

Aus der Abteilung Neuropathologie
(Prof. Dr. med. W. Brück)
im Zentrum Pathologie und Rechtsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Multiple Sklerose
Einflussfaktoren von Oligodendrozytendichte und
Remyelinisierung
Östrogen und Progesteron als Protektiva?

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Thomas Goldschmidt
aus
Frankfurt am Main

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Brück

II. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. J. Gärtner

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juni 2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Multiple Sklerose	1
1.1.1	Histologie und Pathogenese	3
1.1.2	Geschlechtsunterschiede	5
1.1.3	Remyelinisierung	6
1.2	Oligodendrozyten und oligodendrogliale Zelllinien (CG4-Zellen)	7
1.2.1	Die Zelltodinduktoren Stickstoffmonoxid und Staurosporin	8
1.2.2	Östrogen und Progesteron im ZNS	9
1.3	Fragestellung	12
2	Material und Methoden	15
2.1	Histologie	15
2.1.1	Geräte, Verbrauchsmaterialien und Rezepte	15
2.1.2	Histologisches Material	16
2.1.3	Färbeverfahren: Immunhistochemie und LFB-PAS-Hämalaun	18
2.1.4	Auswertung	22
2.2	RT-PCR und Zellkultur	25
2.2.1	Geräte, Verbrauchsmaterialien und Rezepte	25
2.2.2	Rezeptornachweis mittels RT-PCR bei menschlichem und tierischem Gewebe	27
2.2.3	Zellkultur: Proliferations- und Zelltodexperimente an CG4-Zellen mit und ohne Östrogen- bzw. Progesteronpräinkubation	33
2.2.4	Auswertung	35
3	Ergebnisse	37
3.1	Die Anzahl der Oligodendrozyten und OPCs im gesunden Corpus callosum ist unabhängig von Geschlecht und Alter	37
3.2	Es gibt keinen Unterschied zwischen Gesunden und MS-Kranken bezüglich Oligodendrozyten- und OPC-Anzahl im Corpus callosum, die MS-Verlaufsform beeinflusst die Anzahl der Oligodendrozyten, diejenige der OPCs bleibt unbeeinflusst	38
3.3	Es gibt keinen Geschlechtsunterschied in der Remyelinisierungskapazität chronisch demyelinisierter Läsionen bei MS, auch die MS-Verlaufsform hat hierauf keinen Einfluss	40
3.4	Die Remyelinisierungskapazität ist intraindividuell heterogen, die Krankheitsdauer und das Todesalter haben keinen Einfluss auf den Remyelinisierungsgrad der Läsionen	41
3.5	Die anatomische Lokalisation von MS-Läsionen korreliert mit dem Ausmaß der Remyelinisierung	43
3.6	ER β ist bei an MS erkrankten und gesunden Gehirnen in der weißen Substanz nachweisbar, ER α wird nur im Kortex exprimiert; PR findet sich in der gesunden weißen und grauen und variabel in der weißen Substanz MS-Kranker	45
3.7	Humane Oligodendrozyten zeigen eine starke Bande für ER β , für ER α besteht eine schwache, für PR keine Bande	46
3.8	CG4-Zellen zeigen Banden für rER β und rPR, aber nicht für rER α	47

3.9	Östrogen fördert die Proliferation von oligodendroglialen Zellen, Progesteron zeigt keinen proliferativen Effekt	47
3.10	Progesteron wirkt protektiv auf oligodendrogliale Zellen bei Anwesenheit von SNAP, Östrogen zeigt keinen protektiven Effekt.....	49
3.11	Zusammenfassung der Ergebnisse	52
4	Diskussion.....	53
4.1	Einflussfaktoren der Oligodendrozyten- und OPC-Dichte	53
4.2	Einflussfaktoren der Remyelinisierungskapazität bei Multipler Sklerose.....	54
4.3	Die gliale Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren im menschlichen ZNS.....	58
4.4	Die Wirkung von Östrogen und Progesteron auf oligodendrogliale CG4-Zellen ..	61
5	Zusammenfassung	65
6	Literaturverzeichnis	66

Verzeichnis der Abbildungen im Text

Abbildung 1:.....	10
Abbildung 2:.....	22
Abbildung 3:.....	23
Abbildung 4:.....	32
Abbildung 5:.....	37
Abbildung 6:.....	38
Abbildung 7:.....	39
Abbildung 8:.....	40
Abbildung 9:.....	41
Abbildung 10:.....	42
Abbildung 11:.....	43
Abbildung 12:.....	44
Abbildung 13:.....	45
Abbildung 14:.....	46
Abbildung 15:.....	47
Abbildung 16:.....	48
Abbildung 17:.....	50
Abbildung 18:.....	51

Verzeichnis der Tabellen im Text

Tabelle 1:	3
Tabelle 2:	5
Tabelle 3:	9
Tabelle 4:	16
Tabelle 5:	17
Tabelle 6:	18
Tabelle 7:	19
Tabelle 8:	19
Tabelle 9:	20
Tabelle 10:	28
Tabelle 11:	29
Tabelle 12:	31
Tabelle 13:	31

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.:	Abbildung
Aqua bidest:	<i>Aqua bidestillata</i> zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest:	<i>Aqua destillata</i> destilliertes Wasser
bspw.:	beispielsweise
bzw.:	beziehungsweise
ca.:	circa
C.c.:	<i>Corpus callosum</i>
CD4+:	<i>cluster of differentiation 4 positive</i> Differenzierungsmuster 4 positiv
CD8+:	<i>cluster of differentiation 8 positive</i> Differenzierungsmuster 8 positiv
CG4-Zellen:	Central Glia 4-Zellen
DMEM:	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium, Einsatz in der Zellkultur
dNTPs:	Desoxynukleotidtriphosphate
EAE:	experimentelle autoimmune Enzephalitis
ER:	<i>Estrogen receptor</i> Östrogenrezeptor
GABA:	<i>gamma-Aminobutyric acid</i> Gammaaminobuttersäure
h:	<i>hora(e)</i> Stunde(n)
Lj:	Lebensjahr
LFB-PAS:	<i>Luxol Fast Blue - Periodic acid Schiff</i> Luxol Fast Blue – Perjodsäure Schiff
min:	Minute(n)
MRT:	Magnetresonanztomographie
MS:	Multiple Sklerose
NAWM:	<i>normal-appearing white matter</i> normal erscheinende weiße Substanz

NO:	Stickstoffmonoxid
(i)NOS:	(induzierbare)Stickstoffmonoxid-Synthase
OLIG2:	Oligodendrozyten-Transkriptionsfaktor 2
OPC:	<i>oligodendrocyte precursor cell</i> Vorläuferzelle von Oligodendrozyten
PAS:	<i>Periodic acid Schiff</i> Perjodsäure Schiff
PPMS:	<i>primary-progressive multiple sclerosis</i> primär progrediente Multiple Sklerose
PR:	Progesteronrezeptor
PRMS:	<i>progressive-relapsing multiple sclerosis</i> progredient-schubförmige Multiple Sklerose
RM:	Rückenmark
rpm:	<i>rounds per minute</i> Runden pro Minute
RRMS:	<i>relapsing-remitting multiple sclerosis</i> schubförmige Multiple Sklerose
s.:	siehe
s.a.:	siehe auch
sec:	Sekunde(n)
SIN-1:	3-Morpholino-15N-Sydnominin
SNAP:	S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin
sog.:	sogenannte(r)
SPMS:	<i>secondary-progressive multiple sclerosis</i> sekundär progrediente Multiple Sklerose
Tab.:	Tabelle
Taq:	<i>Thermus aquaticus</i>
Th1-Zellen:	T-Helfer-1-Zellen
TRAIL:	<i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i> mit Tumornekrosefaktor verwandter Apoptose-induzierender Ligand
UMG:	Universitätsmedizin Göttingen
vgl.:	vergleiche
vs.:	versus
ZNS:	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

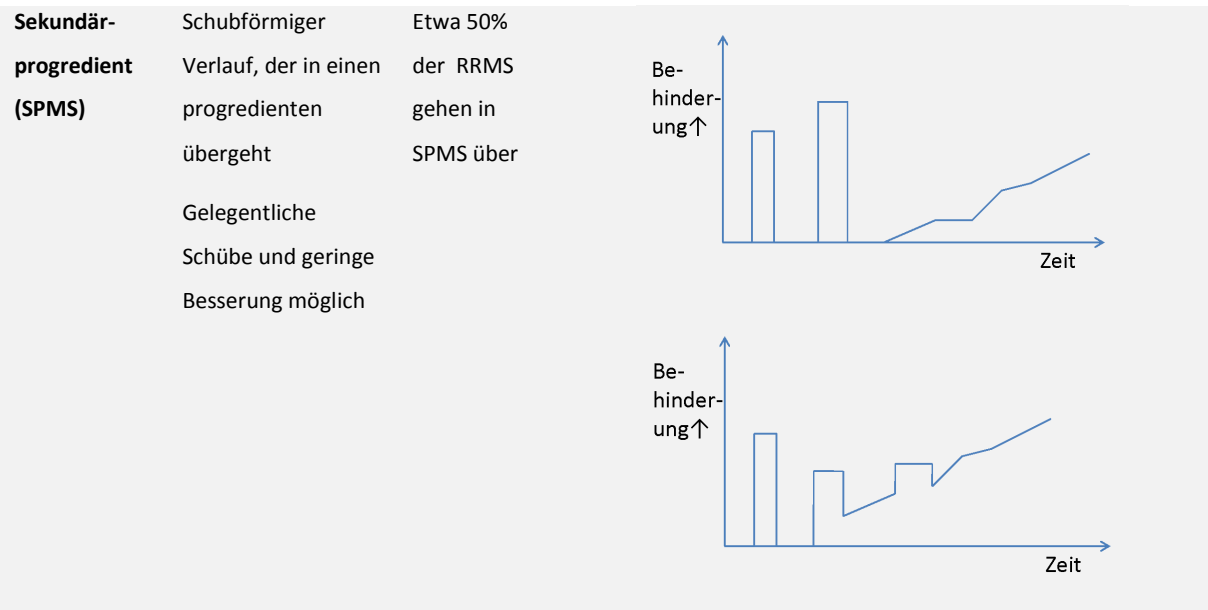
Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS). In Deutschland waren im Jahr 2000 etwa 120.000 Menschen an MS erkrankt (Hein und Hopfenmuller 2000). In westlichen Ländern ist MS der häufigste Grund für eine neurologische Behinderung im jüngeren Erwachsenenalter (Courtney et al. 2009). MS weist eine große klinische, bildgebende und pathologische Heterogenität auf (Wiendl et al. 2006). Frauen erkranken mindestens doppelt so häufig wie Männer (Orton et al. 2006; Alonso und Hernan 2008).

Da grundsätzlich alle Teile des ZNS betroffen sein können (Lublin 2004), ist das klinische Bild der Erkrankung sehr vielfältig. Symptome entstehen, wenn die Nervenleitung durch die Demyelinisierung blockiert wird (McDonald und Sears 1970) bzw. wenn es zu axonalem Verlust kommt. Die Initialsymptome bei jüngeren Patienten bestehen meist aus sensorischen Störungen oder Sehstörungen durch eine Retrobulbärneuritis; bei älteren Patienten beginnt die Erkrankung häufig mit motorischen Beeinträchtigungen (Weinshenker et al. 1989). Typische Symptome sind weiterhin ein Auftreten von Doppelbildern und Schwindel (bei Hirnstammeteiligung), Gleichgewichts- (bei Kleinhirnbeteiligung) und Blasenstörungen (möglich bei Hirn- und Rückenmarksbeteiligung) (Compston und Coles 2002; Del Popolo et al. 2008). Über diese Symptome hinaus leiden viele Patienten an kognitiven und psychischen Beeinträchtigungen (Jose Sa 2008; Smestad et al. 2009). Hierfür werden sowohl Läsionen der grauen als auch der weißen Substanz verantwortlich gemacht (Sanfilippo et al. 2006).

