen Schnitten des Corpus callosum fünf Wochen Cuprizone-behandelter $\text{IKK2}^{\text{ZNS WT}}$ und $\text{IKK2}^{\text{ZNS KO}}$ Mäuse mit Quantifizierung. Zellzahlen wurden in je drei Gesichtsfeldern in 40 facher Vergrößerung bestimmt. Gezeigt sind repräsentative Daten (Mittelwert \pm SEM) aus einem von zwei Experimenten mit jeweils mindestens fünf Tieren pro Gruppe. Balken 300 μm . ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. B) Immunfluoreszenzfärbung auf NG2^+ Zellen (rot) auf frontalen Gehirnschnitten fünf Wochen Cuprizone-behandelter Mäuse. Zellkerne sind blau gefärbt (DAPI). Ausgezählt wurden von zwei Mäusen pro Gruppe je fünf Gesichtsfelder in 20 facher Vergrößerung. Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM. Balken 30 μm .

NG2 ist ein Marker für Vorläuferzellen, die zu neuen myelinbildenden Oligodendrozyten ausreifen können. Ein vermehrtes Auftreten dieser Vorläuferzellen ist bei einer beginnenden Remyelinisierung zu beobachten. In den $IKK2^{ZNS\ KO}$ Mäusen, die kaum Demyelinisierung aufweisen, ist nur eine vergleichbar geringe Anzahl NG2-positiver Zellen im Corpus callosum detektierbar (Abb. 6.5B): $105,5 (\pm 10,8)$ Zellen/ mm^2 im Vergleich zu $153,8 (\pm 17,3)$ Zellen/ mm^2 in den Kontrolltieren.

Die genetische Inhibition des IKK/NF- κ B Signalweges im ZNS schützt die Mäuse deutlich vor der Cuprizone-induzierten toxischen Demyelinisierung und hemmt die begleitende Infiltration durch gehirneigene Immunzellen.

6.3.1.2 Myelinprotektive Funktion von IKK2 während der chronischen Demyelinisierungsphase

Die $IKK2^{ZNS\ KO}$ Mäuse bleiben auch in der chronischen Phase der Cuprizone-induzierten Demyelinisierung, nach zehn Wochen Fütterung, geschützt (Abb. 6.6). Während die Demyelinisierung in den Kontrollmäusen im Verhältnis zur akuten Phase noch weiter voranschreitet (Grad $2,5 \pm 0,3$), bleiben die schwächeren Läsionen der $IKK2^{ZNS\ KO}$ Mäuse konstant (Grad $1,1 \pm 0,2$; $p < 0,01$). Anders verhält es sich bezüglich der begleitenden Gliose: In den stärker von der Demyelinisierung betroffenen $IKK2^{ZNS\ WT}$ Mäusen nimmt die Reaktion in der chronischen Phase ab ($1077,3 \pm 214,1$ MAC-3⁺ Zellen/ mm^2 , $421,3 \pm 18,9$ GFAP⁺ Zellen/ mm^2). In den geschützten $IKK2^{ZNS\ KO}$ Mäusen, die in der akuten Phase kaum aktivierte gliale Zellen aufweisen, findet man in diesem Krankheitsstadium $1069,3 (\pm 90,5)$ MAC3⁺ Zellen/ mm^2 und $343,1 (\pm 46,0)$ GFAP⁺ Zellen/ mm^2 . $IKK2^{ZNS\ WT}$ und $IKK2^{ZNS\ KO}$ Mäuse weisen dadurch in dieser Phase der toxischen Demyelinisierung ein vergleichbar niedriges Ausmaß an glialer Aktivierung auf.

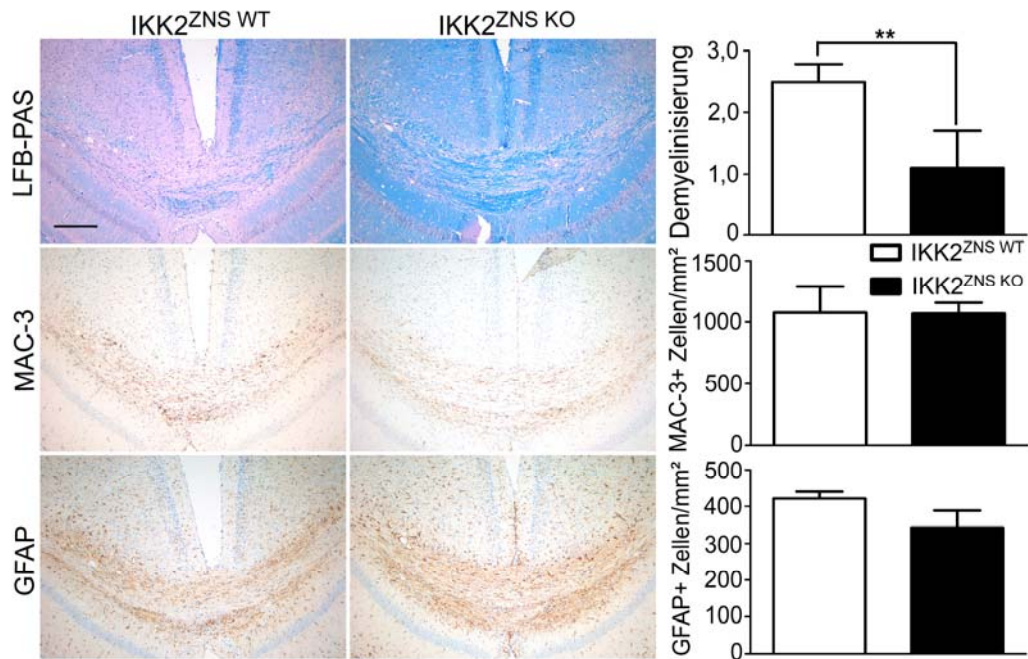


Abb. 6.6: Myelinerhalt während chronischer Demyelinisierung in IKK2^{ZNS KO} Tieren. Immunohistochemische Färbung auf frontalen Schnitten des Corpus callosum zehn Wochen Cuprizon-behandelter IKK2^{ZNS WT} und IKK2^{ZNS KO} Mäuse mit Quantifizierung. Zellzahlen wurden in je drei Gesichtsfeldern in 40 facher Vergrößerung bestimmt. Gezeigt sind repräsentative Daten (Mittelwert ± SEM) aus einem von zwei Experimenten mit jeweils mindestens fünf Tieren pro Gruppe. Balken 300 µm. ** p<0,01.

Die elektronenmikroskopische Analyse der Läsionen im Corpus callosum veranschaulicht den prägnanten Unterschied zwischen IKK2^{ZNS KO} und Kontrollmäusen in der chronischen Phase der Cuprizon-Verfütterung und erlaubt eine noch exaktere quantitative Einschätzung der Demyelinisierung (Abb. 6.7).

Nur wenige Axone bleiben in den zehn Wochen Cuprizon-behandelten IKK2^{ZNS WT} Mäusen myelinisiert (20,3% ± 7,1%). Die Cuprizon-behandelten IKK2^{ZNS KO} Mäuse dagegen unterscheiden sich mit zu 62,9% (± 4,2%) myelinisierten Axonen kaum von ihren unbehandelten Wurfgeschwistern (66,6% ± 1,1%).

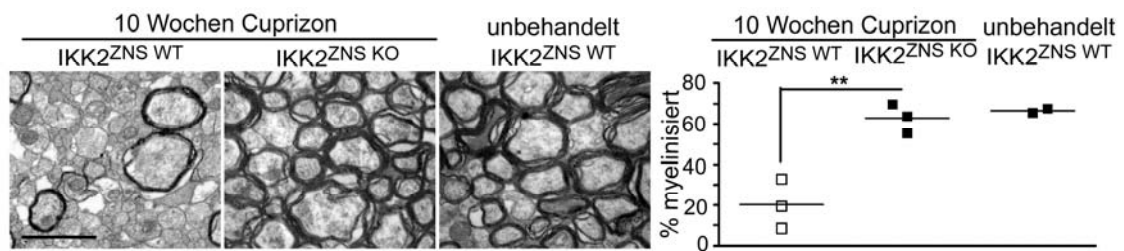


Abb. 6.7: Geringerer Myelinverlust während chronischer Demyelinisierung in $IKK2^{ZNS\ KO}$ Mäusen (Elektronenmikroskopie). Ultradünnschnitte des Corpus callosum von zehn Wochen Cuprizon-behandelten und von unbehandelten Mäusen. Der Anteil myelinisierter Axone wurde quantifiziert (rechts). Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert von mindestens 150 Axonen aus einer Maus dar. Berücksichtigt wurden Axone eines Durchmessers größer als 250 nm. Balken 400 nm. ** $p < 0,01$.

6.3.1.3 Inhibierte Zytokininduktion während toxischer Demyelinisierung in Abwesenheit von IKK2 im ZNS

Sowohl Zelltod als auch gliale Reaktion sind Prozesse, die durch proinflammatorische Zytokine und durch Chemokine reguliert werden. Um die Regulation bestimmter myelintoxischer und proinflammatorischer Zyto- und Chemokine während der induzierten Demyelinisierung in $IKK2^{ZNS\ KO}$ und $IKK2^{ZNS\ WT}$ Mäusen zu untersuchen, wurde eine Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Realtime-PCR an *ex vivo* isolierten Corpora callosa durchgeführt.

In den Cuprizon-behandelten $IKK2^{ZNS\ WT}$ Mäusen findet man im Vergleich zu unbehandelten Tieren eine vielfach erhöhte Induktion von inflammatorischen Zytokinen wie $TNF\alpha$ (2,5 fach erhöht) und $IL-1\beta$ (16,8 fach) und von Chemokinen wie CXCL10 (23,1 fach), CCL2 (8,6 fach) und CCL3 (10,6 fach) im Corpus callosum (Abb. 6.8). Dagegen geht die verminderte Demyelinisierung und gliale Reaktion in den Cuprizon-behandelten $IKK2^{ZNS\ KO}$ Mäusen mit einer deutlich schwächeren Zytokinantwort einher. In den $IKK2^{ZNS\ KO}$ Tieren ist die Induktion proinflammatorischer Zytokine signifikant verringert ($TNF\alpha$ 1,1 fach erhöht; $IL-1\beta$ 1,9 fach). Zudem werden in diesen Mäusen die Chemokine CXCL10, CCL2 und CCL3 tendenziell schwächer induziert.

$IKK2^{ZNS\ KO}$ Mäuse zeigen somit während der toxischen Demyelinisierung durch Cuprizon eine deutlich schwächere Zytokinantwort im Corpus callosum im Vergleich zu den Kontrolltieren.

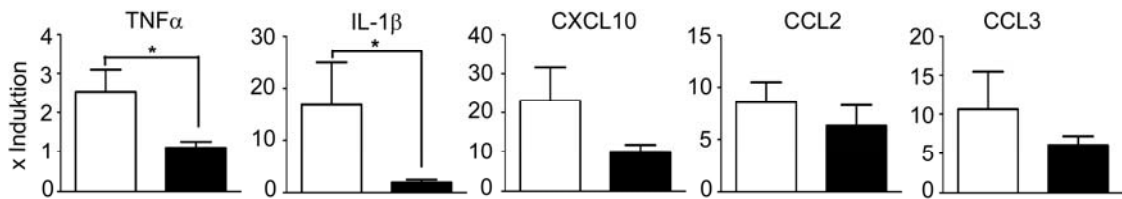


Abb. 6.8: Reduzierte Expression selektiver Zytokine und Chemokine im Corpus callosum Cuprizon-behandelter IKK2^{ZNS}KO Mäuse. RTQ-PCR von aus dem Corpus callosum fünf Wochen Cuprizon-behandelter IKK2^{ZNS}KO und Kontrollmäuse gewonnener RNA. Die Zytokinexpression ist normalisiert auf die Expression von GAPDH. Dargestellt ist die Induktion im Vergleich zu unbehandelten IKK2^{ZNS}WT Mäusen. * p<0,05.

6.3.2 Normale Remyelinisierung in Abwesenheit von IKK2 im ZNS

Die durch Cuprizon-Verfütterung induzierte toxische Demyelinisierung ist ein reversibler Prozess. Wird nach mehrwöchiger Behandlung die Cuprizon-Verfütterung eingestellt, so findet eine spontane Remyelinisierung durch neu ausdifferenzierte Oligodendrozyten statt. Um die Remyelinisierung in IKK2^{ZNS}KO Mäusen mit der in IKK2^{ZNS}WT Mäusen zu vergleichen, ist jedoch eine vergleichbare Ausgangssituation nötig. Diese ist durch die Protektion der IKK2^{ZNS}KO Mäuse im Cuprizon-Modell nicht gegeben.

Ein alternatives, ebenfalls reversibles Modell der toxischen Demyelinisierung ist die lokale Injektion von LPC in das Rückenmark. Während die Axone im gesunden murinen IKK2^{ZNS}WT Rückenmark zu durchschnittlich 73,6% \pm 4,0% myelinisiert sind, bewirkt eine LPC-Injektion bereits nach vier Tagen eine deutliche Degeneration des Myelins (Abb.6.9A): in der betroffenen Region der IKK2^{ZNS}WT Kontrollmäuse sind nur noch 15,0% (\pm 3,3%) der Axone myelinisiert. Die IKK2^{ZNS}KO Mäuse weisen mit 10,6% (\pm 2,8%) myelinisierten Axonen einen ähnlichen Schweregrad auf.

Die LPC-induzierte toxische Demyelinisierung ist also von der Aktivierung des IKK/NF- κ B Signalweges in ZNS-Zellen unabhängig. Dieses Modell erweist sich damit als geeignet zur Untersuchung der spontanen Remyelinisierung in den IKK2^{ZNS}KO Mäusen.

Die Remyelinisierung in IKK2^{ZNS}WT und IKK2^{ZNS}KO Mäusen wurde 14 Tage nach LPC-Injektion elektronenmikroskopisch ausgewertet (Abb. 6.9B). Zu diesem Zeitpunkt ist ein großer Teil der demyelinisierten Axone wieder remyelinisiert: 41,0% (\pm 3,3%) der Axone in den IKK2^{ZNS}WT und 48,0% (\pm 5,6%) in den IKK2^{ZNS}KO Mäusen. Die IKK2-

deletierten Mäuse unterscheiden sich dabei kaum von den Kontrolltieren. Auch die Dicke der neugebildeten Myelinschicht ist in den IKK2-deletierten und IKK2-kompetenten Mäusen ähnlich: die G-Ratio der Axone in der betroffenen Region beträgt unabhängig vom Genotyp durchschnittlich $0,93 (\pm 0,01)$.