MS beginnt typischerweise um das 30. Lebensjahr (Lj), kann in seltenen Fällen aber auch vor dem 15. und nach dem 50. Lj auftreten (Prineas et al. 2002). Der klinische Verlauf eines individuellen Patienten ist nicht vorhersagbar (Vukusic und Confavreux 2007). Er bewegt sich zwischen den seltenen Extremen: Tod innerhalb weniger Monate und komplett asymptomatischen Verläufen. Einigen Faktoren wird jedoch ein prognostischer Wert zugeschrieben. Für eine gute Prognose sprechen z.B. weibliches Geschlecht und das Überwiegen sensorischer Symptome, für eine schlechte Prognose hingegen männliches Geschlecht und das frühe Überwiegen motorischer Symptome (Noseworthy et al. 2000). Auch der Verlaufsform wird ein prognostischer Wert beigemessen (s.u.). Durchschnittlich sind 50% der unbehandelten Patienten 15 Jahre nach Diagnosestellung auf eine Gehhilfe angewiesen (Weinshenker et al. 1989).

Es werden verschiedene klinische Verlaufsformen unterschieden. Am gebräuchlichsten ist die Einteilung nach Lublin und Reingold (Lublin und Reingold 1996). Die wissenschaftlich und klinisch relevanten Verläufe sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Der progrediente Verlauf (PPMS und SPMS) ist im Vergleich zum schubförmigen mit einer rascheren Zunahme an Behinderung und damit einer schlechteren Prognose assoziiert (Runmarker und Andersen 1993).

	Definition	Anteil der MS-Patienten	Graphische Darstellung
Schubförmig (RRMS)	Wiederkehrende Schübe mit vollständiger oder unvollständiger Remission, freies Intervall zwischen Schüben	85-90%, kann in SPMS übergehen	
Primär-progredient (PPMS)	Progredientes Fortschreiten der Erkrankung von Beginn an, gelegentliche Plateaus und geringe Besserung möglich	10%	

**Tabelle 1:**

Die verschiedenen MS-Verlaufsformen nach Lublin und Reingold (1996), S. 908-10.

Die Diagnose „schubförmige MS“ (RRMS) kann rein klinisch gestellt werden. Gefordert werden eine räumliche und eine zeitliche Dissemination, d.h. der Nachweis, dass mindestens zwei verschiedene Bereiche des ZNS zu verschiedenen Zeiten betroffen waren. Paraklinische Befunde, die durch elektrophysiologische Untersuchungen, durch Liquoranalyse oder den Einsatz der Magnetresonanztomographie (MRT) erhoben werden, können die räumliche bzw. die zeitliche Dissemination ersetzen (Polman et al. 2005). Auf diese Weise ist ein Abwarten eines nächsten klinischen Schubes häufig nicht mehr nötig. Eine frühe Diagnose erscheint deshalb wichtig, da es Hinweise gibt, dass eine früh begonnene Therapie den Verlauf der Krankheit positiv beeinflusst (Tintoré 2008). Die Diagnosen PPMS bzw. SPMS werden durch den klinischen Verlauf und zusätzliche paraklinische Befunde gestellt (Polman et al. 2005).

In der MS-Therapie kann trotz großer Fortschritte in den letzten Jahrzehnten bislang kein Medikament das Fortschreiten der Krankheit zum Stillstand bringen (Weiner 2009). Als besonders schwer zu beeinflussen haben sich die progredienten Verläufe erwiesen (Hohlfeld und Wekerle 2004; Weiner 2009). Hormonpräparate werden derzeit in der MS-Therapie nicht eingesetzt.

1.1.1 Histologie und Pathogenese

Demyelinisierung, relative Schonung von Axonen, Entzündung, astrogliale Vernarbung und variable Remyelinisierung (s. 1.1.3) sind typische Kennzeichen einer MS-Läsion (Prineas et al. 2002). Die Läsionen treten multifokal auf und sind gehäuft in den Nervi optici, der

periventrikulären weißen Substanz, im Hirnstamm, Kleinhirn und der weißen Substanz des Rückenmarks zu finden (Noseworthy et al. 2000). Sie sind überwiegend perivenös gelegen und messen einige Millimeter bis einige Zentimeter im Durchmesser (Adams und Kubik 1952). In 2/3 der Fälle sind Großhirn, Rückenmark und Nervi optici ähnlich stark betroffen, mit Auslassung einer dieser Regionen in weniger als 15 % der Fälle (Ikuta und Zimmerman 1976). Der Großteil (40 %) der zerebralen Läsionen befindet sich in der periventrikulären weißen Substanz (Brownell und Hughes 1962). Hierzu zählt auch das Corpus callosum (C.c.), das eine Nervenfaserverbindung zwischen den beiden Hemisphären darstellt und in dieser Arbeit vielfach Fokus der Untersuchung ist. Läsionen der kortikalen grauen Substanz wurden traditionell als selten eingestuft (Charcot 1886; Adams und Kubik 1952), sind aber bei Patienten mit langjähriger MS (Verlaufsform unberücksichtigt) in 90 % vorhanden (Wegner und Stadelmann 2009). Insbesondere bei progredienten Verläufen (Miller et al. 2002; Kutzelnigg et al. 2005) - PPMS und SPMS - können außerhalb der Läsionen, in der sogenannten „normal erscheinenden weißen Substanz“ (NAWM), diffuse axonale Schäden und Mikrogliaaktivierung beobachtet werden (Kutzelnigg et al. 2005). Diese scheinen im C.c. besonders ausgeprägt zu sein (Evangelou et al. 2000).

Chronische Läsionen sind häufig komplett demyelinisiert, frei von entzündlicher Aktivität und frei von Oligodendrozyten (Prineas 2002, zu Oligodendrozyten s. 1.2). Aktiv demyelinisierende Läsionen stellen sich dagegen heterogener dar; sie sind gekennzeichnet durch Myelinphagozytose (Brück et al. 1995), variablen Oligodendrozytenverlust (Brück et al. 1994) und ein perivaskuläres und intraläsionelles entzündliches Infiltrat, das von T-Lymphozyten und Mikroglia/Makrophagen dominiert wird, aber auch B-Zellen und Plasmazellen beinhaltet (Noseworthy et al. 2000). Neuere immunpathologische Erkenntnisse, die an aktiv demyelinisierenden MS-Läsionen zustande kamen, unterstreichen die Vorstellung einer pathogenetischen Heterogenität von MS (Lucchinetti et al. 2000). Lucchinetti und Kollegen unterscheiden vier histologische Typen von MS-Läsionen (s. Tab. 2). Den vier Typen ist gemeinsam, dass sie ein entzündliches Infiltrat von T-Lymphozyten und Makrophagen aufweisen. Unterscheiden kann man sie unter anderem hinsichtlich des vermuteten Mechanismus und der Höhe des Oligodendrozytenverlusts, sowie bezüglich des Nachweises von aktiviertem Komplement und Immunglobulinen. Für die nach den Typ-II-Läsionen am zweithäufigsten auftretenden Typ-III-Läsionen nehmen die Autoren eine primäre Schädigung der Oligodendrozyten an, verursacht möglicherweise durch ein noch unbekanntes Virus oder Toxin. Auch für Typ IV, der bisher nur bei PPMS zu beobachten war, wird eine primäre

Schädigung der Oligodendrozyten diskutiert. Für die Typen I-III ergab sich keine eindeutige Korrelation mit einem bestimmten klinischen Verlauf.

	<i>OG (Zellen / mm²)</i>	<i>Besonderheit</i>	<i>Vermuteter Pathomechanismus</i>
Typ I	295 ± 73	Komplement, IgG -	T-Zellen/ Makrophagen
Typ II	249 ± 30	Komplement, IgG +++	Antikörper vermittelt
Typ III	51 ± 24	Apoptotische OG: 14 – 37 %	Primäre OG-Schädigung
Typ IV	55 ± 55	OG-Verlust, keine Apoptose	Primäre OG-Schädigung

Tabelle 2:

Vier Typen der MS-Histologie nach Lucchinetti et al. (2000), S. 709, OG = Oligodendrozyten.

Eine alternative Erklärung für die histologische Heterogenität bei MS wäre, dass es sich bei den vier Läsionstypen um verschiedene Stadien der gleichen Krankheit handelt (Barnett und Prineas 2004). Barnett und Prineas verstehen die primäre Oligodendrozytenschädigung der Typ-III-Läsionen als das initiale Ereignis der Krankheitsentstehung. Die „Neurodegenerationshypothese“ geht hierbei von einem intrinsischen Schaden der Oligodendrozyten aus, der zu oligodendroglialem Zelltod und durch die Beseitigung des Zelldetritus zu einer Entzündungsreaktion und Autoimmunisierung führt (Trapp 2004; Prat und Antel 2005). In deren Folge erst entstünden dann die typischen MS-Läsionen. Das entzündliche Infiltrat wäre entsprechend Folge und nicht Ursache der primären Demyelinisierung (Barnett et al. 2006), könnte aber im Verlauf die Krankheit weiter unterhalten (Barnett und Sutton 2006).

1.1.2 Geschlechtsunterschiede

Das Geschlecht hat einen großen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit an MS zu erkranken. Frauen erkranken mindestens doppelt so häufig wie Männer, wobei die Inzidenz für Frauen in den letzten Jahrzehnten im Gegensatz zu derjenigen für Männer noch zugenommen hat (Orton et al. 2006; Alonso und Hernan 2008). Berücksichtigt man die verschiedenen Verlaufsformen, so findet man, dass bei schubförmigem Verlauf die Inzidenz für Frauen bis zu 3,5mal über derjenigen für Männer liegt (Noseworthy et al. 2000). An der prognostisch ungünstigeren PPMS erkranken dagegen Männer häufiger als Frauen (Weinshenker et al. 1991; Runmarker und Andersen 1993). Doch scheint das männliche Geschlecht auch unabhängig von der Verlaufsform ein prognostisch negativer Faktor zu sein (Weinshenker et al. 1991; Confavreux

und Vukusic 2006). Zu geschlechtsabhängigen Unterschieden bezüglich der MS-Histologie liegen nur wenige Studien vor. Kuhlmann und Kollegen (Kuhlmann et al. 2009) konnten keine Geschlechtsunterschiede in der Zusammensetzung oder im Ausmaß der Entzündungsreaktion früher MS-Läsionen feststellen. Auch das Ausmaß der kortikalen Beteiligung war zwischen den Geschlechtern nicht unterschiedlich. Nur hinsichtlich des axonalen Schadens innerhalb der NAWM scheinen Männer stärker betroffen zu sein als Frauen (Ganter et al. 1999). Geschlechtsunterschiede bei gesunden Gehirnen sind hingegen schon länger bekannt. Für MS am relevantesten scheint zu sein, dass männliche Gehirne bei einem etwa 10% größeren Volumen (Goldstein et al. 2001) proportional über weniger graue und mehr weiße Substanz verfügen als weibliche (Filipek et al. 1994; Goldstein et al. 2001). Bei gesunden Ratten und Mäusen konnte überdies gezeigt werden, dass die Oligodendrozytendichte im Corpus callosum, dem Fornix und in der weißen Substanz des Rückenmarks bei männlichen Tieren um 20-40% höher liegt als bei weiblichen (Cerghet et al. 2006). Dies wurde in Zusammenhang gebracht mit einer kürzeren Lebensdauer von weiblichen Oligodendrozyten, auf die vermehrter Zelltod und erhöhter Zellumsatz von weiblichen vs. männlichen Oligodendrozyten hinweisen (Cerghet et al. 2006). Beim Menschen stehen derartige Untersuchungen noch aus, wobei analoge Ergebnisse die höhere Suszeptibilität von Frauen für MS erhellen könnten.

1.1.3 Remyelinisierung

Die Remyelinisierung ist ein endogener Reparaturmechanismus, bei dem Oligodendrozyten nach erfolgter Demyelinisierung neues Myelin bilden (s.a. 1.2). Auf diese Weise wird die axonale elektrische Leitgeschwindigkeit erhöht (Smith et al. 1981), neurologische Funktionen können wiederhergestellt (Liebetanz und Merkler 2006; Duncan et al. 2009) und der axonale Verlust reduziert werden (Irvine und Blakemore 2008). Das neu gebildete Myelin ist jedoch nicht identisch mit dem vorbestehenden Myelin. Es befindet sich meist am Läsionsrand (Prineas und Connell 1979), ist dünner (Ludwin und Maitland 1984) und die Internodien sind kürzer (Prineas und Connell 1979). Aufgrund dieser morphologischen Unterschiede ist es von vorbestehendem Myelin nach entsprechender Färbung lichtmikroskopisch unterscheidbar. In Tiermodellen tritt die Remyelinisierung regelmäßig und nahezu vollständig nach traumatischer (Lasiene et al. 2008) und toxischer (Matsushima und Morell 2001; Blakemore und Franklin 2008) Demyelinisierung auf. Bei Demyelinisierung durch MS ist die Remyelinisierung hingegen stark eingeschränkt. Die meisten chronischen MS-Läsionen sind

nicht oder nur teilweise und nur in etwa 20% komplett remyelinisiert (Patrikios et al. 2006; Patani et al. 2007; Goldschmidt et al. 2009). Bei frischen Läsionen ist die Remyelinisierungsrate hingegen höher (Prineas et al. 1993; Goldschmidt et al. 2009). Wir konnten zeigen, dass 80,7% der neu aufgetretenen Läsionen Zeichen von Remyelinisierung aufweisen, im Gegensatz zu nur 60% bei chronischen Läsionen (Goldschmidt et al. 2009). Wie diese Abnahme der Remyelinisierungskapazität im Krankheitsverlauf und das generelle MS-spezifische Remyelinisierungsversagen zu erklären sind, ist zum heutigen Zeitpunkt noch unklar. Eine wichtige Rolle scheinen jedoch die sog. Oligodendrozytenvorläuferzellen (OPCs) einzunehmen, die im gesamten ZNS zu finden sind (Dawson et al. 2000), doch in der grauen Substanz häufiger (75 Zellen/mm²) als in der weißen (46 Zellen/mm²) vorkommen (Kuhlmann et al. 2008). Es wird davon ausgegangen, dass sie den Hauptursprung der remyelinisierenden Oligodendrozyten darstellen (Scolding et al. 1998; Keirstead und Blakemore 1999; Franklin und French-Constant 2008). Die Differenzierung von OPCs in myelinisierende Oligodendrozyten scheint bei MS gestört zu sein, denn auch in chronischen, nicht remyelinisierenden Läsionen sind OPCs nachweisbar (Wolswijk 2002; Kuhlmann et al. 2008). Die Ursache dieses Differenzierungsblocks ist unklar. Generell sind die Faktoren, die die Remyelinisierungskapazität bei MS beeinflussen, nur unvollständig verstanden.

1.2 Oligodendrozyten und oligodendrogliale Zelllinien (CG4-Zellen)

Oligodendrozyten sind neben Astrozyten die Hauptvertreter der Gruppe der Neuroglia, die zusammen etwa 90% der ZNS-Zellen ausmachen. Adulte Oligodendrozyten haben einen runden, chromatindichten Zellkern mit schmalen Zytoplasmasaum und messen ca. 8-10µm im Durchmesser (vgl. Abb. 1B). Ihre Hauptfunktion ist die Myelinisierung von Axonen. Die Myelinscheiden werden mittels dünner Membranfortsätze (~30/Zelle) gebildet, die sich mehrfach um etwa 200µm lange Axonsegmente winden und auf diese Weise die intraaxonale elektrische Leitfähigkeit verbessern (Baumann und Pham-Dinh 2001). Die Dicke der Myelinscheide ist hierbei proportional dem Axondurchmesser (Waxman und Sims 1984).

Im Laufe der MS-Erkrankung kommt es zu einem intraläsionellen Oligodendrozytenverlust (vgl. 1.1.1). In dieser Arbeit soll der Einfluss von Östrogen und Progesteron auf das Überleben von Oligodendrozyten in Anwesenheit von Zelltodinduktoren (s.1.2.1) untersucht werden. Hierfür kommt die Zelllinie Central Glia 4 (CG4) zum Einsatz, welche spontan aus bipotenten Vorläuferzellen aus Primärkulturen des Ratten-ZNS entstanden ist (Louis et al. 1992). Sie lässt sich in Astrozyten und in adulte Oligodendrozyten differenzieren. Unter

Einfluss von Mitogenen der neuronalen Zelllinie B104 (Schubert et al. 1974) können CG4-Zellen unter Wahrung ihrer Bipotentialität über lange Zeit kultiviert werden. Werden die Mitogene entzogen, so differenzieren sie sich zu 98% in adulte Oligodendrozyten (Louis et al. 1992). Diese Oligodendrozyten sind hinsichtlich Karyotyp, Zellmorphologie und immunzytochemischen Markern von primären Oligodendrozyten nicht zu unterscheiden (Louis et al. 1992; Franklin et al. 1995). Werden CG4-Zellen in demyelinisierte ZNS-Läsionen lebender Ratten transplantiert, so zeichnen sich die neu differenzierten adulten Oligodendrozyten durch eine hohe Remyelinisierungskapazität aus und zeigen keine Anzeichen von Malignität (Franklin et al. 1995).

1.2.1 Die Zelltodinduktoren Stickstoffmonoxid und Staurosporin

Stickstoffmonoxid (NO) hat im menschlichen Körper vielerlei Funktionen. Als Signalmolekül vermittelt es u.a. eine Vasodilatation und trägt zur Neurotransmission bei (Lowenstein et al. 1994), höhere Konzentrationen führen zum Zelltod. NO hat trotz einer im Sekundenbereich liegenden Halbwertszeit aufgrund seiner hohen Membrandiffusionskapazität einen großen Wirkradius (Wood und Garthwaite 1994). Es wird physiologischerweise durch die calciumabhängigen und konstitutiven endothelialen und neuronalen NO-Synthasen (NOS) aus Arginin und freiem Sauerstoff synthetisiert: $\text{Arginin} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Citrullin} + \text{NO}$. Höhere und damit zytotoxisch wirksame (Moncada und Erusalimsky 2002) NO-Konzentrationen werden durch die calciumunabhängige, induzierbare NOS (iNOS) erreicht. Diese wird bei Gesunden im ZNS nicht exprimiert, bei Entzündungen und insbesondere bei akuter MS ist sie jedoch in Mikroglia/Makrophagen und Astrozyten nachweisbar (Murphy et al. 1993; Oleszak et al. 1998). *In vitro* führt NO zu mitochondrialer Dysfunktion, DNA-Schäden, Änderungen in der Zellmorphologie und Zelltod von Rattenoligodendrozyten (Mitrovic et al. 1995). Ob der Zelltod nekrotisch oder apoptotisch verläuft, ist dabei vermutlich abhängig von der Höhe der NO-Konzentration (Bonfoco et al. 1995). Es gibt Hinweise, dass NO auch bei MS den Zelltod von Oligodendrozyten induziert. Dafür spricht der Nachweis von iNOS und von Nitrotyrosin innerhalb von MS-Läsionen (De Groot et al. 1997; Cross et al. 1998; J. S. Liu et al. 2001). Letzteres wird durch Peroxynitrit gebildet, welches spontan bei Anwesenheit von NO und Sauerstoffradikalen entsteht und bei humanen Oligodendrozyten *in vitro* zum Zelltod führt (Jack et al. 2007). In dieser Arbeit kommt S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin (SNAP) als NO-Donor zum Einsatz. Bei 37°C setzt SNAP spontan NO frei (Kowaluk und Fung 1990).

Staurosporin wurde 1977 aus *Streptomyces staurosporeus* isoliert (Nakano und Omura 2009) und ist ein unspezifischer Proteinkinasehemmstoff (Ruegg und Burgess 1989). Es induziert über noch nicht abschließend geklärte, wahrscheinlich mitochondriale Mechanismen einen apoptotischen Zelltod bei den meisten Zellarten, eingeschlossen Ratten-Oligodendrozyten (Gu et al. 1999; Studzinski und Benjamins 2001). Es wurde ein intrazellulärer Calciumanstieg und ein vermehrtes Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies nach Staurosporin-Gabe beschrieben (Kruman et al. 1998). Da hohe intrazelluläre Calciumlevel über einen mitochondrialen Calciumanstieg zu apoptotischem Zelltod führen können (Rizzuto et al. 2003) und das Binden des Calciums durch einen Chelator die Staurosporin-induzierte Apoptose verhindert (Kruman et al. 1998), ist die Hypothese naheliegend, dass der intrazelluläre Calciumanstieg eine ursächliche Rolle in der Zytotoxizität von Staurosporin spielt. In dieser Arbeit wird Staurosporin als Kontrolle eingesetzt.

1.2.2 Östrogen und Progesteron im ZNS

Östrogen und Progesteron sind sog. „weibliche“ Steroidhormone. Sie liegen bei Frauen im geschlechtsreifen Alter, zyklusabhängig, in wesentlich höheren Blutkonzentrationen vor als bei Männern (s. Tab. 3). Sie werden hauptsächlich gonadal synthetisiert und nur zu einem geringen Anteil adrenal. Während der Schwangerschaft werden besonders hohe Blutlevel erreicht (s. Tab. 3). Postmenopausale Frauen haben hingegen Blutlevel, die mit denjenigen von Männern vergleichbar sind. Die Menopause tritt meist zwischen dem 40. und 50. und nur bei 0,9% der Frauen vor dem 40. Lebensjahr auf (Coulam et al. 1986).

	<i>Östrogenkonzentration im Blut</i>	<i>Progesteronkonzentration im Blut</i>
Weiblicher Zyklus	0,1 – 1 nM	<5 – 80 nM
Schwangerschaft	bis zu 100 nM	bis zu 600 nM
Männer	0,03 – 0,25 nM	0,3 – 1 nM

Tabelle 3:

Blutkonzentrationen von Östrogen (17 β -Östradiol)- und Progesteron nach Nicot (2009), S. 50.

Aufgrund ihrer Lipophilie können Östrogen und Progesteron die Bluthirnschranke überwinden und ins ZNS gelangen. Das ZNS ist darüberhinaus auch selbst Produktionsort für Progesteron (Plassart-Schiess und Baulieu 2001) und Östrogen (Cornil et al. 2006). Die intrazerebrale Progesteronproduktion erfolgt in Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen

(Zwain und Yen 1999) und ist dabei weitestgehend unabhängig von der gonadalen und adrenalen Synthese (Baulieu 1997). Für eine hirneigene Östrogenproduktion spricht die Expression des Enzyms Aromatase in menschlichen Neuronen (Stoffel-Wagner et al. 1999; Yague et al. 2006) und in aktivierten Mäuse- (Garcia-Segura et al. 1999) und Rattenastrozyten (Carswell et al. 2005). Das Enzym katalysiert die letzte Stufe der Östrogensynthese und wandelt Androgene in Östrogene um.

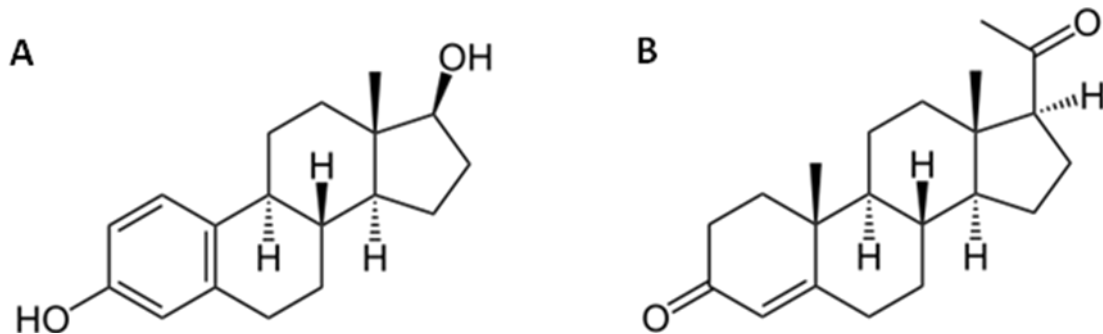


Abbildung 1:
Die Strukturformeln von A: 17β-Östradiol, B: Progesteron.