Diese Daten zeigen, dass eine Deletion von IKK2 in ZNS-Zellen keinen Einfluß auf die spontane Remyelinisierung nach einer lokalen LPC-induzierten Demyelinisierungsläsion im ZNS hat.

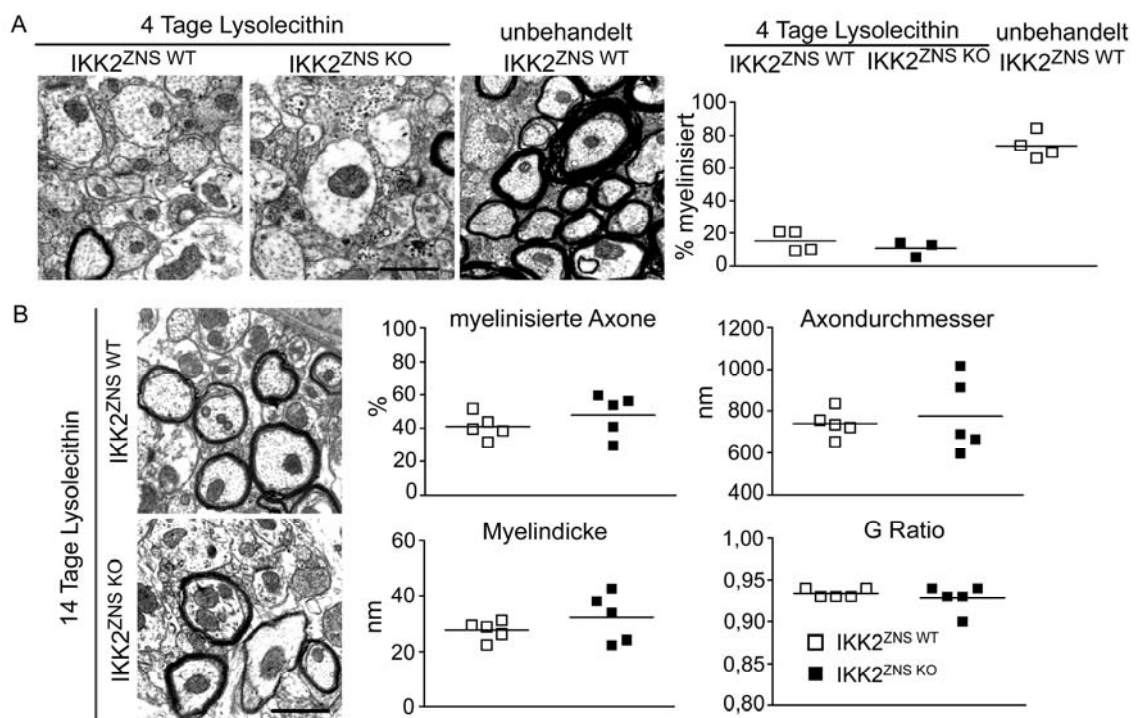


Abb. 6.9.: Normale Remyelinisierung in Abwesenheit von IKK2 im ZNS. A) Elektronenmikroskopische Aufnahmen transversaler Ultradünnschnitte des Rückenmarks adulter IKK2^{ZNS KO} und Kontrollmäuse vier Tage nach LPC-Injektion und unbehandelt. Quantifizierung des Anteils myelinisierter Axone (rechts). B) Elektronenmikroskopische Aufnahmen transversaler Ultradünnschnitte des Rückenmarks adulter IKK2^{ZNS KO} und Kontrollmäuse 14 Tage nach LPC-Injektion. Quantifizierung des Anteils myelinisierter Axone, des Axondurchmessers, der Myelindicke und der G-Ratio (rechts). Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert von mindestens 150 Axonen aus einer Maus dar. Berücksichtigt wurden Axone eines Durchmessers größer als 300 nm. Balken 1 μ m.

6.4 De- und Remyelinisierung in Abwesenheit von IKK2 in Oligodendrozyten

Für den protektiven Effekt der Nestin-Cre vermittelten IKK2-Deletion bei der toxischen Demyelinisierung können, aufgrund der Zellspezifität des Promotors, nur Zellen neuroektodermalen Ursprungs verantwortlich sein. Da der Cuprizon-induzierte Schaden spezifisch Oligodendrozyten betrifft, wurde hier der Effekt einer Oligodendrozyten-spezifischen IKK2-Deletion auf die Demyelinisierung und Remyelinisierung untersucht.

6.4.1 Unveränderte toxische Demyelinisierung in Abwesenheit von IKK2 in Oligodendrozyten

Anders als $IKK2^{ZNS\ KO}$ Mäuse zeigen Mäuse mit einer auf reife Oligodendrozyten beschränkten IKK2-Deletion ($IKK2^{MOG\ KO}$) nach fünf Wochen Cuprizon-Behandlung eine stark ausgeprägte Demyelinisierung im Corpus callosum (Abb. 6.10A). Der durch LFB-PAS-Färbung detektierte Myelinverlust erreicht in den $IKK2^{MOG\ KO}$ Mäusen einen Demyelinisierungsgrad $2,4 (\pm 0,2)$, der sich kaum von dem der $IKK2^{MOG\ WT}$ Wurfgeschwister (Grad $2,6 \pm 0,2$) unterscheidet. Diese Demyelinisierung wird zudem begleitet von einer Gliose durch $4130,0 (\pm 690,3)$ $MAC-3^+$ Mikroglia/mm² und $186,6 (\pm 44,1)$ $GFAP^+$ Astrozyten/mm², welche mit der in den Kontrolltieren ($3701,0 \pm 745,7$ $MAC3^+$ Zellen/mm² und $155,7 \pm 11,8$ $GFAP^+$ Zellen/mm²) vergleichbar ist. Eine Deletion von IKK2 in reifen Oligodendrozyten hat also keine Auswirkung auf die Cuprizon-induzierte toxische Demyelinisierung: Der kanonische NF- κ B Signalweg in diesen Zellen spielt folglich keine essentielle Rolle bei diesem Prozess.

Ein frühes Zeichen für eine beginnende Remyelinisierung ist, wie bereits erwähnt, ein vermehrtes Auftreten von NG2-positiven Vorläuferzellen in der von der Demyelinisierung betroffenen Region. Im demyelinisierten Corpus callosum der fünf Wochen Cuprizon-behandelten $IKK2^{MOG\ KO}$ Mäuse lassen sich $115,33 (\pm 13,1)$ $NG2^+$ Zellen/mm² detektieren, unwesentlich mehr als in den $IKK2^{MOG\ WT}$ Kontrollmäusen ($79,6 \pm 5,26$ $NG2^+$ Zellen/mm²). Diese Daten (Abb. 6.10B) deuten nicht auf einen Unterschied zwischen $IKK2^{MOG\ KO}$ und $IKK2^{MOG\ WT}$ Mäusen bezüglich der frühen Remyelinisierung hin.

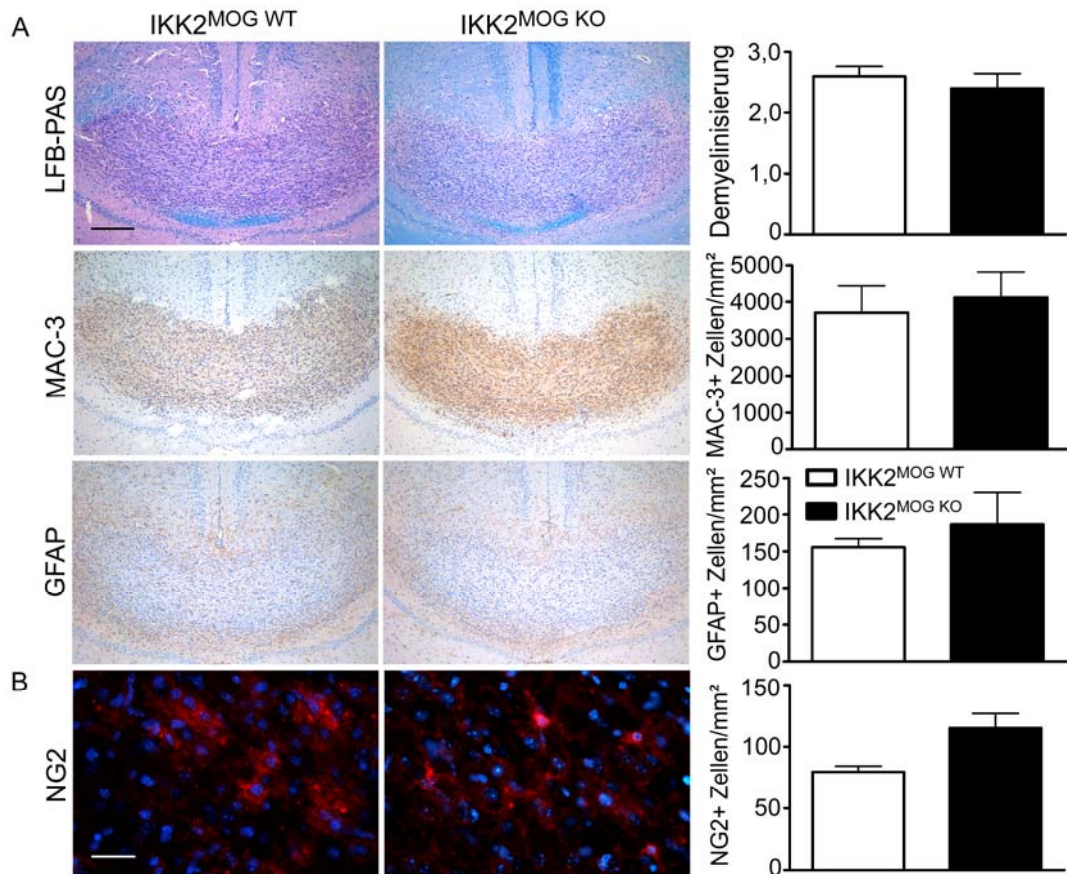


Abb. 6.10: Vergleichbarer Myelinverlust und ähnliche Gliose während der akuten toxischen Demyelinisierung in IKK2^{MOG KO} und IKK2^{MOG WT} Mäusen. A) Immunhistochemische Färbung von frontalen Schnitten des Corpus callosum fünf Wochen Cuprizone-behandelter IKK2^{MOG WT} und IKK2^{MOG KO} Mäuse mit Quantifizierung. Zellzahlen wurden in je drei Gesichtsfeldern in 40 facher Vergrößerung bestimmt. Gezeigt sind repräsentative Daten (Mittelwert ± SEM; n>5) aus einem von zwei unabhängigen Experimenten. Balken 300 µm. B) Immunfluoreszenzfärbung auf NG2⁺ Zellen (rot) auf frontalen Gehirnschnitten fünf Wochen Cuprizone-behandelter Mäuse. Zellkerne sind blau gefärbt (DAPI). Quantitativ ausgewertet wurden von zwei Mäusen pro Gruppe je fünf Gesichtsfelder in 20 facher Vergrößerung. Daten sind angegeben als Mittelwert ± SEM. Balken 30 µm.

6.4.2 Normale Remyelinisierung in Abwesenheit oligodendrozytärer IKK2

Um die Fähigkeit zur spontanen Remyelinisierung der im Corpus callosum demyelinisierten IKK2^{MOG KO} Tiere zu untersuchen, wurde in der akuten Phase die Cuprizone-Verfütterung eingestellt, und die Tiere wurden zur Regeneration weitere fünf Wochen unter normalen Haltungsbedingungen und mit Normalfutter gehalten.

Die Histologie nach fünf Wochen Normalfutter (Abbildung 6.11.) zeigt, dass nun sowohl die IKK2^{MOG WT} als auch die IKK2^{MOG KO} Mäuse eine deutlich verbesserte Myelinstruktur

im Corpus callosum aufweisen. Während beide Gruppen in der akuten Phase der Behandlung im Corpus callosum eine Demyelinisierung von über 2/3 der Fläche (Demyelinisierungsgrad $> 2,0$) aufwiesen, geht diese nach der fünföchigen Regenerationsphase auf einen Demyelinisierungsgrad von $1,3 (\pm 0,2; IKK2^{MOG KO})$ bzw. $1,4 (\pm 0,3; IKK2^{MOG WT})$ zurück. Die Remyelinisierung bewirkt zudem eine deutliche Verminderung der glialen Aktivierung in der Region: Nur noch $137,6 (\pm 16,0; IKK2^{MOG KO})$ bzw. $191,0 (\pm 31,9; IKK2^{MOG WT})$ MAC3⁺ Mikroglia/mm² und $223,0 (\pm 50,9; IKK2^{MOG KO})$ bzw. $179,8 (\pm 18,6; IKK2^{MOG WT})$ GFAP⁺ Astrozyten/mm² sind in der Phase der Remyelinisierung detektierbar. Diese Daten verdeutlichen, dass weder die spontane Remyelinisierung noch der begleitende Rückgang der Gliose durch die oligodendrozytäre IKK2-Deletion offensichtlich beeinflusst sind.

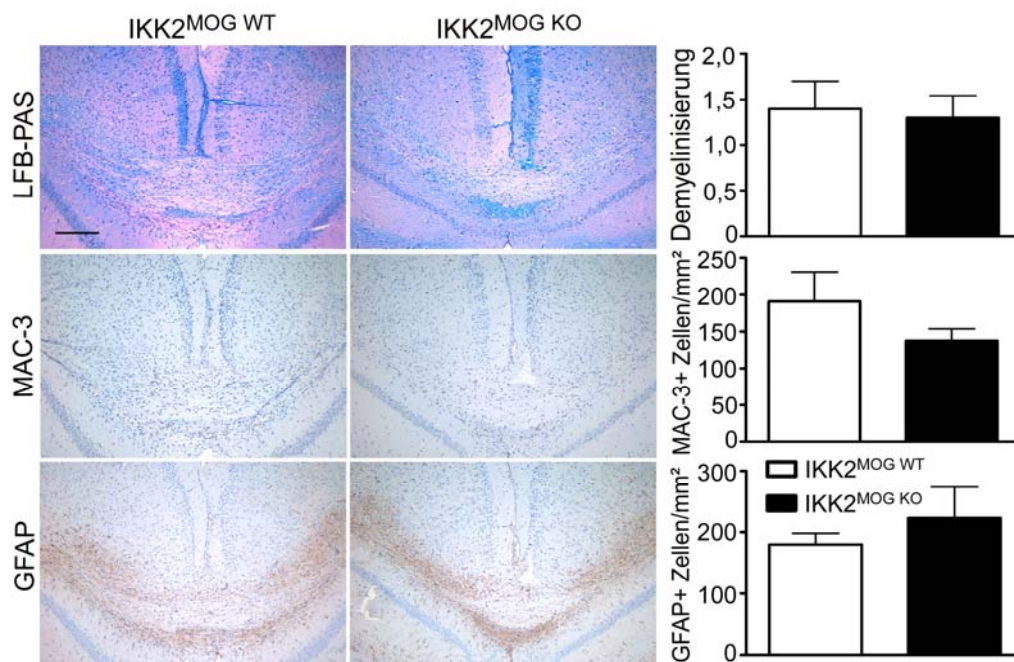


Abb. 6.11: Vergleichbare spontane Remyelinisierung in IKK2^{MOG KO} und IKK2^{MOG WT} Mäusen. Immunhistochemische Färbung auf frontalen Schnitten des Corpus callosum von IKK2^{MOG WT} und IKK2^{MOG KO} Mäusen nach fünf Wochen Cuprizon-Behandlung und darauffolgender fünföchiger Erholphase mit Quantifizierung. Zellzahlen wurden in je drei Gesichtsfeldern in 40 facher Vergrößerung bestimmt. Gezeigt sind repräsentative Daten (Mittelwert \pm SEM; $n > 5$) aus einem von zwei Experimenten. Balken 300 μ m.