Von den natürlich vorkommenden Östrogenen ist 17β-Östradiol (s. Abb. 1A) das biologisch aktivste (Rabe und Runnebaum 1994). Es werden zwei Östrogen-spezifische Rezeptoren unterschieden: ERα und ERβ. Diese Rezeptoren sind Produkte zweier Gene, die auf verschiedenen Chromosomen liegen (Enmark et al. 1997). Sie kommen sowohl als nukleäre Transkriptionsfaktoren als auch zytoplasmatisch und als Membranrezeptoren vor (Hammes und Levin 2007; Vasudevan und Pfaff 2007). Sie sind einander strukturell ähnlich und haben nur gering abweichende Ligandenbindungseigenschaften (Kuiper et al. 1997). Der überwiegende Teil der Neuronen im Ratten-ZNS exprimiert ERα und/oder ERβ (Shughrue et al. 1997; Papka et al. 2001). Zu Astrozyten gibt es unterschiedliche Angaben: ältere Studien konnten in primären Zellkulturen ERα (Santagati et al. 1994; Jung-Testas und Baulieu 1998), eine Studie konnte im Hippocampus ERβ, aber nicht ERα nachweisen (Azcoitia et al. 1999), andere Studien in einem Kern des Hypothalamus weder ERα noch ERβ (Mong und McCarthy 1999; Mong et al. 2002). Im Rückenmark der Ratte wurden hingegen beide ERs nachgewiesen (Platania et al. 2003). Bei Oligodendrozyten werden Unterschiede in der Rezeptorexpression *in vitro* vs. *in vivo* postuliert (Z. Zhang et al. 2004). Zhang und Kollegen konnten in einer Oligodendrozyten-Zelllinie sowohl ERα als auch ERβ nachweisen, *in vivo* fanden sie im Großhirn bei Oligodendrozyten hingegen nur ERβ und nicht ERα. Diese Untersuchungen erfolgten an Rattenzellen. Ob menschliche gliale Zellen ERα und/oder ERβ exprimieren, ist nicht bekannt.

Östrogene wirken auf Neurone protektiv gegenüber einer Reihe von Pathomechanismen, beispielsweise bei Amyloidentstehung (Brinton 2001), Glutamattoxizität (Singer et al. 1996) und Ischämie (Jover et al. 2002). Auch bezüglich Oligodendrozyten sind Östrogene und besonders 17β -Östradiol protektiv wirksam. Eine 24stündige Präinkubation mit 17β -Östradiol schützt primäre Ratten-Oligodendrozyten und CG4-Zellen signifikant vor dem Peroxynitrit freisetzenden Zelltodinduktor SIN-1 (Takao et al. 2004). Cantarella und Kollegen konnten ferner zeigen, dass TRAIL, ein direkter Apoptoseinduktor, der vermutlich bei MS eine Rolle spielt (Wosik et al. 2003), signifikant weniger zytotoxisch auf Oligodendrozyten wirkt, wenn die Zellen zuvor 48 Stunden mit 17β -Östradiol inkubiert wurden (Cantarella et al. 2004). Dieser Effekt verhielt sich proportional zur verwendeten Östrogenmenge (0,2 bis 30nM). Eine ältere Studie konnte ferner eine promyelinisierende Wirkung von Östrogen beobachten (Curry und Heim 1966).

Die Progesteron-spezifischen Rezeptoren gehören wie die Östrogenrezeptoren zur Steroidhormonrezeptorsuperfamilie (Evans et al. 1987; Aranda und Pascual 2001) und gleichen ihnen in Struktur und Funktionsweise. Auch Progesteronrezeptoren können als Membranrezeptoren funktionieren (Hammes und Levin 2007) und auch hier sind zwei Rezeptortypen bekannt: PR-A und PR-B. Diese werden von demselben Gen kodiert und unterscheiden sich strukturell nur dadurch, dass PR-B N-terminal 164 Basenpaare länger ist und über eine zusätzliche Aktivierungseinheit verfügt (Sartorius et al. 1994). Im Rattenhirn konnten die Progesteronrezeptoren innerhalb der grauen Substanz in geringen Mengen nahezu ubiquitär und in größeren Mengen im Hypothalamus nachgewiesen werden (Kato et al. 1994; Brinton et al. 2008), dies gilt auch für Oligodendrozyten und Astrozyten aus primären Rattenhirnkulturen (Jung-Testas et al. 1992). Inwiefern menschliche gliale Zellen die Progesteronrezeptoren exprimieren, ist nicht bekannt.

Progesteron (s. Abb. 1B) reduziert das Ausmaß von posttraumatischen Hirnödemen (Roof et al. 1996) und wirkt neuroprotektiv, u.a. indem es die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine unterdrückt (He et al. 2004). Es werden aber auch direkte antiapoptotische Wirkungen von Progesteron auf Neurone diskutiert (Djebaili et al. 2005). Ferner verstärkt Progesteron im Ratten-ZNS sowohl Myelinisierung (Ghoumari et al. 2003) als auch Remyelinisierung (Ibanez et al. 2004). In einem Tiermodell der MS, der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE), gibt es unterschiedliche Ansichten zur Wirkung von Progesteron. Es sind sowohl krankheitsfördernde (Hoffman et al. 2001) als auch

krankheitsabschwächende (Garay et al. 2007) Effekte beschrieben worden. Ob Progesteron den Zelltod von Oligodendrozyten beeinflusst, ist nicht bekannt.

1.3 Fragestellung

Die gemeinsame Endstrecke der meisten MS-Läsionen ist die Oligodendrozyten-depletierte Glianarbe. Und vermutlich ist eine primäre Oligodendrozytenschädigung die Ursache einiger (Typ-III- und -IV-Läsionen), vielleicht sogar sämtlicher MS-Läsionen (Neurodegenerationshypothese). In dieser Arbeit wird das Hauptaugenmerk auf die Zellgruppe der Oligodendrozyten gerichtet. Neue Erkenntnisse zu den Einflussfaktoren von Zellzahl/mm² (Dichte), Funktion (hier: Remyelinisierung), Proliferation und Vulnerabilität von Oligodendrozyten könnten zu einem besseren Verständnis der MS-Erkrankung und eventuell zu neuen therapeutischen Ansätzen führen. Dabei sind die bekannten Phänomene (1), dass Frauen häufiger von der MS-Erkrankung betroffen sind als Männer und dabei überwiegend mildere Verläufe entwickeln, sowie (2), dass die weiblichen Geschlechtshormone Östrogen und Progesteron zytoprotektiv wirksam sind, die Gründe für den besonderen Fokus, der hier auf das Geschlecht hinsichtlich Zellzahl und Funktion und auf die Hormone Östrogen und Progesteron hinsichtlich Proliferation und Vulnerabilität gelegt wird.

Die zentralen Fragen dieser Arbeit mit Erläuterung:

1. Beeinflusst das Geschlecht die Oligodendrozyten- und/oder OPC-Dichte beim Menschen?

Es gibt bislang keine Studie, die versucht hätte, beim Menschen Geschlechtsunterschiede in der Oligodendrozytendichte aufzudecken. Dass diese Frage nun an Relevanz gewonnen hat, liegt an den Ergebnissen von Cerghet und Kollegen, die bei gesunden weiblichen Ratten eine im Vergleich zu männlichen Ratten 20 bis 40% geringere Oligodendrozytendichte feststellten (Cerghet et al. 2006). Die Autoren fanden neben der geringeren Zelldichte auch eine kürzere Lebensdauer und eine höhere Apoptoserate von weiblichen vs. männlichen Oligodendrozyten. Dies schien, übertragen auf den Menschen, eine zusätzliche Erklärung für die höhere Suszeptibilität von Frauen für MS anzubieten: nicht nur immunologische (Whitacre 2001), sondern auch histologische, oligodendrozytenspezifische Faktoren könnten dazu beitragen. In dieser Arbeit wollen wir untersuchen, ob die Erkenntnisse von Cerghet et al. auf den Menschen übertragbar sind. Neben der Oligodendrozytendichte haben wir als weiteren

Parameter die OPC-Dichte gewählt, um dadurch Zusatzinformationen und womöglich zusätzliche Unterschiede bezüglich der Oligodendrozytendifferenzierung feststellen zu können. Als mögliche andere Einflussfaktoren werden untersucht: Alter, MS-Erkrankung und MS-Verlaufsform.

2. Beeinflusst das Geschlecht die Remyelinisierung bei MS?

In Tiermodellen remyelinisieren ältere Ratten langsamer als junge (Shields et al. 1999; Sim et al. 2002), sind die Tiere alt und männlich remyelinisieren sie im Vergleich zu alten, weiblichen noch einmal signifikant langsamer (Li et al. 2006). Beim Menschen ist das Geschlecht bislang nicht als Einflussfaktor der Remyelinisierung nachgewiesen worden, neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet könnten aber potentiell von therapeutischem Nutzen sein. Um die Hypothese zu prüfen, dass weibliche gonadale Geschlechtshormone und insbesondere Progesteron proremyelinisierend wirken, untersuchen wir Patientinnen, die vor dem 40. Lebensjahr verstorben sind und demzufolge zu Lebzeiten noch der zyklusabhängigen Östrogen- und Progesteronsynthese der Gonaden ausgesetzt waren. Als mögliche andere Einflussfaktoren werden untersucht: MS-Verlaufsform, Todesalter, Krankheitsdauer und Läsionslokalisation.

3. Gibt es zwischen MS-Kranken und Gesunden Unterschiede in der Rezeptorexpression? Exprimieren menschliche Oligodendrozyten Östrogen- und/oder Progesteronrezeptoren?

Es gibt sich widersprechende Angaben, ob die Blutkonzentration von Östrogen mit der Krankheitsaktivität bei MS korreliert (Bansil et al. 1999; Tomassini et al. 2005) und Progesteron scheint bei MS-Kranken und Gesunden in dergleichen Blutkonzentrationen vorzuliegen (Tomassini et al. 2005). Ob es Unterschiede in der Rezeptorexpression gibt, soll hier untersucht werden. Es gibt viele Studien, die über die neuronale Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren bei der Ratte berichten (vgl. 1.2.2). Nur wenige Studien berichten über die Rezeptorenexpression bei glialen Zellen des Rattenhirns (Jung-Testas et al. 1992; Platania et al. 2003; Z. Zhang et al. 2004). In zwei Studien an Feten (Brandenberger et al. 1997; Takeyama et al. 2001) und einer Studie an Erwachsenen (Österlund et al. 2000) wurde die Expression der Östrogenrezeptoren im menschlichen Gehirn gezeigt, doch man beschränkte sich auf die graue Substanz, weshalb bis heute nicht bekannt ist, ob menschliche gliale Zellen (Oligodendrozyten, Astrozyten und Mikroglia) Östrogen- und/oder

Progesteronrezeptoren exprimieren. Dies soll hier untersucht werden. Um die Ergebnisse unserer Zellkulturexperimente (s. nächster Punkt) besser interpretieren zu können, werden wir ferner die oligodendrogliale Zelllinie CG4 hinsichtlich ihrer Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression untersuchen.

4. Wie beeinflussen Östrogen und Progesteron die Proliferation und Vulnerabilität von Oligodendrozyten?

Zunächst wollen wir die Beeinflussbarkeit der Oligodendrozyten-Proliferation durch Östrogen und Progesteron untersuchen. Der Einfluss muss bekannt sein, um die nachfolgenden Zytotoxizitätsversuche adäquat durchführen und interpretieren zu können. Oligodendrozyten gelten aufgrund ihrer hohen metabolischen Beanspruchung durch Myelinsynthese und Myelinerhaltung als besonders vulnerabel gegenüber toxischen Einflüssen (Bradl und Lassmann 2010) und NO gilt als ein bei der Entstehung von MS-Läsionen beteiligtes Molekül (s. 1.2.2). Hier wollen wir testen, ob Östrogen und Progesteron protektiv bei NO-vermitteltem Zelltod wirken. Hinsichtlich Progesteron gibt es hierzu keine Studien, obgleich vermutet wird, dass Progesteron einen protektiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf bei MS hat (Confavreux et al. 1998; Vukusic et al. 2009).

2 Material und Methoden

2.1 Histologie

2.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Rezepte

Geräte:

<i>Destilliermaschine, Integra</i>	<i>SG-Wasseraufbereitung, Hamburg-Barsbüttel</i>
<i>Digital-Mikroskopkamera, DP 71</i>	<i>Olympus, Hamburg</i>
<i>Einbettautomat, Leica TP 1020</i>	<i>Leica Mikrosysteme, Bensheim</i>
<i>Färbekammer</i>	<i>Eigenbau aus Plexiglas</i>
<i>Färbe-Küvetten</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Gitterokular, WH10X-H/22</i>	<i>Olympus, Hamburg</i>
<i>Kühlschrank (4 °C), Liebherr Premium</i>	<i>Liebherr, Biberach an der Riss</i>
<i>Lichtmikroskop, BX-51</i>	<i>Olympus, Hamburg</i>
<i>Mikrotom, Leica Ultracut ULT</i>	<i>Leica Mikrosysteme, Bensheim</i>
<i>Mikrowelle</i>	<i>Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe</i>
<i>Paraffinausgießstation, Histocentre 2A</i>	<i>Shandon, Frankfurt</i>
<i>pH-Meter</i>	<i>WTW, Weilheim</i>
<i>Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000 µl), Research</i>	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
<i>Vortexer, Heidolph Reax Top</i>	<i>Heidolph Instruments, Schwabach</i>

Verbrauchsmaterialien:

<i>Avidin-Peroxidase, E2886</i>	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
<i>Biotinylierter Sekundäantikörper (Anti-Kaninchen)</i>	<i>Amersham Biosciences, Freiburg</i>
<i>Casein 0,2%, Tropix I-Block T2015</i>	<i>Biosystems, Foster City, California, USA</i>
<i>Deckgläschen</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Diaminobenzidin (DAB)</i>	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
<i>Eindeckelmedium, Aqua-mount</i>	<i>Lerner Laboratories, Pittsburgh, USA</i>
<i>Essigsäure (10%)</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Ethanol (96%)</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Lithiumcarbonatlösung</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Hämalaun-Lösung</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Humaner Anti-OLIG2 Primäantikörper (IgG, monoklonal, aus Kaninchen), 18953</i>	<i>IBL, Spring Lake Park, Minnesota, USA</i>
<i>Isopropanol</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Luxol-Fast-Blue-Reagenz (LFB)</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Natriumhydroxid (NaOH)</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Objekträger</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>

<i>Paraffin, Paraplast</i>	<i>Roth, Karlsruhe</i>
<i>Periodsäure (1 %ig)</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)</i>	<i>Seromed, Berlin</i>
<i>Schiff'sches Reagenz</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Triton X-100</i>	<i>MP-Biomedicals, Solon, Ohio, USA</i>
<i>Wasserstoffperoxid (H₂O₂)</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Xylol</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Zitronensäure-Monohydrat</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>

Rezepte:

Zitratpuffer pH 6,0 wird angesetzt aus 2,1g Zitronensäure-Monohydrat in 1000ml aqua bidest und anschließend mit 1N Natronlauge mithilfe eines pH-Meters auf pH 6,0 eingestellt.

DAB 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochloridhydrat, DAB-Stammlösung: 2g DAB werden in 80ml 1xPBS gelöst und in 1 ml Aliquots bei -20°C gelagert. DAB-Gebrauchslösung: 1ml DAB-Stammlösung ad 49ml 1xPBS + 20µl 30% H₂O₂.

2.1.2 Histologisches Material

Wir untersuchten das Corpus callosum (C.c.) von 23 menschlichen nicht pathologisch veränderten Gehirnen. Diese entnahmen wir dem Autopsie-Archiv der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) in Form von in Paraffin eingebetteten Gewebeblöcken. 10 der Gehirne stammten von Personen aus der dritten Lebensdekade (21-30 Jahre), 13 Gehirne von Personen aus der achten Lebensdekade (71-80 Jahre). Sämtliche Patienten waren an nicht-neurologischen Erkrankungen verstorben. Die Altersgruppe 21-30 Jahre bestand aus Gehirnen von fünf Frauen und fünf Männern, die Altersgruppe 71-80 Jahre aus Gehirnen von sechs Frauen und sieben Männern (vgl. Tab. 4).

	<i>36 Autopsien von MS-Patienten</i>		
	<i>23 gesunde Corpora callosa</i>	<i>9 Corpora callosa ohne Läsion</i>	<i>119 Blöcke verschiedener Lokalisation mit MS-Läsionen</i>
Anzahl/Geschlecht	5 ♀, 5 ♂ (21-30J.) 6 ♀, 7 ♂ (71-80J.)	1 ♀, 8 ♂	50 ♀, 69 ♂

Tabelle 4:
Übersicht über das verwendete histologische Material.

Des Weiteren untersuchten wir Autopsien von 36 MS-Patienten, 17 weiblichen und 19 männlichen (s.a. Tab. 4). Wir werteten 119 in Paraffin eingebettete Gewebeblöcke mit insgesamt 174 chronisch inaktiven MS-Läsionen aus (1-11 Blöcke/Fall, \bar{x} 3,5 Blöcke/Fall). Die Läsionen lagen sowohl in der grauen als auch in der weißen Substanz. Die Gewebeblöcke wurden uns freundlicherweise von Dr. Jack Antel aus dem Montreal Neurological Institute der McGill-Universität in Montreal zur Verfügung gestellt. Sie stammten aus dem Groß- und Kleinhirn sowie aus dem Hirnstamm. Im Durchschnitt waren bei den weiblichen Gehirnen 4,5, bei den männlichen 5,1 Läsionen/Gehirn vorhanden (vgl. Tab. 6). Aus den uns vorhandenen Angaben zu Todesalter und Krankheitsdauer (s. Tab. 6) errechneten sich folgende Werte: Das durchschnittliche Todesalter der weiblichen Patienten betrug 56, die durchschnittliche Krankheitsdauer 18 Jahre. Bei den männlichen Patienten lag das durchschnittliche Todesalter bei 59, die durchschnittliche Krankheitsdauer bei 17 Jahren. Zur klinischen Verlaufsform lagen uns bei 11 Frauen und 14 Männern weitere Informationen vor. 6 Frauen hatten eine PPMS, 5 Frauen eine SPMS. Bei den Männern zählten wir 5 PPMS- und 9 SPMS-Fälle. Die 9 läsionsfreien Corpora callosa (1♀, 8♂), die wir zur Untersuchung der NAWM bei MS heranzogen (vgl. 1.1.1), stammten aus dem gleichen Patientenkollektiv. Das durchschnittliche Todesalter betrug hier 60, die durchschnittliche Krankheitsdauer 22 Jahre. Die klinische Verlaufsform war bei sieben der neun Fälle bekannt: 3 PPMS-, 4 SPMS-Fälle (s. Tab. 5).

	<i>Geschlecht</i>	<i>Verlaufsform</i>	<i>Todesalter/Krankheitsdauer</i>
1	weiblich	SPMS	? / 36
2	männlich	SPMS	54 / 11
3	männlich	SPMS	76 / 34
4	männlich	SPMS	52 / 16
5	männlich	PPMS	? / 11
6	männlich	PPMS	60 / 3
7	männlich	PPMS	51 / 8
8	männlich	?	66 / 34
9	männlich	?	? / ?

Tabelle 5:

Aufstellung der MS-Fälle, von denen läsionsfreie C.c. vorlagen. Mit Angabe von Geschlecht, Verlaufsform, Todesalter und Krankheitsdauer. Todesalter und Krankheitsdauer in Jahren, „?“ bedeutet, dass uns hierzu keine Angaben vorlagen.

<i>männlich</i>	<i>Klinischer Verlauf</i>	<i>Anzahl Läsionen</i>	<i>Todesalter/ Krankheits- dauer</i>	<i>weiblich</i>	<i>Klinischer Verlauf</i>	<i>Anzahl Läsionen</i>	<i>Todesalter/ Krankheits- dauer</i>
1	SPMS	11	63 / 18	1	SPMS	3	? / 36
2	SPMS	4	69 / 7	2	SPMS	5	60 / 25
3	SPMS	5	54 / 11	3	SPMS	5	59 / 16
4	SPMS	3	76 / 34	4	SPMS	9	28 / 4
5	SPMS	3	41 / 6	5	SPMS	6	? / ?
6	SPMS	5	57 / 12	6	PPMS	7	70 / 7
7	SPMS	6	57 / 29	7	PPMS	3	60 / 14
8	SPMS	6	52 / 16	8	PPMS	2	66 / 30
9	SPMS	2	71 / ?	9	PPMS	6	61 / 31
10	PPMS	4	? / 11	10	PPMS	7	52 / 8
11	PPMS	1	74 / ?	11	PPMS	4	45 / 12
12	PPMS	7	60 / 3	12	?	2	74 / ?
13	PPMS	8	57 / 15	13	?	8	59 / 9
14	PPMS	3	51 / 8	14	?	3	76 / 20
15	?	7	49 / ?	15	?	5	35 / ?
16	?	9	61 / 32	16	?	1	49 / ?
17	?	6	38 / ?	17	?	1	59 / 41
18	?	3	66 / 34				
19	?	4	66 / ?				

Tabelle 6:

Übersicht der untersuchten MS-Fälle mit Angaben über Geschlecht, klinische Verlaufsform, Anzahl der Läsionen, Todesalter und Krankheitsdauer. Todesalter und Krankheitsdauer in Jahren, „?“ bedeutet, dass uns hierzu keine Angaben vorlagen.

Das Einverständnis der Ethikkommission zur Verwendung des obenstehenden histologischen Materials lag uns zu Beginn der Studie vor. Sämtliches Gewebe wurde zur Konservierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol dehydriert und daraufhin in Paraffin eingebettet.

2.1.3 Färbeverfahren: Immunhistochemie und LFB-PAS-Hämalaun

Aus den in Paraffin eingebetteten Gewebeblöcken fertigten wir mithilfe eines Mikrotoms 4µm dicke Gewebeschnitte an und zogen diese auf Objektträger. Um das Gewebe anfärben zu können, mussten wir die Schnitte durch Xylol entparaffinieren und in einer absteigenden

Alkoholreihe rehydrieren (s. Tab. 7). Anschließend wurden verschiedene Färbeverfahren eingesetzt (s. Tab. 8)

(1) 10 min x 4 Xylol-Entparaffinierung

(2) 3 min Xylol/Isopropanol (50:50, je 100%)

(3) 3 min x 2 Isopropanol 100%

(4) 3 min Isopropanol 90%

(5) 3 min Isopropanol 70%

(6) 3 min Isopropanol 50%

(7) 1 min Aqua bidest

Tabelle 7:

Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte. Von (1) bis (7) Eintauchen der Schnitte in eine Küvette, gefüllt mit der jeweiligen Substanz.