Eine elektronenmikroskopische Quantifizierung der spontanen Remyelinisierung auf der Ebene einzelner Axone ist in Abbildung 6.12 gezeigt. Unabhängig vom Genotyp sind die Axone zum Großteil wieder von einer intakten Myelinschicht umgeben: zu $57,3\% (\pm 2,1\%; IKK2^{MOG WT})$ bzw. $54,1\% (\pm 4,1\%; IKK2^{MOG KO})$. Die Myelinschicht ist mit

durchschnittlich $40,7 (\pm 2,0 \text{ nm}; \text{IKK2}^{\text{MOG WT}})$ bzw. $37,7 (\pm 1,5 \text{ nm}; \text{IKK2}^{\text{MOG KO}})$ etwas dünner als in unbehandelten adulten Mäusen ($48,8 \pm 10,8 \text{ nm}$, vgl. Abb. 6.3). Die G-Ratio, das Verhältnis von Axondurchmesser zu Faserdicke, ist bei der Remyelinisierung mit durchschnittlich $0,86 (\pm 0,01; \text{IKK2}^{\text{MOG WT}}$ und $\text{IKK2}^{\text{MOG KO}})$ höher als bei unbehandelten adulten Mäusen mit unbeschädigtem Myelin ($0,83 \pm 0,04$), jedoch niedriger als bei jungen erst im Prozess der Myelinisierung befindlichen Mäusen ($0,94 \pm 0,00$; vgl. Abb. 6.3). Dieser Wert erlaubt damit die Unterscheidung remyelinisierender Axone von solchen, die nicht demyelinisiert wurden. Die Daten bestätigen, dass eine Deletion von IKK2 in Oligodendrozyten keinen Einfluss auf die spontane Remyelinisierung hat.

Weder die toxische Demyelinisierung noch die spontane Remyelinisierung sind damit abhängig von der Aktivierung des NF- κ B Signalweges in Oligodendrozyten.

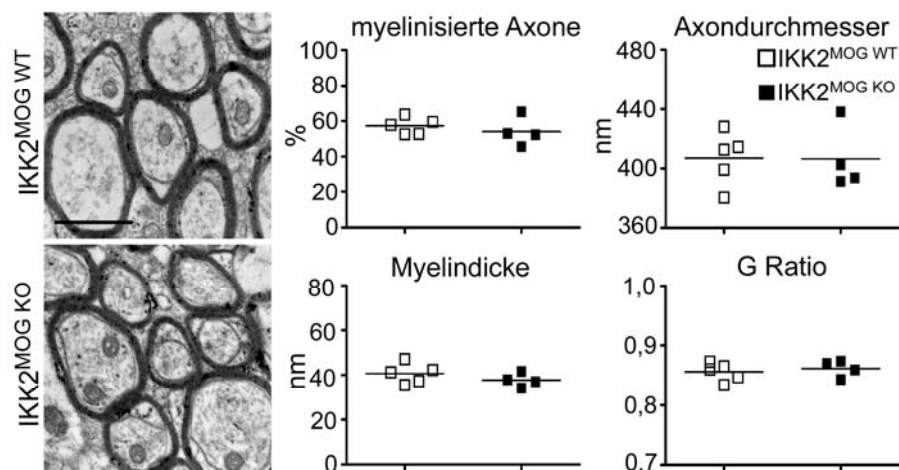


Abb. 6.12: Normale Remyelinisierung in $\text{IKK2}^{\text{MOG KO}}$ Mäusen (Elektronenmikroskopie). Elektronenmikroskopische Aufnahmen sagittaler Ultradünnschnitte des corpus callosums adulter $\text{IKK2}^{\text{MOG KO}}$ - und Kontrollmäuse nach fünf Wochen Cuprizon-Fütterung und fünf Wochen Regeneration (links). Quantifizierung der Myelindicke, des Axondurchmessers, der G-Ratio und des prozentualen Anteils myelinisierter Axone (rechts). Jeder Datenpunkt entspricht dem Durchschnittswert aus mindestens 150 Axonen einer Maus. Berücksichtigt wurden Axone eines Durchmessers größer als 250 nm. Balken 400 nm.

6.4.3 Unveränderte autoimmune Demyelinisierung in Abwesenheit von IKK2 in Oligodendrozyten

Als ein weiteres Modell, welches die pathologische Demyelinisierung simuliert, wurde die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) verwendet. Bei diesem immunvermittelten Modell wird die Zerstörung von Oligodendrozyten durch MOG-spezifische T-Lymphozyten eingeleitet.

IKK2^{MOG KO} Mäuse und ihre IKK2^{MOG WT} Wurfgeschwister wurden im Alter von 8-10 Wochen mit einem synthetischen MOG-Peptid immunisiert. Durch zusätzliche Verabreichung von Pertussistoxin (PTX) wurde die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke für die aktivierten Lymphozyten erhöht. Die Tiere entwickelten mit einer Inzidenz von 70% ab dem 13. Tag nach Immunisierung zunehmende klinische Symptome der Paralyse in den hinteren Extremitäten, mit einem durchschnittlichen maximalen Score (vgl. 5.4.2) von 1,9 ($\pm 0,4$; IKK2^{MOG WT}) bzw. 2,2 ($\pm 0,4$; IKK2^{MOG KO}) die ab Tag 20 nach Immunisierung in eine remittierende und dann chronische Verlaufsform übergingen. Der Versuch wurde an Tag 30 nach Immunisierung beendet, mit einem durchschnittlichen klinischen Score der Mäuse von 1,6 ($\pm 0,5$; IKK2^{MOG WT}) bzw. 1,2 ($\pm 0,3$; IKK2^{MOG KO}). Bezüglich der neurologischen Symptome im Krankheitsverlauf unterschieden sich die oligodendrozytär IKK2-deletierten Tiere nicht von ihren WT Wurfgeschwistern.

In Abbildung 6.13 ist eine Histologie der erkrankten Tiere, 30 Tage nach Immunisierung, dargestellt. Anhand einer LFB-PAS-Färbung wurde zunächst die Ausdehnung der Läsionen im Rückenmark der immunisierten Mäuse bestimmt, dargestellt als Verhältnis demyelinisierter Fläche zu Gesamtfläche der weißen Substanz. Die Rückenmarksschnitte der IKK2^{MOG KO} Mäuse weisen eine durchschnittlich zu 17,1% ($\pm 6,9\%$) demyelinisierte weiße Substanz auf, vergleichbar mit der zu 21,0% ($\pm 10,1\%$) demyelinisierten weißen Substanz der Kontrolltiere. Als zusätzlichen Maßstab der Myelinzerstörung wurde die Anzahl degeneriertes Myelin (dMBP) inkorporierender Zellen in den Läsionen gezählt. Mit 15,3 ($\pm 3,2$) dMBP⁺ Zellen/mm² unterscheiden sich die IKK2^{MOG KO} Mäuse auch hier nicht von den IKK2^{MOG WT} Kontrolltieren, welche 13,9 ($\pm 5,8$) dMBP⁺ Zellen/mm² aufweisen. In der Anzahl infiltrierender MAC-3⁺ Makrophagen in den Läsionen von IKK2^{MOG KO} (156,7 \pm 61,5 Zellen/mm²) und IKK2^{MOG WT} Tieren (213,6 \pm 152,6 Zellen/mm²) ist ebenfalls kein Unterschied festzustellen.

Auf die MOG-induzierte EAE ist folglich ebenso wenig ein Einfluss der oligodendrozytären IKK/NF- κ B Aktivierung feststellbar wie auf die toxische Demyelinisierung.

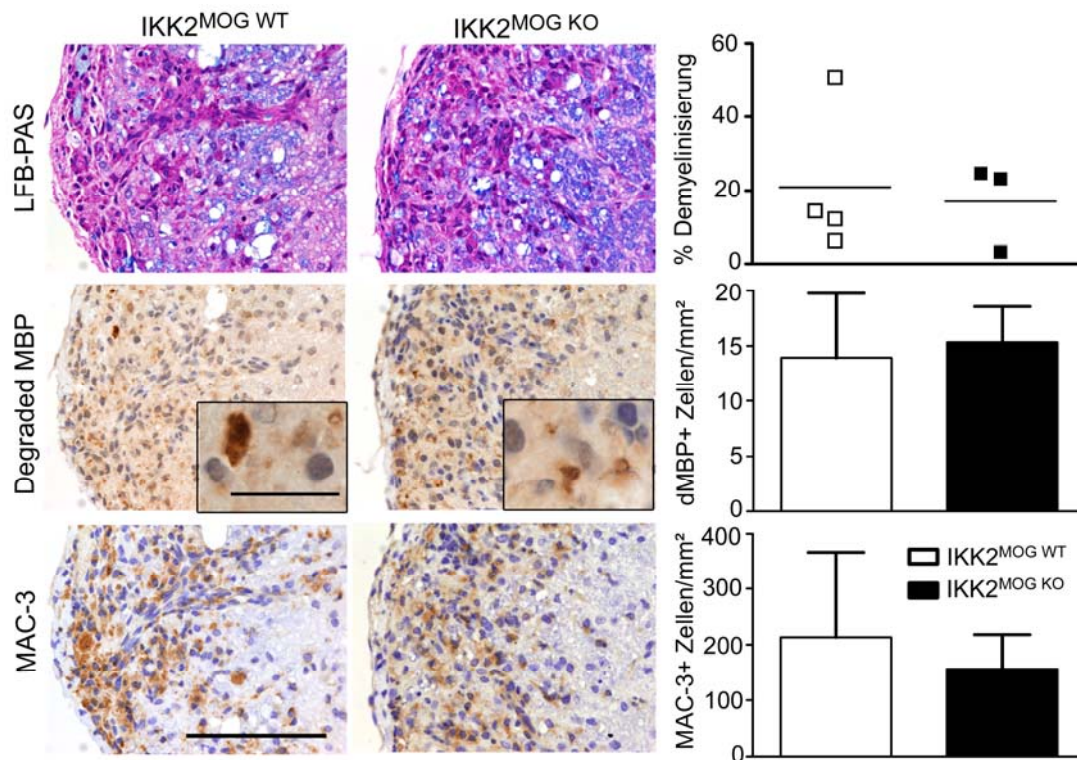


Abb. 6.13: Unveränderte Demyelinisierung und Gliose während der EAE in $IKK2^{MOG\ KO}$ Mäusen. LFB-PAS Färbung und Immunhistochemie mit spezifischen Antikörpern für degeneriertes MBP (dMBP) und MAC-3 auf horizontalen Schnitten des Rückenmarks von $IKK2^{MOG\ WT}$ und $IKK2^{MOG\ KO}$ Mäusen, 30 Tage nach MOG-Immunisierung. Datenpunkte stellen Durchschnittswerte aus drei ausgewerteten Rückenmarks-Querschnitten einer Maus dar. Zellzahlen wurden auf drei Querschnitten pro Maus bestimmt und sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Balken 100 μ m bzw. 20 μ m (Bildausschnitt).

6.5 Verminderte Zytokinexpression in IKK2-deletierten primären Astrozyten

Aufgrund der Spezifität des Nestin-Promotors müssen Zellen neuroektodermalen Ursprungs für den schützenden Effekt der IKK2-Deletion bei der toxischen Demyelinisierung verantwortlich sein. Die naheliegendste Möglichkeit, dass der NF- κ B Signalweg in Oligodendrozyten deren Überleben reguliert, konnte durch Versuche an zellspezifisch IKK2-deletierten Mäusen ausgeschlossen werden. Eine weiterer Zelltyp neuroektodermalen Ursprungs ist der Astrozyt, der (ähnlich wie Mikrogliazellen) das Milieu an Zytokinen und Chemokinen im ZNS regulieren kann. Die Cuprizin-induzierte toxische Demyelinisierung geht mit einer IKK2-abhängigen starken Erhöhung in der Genexpression inflammatorischer Zytokine und Chemokine einher (vgl. Abb. 6.8), was für eine wichtige Funktion der Gliazellen bei diesem Prozess spricht.

Um die Funktionalität IKK2-deletierter Astrozyten *in vitro* zu untersuchen, wurden primäre Astrozyten aus IKK2^{ZNS KO} und IKK2^{ZNS WT} Mäusen gewonnen. In Abbildung 6.14A ist zu sehen, dass Cre-negative Astrozyten nach Stimulation des TLR4 mit LPS zu 58,5% ($\pm 6,4\%$) eine Translokation der NF- κ B Untereinheit p65 in den Zellkern aufweisen. Dagegen findet nur in 16,3% ($\pm 3,4\%$; $p < 0,01$) der IKK2-deletierten Astrozyten nach Stimulation eine solche Translokation statt, die Voraussetzung für die Aktivierung von NF- κ B als Transkriptionsfaktor ist. Die Aktivierung des NF- κ B Signalweges in Astrozyten durch TLR4-Stimulation führt zu einer ausgeprägten Induktion von Chemokinen und inflammatorischen Zytokinen (Abb. 6.14B). In IKK2^{ZNS WT} Astrozyten ist nach LPS-Stimulation TNF α um das 33,6 ($\pm 4,5$) fache und IL-1 β um das 76,6 ($\pm 11,4$) fache erhöht, die Chemokine CXCL10 um das 5,9 ($\pm 0,6$) fache, CCL2 um das 7,3 ($\pm 0,8$) fache und CCL3 um das 6,7 ($\pm 1,2$) fache. Dagegen ist die Induktion all dieser Zytokine in IKK2-deletierten Astrozyten deutlich reduziert. Signifikant weniger werden IL-1 β (39,6 $\pm 2,2$ fach), CXCL10 (3,8 $\pm 0,3$ fach) und CCL2 (3,8 $\pm 0,3$ fach) induziert.

Die verminderte Zytokinausschüttung durch IKK2-deletierte Astrozyten korreliert mit der reduzierten Zytokinmenge in den ZNS spezifisch IKK2-deletierten Tiere während der toxischen Demyelinisierung.

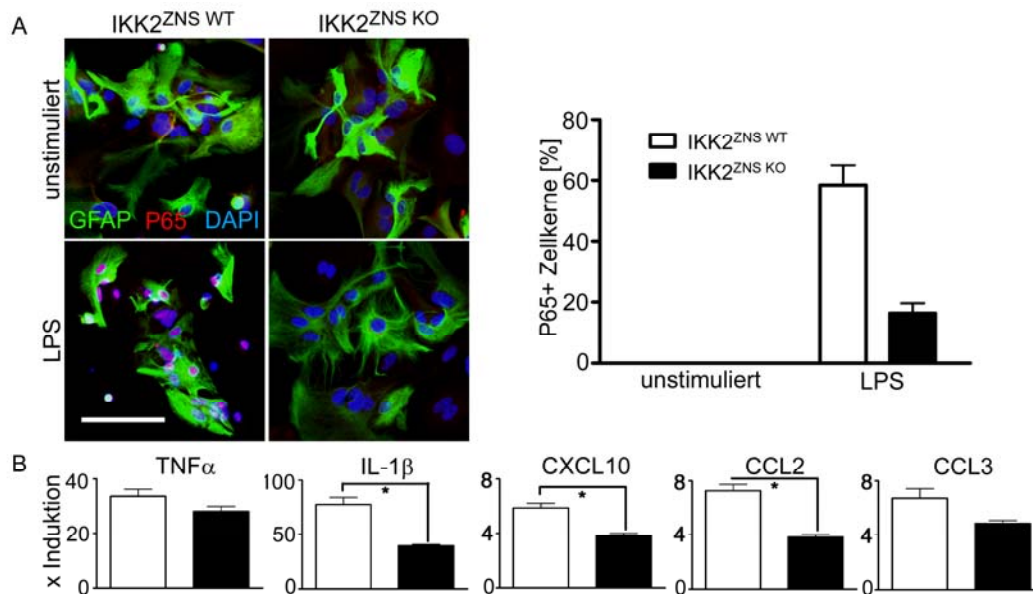


Abb. 6.14: Inhibierte p65-Translokation und reduzierte Zytokinexpression in IKK2-deletierten Astrozyten. A) Immunfluoreszenz-gefärbte primäre Astrozyten aus IKK2^{ZNS KO}- und Kontrolltieren und Quantifizierung. Stimulation mit 100 μ g/ml LPS für 60 min. In sechs Gesichtsfeldern in 20x Vergrößerung wurden die GFAP⁺ Zellen und davon die p65⁺ Zellkerne gezählt. Balken 30 μ m. *** p<0,001. B) Bestimmung der Zytokin- und Chemokinexpression stimulierter Astrozyten durch RTQ-PCR. Stimulation mit 100 μ g/ml LPS für vier Std. Gezeigt sind jeweils repräsentative Daten aus drei unabhängigen Versuchen. Die Zytokinexpression ist normalisiert auf die Expression von GAPDH. Dargestellt ist die Induktion im Vergleich zu unstimulierten IKK2^{ZNS WT} Astrozyten. * p<0,05.

Die einzigen Zellen, die außer Astrozyten das Zytokinniveau im Gehirn beeinflussen, sind Mikrogliazellen. Mikroglia sind nicht neuroektodermalen sondern mesodermalen Ursprungs und damit von der durch den Nestin Promotor vermittelten IKK2-Deletion ausgeschlossen. Primäre Mikroglia aus IKK2^{ZNS KO} Mäusen sind somit zu einer normalen Aktivierung des NF- κ B Signalweges in der Lage, was durch die unveränderte TLR4-induzierte Translokation der NF- κ B Untereinheit p65 in den Zellkern bestätigt wird (Abb. 6.15A). In den IKK2^{ZNS KO} Mikroglia kann durch LPS eine p65-Translokation in 97,2% (\pm 1,3%) der Zellen induziert werden, im Vergleich zu 93,0% (\pm 5,2%) in IKK2^{ZNS WT} Mikroglia. Die Stimulation des TLR4 in Mikrogliazellen führt ebenfalls zu einer prägnanten Zunahme der Zytokin- und Chemokinlevel (Abb. 6.15B), vergleichbar mit der Zytokininduktion in Astrozyten. Die Mikrogliazellen der IKK2^{ZNS KO} Mäuse sind diesbezüglich voll funktionell: Die Zytokinlevel nach LPS-Stimulation unterscheiden sich nicht von denen der WT Mikroglia.

Mikrogliazellen scheiden damit als Verursacher der verringerten Zytokinlevel im IKK2^{ZNS KO} Gehirn während der toxischen Myelinisierung aus. Dieser Effekt muß demnach durch die IKK2-Deletion in Astrozyten vermittelt sein.

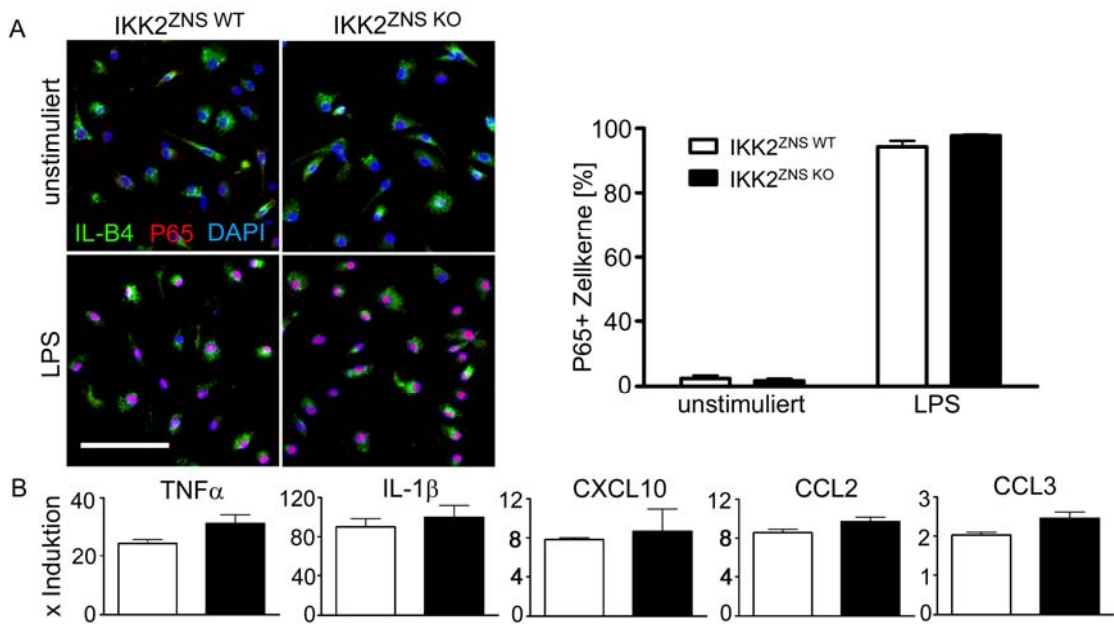


Abb. 6.15: Unveränderte p65-Translokation und Zytokinexpression in IKK2^{ZNS KO} Mikroglia. A) Immunfluoreszenz-gefärbte primäre Mikrogliazellen aus IKK2^{ZNS KO}- und Kontrollzellen und Quantifizierung. Stimulation mit 100 μ g/ml LPS für 30 min. In sechs Gesichtsfeldern in 20x Vergrößerung wurden die IL-B4 positiven Zellen (grün) und davon die P65 positiven Zellkerne (rot) gezählt. Balken 50 μ m. B) Bestimmung der Zytokin- und Chemokinexpression stimulierter Mikrogliazellen durch RTQ-PCR. Stimulation mit 100 μ g/ml LPS für 4 Std. Gezeigt sind jeweils repräsentative Daten aus drei unabhängigen Versuchen. Die Zytokinexpression ist normalisiert auf die Expression von GAPDH. Dargestellt ist die Induktion im Vergleich zu unstimulierten IKK2^{ZNS WT} Mikrogliazellen.

7 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion des klassischen IKK/NF- κ B Signalweges bei der Regulation der Myelinisierung des ZNS unter physiologischen und pathologischen Bedingungen untersucht. Im Rahmen dieser Zielsetzung konnte ein wichtiger Einfluss des Signalweges während der toxischen Demyelinisierung identifiziert werden. Bei der Myelinisierung des ZNS, sowohl während der Entwicklung als auch während der Regenerationsphase nach einer toxischen Demyelinisierung, konnte eine essentielle Funktion des Signalweges nicht belegt werden.

7.1 Myelinisierung im peripheren und zentralen Nervensystem

Die Myelinisierung ausgewählter Axone des vertebralen Nervensystems ist ein frühes postnatales Ereignis, welches durch reziproke Kommunikation zwischen Neuronen und myelinbildenden Gliazellen gesteuert wird. Dabei ist die Dicke der Myelinschicht abhängig vom Durchmesser des umwickelten Axons und dünne Axone (unter 250 nm) sind zum Großteil nicht myelinisiert. Die axonalen Signale, welche die Myelinisierung steuern, sind bisher noch wenig erforscht. Die Myelinisierung erfolgt durch spezialisierte Zellen, den Oligodendrozyten im ZNS und den Schwannzellen im PNS. Der Hauptunterschied zwischen beiden Zelltypen besteht darin, dass Oligodendrozyten mehrere Axone in ihrer Umgebung mit einer Myelinschicht umgeben können, während eine Schwannzelle stets nur ein einziges Axon myelinisiert. Zudem unterscheiden sich die Zellen in der Zusammensetzung der gebildeten proteinreichen Myelinschicht (Simons und Trotter 2007).

Dennoch haben verschiedene Beobachtungen zu der Annahme geführt, dass die axonalen Signale, welche die Myelinisierung einleiten und regulieren, im PNS und im ZNS zumindest ähnlich sind: Zunächst einmal wird davon ausgegangen, dass sensorische und motorische Axone, die sich durch das ZNS und das PNS erstrecken, auf ihrer kompletten Länge denselben myelinisierten oder unmyelinisierten Phenotyp aufweisen. Zudem konnte gezeigt werden, dass unter bestimmten Bedingungen Schwannzellen fähig sind, auch ZNS-Axone zu myelinisieren (Duncan und Hoffman 1997; Lavdas *et al.*, 2008). Umgekehrt sind Oligodendrozyten zumindest *in vitro* in der Lage, periphere Axone zu myelinisieren (Weinberg und Spencer 1979).

Auf der anderen Seite wurden schon einige axonale Signale beschrieben, die einen unterschiedlichen Effekt im ZNS und im PNS sowohl auf die gliale Entwicklung als auch auf die Myelinisierung haben. Das Neurotrophin-3 beispielsweise regt die Proliferation und das Überleben von OPCs an (Barres *et al.*, 1994), während es die Myelinisierung durch Schwannzellen hemmt (Chan *et al.*, 2001; Yamauchi *et al.*, 2003). Ein weiteres Beispiel stellt der Neuronale Wachstumsfaktor dar. Dieser Faktor beeinflusst die Myelinisierung indirekt, indem er in Neuronen axonale Signale reguliert, welche sich auf die Gliazellen im PNS und ZNS unterschiedlich auswirken: Der Faktor verstärkt die Myelinisierung durch Schwannzellen, reduziert dagegen die Reifung von Oligodendrozyten (Chan *et al.*, 2004).

Viele dieser bekannten Signale, die die Myelinisierung einleiten, wie Wachstumsfaktoren und Cytokine, können zu einer Aktivierung des IKK/NF- κ B Signalweges führen. In einer humanen Oligodendrozyten-Zelllinie wurde z.B. eine TNF α induzierte und NF- κ B vermittelte Expression des Myelin-Proteins MBP nachgewiesen (Huang *et al.*, 2002). Im PNS konnte eine wichtige Rolle des IKK/NF- κ B Signalweges bei der Myelinisierung durch Schwannzellen identifiziert werden: Nickols *et al.* (2003) konnten in Ratten in einem frühen perinatalen Entwicklungsstadium eine starke Aktivierung von NF- κ B in Schwannzellen nachweisen. Eine Blockade des Signalweges in kultivierten Schwannzellen führte zu einer fast vollständigen Unterdrückung der Myelinisierung. Die Gruppe konnte zudem zeigen, dass die Aktivierung des IKK/NF- κ B Signalweges für die Expression des durch axonalen Kontakt induzierten Transkriptionsfaktors Oct-6 notwendig ist, welcher in Schwannzellen die Expression myelinspezifischer Gene vermittelt (Nickols *et al.*, 2003). Aufgrund der Ähnlichkeit von Schwannzellen und Oligodendrozyten scheint eine Beteiligung des IKK/NF- κ B Signalweges an der Myelinisierung des ZNS naheliegend.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Auswirkung einer Inhibition des IKK/NF- κ B Signalweges auf die Myelinisierung im ZNS untersucht. Zu diesem Zweck wurden Mäuse mit einer Deletion der Kinase IKK2 unter dem Nestin-Promotor, welcher in neuroektodermalen Zellen bereits embryonal aktiv ist, verwendet. Die Aktivierung des klassischen NF- κ B Signalweges über IKK2 ist dadurch u.a. in Oligodendrozyten und ihren Vorläuferzellen blockiert. Kultivierte IKK2-deletierte Oligodendrozyten entwickelten *in vitro* eine normale Morphologie, wie durch die Fluoreszenzfärbung unterschiedlicher Entwicklungsmarker deutlich gemacht wurde. Durch eine immunhistochemische Färbung des Myelinproteins PLP in unterschiedlichen Stadien der Myelinisierung konnte zudem gezeigt werden, dass die Entwicklung des Myelins im

ZNS neuroektodermal IKK2-deletierter Mäuse auch *in vivo* morphologisch unauffällig ist. Darüber hinaus war in der quantitativen elektronenmikroskopischen Analyse myelinisierter Axone im Corpus callosum ebenfalls kein Unterschied zwischen IKK2-kompetenten und ZNS-spezifisch IKK2-deletierten Mäusen nachweisbar.