36 Autopsien von MS-Patienten			
	23 gesunde Corpora callosa	9 Corpora callosa ohne Läsion	119 Blöcke verschiedener Lokalisation mit MS-Läsionen
Färbung	Immunhistochemie (Anti-OLIG2-Ak)	Immunhistochemie (Anti-OLIG2-Ak)	LFB-PAS + Hämalaun

Tabelle 8:

Übersicht über das verwendete histologische Material und die angewandten Färbemethoden. Ak = Antikörper.

Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist ein Färbeverfahren von Gewebeschnitten, bei dem durch spezifisches Binden von Antikörpern an bestimmte Antigen-Epitope Gewebestrukturen gezielt lichtmikroskopisch sichtbar gemacht werden können. Hier kam die sog. Avidin-Biotin-Methode zur Anwendung, die nach dem Prinzip der indirekten Immunhistochemie funktioniert. D.h., dass der spezifische Primärantikörper (hier: monoklonaler Anti-OLIG2-Antikörper aus dem Kaninchen, Konzentration 1:50, IBL, Spring Lake Park, USA) nicht direkt mit einem Enzym konjugiert ist, welches die spätere Färbung katalysiert, sondern, dass es eines zweiten Antikörpers bedarf (Sekundärantikörper), der den ersten bindet und im Fall der Avidin-Biotin-Methode mit Biotin markiert ist. Im nächsten Schritt erst bindet das Enzym

Avidin-Peroxidase, das durch das Avidin hochaffin für Biotin ist, an das Biotin des Sekundärantikörpers. Zusammen mit dem Entwicklungsmedium entsteht daraus schließlich eine spezifische Färbung der durch den Primärantikörper gebundenen Struktur. Ein sog. Hintergrund, d.h. eine unspezifische gleichmäßige Anfärbung des gesamten Gewebes, kann durch endogene Peroxidaseaktivität oder endogenes Biotin des Gewebes entstehen. Tabelle 9 gibt einen Überblick über die einzelnen Schritte der immunhistochemischen Färbung.

(1) 3 min x 10: Vorbehandlung in Mikrowelle

(2) 20 min Inkubation mit 3% H₂O₂

(3) evtl. Vorbehandlung mit Triton X-100

(4) 20 min Inkubation mit 0,2% Casein

(5) Inkubation mit dem Primärantikörper (Anti-OLIG2 aus dem Kaninchen, 1:50 in 0,02% Casein) Inkubation über Nacht bei 4°C in feuchter Kammer unter Deckglas

(6) Hinzugabe des biotinylierten Sekundärantikörpers (1:100, in 0,02% Casein), Inkubation für eine Stunde

(7) Hinzugabe der Avidin-Peroxidase (1:1000, in 0,02% Casein), Inkubation für eine Stunde

(8) Entwicklung mit DAB (Diaminobenzidin) für 20 min

Tabelle 9:

Die einzelnen Schritte der immunhistochemischen Färbung. Zwischen (1) und (2) Spülen mit Aqua bidest. Spülen mit PBS zwischen (2) und (3) bzw. (4), zwischen (5) und (6), (6) und (7) und (7) und (8). H₂O₂ und Casein wurden in PBS gelöst. Soweit nicht anders vermerkt, Inkubation bei Raumtemperatur.

Um eine bessere Antikörperbindung zu erreichen, wurden die Gewebeschnitte vorbehandelt. Die Vorbehandlung bestand aus zehnmaliger dreiminütiger Inkubation mit Zitrat-Puffer (pH 6) in einer handelsüblichen Mikrowelle bei 800W. Bei Verdunstung wurden abwechselnd der Citrat-Puffer und Aqua bidest (zweifach destilliertes Wasser) nachgefüllt. Anschließend wurde die endogene Peroxidaseaktivität durch 20minütige Inkubation in 3%iger Wasserstoffperoxidlösung in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) blockiert. Bei den gesunden C.c. schloss sich an dieser Stelle noch eine einstündige Inkubation mit dem Detergens Triton X-100 1-10% (in PBS) an. Dies führt zu einer vermehrten Bindung des Primärantikörpers an intrazelluläre Antigene durch Aufbruch lipider Strukturen wie beispielsweise der Zellmembran (Weruaga et al. 1998). Um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern, wurden alle Objektträger mit 0,2%igem Casein gleichmäßig benetzt und in der geschlossenen Färbekammer 20 Minuten (min) inkubiert. Nun wurde der primäre Antikörper in 0,02% Casein-Lösung (in PBS) auf die Objektträger gegeben und ein Deckglas aufgelegt. Bei den gesunden C.c. wurde auch an dieser Stelle Triton X-100, jedoch in niedrigerer Dosierung (0,1-1%) hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht

in einer geschlossenen Färbekammer bei 4°C. Am Folgetag wurden die Deckgläser entfernt und die Objektträger dreimal in PBS gespült. Der biotinylierte sekundäre Antikörper (Anti-Kaninchen, in der Konzentration 1:200) wurde in 0,02% Casein-Lösung verdünnt und für eine Stunde auf die Objektträger aufgetragen. Nach abermaliger Spülung mit PBS wurde die Avidin-Peroxidase (1:1000 in 0,02% Casein verdünnt) hinzugegeben und für eine Stunde belassen. Die Visualisierung der Antikörperbindung wurde schließlich mit DAB (Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Hydrat, in PBS (49:50) und 30% Wasserstoffperoxid, 1:2500) durchgeführt, welches eine bräunliche Färbung erzeugt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte in Aqua dest gestellt und mit einem wasserbasierten Eindeckelmedium (Aqua-mount) eingedeckelt.

LFB-PAS-Hämalaun-Färbung

Um De- und Remyelinisierungen nachzuweisen, wählten wir die Myelinscheiden sichtbarmachende Luxol fast blue (LFB)-periodic acid-Schiff (PAS)-Hämalaun-Färbung (vgl. Abb. 1 in 2.1.3). Sie färbt stark lipidhaltige Strukturen wie Myelinscheiden blau (Goto 1987) und zeigt zuverlässig die Remyelinisierung bei chronischen MS-Läsionen (Goldschmidt et al. 2009). Zur Herstellung der LFB-Lösung wurde eine Küvette mit Ethanol (96%) gefüllt, darin 1g LFB gelöst und 5ml Essigsäure (10%) hinzugegeben. Nach der Entparaffinierung wurde die absteigende Alkoholreihe (s.o.) bis zum 90% Iso-Propanol durchgeführt und über Nacht bei 60°C mit der LFB-Lösung inkubiert. Am Folgetag wurden die Objektträger vor der Differenzierung für einige Minuten in 90% Isopropanol gestellt, dann in 0,05% Lithiumcarbonatlösung und nachfolgend in 70% Isopropanol kurz eingetaucht und schließlich mit Aqua bidest gespült. Für die sich anschließende PAS-Färbung wurden die Schnitte wie folgt behandelt: 5 min in Periodsäure (1%ig), 5 min Spülung mit Leitungswasser, kurze Spülung mit Aqua bidest, 20minütige Inkubation mit Schiff'schem Reagenz und 5 min Spülung mit Leitungswasser. PAS färbt Glykogen und Mukopolysaccharide, die in Kollagen, Basalmembranen und Zellwänden zu finden sind, magentarot bis pink. Hieran wurde die Färbung mit Hämalaun angeschlossen. Hämalaun ist ein kationischer Farbstoff und färbt anionenreiche Zellkomponenten wie Zellkerne und Mitochondrien blau-violett. Die Gewebeschnitte wurden 9 Sekunden in die Hämalaunlösung gehalten und dann zum Bläuen mit Leitungswasser gespült. Anschließend wurden sie in Aqua dest gegeben und mit Aqua-mount eingedeckelt.

2.1.4 Auswertung

Die Gewebeschnitte wurden lichtmikroskopisch ausgewertet. Hierbei kamen ein Mikroskop, eine Mikroskopkamera sowie ein Gitterokular zur Anwendung.

Die elektronische Datenverarbeitung wurde mit Microsoft Excel 2007 (Microsoft, Unterschleißheim), die Fotoverarbeitung mit ColorView II analySIS (Soft Imaging System, Münster) durchgeführt. Die statistische Analyse und graphische Veranschaulichung erfolgte mit GraphPad Prism 5 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Als statistische Tests kamen der Studentsche t-Test, der Fishersche F-Test und der Mann-Whitney-U-Test zum Einsatz. Das Signifikanzniveau betrug jeweils $p < 0,05$ (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$). Der Studentsche t-Test lässt die Aussage zu, ob sich die Mittelwerte unabhängiger Stichproben über Zufall hinaus voneinander unterscheiden. Der Fishersche F-Test erlaubt die Aussage, ob sich die Stichproben voneinander bezüglich der Varianz, d.h. der Standardabweichung, signifikant unterscheiden. Der Mann-Whitney-U-Test dient der Überprüfung, ob sich zwei ordinal geordnete, unabhängige Verteilungen voneinander statistisch unterscheiden oder einer Grundgesamtheit entstammen.

OLIG2 positive Zellen

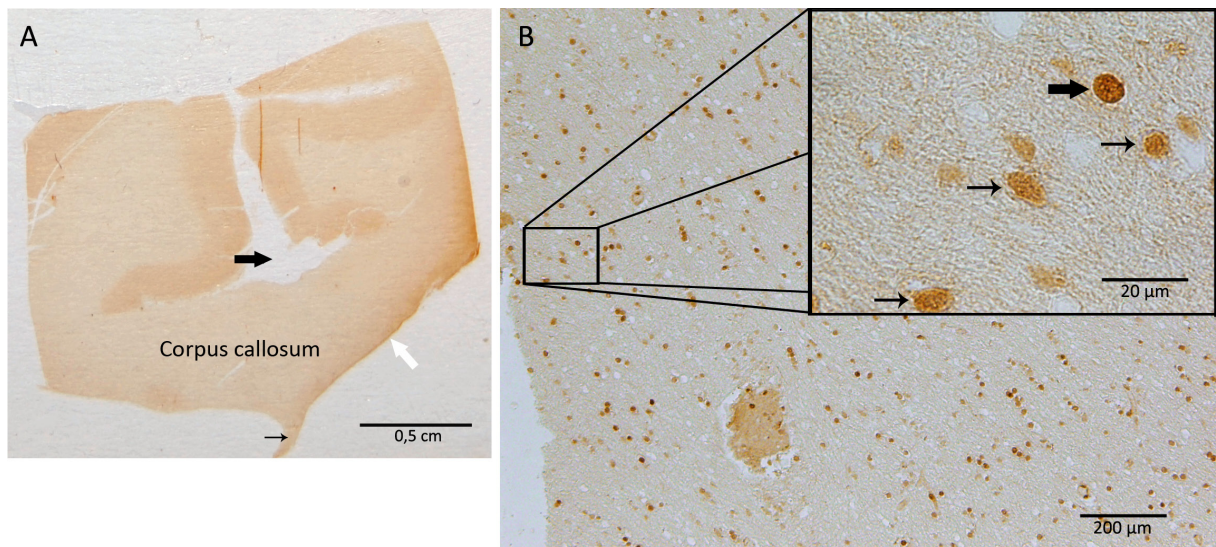


Abbildung 2:

A: Coronarer Anschnitt des Corpus callosum (C.c.). Der dünne schwarze Pfeil zeigt auf das Septum pellucidum, der dicke schwarze Pfeil auf den Sinus sagittalis inferior. Der weiße Pfeil markiert die periventriculäre Seite des C.c., an welcher die Auszählung vorgenommen wurde. **B: Das Färbeverhalten von adulten Oligodendrozyten und OPCs unterscheidet sich.** Ausschnitt (100fache Vergrößerung) aus dem Bereich des periventriculären C.c. mit eingblendeter 1000facher Vergrößerung, die eine OPC (dicker schwarzer Pfeil) und adulte Oligodendrozyten zeigt (dünne schwarze Pfeile). **A+B:** Färbung: Immunhistochemie (Anti-OLIG2-Antikörper), Entwicklung mit DAB.