IKK2-deletierte Oligodendrozyten zeigten sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der Lage, normal zu differenzieren und auszureifen. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass der IKK/NF- κ B Signalweg im ZNS, im Gegensatz zum PNS, nicht kritisch für die physiologische Myelinisierung ist.

Eine Aktivierung des alternativen, durch IKK1 vermittelten NF- κ B Signalweges in myelinisierenden Axonen kann dagegen nicht ausgeschlossen werden. Die Membran-assoziierte Tyrosinkinase ErbB2 beispielsweise, welche während der Myelinisierung durch Neuregulin induziert wird, ist für die terminale Differenzierung und Reifung von Oligodendrozyten kritisch (Chen *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2001). ErbB2 induziert die Aktivierung von NF- κ B über die NF- κ B induzierende Kinase, welche ein wichtiger Mediator des alternativen NF- κ B Signalweges ist (Chen *et al.*, 2003). In einer früheren Studie aus unserem Labor konnten keine apparenten histopathologischen Auffälligkeiten der Myelinisierung in der Abwesenheit von IKK1 im ZNS festgestellt werden (van Loo *et al.*, 2006). Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass beide Wege der NF- κ B Aktivierung (über IKK1 und IKK2) gemeinsam synergistische und supraadditive Effekte aufweisen, welche bei einer selektiven Depletion eines Signalweges redundant sind. Ein solch additiver Effekt von IKK1 und IKK2 wurde beispielsweise bei der neuronalen Entwicklung während der Mausembryogenese beobachtet (Li *et al.*, 2000). Die Deletion von IKK1 und IKK2 und ist pränatal lethal. Um einen additiven Effekt auf die (postnatale) Myelinisierung zu untersuchen müssten Mäuse mit einer konditionalen Deletion beider Kinasen hergestellt werden.

7.2 Funktion des IKK/NF- κ B Signalweges bei der toxischen Demyelinisierung

Der klassische NF- κ B Signalweg kann durch den T-Zell- und B-Zell-Rezeptor aktiviert werden und vermittelt so die Differenzierung und Aktivierung von Leukozyten. Daneben ist der ubiquitär aktive Signalweg u.a. auch an vielen neuronalen und glialen Prozessen beteiligt. Beides zusammen legt eine wichtige regulatorische Funktion des Signalweges bei Autoimmunreaktionen im ZNS nahe, die bereits durch einige Studien

belegt wurde. So sind z.B. NF- κ B1 (p50)-defiziente Mäuse aufgrund einer gestörten primären T-Zell-Aktivierung resistent gegen die MOG-induzierte EAE (Hilliard *et al.*, 1999). Der NF- κ B Signalweg wird während der EAE aber nicht nur in T-Zellen sondern auch in Makrophagen und Mikroglia aktiviert (Kaltschmidt *et al.*, 1994). Zudem bewirkt eine genetische Inhibition des IKK/NF- κ B Signalweges in Gehirnzellen u.a. eine verminderte Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 in Astrozyten und resultiert ebenfalls in einer schwächeren Verlaufsform der EAE (van Loo *et al.*, 2006). Bei der EAE spielt also der IKK/NF- κ B Signalweg sowohl peripher, während der primären T-Zell-Aktivierung, als auch in gehirneigenen Immunzellen eine Rolle.

In aktiven MS-Läsionen weisen jedoch nicht nur Immunzellen eine NF- κ B-Aktivierung auf: nukleäres aktiviertes NF- κ B2 (p65) ist in den Randbereichen der Läsionen auch in Oligodendrozyten detektierbar (Bonetti *et al.*, 1999). Da NF- κ B neben seiner Funktion im Immunsystem auch bei der Regulation von Apoptose versus Zellüberleben eine prominente Rolle spielt, ist eine Funktion des Signalweges sowohl beim Untergang von Oligodendrozyten als auch bei der Remyelinisierung in MS-Plaques denkbar. Beides sind Prozesse, die im Gegensatz zur peripheren Immunantwort noch wenig untersucht sind. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die Beteiligung des IKK/NF- κ B Signalweges bei der Demyelinisierung, unabhängig von einer peripheren Immunantwort, sowie bei der Remyelinisierung zu untersuchen.

Die toxische Demyelinisierung durch Cuprizon-Verfütterung bietet die Möglichkeit, den Prozess der Myelinzerstörung direkt zu untersuchen, da durch eine intakte Blut-Hirn-Schranke die Beteiligung peripherer Immunzellen weitestgehend ausgeschlossen werden kann. Zudem ist die Myelinschädigung reversibel und ermöglicht damit die Untersuchung der spontanen posttoxischen Remyelinisierung (Matsushima und Morell 2001).

Um die Rolle des IKK/NF- κ B Signalweges bei der toxischen Demyelinisierung zu untersuchen, wurden deshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit Mäuse mit einer IKK2-Deletion in ZNS-Zellen (Neurone, Oligodendrozyten und Astrozyten) sowie IKK2-kompetente Kontrolltiere über mehrere Wochen mit Cuprizon behandelt. Nach fünf Wochen (akute Phase der Demyelinisierung) bzw. zehn Wochen (chronische Phase der Demyelinisierung) wurden die Mäuse bzgl. des Myelinverlustes und der Immunzellaktivierung im Corpus callosum ausführlich histologisch untersucht. Die quantitative Auswertung der Histologie zeigt, dass die im ZNS IKK2-deletierten Tiere deutlich vor Cuprizon-induziertem Myelinverlust geschützt sind und dieser protektive

Effekt mit einer verminderten Rekrutierung von Mikroglia und Astrozyten einhergeht. Der verminderte Myelinverlust dieser Tiere wurde durch eine elektronenmikroskopische Untersuchung bestätigt.

Die Inhibition des IKK/NF- κ B Signalweges in Gehirnzellen wirkt sich somit während der toxischen Demyelinisierung deutlich protektiv aus. Durch diese Experimente konnte eine wichtige Funktion des Signalweges während der Cuprizin-induzierten Demyelinisierung dargestellt werden.

Diese Daten korrelieren mit anderen Studien, in welchen nach Deletion von TNF-Proteinen wie TNF α , LT α oder TWEAK, welche alle u.a. eine NF- κ B-Aktivierung induzieren, ebenfalls eine verminderte bzw. verzögerte Cuprizin-induzierte Demyelinisierung beschrieben wurde (Iocca *et al.*, 2008; Plant *et al.*, 2005). Die Autoren dieser Studien begründen ihre Beobachtung mit einer verminderten Mikroglia-migration bzw. -aktivierung. Dass die Aktivierung von Mikrogliazellen und die daraus resultierende Zytokinproduktion die Cuprizin-induzierte Demyelinisierung verstärken, wurde auch von Pasquini *et al.* beobachtet (Pasquini *et al.*, 2007). Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Effekt des IKK/NF- κ B Signalweges auf die Demyelinisierung ist jedoch nicht primär auf eine modulierte Mikrogliaaktivierung zurückzuführen, da die verwendeten Mauslinien eine intakte NF- κ B Aktivierung in Mikrogliazellen aufweisen.

In welchen Zellen vermittelt nun die Depletion des IKK/NF- κ B Signalweges die schützende Wirkung während der toxischen Demyelinisierung?

Der Wirkungsmechanismus von Cuprizin ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt, doch verursacht es spezifisch die Apoptose von Oligodendrozyten (Matsushima und Morell 2001). Wie in vielen anderen Zelltypen reguliert der NF- κ B Signalweg auch in Oligodendrozyten das Zellüberleben und kann auf diese sowohl proapoptotisch wirken, als auch die Zellen vor dem Zelltod schützen (Hamanoue *et al.*, 2004; Vollgraf *et al.*, 1999).

Der protektive Effekt der NF- κ B-Inhibition im ZNS könnte demnach auf eine höhere Toleranz der Oligodendrozyten gegenüber eines Apoptose induzierenden Stimulus wie TNF α zurückzuführen sein. Diese Annahme konnte jedoch durch die Applikation des Cuprizin-Modells auf Mäuse mit einer spezifischen IKK2-Deletion in reifen Oligodendrozyten ausgeschlossen werden: Sind von der Inhibition des IKK/NF- κ B Signalweges ausschließlich Oligodendrozyten betroffen, so bewirkt die Cuprizin-Verfütterung eine mit Kontrollmäusen vergleichbare Demyelinisierung und Gliose im

Corpus callosum. Auch während der EAE, dem durch periphere Immunzellen vermittelten Mausmodell einer autoimmunen Demyelinisierung des ZNS, konnte kein Effekt der oligodendrozytenspezifischen IKK2-Deletion ausgemacht werden. Weder die Myelindegeneration und der Untergang der Oligodendrozyten, noch die Makrophageninfiltration zeigten sich durch die Inhibition des NF- κ B Signalweges beeinträchtigt.

Sowohl die toxische als auch die immunvermittelte Demyelinisierung sind demnach unabhängig von der oligodendroglialen NF- κ B Aktivierung über den kanonischen Signalweg.

Neben den Oligodendrozyten sind von der durch den Nestin-Promotor gesteuerten ZNS-spezifischen IKK2-Deletion Neurone und Astrozyten betroffen. Theoretisch ist es möglich, dass durch die Cuprizongabe auf einem NF- κ B-mediierten Weg die Axon-Glia-Kommunikation gestört wird, und es dadurch zu einer primären Demyelinisierung via axonaler Störung und zu einer anschließenden sekundären Degeneration von Oligodendrozyten kommt. Das Überleben von Oligodendrozyten im ZNS und die Myelinsynthese hängen von der ausreichenden Bereitstellung bestimmter in Neuronen synthetisierten Wachstumsfaktoren wie FGF-2, IGF-1, NT-3 und CNTF ab (Simons und Trajkovic 2006). Die Expression einiger dieser Wachstumsfaktoren, z.B. FGF-2 und IGF-1, wird über den NF- κ B-Signalweg reguliert (Crisostomo *et al.*, 2008). Diese Faktoren können jedoch nicht nur von Neuronen sondern auch von Astrozyten produziert werden (Dhandapani *et al.*, 2003; Eckenstein 1994). Eine Abhängigkeit der Cuprizon-induzierten Demyelinisierung von einer neuronalen NF- κ B Aktivierung ist daher denkbar, wobei einiges für einen additiven Effekt von Neuronen und Astrozyten spricht. Ein Einfluss des IKK/NF- κ B Signalweges allein in Neuronen kann letztlich nur durch eine zellspezifische Inhibition des Signalweges, etwa durch Kreuzung der IKK2-gefloxten Mäuse mit der neuronenspezifischen Synapsin-Cre Linie (Zhu *et al.*, 2001), ausgeschlossen werden.

Wahrscheinlicher scheint, aufgrund deren immunmodulatorischer Funktion, eine essentielle und NF- κ B-abhängige Rolle der neuroektodermalen Astrozyten bei der toxischen Demyelinisierung. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Cuprizon-induzierte Demyelinisierung in Wildtyp (WT)-Mäusen mit einer starken Induktion sowohl proinflammatorischer als auch chemoattraktiver Zytokine im geschädigten Corpus callosum einhergeht. Die Deletion von IKK2 in ZNS-Zellen führte in diesen Experimenten zu einer starken Reduktion der Zytokinantwort während der Demyelinisierung, von der insbesondere die TNF α - und IL-1 β -Produktion betroffen

waren. Im ZNS werden diese Zytokine hauptsächlich von Mikroglia und Astrozyten produziert: Durch Stimulation des IKK/NF- κ B Signalweges in primären Astrozyten und Mikroglia aus WT-Mäusen konnte auch *in vitro* eine massive Zytokinantwort dieser Zellen hervorgerufen werden. In IKK2-deletierten Astrozyten dagegen fiel diese Zytokinantwort deutlich schwächer aus. Die Inhibition der NF- κ B-Aktivierung in Astrozyten kommt also als Ursache für die reduzierte Zytokinantwort während der Cuprizin-induzierten Demyelinisierung in Abwesenheit von IKK2 im ZNS in Frage (vgl. Abb. 7.1).

Quinones *et al.* (2008) haben gezeigt, dass die transgene Überexpression von TNF α in Astrozyten eine Demyelinisierung im murinen ZNS verursacht (Quinones *et al.*, 2008). Die durch Inhibition des NF- κ B Signalweges verminderte Expression von TNF α und anderen Zytokinen in Astrozyten IKK2-deletierter Mäuse kann somit die Protektion der Oligodendrozyten vor Cuprizin-induzierter Demyelinisierung sehr gut erklären.

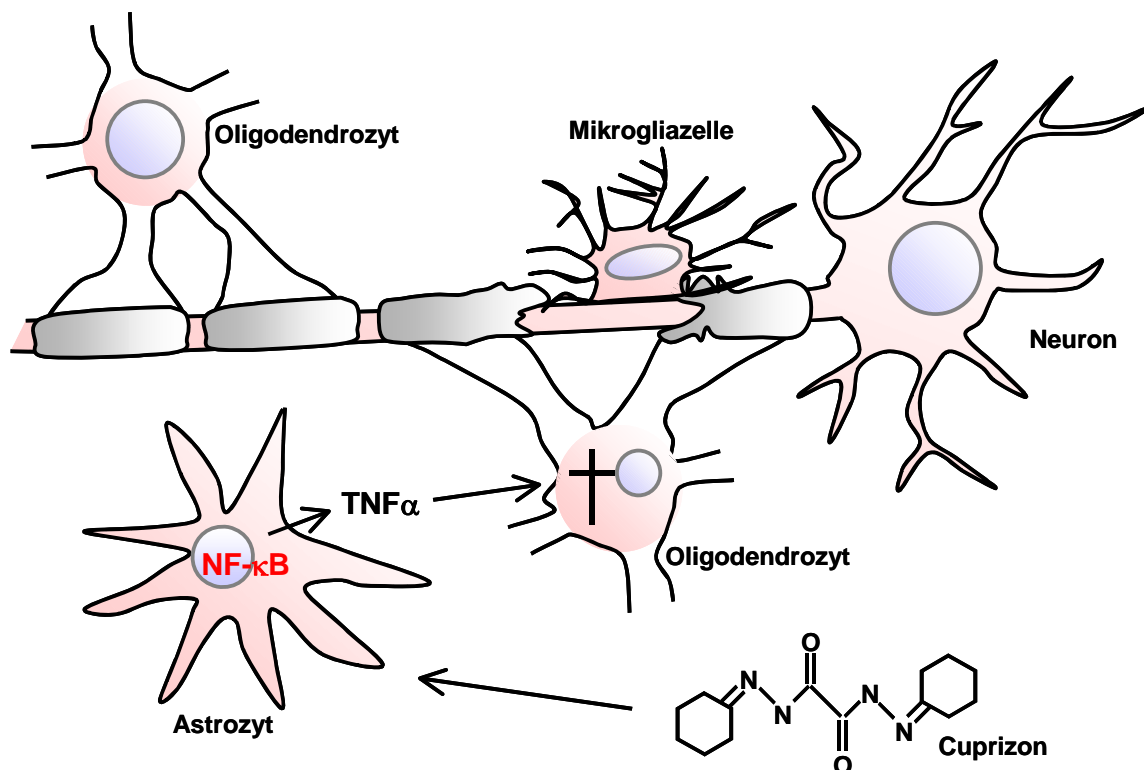


Abb. 7.1.: Hypothese zur Wirkungsweise von NF- κ B während der toxischen Demyelinisierung durch Cuprizin im ZNS. Cuprizin bewirkt eine NF- κ B-abhängige Produktion von TNF α und anderen Zytokinen durch Astrozyten. Diese inflammatorischen Mediatoren könnten den oligodendrozytären Zelltod verursachen, welcher in dem beobachteten Myelinverlust resultiert.

Die Vermutung, dass die IKK2-Deletion spezifisch in Astrozyten für die Protektion von Oligodendrozyten vor Cuprizin-induzierter Demyelinisierung verantwortlich ist, könnte experimentell durch eine astrozytenspezifische Inhibition des NF- κ B Signalweges verlässlich bestätigt werden. Ein Promotor, der lange Zeit als spezifisch für Astrozyten angesehen wurde, ist der GFAP-Promotor: eine Vielzahl von GFAP-Cre-Linien wurden deshalb mit dem Ziel einer astrozytenspezifischen Gendeletion generiert (Bajenaru *et al.*, 2002; Kwon *et al.*, 2001; Marino *et al.*, 2000; Zhuo *et al.*, 2001). GFAP wird jedoch auch in Vorläuferzellen exprimiert, die zu Neuronen ausdifferenzieren können (Garcia *et al.*, 2004). Da die Cre-vermittelte Rekombination irreversibel ist, resultiert die Verwendung der GFAP-Cre partiell auch in einer neuronalen Deletion. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, könnte eine induzierbare Expression der Cre-Rekombinase sein. In den letzten Jahren wurden von mehreren Gruppen Mauslinien generiert und charakterisiert, die ein Cre-Östrogenrezeptor Fusionsprotein (*Cre-estrogen receptor*, CreER^{T2}) unter dem humanen GFAP-Promotor (hGFAP) exprimieren (Chow *et al.*, 2008; Ganat *et al.*, 2006; Hirrlinger *et al.*, 2006). Diese Cre-Rekombinase wird erst durch das Östrogen-Analog 4-Hydroxy-Tamoxifen aktiviert, welches den Mäusen postnatal verabreicht werden kann. Die bisher verfügbaren hGFAP-CreER^{T2} Mauslinien weisen jedoch nur eine Rekombinationsrate von (abhängig von der Gehirnregion) 30-80% in Astrozyten auf, zudem finden sich ca. 30 Tage nach Tamoxifen-Verabreichung wieder zunehmend ausgereifte Neurone mit einer Cre-vermittelten Rekombination (Chow *et al.*, 2008; Ganat *et al.*, 2006; Hirrlinger *et al.*, 2006). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist eine stabile und vollständige astrozytenspezifische Gendeletion technisch noch nicht realisierbar.

7.3 IKK2 und Mechanismen der Remyelinisierung im ZNS

Inflammatorische Zytokine, welche während der Demyelinisierung von Astrozyten und Mikroglia gebildet werden, spielen eine wichtige Rolle bei der Zerstörung des Myelins während der toxischen Demyelinisierung. Bei der MS beispielweise findet man in aktiven Läsionen eine erhöhte Anzahl an inflammatorischen Makrophagen (Lucchinetti *et al.*, 1999). Die Inflammation ist jedoch gleichzeitig wichtig für den Prozess der spontan auftretenden Remyelinisierung. Die Remyelinisierung beruht auf der Rekrutierung und Proliferation von OPCs in der Läsion, sowie auf deren Differenzierung und Reifung zu myelinbildenden Oligodendrozyten. Durch Bildung einer neuen Myelinschicht um unbeschädigte Axone kann deren Funktion

weitestgehend wiederhergestellt werden. Eine Suppression der Inflammation durch Kortikosteroide, welche auch zur Therapie von MS eingesetzt werden, beeinträchtigt im toxischen Demyelinisierungsmodell die Differenzierung von OPCs und dadurch die Remyelinisierung (Chari *et al.*, 2006). Die Induktion einer inflammatorischen Antwort durch Zymosan dagegen verbessert die Myelinisierung von retinalen Axonen durch transplantierte OPCs (Setzu *et al.*, 2006). Dabei kommen den gehirneigenen Immunzellen zwei wichtige Aufgaben zu. Mikroglia sind die phagozytisch aktiven Zellen des ZNS und beseitigen während der Demyelinisierung anfallende Myelinreste (Smith 1999). Dadurch schaffen sie eine wichtige Voraussetzung für die Remyelinisierung, da Myelin die Differenzierung von OPCs inhibieren kann (Kotter *et al.*, 2006). Daneben beeinflussen die Immunzellen die Remyelinisierung durch die Produktion inflammatorischer Zytokine und Chemokine, welche die Proliferation und Differenzierung von OPCs regulieren. IL-1 β beispielweise, ein Zytokin, dessen Produktion in IKK2-deletierten Astrozyten vermindert ist, ist wichtig für die Differenzierung von OPCs: In IL-1 β -defizienten Mäusen ist die Differenzierung dieser Zellen nach Cuprizon-induzierter Demyelinisierung verzögert (Mason *et al.*, 2001). Die Autoren begründen diesen Effekt der IL-1 β -Deletion mit einer verminderten IGF-1-Produktion durch Mikroglia und Astrozyten. Zhang *et al.* (2006) haben zudem einen positiven Effekt des Zytokins IL-11, dessen Produktion in Astrozyten durch IL-1 β induziert wird, auf die Reifung von Oligodendrozyten beschrieben (Zhang *et al.*, 2006). Für TNF α , welches durch seine proapoptische Wirkung auf Oligodendrozyten eine Demyelinisierung hervorrufen kann, wurde daneben eine Funktion bei der Proliferation von OPCs nach einer toxischen Demyelinisierung beschrieben (Arnett *et al.*, 2001). Die positive Wirkung dieser Zytokine, welche auch die Aktivierung von NF- κ B induzieren, auf die Proliferation und Differenzierung von OPCs legt eine Beteiligung des IKK/NF- κ B Signalweges an diesen regenerativen Prozessen nahe. Zudem wird die Expression von sowohl IL-1 β als auch TNF α in Astrozyten durch eine IKK2-medierte NF- κ B Aktivierung moduliert. Es stellte sich deshalb die Frage, ob der Signalweg neben der Demyelinisierung auch für die Remyelinisierung von Bedeutung ist.

Die toxische Demyelinisierung im ZNS sowohl durch Cuprizon als auch durch Lysolecithin ist reversibel: nach dem Absetzen der Agentien und dem konsekutiven Abbau des zerstörten Myelins durch Makrophagen oder Mikroglia kommt es durch Proliferation und Reifung von OPCs zu einer spontanen Remyelinisierung der Axone (Larsen *et al.*, 2003; Matsushima und Morell 2001). Mit Hilfe dieser Modelle wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des IKK/NF- κ B Signalweges auf die

Remyelinisierung im ZNS untersucht. Dabei konnte im Rahmen einer ausführlichen elektronenmikroskopischen Analyse remyelinisierender Axone gezeigt werden, dass die Deletion von IKK2 in Oligodendrozyten, sowohl unter dem MOG-Promotor (spät aktiv) als auch unter dem Nestin-Promotor (früh aktiv), die spontane Remyelinisierung nach einer toxischen Demyelinisierung im ZNS nicht beeinflusst. Dass die Inhibition des Signalweges in Oligodendrozyten die Remyelinisierung nicht stört, überrascht insofern nicht, als auch während der physiologischen Myelinisierung IKK2-deletierte OPCs *in vitro* und *in vivo* normal differenzieren und ausgereift eine intakte Myelinschicht ausbilden. Im Unterschied zur Myelinisierung liegt zwar bei der Remyelinisierung eine verstärkte Präsenz von Immunzellen vor, die den Reifungsprozess der OPCs durch Zytokine modulieren. Da Astrozyten von der IKK2-Deletion unter dem Nestin-Promotor mitbetroffen sind, wurde jedoch eine Beteiligung des astrozytären IKK/NF- κ B Signalweges an diesen Prozessen ebenfalls ausgeschlossen.

Ein prominenter Einfluss des IKK/NF- κ B Signalweges in ZNS-Zellen auf die Remyelinisierung nach einer toxischen Demyelinisierung konnte somit nicht belegt werden.

7.4 Manipulationsmöglichkeiten im IKK/NF- κ B Signalweg

Der Inflammationsprozess ist ein wichtiges Angriffsziel für potentielle Therapien gegen Demyelinisierungserkrankungen wie die MS. Durch diese Eingriffe dürfen jedoch spontan auftretende Reparaturmechanismen wie die Ausreifung von OPCs zu myelinbildenden Oligodendrozyten nicht beeinträchtigt werden. Der IKK/NF- κ B Signalweg zählt zu den wichtigsten Mediatoren einer Inflammation. Er vermittelt die Leukozytenaktivierung und wird durch inflammatorische Zytokine und über die TLRs auch bei Infektionen induziert.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass durch eine Interruption dieses Signalweges in Gehirnzellen zudem die Oligodendrozytendegeneration während einer toxischen Demyelinisierung deutlich gehemmt wird. Die Remyelinisierung wird durch Inhibition der IKK2-vermittelten NF- κ B-Aktivierung jedoch nicht beeinträchtigt. Der Signalweg bietet damit optimale Voraussetzungen für eine potentielle Therapie bei der MS.

Wie eingangs erwähnt (vgl. 3.3.1.) wird der IKK/NF- κ B Signalweg auf vielen Ebenen streng reguliert, wodurch sich verschiedene Möglichkeiten der Manipulation dieses

Signalweges ergeben. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mäuse haben eine Deletion der Kinase IKK2 in Gehirnzellen. IKK2 ist essentiell für die Funktion des IKK-Komplexes (Delhase *et al.*, 1999). Die vorliegenden Daten bestätigen, dass in Abwesenheit von IKK2 eine Translokation von NF- κ B nur in geringem Maße stattfindet und die NF- κ B-abhängige Expression von Zytokinen deutlich beeinträchtigt ist. Betroffen von der Inhibition sind sämtliche Aktivierungswege, die in Gehirnzellen NF- κ B auf dem klassischen Weg induzieren können, im Wesentlichen also der TNF-, IL-1 β - und TLR-Signalweg. Nicht beeinträchtigt sind dagegen parallel zum NF- κ B Signalweg induzierte Signale, wie z.B. die TLR-induzierte Aktivierung des Interferon-Signalweges, die Aktivierung des JNK-Signalweges oder die TNF-induzierte Caspase-Kaskade. Die Deletion von TNF α beispielsweise führt zwar nicht zu einer Protektion aber doch zu einer Verzögerung der toxischen Demyelinisierung im Cuprizin-Modell. Gleichzeitig wirkt sich diese Deletion jedoch stark verzögernd auf die Remyelinisierung der Tiere aus (Arnett *et al.*, 2001). Eine Deletion von IL-1 β wirkt sich ebenfalls inhibierend auf den Remyelinisierungsprozess im ZNS aus (Mason *et al.*, 2001). Neben dem IKK/NF- κ B Signalweg werden durch diese Stimuli weitere Signalwege aktiviert. Mit Hilfe der IKK2-deletierten Tiere ist es im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelungen, spezifisch den Einfluss der NF- κ B Aktivierung in Gehirnzellen auf die toxische Demyelinisierung zu isolieren. Durch Manipulation des Signalweges auf der Ebene des IKK-Komplexes bleiben die Mechanismen der Remyelinisierung erhalten.

IKK2, als für die Aktivierung des klassischen NF- κ B Signalweges essentielle und spezifische Kinase, ist somit auch im Hinblick auf eine Therapieentwicklung ein effektives und selektives Zielprotein. Eine Beteiligung des NF- κ B Signalweges an inflammatorischen Prozessen, z.B. während der zerebralen Ischämie und bei der Asthmaerkrankung, ist seit längerem bekannt und IKK2-Inhibitoren erwiesen sich in präklinischen Studien zu diesen Krankheiten als vielversprechend (Birrell *et al.*, 2005; Catley *et al.*, 2005; Schwaninger *et al.*, 2006). In den letzten Jahren werden deshalb zunehmend auch in der pharmazeutischen Industrie IKK2-spezifische Inhibitoren entwickelt, zusätzlich zu zahlreichen unspezifischen Inhibitoren, die bereits auf dem Markt sind (Karin *et al.*, 2004).

Weitere mögliche Angriffspunkte im IKK/NF- κ B Signalweg sind die Degradation des I κ B im Proteasom sowie die Bindung von NF- κ B an seine DNA-Zielsequenzen. Proteasom-Inhibitoren werden als Therapeutikum gegen Myelome bereits klinisch getestet, jedoch bisher erfolglos (Kozuch *et al.*, 2008). Sie haben zudem den Nachteil, sehr unspezifisch zu sein, da die proteasomale Degradation an vielen zellulären

Prozessen beteiligt ist. Eine Möglichkeit, die Bindungskapazität von NF- κ B für seine DNA-Zielsequenzen zu reduzieren, sind interferierende Oligodeoxynukleotide (ODN). Diese haben den Vorteil, eine sehr spezifische Interaktion zu erlauben, sind jedoch relativ instabil. Zudem ist der Transport der ODNs in das Zielorgan schwierig. ODNs für NF- κ B sind jedoch in der präklinischen Entwicklung (Isomura und Morita 2006). Für eine potentielle Behandlung von ZNS-Erkrankungen durch Inhibition des IKK/NF- κ B Signalweges, sei es durch Peptide oder durch ODNs, ist zusätzlich die erschwerte Zugänglichkeit des Zielorgans zu berücksichtigen: Die Durchgängigkeit der Agentien durch die Bluthirnschranke muss gewährleistet sein.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte der IKK/NF- κ B Signalweg als kritisch für die toxische Demyelinisierung identifiziert werden. Die Kinase IKK2 kommt daher als potentieller Angriffspunkt für neue Therapien bei Demyelinisierungserkrankungen wie der MS und Leukodystrophien in Betracht.