Um bei den immunhistochemisch angefärbten Gewebeschnitten (vgl. Tab. 7) die Anzahl an OLIG2 positiven Zellen zu ermitteln, wurde zunächst bei geringer Vergrößerung der breiteste Anschnitt des C.c. aufgesucht, um dann von periventrikulär nach rostral zu mäandern und nach einem standardisierten Schema 10 verschiedene Lokalisationen bei 400facher Vergrößerung (Okular 10x, Objektiv 40x) auszuzählen (s. Abb. 2A). Es wurde hier zwischen schwacher und starker Anfärbung unterschieden, da gezeigt werden konnte, dass durch die Intensität der Färbung zwischen Oligodendrozyten und OPCs unterschieden werden kann (Kitada und Rowitch 2006; Kuhlmann et al. 2008). OPCs exprimieren wesentlich mehr OLIG2 und erscheinen deshalb bei der Färbung dunkler als Oligodendrozyten (s. Abb. 2B). Anschließend wurde der Mittelwert aus den 10 ermittelten Werten gebildet und dieser mit dem Faktor 16 multipliziert, um die Zellzahl pro Quadratmillimeter zu erhalten (Kantenlänge des Zählgitters: 250µm bei 400facher Vergrößerung).

LFB-PAS-Färbung und Remyelinisierung

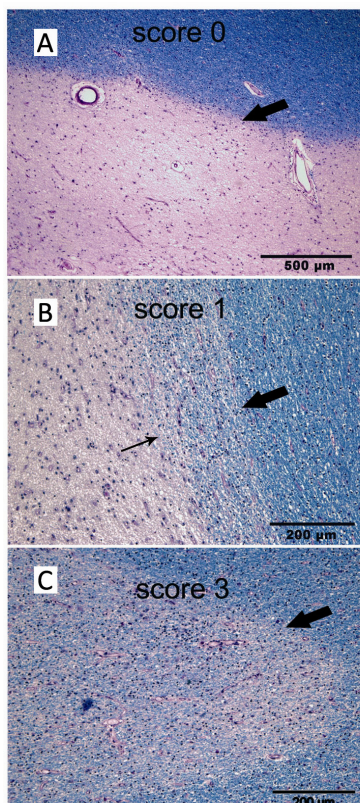


Abbildung 3:

Der Score unterteilt die Läsionen hinsichtlich des Remyelinisierungsgrads: **A:** Score 0 bedeutet, dass keine Remyelinisierung detektierbar ist. Der dicke Pfeil zeigt den Läsionsrand. **B:** Bei Score 1 machen die remyelinisierten Anteile der Läsion weniger als 50% der Läsionsfläche aus. Der remyelinisierte Bereich ist schwächer angefärbt und befindet sich am Läsionsrand (dicker Pfeil). Der dünne Pfeil zeigt den Übergang vom remyelinisierten zum unremyelinisierten Bereich der Läsion. **C:** Score-3-Läsionen sind komplett remyelinisiert, sog. „shadow plaques“. Der dicke Pfeil zeigt den Läsionsrand. **A-C:** Färbung: LFB-PAS-Hämalaunfärbung, Myelin erscheint blau, Zellkerne blau-violett.

Um das Ausmaß der Remyelinisierung der chronischen MS-Läsionen vergleichen zu können, teilten wir diese nach folgendem semiquantitativen Score ein: Score 0 = keine Zeichen von Remyelinisierung, 1 = weniger als 50% der Läsion ist remyelinisiert, 2 = mehr als 50% der Läsion ist remyelinisiert, 3 = 100% der Läsion ist remyelinisiert (s. Abb. 3). Remyelinisierte

Anteile wurden durch die im Gegensatz zu älterem und dickerem Myelin blässere Anfärbung durch LFB-PAS identifiziert. Das dünnere, durch Remyelinisierung entstandene Myelin befand sich am Läsionsrand bzw. füllte die ganze Läsion aus (vgl. Abb. 3). Der Score bildet Tendenzen ab: eine geringe Remyelinisierungskapazität (Score-0- und -1-Läsionen) wird von einer ausgeprägten Remyelinisierungskapazität (Score-2- und -3-Läsionen) abgegrenzt. Desweiteren hilft er anschnittbedingte Schwankungen bezüglich der Remyelinisierungsfläche abzufedern, die trotz des Bemühens um Standardisierung auftreten können. Die meisten Läsionen konnten in Gänze dargestellt werden. Sehr kleine ($< 3\text{mm}$), perivaskuläre Läsionen, bei denen die anschnittbedingten Schwankungen am größten sind, wurden nicht gezählt. Alle Läsionen erfüllten die weithin akzeptierten Kriterien der MS-Diagnostik (Lassmann et al. 1998; Prineas et al. 2002).

2.2 RT-PCR und Zellkultur

2.2.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Rezepte

RT-PCR:

Geräte:

<i>Dispergierer, Ultra Turrax T18 Basic</i>	<i>IKA, Staufen</i>
<i>Elektrophoresekammer, Subcell-GT</i>	<i>BioRad, München</i>
<i>Flachbettkammer</i>	<i>BioRad, München</i>
<i>Gefrierschrank -20°C, Liebherr Comfort</i>	<i>Liebherr, Biberach an der Riss</i>
<i>Gefrierschrank -80°C</i>	<i>Sanyo Fisher Sales, München</i>
<i>Magnetrührer, Variomag Mono</i>	<i>H+P Labortechnik, Oberschleißheim</i>
<i>Mikrowelle</i>	<i>Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe</i>
<i>Strom/Spannungsgeber, BluePower 500</i>	<i>Serva Electrophoresis, Heidelberg</i>
<i>Thermocycler</i>	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
<i>Thermocycler, Biometra T3</i>	<i>Biometra, Göttingen</i>
<i>Tischzentrifuge</i>	<i>Qualitron Incorporations, Hooland, USA</i>
<i>UV-Spektrometer, Bioanalyser 2100</i>	<i>Agilent Technologies, Waldbronn</i>
<i>Vortexer, Heidolph Reax Top</i>	<i>Heidolph Instruments, Schwabach</i>
<i>Zentrifuge, Centrifuge 5415K</i>	<i>Eppendorf, Hamburg</i>

Verbrauchsmaterialien:

<i>Agarose</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Aqua pura</i>	<i>Roth, Karlsruhe</i>
<i>Borsäure</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>dNTPs (Oligodesoxynukleotidtriphosphat)</i>	<i>Roche, Mannheim</i>
<i>Ethanol</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Ethidiumbromid</i>	<i>Roche, Mannheim</i>
<i>Größenmarker, 100bp-Leiter</i>	<i>Promega, Mannheim</i>
<i>Na-EDTA</i>	<i>Sigma, Aldrich, Steinheim</i>
<i>Oligo-d(T)-Primer</i>	<i>Roche, Mannheim</i>
<i>Oligonukleotid-Primer</i>	<i>MWG-Operon, Ebersberg</i>
<i>PCR-Puffer</i>	<i>Promega, Mannheim</i>
<i>Reverse Transkriptase, Omniscript</i>	<i>Quiagen, Hilden</i>
<i>RLT-6-Mercaptoethanol</i>	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
<i>RNA-Extraktions-Bausatz, RNeasy Mini Kit</i>	<i>Quiagen, Hilden</i>
<i>RNA-Ladepuffer, Blue Orange</i>	<i>Promega, Mannheim</i>
<i>RNase-Inhibitor</i>	<i>Roche, Mannheim</i>

<i>Taq-Polymerase</i>	<i>Promega, Mannheim</i>
<i>TRIS Base (Trisaminomethan)</i>	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>

Rezepte:

10xTBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer), angesetzt aus 108g TRIS Base, 55g Borsäure und 40ml EDTA (s.u.) pH 8,0 ad 1000ml aqua bidest.

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure): 18,61g Na-EDTA in 20ml Aqua bidest lösen, mittels pH-Meter und NaOH (s. 2.1.1) auf pH 8 einstellen.

Zellkultur:**Geräte:**

<i>Destilliermaschine Typ Integra SG-Wasseraufbereitung</i>	<i>Hamburg, Barsbüttel</i>
<i>Gefrierschränke (-20°C; -80°C), Liebherr Comfort, Sanyo</i>	<i>Liebherr, Biberach an der Riss; Sanyo, München</i>
<i>Inkubator, Hera Cell 150 Heraeus</i>	<i>Cellstar Nunc GmbH Wiesbaden</i>
<i>Kühlschränke (4°C), Liebherr Comfort</i>	<i>Liebherr, Biberach an der Riss</i>
<i>Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000µl), Research</i>	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
<i>Pipettierhilfe, Accu-jet</i>	<i>Brand, Wertheim</i>
<i>Spektrophotometer, Microplate Reader Model 680</i>	<i>BioRad, München</i>
<i>Vortexer, Heidolph Reax Top</i>	<i>Heidolph Instruments, Schwabach</i>
<i>Zählkammer nach Neubauer</i>	<i>Karl Hecht, Sondheim/Rhön</i>
<i>Zellschaber (25cm)</i>	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
<i>Zentrifuge, Centrifuge 5415R</i>	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
<i>Zellkulturbank, Microflow Medical Safety Cabinet</i>	<i>Andover, Hants, UK</i>

Verbrauchsmaterialien:

<i>Auslaufpipetten (5, 10, 25ml)</i>	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
<i>Biotase</i>	<i>Biochrom, Berlin</i>
<i>Biotin</i>	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
<i>Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium (DMEM)</i>	<i>PAA, Pasching, Österreich</i>
<i>Falcons (50 ml)</i>	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
<i>Fetales Kälberserum (FCS)</i>	<i>Biochrom, Berlin</i>
<i>Insulin</i>	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
<i>Kavitätenplatten, à 24 bzw. 96 wells</i>	<i>Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen</i>
<i>Mediumflaschen (Glas; verschiedene Größen)</i>	<i>Schott Duran, St. Gallen, Schweiz</i>
<i>N1-Supplement</i>	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
<i>Östrogen, E4389</i>	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>

<i>Pasteurpipetten 250ml</i>	<i>WU, Mainz</i>
<i>PBS</i>	<i>Biochrom, Berlin</i>
<i>Penicillin/Streptomycin-Zellkulturzusatz</i>	<i>Biochrom, Berlin</i>
<i>Poly-L-Ornithin (PLO)</i>	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
<i>Progesteron, P8783</i>	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
<i>Reaktionsgefäße (1,5ml; 2ml)</i>	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
<i>Salzsäure (HCl, 1M)</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>SNAP</i>	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
<i>Staurosporin</i>	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
<i>Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid</i>	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
<i>Trypan Blue</i>	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
<i>Zellkulturflaschen, Cell Star 75cm²</i>	<i>Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen</i>

Rezepte:

MTT-Reagenz: 5mg Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid in 1ml PBS lösen, dann steril filtrieren, cave Lichtempfindlichkeit. Gebrauchslösung 1:10 mit PBS verdünnen.

N1-Medium mit Biotin: 500ml DMEM, 5ml N1-Supplement, 5ml Penicillin (10kU/ml)/ Streptomycin (10mg/ml), 200µl Biotin, aliquotiert zu 35ml.

B104 konditioniertes Medium: 99ml DMEM mit 1ml 10% FCS + Penicillin/Streptomycin in DMEM. Nach 3 Tagen Inkubation wird der Überstand abgezogen.

CG-4 Erhaltungsmedium: 70% N1 Medium mit Biotin, 30% B104 Medium.

CG-4 Differenzierungsmedium: 98% N1 Medium mit Biotin, 2% FCS.