8 Literatur

Albensi BC, Mattson MP. Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse* 2000; 35: 151-159.

Alkalay I, Yaron A, Hatzubai A *et al.* In vivo stimulation of I kappa B phosphorylation is not sufficient to activate NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 1294-1301.

Arenzana-Seisdedos F, Turpin P, Rodriguez M *et al.* Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci* 1997; 110 (Pt 3): 369-378.

Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 2001; 4: 1116-1122.

Artis D, Speirs K, Joyce K *et al.* NF-kappa B1 is required for optimal CD4+ Th1 cell development and resistance to *Leishmania major*. *J Immunol* 2003; 170: 1995-2003.

Azoitei N, Wirth T, Baumann B. Activation of the IkappaB kinase complex is sufficient for neuronal differentiation of PC12 cells. *J Neurochem* 2005; 93: 1487-1501.

Bajenaru ML, Zhu Y, Hedrick NM, Donahoe J, Parada LF, Gutmann DH. Astrocyte-specific inactivation of the neurofibromatosis 1 gene (NF1) is insufficient for astrocytoma formation. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 5100-5113.

Bajpai UD, Zhang K, Teutsch M, Sen R, Wortis HH. Bruton's tyrosine kinase links the B cell receptor to nuclear factor kappaB activation. *J Exp Med* 2000; 191: 1735-1744.

Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D *et al.* Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 1997; 100: 2961-2969.

Barres BA, Raff MC, Gaese F, Bartke I, Dechant G, Barde YA. A crucial role for neurotrophin-3 in oligodendrocyte development. *Nature* 1994; 367: 371-375.

Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W *et al.* Control of synaptic strength by glial TNFalpha. *Science* 2002; 295: 2282-2285.

Beinke S, Ley SC. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J* 2004; 382: 393-409.

Birrell MA, Hardaker E, Wong S *et al.* Ikappa-B kinase-2 inhibitor blocks inflammation in human airway smooth muscle and a rat model of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 962-971.

Blonska M, Shambharkar PB, Kobayashi M *et al.* TAK1 is recruited to the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptor 1 complex in a receptor-interacting protein (RIP)-dependent manner and cooperates with MEKK3 leading to NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 2005; 280: 43056-43063.

- Bo L, Mork S, Kong PA, Nyland H, Pardo CA, Trapp BD. Detection of MHC class II-antigens on macrophages and microglia, but not on astrocytes and endothelia in active multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol* 1994; 51: 135-146.
- Bohuslav J, Kravchenko VV, Parry GC *et al.* Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF-kappaB. *J Clin Invest* 1998; 102: 1645-1652.
- Bonetti B, Stegagno C, Cannella B, Rizzuto N, Moretto G, Raine CS. Activation of NF-kappaB and c-jun transcription factors in multiple sclerosis lesions. Implications for oligodendrocyte pathology. *Am J Pathol* 1999; 155: 1433-1438.
- Brambilla R, Bracchi-Ricard V, Hu WH *et al.* Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *J Exp Med* 2005; 202: 145-156.
- Buch T, Heppner FL, Tertilt C *et al.* A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nat Methods* 2005; 2: 419-426.
- Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 1996; 383: 443-446.
- Catley MC, Chivers JE, Holden NS, Barnes PJ, Newton R. Validation of IKK beta as therapeutic target in airway inflammatory disease by adenoviral-mediated delivery of dominant-negative IKK beta to pulmonary epithelial cells. *Br J Pharmacol* 2005; 145: 114-122.
- Chan JR, Cosgaya JM, Wu YJ, Shooter EM. Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 14661-14668.
- Chan JR, Watkins TA, Cosgaya JM *et al.* NGF controls axonal receptivity to myelination by Schwann cells or oligodendrocytes. *Neuron* 2004; 43: 183-191.
- Chari DM, Zhao C, Kotter MR, Blakemore WF, Franklin RJ. Corticosteroids delay remyelination of experimental demyelination in the rodent central nervous system. *J Neurosci Res* 2006; 83: 594-605.
- Chen D, Xu LG, Chen L, Li L, Zhai Z, Shu HB. NIK is a component of the EGF/heregulin receptor signaling complexes. *Oncogene* 2003; 22: 4348-4355.
- Chen S, Velardez MO, Warot X *et al.* Neuregulin 1-erbB signaling is necessary for normal myelination and sensory function. *J Neurosci* 2006; 26: 3079-3086.
- Chow LM, Zhang J, Baker SJ. Inducible Cre recombinase activity in mouse mature astrocytes and adult neural precursor cells. *Transgenic Res* 2008.
- Combs CK, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE. beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 2001; 21: 1179-1188.
- Coornaert B, Baens M, Heyninck K *et al.* T cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase-mediated cleavage of the NF-kappaB inhibitor A20. *Nat Immunol* 2008; 9: 263-271.

- Costello PS, Walters AE, Mee PJ *et al.* The Rho-family GTP exchange factor Vav is a critical transducer of T cell receptor signals to the calcium, ERK, and NF-kappaB pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 3035-3040.
- Crawford MP, Yan SX, Ortega SB *et al.* High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. *Blood* 2004; 103: 4222-4231.
- Crisostomo PR, Wang Y, Markel TA, Wang M, Lahm T, Meldrum DR. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF-alpha, LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF kappa B- but not JNK-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294: C675-C682.
- Dajee M, Lazarov M, Zhang JY *et al.* NF-kappaB blockade and oncogenic Ras trigger invasive human epidermal neoplasia. *Nature* 2003; 421: 639-643.
- de Vos AF, van MM, Brok HP *et al.* Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J Immunol* 2002; 169: 5415-5423.
- Delhase M, Hayakawa M, Chen Y, Karin M. Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science* 1999; 284: 309-313.
- Dessa SA, Yee IM, Ebers GC. Recurrence risks to sibs of MS index cases: impact of consanguineous matings. *Neurology* 2001; 56: 784-785.
- Dhandapani KM, Mahesh VB, Brann DW. Astrocytes and brain function: implications for reproduction. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003; 228: 253-260.
- DiDonato J, Mercurio F, Rosette C *et al.* Mapping of the inducible IkappaB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 1295-1304.
- DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 1997; 388: 548-554.
- DiDonato JA, Mercurio F, Karin M. Phosphorylation of I kappa B alpha precedes but is not sufficient for its dissociation from NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 1302-1311.
- Dienz O, Hehner SP, Droge W, Schmitz ML. Synergistic activation of NF-kappa B by functional cooperation between vav and PKCtheta in T lymphocytes. *J Biol Chem* 2000; 275: 24547-24551.
- Duncan ID, Hoffman RL. Schwann cell invasion of the central nervous system of the myelin mutants. *J Anat* 1997; 190 (Pt 1): 35-49.
- Duyao MP, Buckler AJ, Sonenshein GE. Interaction of an NF-kappa B-like factor with a site upstream of the c-myc promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 4727-4731.
- Eckenstein FP. Fibroblast growth factors in the nervous system. *J Neurobiol* 1994; 25: 1467-1480.

Farina AR, Tacconelli A, Vacca A, Maroder M, Gulino A, Mackay AR. Transcriptional up-regulation of matrix metalloproteinase-9 expression during spontaneous epithelial to neuroblast phenotype conversion by SK-N-SH neuroblastoma cells, involved in enhanced invasivity, depends upon GT-box and nuclear factor kappaB elements. *Cell Growth Differ* 1999; 10: 353-367.

Fridmacher V, Kaltschmidt B, Goudeau B *et al.* Forebrain-specific neuronal inhibition of nuclear factor-kappaB activity leads to loss of neuroprotection. *J Neurosci* 2003; 23: 9403-9408.

Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 2006; 354: 942-955.

Ganat YM, Silbereis J, Cave C *et al.* Early postnatal astroglial cells produce multilineage precursors and neural stem cells in vivo. *J Neurosci* 2006; 26: 8609-8621.

Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 2004; 7: 1233-1241.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 225-260.

GLAUERT AM, GLAUERT RH. Araldite as an embedding medium for electron microscopy. *J Biophys Biochem Cytol* 1958; 4: 191-194.

Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 2006; 129: 1953-1971.

Goudeau B, Huetz F, Samson S *et al.* IkappaBalpha/IkappaBepsilon deficiency reveals that a critical NF-kappaB dosage is required for lymphocyte survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 15800-15805.

Gregory SG, Schmidt S, Seth P *et al.* Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat Genet* 2007; 39: 1083-1091.

Grumont RJ, Rourke IJ, O'Reilly LA *et al.* B lymphocytes differentially use the Rel and nuclear factor kappaB1 (NF-kappaB1) transcription factors to regulate cell cycle progression and apoptosis in quiescent and mitogen-activated cells. *J Exp Med* 1998; 187: 663-674.

Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 1994; 265: 103-106.

Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS, Jr. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 5785-5799.

Hamanoue M, Yoshioka A, Ohashi T, Eto Y, Takamatsu K. NF-kappaB prevents TNF-alpha-induced apoptosis in an oligodendrocyte cell line. *Neurochem Res* 2004; 29: 1571-1576.

Hein T, Hopfenmuller W. [Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany]. *Nervenarzt* 2000; 71: 288-294.

Herndon TM, Shan XC, Tsokos GC, Wange RL. ZAP-70 and SLP-76 regulate protein kinase C-theta and NF-kappa B activation in response to engagement of CD3 and CD28. *J Immunol* 2001; 166: 5654-5664.

Herrmann O, Baumann B, De LR *et al.* IKK mediates ischemia-induced neuronal death. *Nat Med* 2005; 11: 1322-1329.

Hickey WF. Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol* 1991; 1: 97-105.

Hilliard B, Samoilova EB, Liu TS, Rostami A, Chen Y. Experimental autoimmune encephalomyelitis in NF-kappa B-deficient mice: roles of NF-kappa B in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J Immunol* 1999; 163: 2937-2943.

Hirrlinger PG, Scheller A, Braun C, Hirrlinger J, Kirchhoff F. Temporal control of gene recombination in astrocytes by transgenic expression of the tamoxifen-inducible DNA recombinase variant CreERT2. *Glia* 2006; 54: 11-20.

Huang CJ, Nazarian R, Lee J, Zhao PM, Espinosa-Jeffrey A, de VJ. Tumor necrosis factor modulates transcription of myelin basic protein gene through nuclear factor kappa B in a human oligodendrogloma cell line. *Int J Dev Neurosci* 2002; 20: 289-296.

Huang S, Robinson JB, Deguzman A, Bucana CD, Fidler IJ. Blockade of nuclear factor-kappaB signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8. *Cancer Res* 2000; 60: 5334-5339.

Iocca HA, Plant SR, Wang Y *et al.* TNF superfamily member TWEAK exacerbates inflammation and demyelination in the cuprizone-induced model. *J Neuroimmunol* 2008; 194: 97-106.

Isomura I, Morita A. Regulation of NF-kappaB signaling by decoy oligodeoxynucleotides. *Microbiol Immunol* 2006; 50: 559-563.

Jersild C, Svejgaard A, Fog T. HL-A antigens and multiple sclerosis. *Lancet* 1972; 1: 1240-1241.

Jiang H, Sha SH, Schacht J. NF-kappaB pathway protects cochlear hair cells from aminoglycoside-induced ototoxicity. *J Neurosci Res* 2005; 79: 644-651.

Jost PJ, Weiss S, Ferch U *et al.* Bcl10/Malt1 signaling is essential for TCR-induced NF-kappaB activation in thymocytes but dispensable for positive or negative selection. *J Immunol* 2007; 178: 953-960.

Kaltschmidt B, Widera D, Kaltschmidt C. Signaling via NF-kappaB in the nervous system. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1745: 287-299.

Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Lannes-Vieira J *et al.* Transcription factor NF-kappa B is activated in microglia during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1994; 55: 99-106.

- Kanters E, Gijbels MJ, van dM, I *et al.* Hematopoietic NF-kappaB1 deficiency results in small atherosclerotic lesions with an inflammatory phenotype. *Blood* 2004; 103: 934-940.
- Karin M, Yamamoto Y, Wang QM. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 17-26.
- Karman J, Ling C, Sandor M, Fabry Z. Dendritic cells in the initiation of immune responses against central nervous system-derived antigens. *Immunol Lett* 2004; 92: 107-115.
- Kopp E, Medzhitov R, Carothers J *et al.* ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway. *Genes Dev* 1999; 13: 2059-2071.
- Kotter MR, Li WW, Zhao C, Franklin RJ. Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation. *J Neurosci* 2006; 26: 328-332.
- Kozuch PS, Rocha-Lima CM, Dragovich T *et al.* Bortezomib with or without irinotecan in relapsed or refractory colorectal cancer: results from a randomized phase II study. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2320-2326.
- Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, Gelinas C. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene* 2003; 22: 8961-8982.
- Kwon CH, Zhu X, Zhang J *et al.* Pten regulates neuronal soma size: a mouse model of Lhermitte-Duclos disease. *Nat Genet* 2001; 29: 404-411.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005; 201: 233-240.
- Larsen PH, Wells JE, Stallcup WB, Opendakker G, Yong VW. Matrix metalloproteinase-9 facilitates remyelination in part by processing the inhibitory NG2 proteoglycan. *J Neurosci* 2003; 23: 11127-11135.
- Lavdas AA, Papastefanaki F, Thomaidou D, Matsas R. Schwann cell transplantation for CNS repair. *Curr Med Chem* 2008; 15: 151-160.
- Li Q, Estepa G, Memet S, Israel A, Verma IM. Complete lack of NF-kappaB activity in IKK1 and IKK2 double-deficient mice: additional defect in neurulation. *Genes Dev* 2000; 14: 1729-1733.
- Ling L, Cao Z, Goeddel DV. NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 3792-3797.
- Liu YC, Penninger J, Karin M. Immunity by ubiquitylation: a reversible process of modification. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 941-952.
- Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I *et al.* TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev* 1999; 13: 1015-1024.

- Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 1996; 46: 907-911.
- Lucas PC, Yonezumi M, Inohara N *et al.* Bcl10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in malt lymphoma, cooperate in a novel NF-kappa B signaling pathway. *J Biol Chem* 2001; 276: 19012-19019.
- Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study of 113 cases. *Brain* 1999; 122 (Pt 12): 2279-2295.
- Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000; 47: 707-717.
- Lucchinetti CF, Bruck W, Rodriguez M, Lassmann H. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol* 1996; 6: 259-274.
- Luedde T, Beraza N, Kotsikoris V *et al.* Deletion of NEMO/IKKgamma in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 2007; 11: 119-132.
- Lundmark F, Duvefelt K, Iacobaeus E *et al.* Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis. *Nat Genet* 2007; 39: 1108-1113.
- Maeda S, Kamata H, Luo JL, Leffert H, Karin M. IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell* 2005; 121: 977-990.
- Marino S, Vooijs M, van Der GH, Jonkers J, Berns A. Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum. *Genes Dev* 2000; 14: 994-1004.
- Mason JL, Suzuki K, Chaplin DD, Matsushima GK. Interleukin-1beta promotes repair of the CNS. *J Neurosci* 2001; 21: 7046-7052.
- Masuda M, Nagashima R, Kanzaki S, Fujioka M, Ogita K, Ogawa K. Nuclear factor-kappa B nuclear translocation in the cochlea of mice following acoustic overstimulation. *Brain Res* 2006; 1068: 237-247.
- Matsushima GK, Morell P. The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol* 2001; 11: 107-116.
- McAllister-Lucas L, ., Inohara N *et al.* Bimp1, a MAGUK family member linking protein kinase C activation to Bcl10-mediated NF-kappaB induction. *J Biol Chem* 2001; 276: 30589-30597.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E *et al.* MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 1998; 2: 253-258.

Memet S. NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease. *Biochem Pharmacol* 2006; 72: 1180-1195.

Mercurio F, DiDonato JA, Rosette C, Karin M. p105 and p98 precursor proteins play an active role in NF-kappa B-mediated signal transduction. *Genes Dev* 1993; 7: 705-718.

Mercurio F, Zhu H, Murray BW *et al.* IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* 1997; 278: 860-866.

Merrill JE. Proinflammatory and antiinflammatory cytokines in multiple sclerosis and central nervous system acquired immunodeficiency syndrome. *J Immunother (1991)* 1992; 12: 167-170.

Meylan E, Burns K, Hofmann K *et al.* RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* 2004; 5: 503-507.

Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 1997; 278: 1612-1615.

Naumann M, Wulczyn FG, Scheidereit C. The NF-kappa B precursor p105 and the proto-oncogene product Bcl-3 are I kappa B molecules and control nuclear translocation of NF-kappa B. *EMBO J* 1993; 12: 213-222.

Nicholas RS, Wing MG, Compston A. Nonactivated microglia promote oligodendrocyte precursor survival and maturation through the transcription factor NF-kappa B. *Eur J Neurosci* 2001; 13: 959-967.

Nickols JC, Valentine W, Kanwal S, Carter BD. Activation of the transcription factor NF-kappaB in Schwann cells is required for peripheral myelin formation. *Nat Neurosci* 2003; 6: 161-167.

Nikbin B, Bonab MM, Khosravi F, Talebian F. Role of B cells in pathogenesis of multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol* 2007; 79: 13-42.

Nurmi A, Lindsberg PJ, Koistinaho M *et al.* Nuclear factor-kappaB contributes to infarction after permanent focal ischemia. *Stroke* 2004; 35: 987-991.

Orian A, Whiteside S, Israel A, Stancovski I, Schwartz AL, Ciechanover A. Ubiquitin-mediated processing of NF-kappa B transcriptional activator precursor p105. Reconstitution of a cell-free system and identification of the ubiquitin-carrier protein, E2, and a novel ubiquitin-protein ligase, E3, involved in conjugation. *J Biol Chem* 1995; 270: 21707-21714.

Oshiumi H, Sasai M, Shida K, Fujita T, Matsumoto M, Seya T. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem* 2003; 278: 49751-49762.

Ousman SS, David S. Lysophosphatidylcholine induces rapid recruitment and activation of macrophages in the adult mouse spinal cord. *Glia* 2000; 30: 92-104.

Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 1994; 78: 773-785.

- Park SK, Miller R, Krane I, Vartanian T. The erbB2 gene is required for the development of terminally differentiated spinal cord oligodendrocytes. *J Cell Biol* 2001; 154: 1245-1258.
- Pasparakis M, Courtois G, Hafner M *et al.* TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2. *Nature* 2002; 417: 861-866.
- Pasquini LA, Calatayud CA, Bertone Una AL, Millet V, Pasquini JM, Soto EF. The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia. *Neurochem Res* 2007; 32: 279-292.
- Petro JB, Khan WN. Phospholipase C-gamma 2 couples Bruton's tyrosine kinase to the NF-kappaB signaling pathway in B lymphocytes. *J Biol Chem* 2001; 276: 1715-1719.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: e45.
- Plant SR, Arnett HA, Ting JP. Astroglial-derived lymphotoxin-alpha exacerbates inflammation and demyelination, but not remyelination. *Glia* 2005; 49: 1-14.
- Qian Y, Commane M, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Li X. IRAK-mediated translocation of TRAF6 and TAB2 in the interleukin-1-induced activation of NFkappa B. *J Biol Chem* 2001; 276: 41661-41667.
- Quinones MP, Kalkonde Y, Estrada CA *et al.* Role of astrocytes and chemokine systems in acute TNFalpha induced demyelinating syndrome: CCR2-dependent signals promote astrocyte activation and survival via NF-kappaB and Akt. *Mol Cell Neurosci* 2008; 37: 96-109.
- Rebeaud F, Hailfinger S, Posevitz-Fejfar A *et al.* The proteolytic activity of the paracaspase MALT1 is key in T cell activation. *Nat Immunol* 2008; 9: 272-281.
- Rice NR, MacKichan ML, Israel A. The precursor of NF-kappa B p50 has I kappa B-like functions. *Cell* 1992; 71: 243-253.
- RICHARDSON KC, JARETT L, FINKE EH. Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol* 1960; 35: 313-323.
- Rothwarf DM, Zandi E, Natoli G, Karin M. IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the I kappa B kinase complex. *Nature* 1998; 395: 297-300.
- Rubio JP, Bahlo M, Stankovich J *et al.* Analysis of extended HLA haplotypes in multiple sclerosis and narcolepsy families confirms a predisposing effect for the class I region in Tasmanian MS patients. *Immunogenetics* 2007; 59: 177-186.
- Ruland J, Duncan GS, Elia A *et al.* Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure. *Cell* 2001; 104: 33-42.
- Schwaninger M, Inta I, Herrmann O. NF-kappaB signalling in cerebral ischaemia. *Biochem Soc Trans* 2006; 34: 1291-1294.
- Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986; 47: 921-928.

- Senftleben U, Cao Y, Xiao G *et al.* Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science* 2001; 293: 1495-1499.
- Senftleben U, Karin M. The IKK/NF- κ B pathway. *Crit Care Med* 2002; 30: S18-S26.
- Setzu A, Lathia JD, Zhao C *et al.* Inflammation stimulates myelination by transplanted oligodendrocyte precursor cells. *Glia* 2006; 54: 297-303.
- Sha WC, Liou HC, Tuomanen EI, Baltimore D. Targeted disruption of the p50 subunit of NF- κ B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* 1995; 80: 321-330.
- Sherman DL, Brophy PJ. Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 683-690.
- Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annu Rev Cell Biol* 1994; 10: 405-455.
- Simard AR, Rivest S. Neuroprotective effects of resident microglia following acute brain injury. *J Comp Neurol* 2007; 504: 716-729.
- Simons M, Trajkovic K. Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *J Cell Sci* 2006; 119: 4381-4389.
- Simons M, Trotter J. Wrapping it up: the cell biology of myelination. *Curr Opin Neurobiol* 2007; 17: 533-540.
- Smith ME. Phagocytosis of myelin in demyelinating disease: a review. *Neurochem Res* 1999; 24: 261-268.
- Sotgiu S, Pugliatti M, Fois ML *et al.* Genes, environment, and susceptibility to multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 2004; 17: 131-143.
- Sovak MA, Bellas RE, Kim DW *et al.* Aberrant nuclear factor- κ B/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest* 1997; 100: 2952-2960.
- Stilo R, Varricchio E, Liguoro D, Leonardi A, Vito P. A20 is a negative regulator of BCL10- and CARMA3-mediated activation of NF- κ B. *J Cell Sci* 2008; 121: 1165-1171.
- Su TT, Guo B, Kawakami Y *et al.* PKC- β controls I κ B kinase lipid raft recruitment and activation in response to BCR signaling. *Nat Immunol* 2002; 3: 780-786.
- Sun L, Deng L, Ea CK, Xia ZP, Chen ZJ. The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol Cell* 2004; 14: 289-301.
- Tada K, Okazaki T, Sakon S *et al.* Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF- κ B activation and protection from cell death. *J Biol Chem* 2001; 276: 36530-36534.

- Takaesu G, Ninomiya-Tsuji J, Kishida S, Li X, Stark GR, Matsumoto K. Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase leads to activation of TAK1 by inducing TAB2 translocation in the IL-1 signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 2475-2484.
- Talbot PJ, Paquette JS, Ciurli C, Antel JP, Ouellet F. Myelin basic protein and human coronavirus 229E cross-reactive T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1996; 39: 233-240.
- Tan JE, Wong SC, Gan SK, Xu S, Lam KP. The adaptor protein BLNK is required for B cell antigen receptor-induced activation of nuclear factor-kappa B and cell cycle entry and survival of B lymphocytes. *J Biol Chem* 2001; 276: 20055-20063.
- Tang G, Minemoto Y, Dibling B *et al.* Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature* 2001; 414: 313-317.
- Teleshova N, Pashenkov M, Huang YM *et al.* Multiple sclerosis and optic neuritis: CCR5 and CXCR3 expressing T cells are augmented in blood and cerebrospinal fluid. *J Neurol* 2002; 249: 723-729.
- Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ *et al.* Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 2008; 172: 146-155.
- Udalova IA, Richardson A, Denys A *et al.* Functional consequences of a polymorphism affecting NF-kappaB p50-p50 binding to the TNF promoter region. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 9113-9119.
- van Loo G, De Lorenzi R, Schmidt H *et al.* Inhibition of transcription factor NF-kappaB in the central nervous system ameliorates autoimmune encephalomyelitis in mice. *Nat Immunol* 2006; 7: 954-961.
- Villalba M, Coudronniere N, Deckert M, Teixeira E, Mas P, Altman A. A novel functional interaction between Vav and PKCtheta is required for TCR-induced T cell activation. *Immunity* 2000; 12: 151-160.
- Vollgraf U, Wegner M, Richter-Landsberg C. Activation of AP-1 and nuclear factor-kappaB transcription factors is involved in hydrogen peroxide-induced apoptotic cell death of oligodendrocytes. *J Neurochem* 1999; 73: 2501-2509.
- Weinberg EL, Spencer PS. Studies on the control of myelinogenesis. 3. Signalling of oligodendrocyte myelination by regenerating peripheral axons. *Brain Res* 1979; 162: 273-279.
- Wellmann H, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. Retrograde transport of transcription factor NF-kappa B in living neurons. *J Biol Chem* 2001; 276: 11821-11829.
- Werts C, Girardin SE, Philpott DJ. TIR, CARD and PYRIN: three domains for an antimicrobial triad. *Cell Death Differ* 2006; 13: 798-815.
- Willer CJ, Dymont DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 12877-12882.

- Wu CJ, Conze DB, Li T, Srinivasula SM, Ashwell JD. Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 398-406.
- Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995; 80: 695-705.
- Xing B, Liu M, Bing G. Neuroprotection with pioglitazone against LPS insult on dopaminergic neurons may be associated with its inhibition of NF-kappaB and JNK activation and suppression of COX-2 activity. *J Neuroimmunol* 2007; 192: 89-98.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H *et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003; 301: 640-643.
- Yamauchi J, Chan JR, Shooter EM. Neurotrophin 3 activation of TrkC induces Schwann cell migration through the c-Jun N-terminal kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 14421-14426.
- Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* 1997; 91: 243-252.
- Zang YC, Li S, Rivera VM *et al.* Increased CD8+ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis. *J Immunol* 2004; 172: 5120-5127.
- Zhang SQ, Kovalenko A, Cantarella G, Wallach D. Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation. *Immunity* 2000; 12: 301-311.
- Zhang Y, Taveggia C, Melendez-Vasquez C *et al.* Interleukin-11 potentiates oligodendrocyte survival and maturation, and myelin formation. *J Neurosci* 2006; 26: 12174-12185.
- Zhong H, May MJ, Jimi E, Ghosh S. The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol Cell* 2002; 9: 625-636.
- Zhong H, Voll RE, Ghosh S. Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell* 1998; 1: 661-671.
- Zhu Y, Romero MI, Ghosh P *et al.* Ablation of NF1 function in neurons induces abnormal development of cerebral cortex and reactive gliosis in the brain. *Genes Dev* 2001; 15: 859-876.
- Zhuo L, Theis M, varez-Maya I, Brenner M, Willecke K, Messing A. hGFAP-cre transgenic mice for manipulation of glial and neuronal function in vivo. *Genesis* 2001; 31: 85-94.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jenni Raasch
Geburtsdatum: 06.10.1978
Geburtsort: München
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

1984-1988 Grundschole, München
1988-1997 Willi-Graf-Gymnasium, München
06/1997 Abitur (Abschlussnote 2,2)
09/1997-05/1998 Sprachschule Institut Parisien, Paris

Hochschulbildung

09/1998-12/2000 Grundstudium der Technischen Biologie an der Universität Stuttgart (Abschlussnote: gut)
12/2000-03/2005 Hauptstudium der Technischen Biologie mit Hauptfach Zellbiologie; Nebenfächer Tierphysiologie, Industrielle Genetik; Wahlpflichtfach Biochemie
04/2004-03/2005 Diplomarbeit am Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart, Thema "Expression und Funktion der Protein Kinase D während der Mausembryogenese"
Abschlussnote: sehr gut
seit 05/2005 Wissenschaftliche Mitarbeit am Institut für Neuropathologie der Universität Göttingen

Dissertation

01/2007-06/2008 Dissertation im Institut für Neuropathologie der Universität Göttingen unter Anleitung von Prof. Dr. med. M. Prinz