2.2.2 Rezeptornachweis mittels RT-PCR bei menschlichem und tierischem Gewebe

Um festzustellen, ob menschliche und von der Ratte stammende ZNS- und Kontroll-Gewebe (s. Tab. 10) Östrogen- bzw. Progesteronrezeptoren exprimieren, benutzten wir den qualitativen Nachweis von Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) durch die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). mRNA wird für die Proteinbiosynthese benötigt und stellt ein Bindeglied zwischen dem genomischen Bauplan und dem Endprodukt, hier: dem Rezeptor, dar. Nach der RNA-Extraktion schrieben wir diese mithilfe der Reverse-Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion) in komplementäre DNA (cDNA, Desoxyribonukleinsäure) um. Die cDNA diente uns schließlich als Substrat für die eigentliche

Nachweisreaktion, die PCR, welche rezeptorspezifische Sequenzen der cDNA amplifizieren und damit gelelektrophoretisch sichtbar machen kann.

Die cDNA der menschlichen glialen Zellen (vgl. Tab. 10, Nr. 8-11) erhielten wir dankenswerterweise von Herrn Dr. Jack Antel aus dem Montreal Neurological Institute der McGill-Universität in Montreal. Das zugrundeliegende Gewebe stammte aus dem Frontal- oder Temporallappen und aus dem Corpus callosum von erwachsenen Epilepsiepatienten und wurde epilepsiechirurgisch entfernt oder es stammte von totgeborenen Feten. Das Gewebe wurde gemäß dem Protokoll von Yong und Antel (Yong und Antel 2001) behandelt. Neuronen sterben bei dieser Art der Probengewinnung ab. Die Aufreinigung der glialen Untergruppen erfolgte gemäß Protokoll und führt bei Oligodendrozyten und Mikroglia zu etwa 90%igen, bei Astrozyten zu etwa 70%igen Reinkulturen (Yong und Antel 2001). Die cDNA-Proben „Gesund weiblich (GS)“ und „Gesund männlich (WS)“ erhielten wir freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Walter Schulz-Schaeffer aus der Abteilung Neuropathologie der UMG. Erstere stammt aus der frontalen kortikalen grauen Substanz eines neuropathologisch unauffälligen weiblichen Gehirns, letztere aus der zerebralen weißen Substanz eines neuropathologisch unauffälligen männlichen Gehirns. Die Positivkontrolle „MammaCA“ wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. Rainer Girgert aus der gynäkologischen Abteilung der UMG zur Verfügung gestellt. Die cDNA stammte von einer positiv für Östrogen- und Progesteronrezeptoren getesteten Zelllinie eines Mamma-Carcinoms. Die MS-Fälle „MS-1 und MS-2“ entnahmen wir der „*London Brain Bank for Neurodegenerative Diseases*“ des King's College zu London. Das Einverständnis der Ethikkommission der Universität Göttingen lag uns zur Verwendung sämtlicher der in Tabelle 10 dargestellten Gewebe zu Beginn der Studie vor.

Menschliches Gewebe		Nicht-menschliches Gewebe
1. MS1 (innerhalb Läsion in WS)	7. MammaCA	12. Rattenhirn
2. MS1 (NAWM)	8. Oligodendrozyten (adult)	13. CG4-Zellen
3. MS2 (innerhalb Läsion in WS)	9. Astrozyten (fetal)	
4. MS2 (NAWM)	10. Astrozyten (fetal)	
5. Gesund männlich (WS)	11. Mikroglia (adult)	
6. Gesund weiblich (GS)		

Tabelle 10:

Aufstellung der verwendeten cDNA-Proben. MS = Multiple Sklerose, NAWM = normal erscheinende weiße Substanz, WS = Weiße Substanz, GS = Graue Substanz.

RNA-Extraktion

Die RNA wurde entweder aus bei -80°C tiefgefrorenem (MS1, MS2, Gesund männlich, Gesund weiblich) oder aus frischem (Rattenhirn, CG4-Zellen) Gewebe extrahiert. Es wurde ausschließlich RNasefreies, zweifach autoklaviertes Material verwendet, welches nur für Arbeiten mit RNA benutzt wird. Tabelle 11 gibt eine Übersicht über die einzelnen Schritte der RNA-Extraktion wie sie vom Hersteller des hier verwendeten Bausatzes (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden) empfohlen werden. Der Bausatz funktioniert nach dem Prinzip der Festphasenextraktion mit einer Silikatmembran als RNA-Bindner (Boom et al. 1990) und Guanidinthiocyanat als Chaotrop und RNase-Inhibitor (Chomczynski und Sacchi 1987; Boom et al. 1990). Die Homogenisierung erfolgte mithilfe eines mechanischen Dispergierers.

- (1) Die Proben (Gewebe: 30mg, Zelllinien: 10^7 Zellen) werden in 600 μl RLT- β -Mercaptoethanol gelöst und unter Kühlung gleichmäßig homogenisiert (~30 sec).*
- (2) Das Lysat wird für 3 min bei 12.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abpipettiert, der Rest verworfen.*
- (3) Der Überstand wird mit 600 μl 70%igem Ethanol versetzt und durch Pipettieren vermischt, anschließend werden bis zu 700 μl des Lysats auf eine Silikatmembransäule übertragen.*
- (4) Zentrifugieren (15 sec bei 12.000 rpm). Der Durchfluss wird verworfen.*
- (5) Hinzufügen von 700 μl RW1, Zentrifugieren (15 sec bei 12.000 rpm). Der Durchfluss wird verworfen.*
- (6) Hinzufügen von 500 μl RPE, Zentrifugieren (15 sec bei 12.000 rpm). Der Durchfluss wird verworfen.*
- (7) Erneutes Hinzufügen von 500 μl RPE, Zentrifugieren (2 min bei 13.200 rpm). Der Durchfluss wird verworfen.*
- (8) Überführen der Säule in ein neues Sammelgefäß, trocken zentrifugieren (1 min bei 13.200 rpm).*
- (9) Überführen der Säule in ein Elutionsgefäß, Hinzufügen von 30 μl RNasefreiem Wasser, Zentrifugieren (1 min bei 12.000 rpm). Das Eluat enthält die isolierte RNA.*
- (10) Zur Bestimmung der Quantität: photometrische Messung. Zur Bestimmung der Qualität: RNA-Gelelektrophorese.*

Tabelle 11:

Übersicht über die einzelnen Schritte der RNA-Extraktion. RLT, RLC und RW1 sind von der Firma Qiagen patentierte Pufferlösungen: RLT enthält Guanidinthiocyanat, RLC Guanidinhydrochlorid, RW1 Ethanol. Es wurde ausschließlich RNasefreies Material verwendet. Soweit nicht anders angegeben: Durchführung bei Raumtemperatur.

Die Guanidinthiocyanat-Pufferlösung lysiert und denaturiert das Zellhomogenisat. Ethanol wird hinzugesetzt, um die Bindung von RNA an die Silikatmembran zu befördern. Durch die Zentrifugation wird das Lysat über die in einer Säule befindliche Silikatmembran filtriert. Während die RNA dabei an die Silikatmatrix bindet, gelangen alle übrigen Zellbestandteile in das Filtrat und werden in den folgenden Waschschrritten vollständig ausgewaschen. Die RNA wird schließlich mit RNasefreiem Wasser aus der Membran eluiert und den nächsten

Schritten zugeführt. Der mRNA-Anteil der isolierten RNA (normalerweise 3%) wurde dadurch erhöht, dass die Silikatmembran RNA erst ab einer Länge von 200 Nukleotiden bindet. Die quantitative Bestimmung der isolierten RNA erfolgte am UV-Spektrometer bei 260nm. Zusätzlich führten wir für die qualitative Bestimmung noch eine Agarose-Gelelektrophorese durch (s.u.).

cDNA-Synthese

Da mit der PCR nur DNA amplifiziert werden kann, wurde die RNA zunächst mit dem Enzym Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben. Das Endprodukt dieser Reaktion ist ein DNA-Doppelstrang, da das Enzym nicht nur RNA-abhängig DNA polymerisiert, sondern auch den RNA-Anteil des dadurch entstandenen DNA-RNA-Hybrids verdaut und durch einen komplementären DNA-Strang ersetzt.

Um die RNA zu denaturieren, wurden zunächst 13µl RNA in RNasefreiem Wasser (500ng/µl) für 5 min bei 65°C in einem Thermocycler (Eppendorf, Hamburg) inkubiert und dann sogleich auf Eis gestellt. Zur Herstellung des RT-Master-Mix wurden 2µl 10xRT-Puffer (Qiagen, Hilden), 2µl Oligodesoxynucleotidtriphosphate, 1µl Oligo-d(T)-Primer (Primer aus Thymidinbasen, der an den Poly-A-Schwanz der mRNA bindet) und 1µl verdünnter RNase-Inhibitor gemischt. Der RNase-Inhibitor wurde zuvor 1:4 in eiskaltem 1xRT-Puffer verdünnt. Nun wurden 13µl RNA und 1µl des Enzyms Reverse Transkriptase hinzugegeben, woraufhin vorsichtig mit einer Pipette gemischt, zentrifugiert und im Thermocycler bei 37°C 60 min lang inkubiert wurde. Die neu entstandene cDNA wurde bei -20°C gelagert und 1:10 in Aqua pura verdünnt für die PCR verwendet.

Primer

Um eine PCR durchzuführen, benötigt man ein Oligonukleotid-Primer-Paar. Die zwei Oligonukleotidsequenzen werden so ausgewählt, dass sie das zu amplifizierende Segment flankieren (vgl. Abb. 4). Das Erstellen der Primer setzt das Wissen um die Gensequenz der gesuchten Rezeptoren voraus. Diese recherchierten wir mithilfe der Online-Gendatenbanken OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>) und *Genome Browser Gateway* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>). Tabelle 12 gibt die internationale Codierung der den Primern zugrundeliegenden mRNA-Sequenzen wider. Die Primer für PR und rPR erfassen hierbei sowohl (r)PR-A als auch (r)PR-B, da für die Primerbindung der gemeinsame Anteil der mRNA gewählt wurde.

	<i>Östrogenrezeptor</i>	<i>Progesteronrezeptor</i>
Ratte:	rER α : NM_012689 rER β : NM_012754	rPR: NM_022847
Mensch:	ER α : NM_001122741 ER β : NM_001040275	PR: NM_000926

Tabelle 12:

Östrogen- und Progesteronrezeptorsequenzen der Ratte und des Menschen und deren internationale Codierung.

Das Designen der Primer erfolgte mithilfe des Internetprogramms Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (Rozen und Skaletsky 2000), wobei darauf geachtet wurde, dass die Anlagerungsstellen der Primer über Exon-Grenzen hinausgingen, um die Amplifikation genomischer DNA zu unterbinden. Die Spezifität der Primer wurde mithilfe des Internetprogramms „Blast“ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) sichergestellt. Tabelle 13 zeigt die Basensequenzen der in dieser Arbeit eingesetzten Primer.

<i>Primer</i>	<i>AT (°C)</i>	<i>BP</i>	<i>Vorwärts</i>	<i>Rückwärts</i>
rER α	57	159	AAA-GAG-AGT-GCC-AGG-CTT-TG	TGA-TTC-CTG-TCC-AAG-AGC-AA
rER β	57,8	169	AGG-AAT-GGT-CAA-GTG-TGG-AT	CAG-TTG-CTC-TGG-ACT-CAA-GG
rPR	52	214	ACA-CAA-TTC-CTT-TGG-AAG-GC	CGG-GAT-TGG-ATG-AAC-GTA-TT
ER α	57,4	217	CTT-GCT-CTT-GGA-CAG-GAA-CC	CAG-GAC-TCG-GTG-GAT-ATG-GT
ER β	52,7	160	AGA-AGA-TTC-CCG-GCT-TTG-TG	CCC-TCA-TCC-CTG-TCC-AGA-AC
PR	57,4	252	CAA-CTA-CCT-GAG-GCC-GGA-TT	TTT-CTA-AGG-CGA-CAT-GCT-GG

Tabelle 13:

Aufstellung der verwendeten Primer mit Angaben über die optimale Anlagerungstemperatur (AT), die Anzahl der Basenpaare (BP) des PCR-Produkts und die Basensequenz der Primer.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der gezielten exponentiellen Vervielfältigung von DNA-Segmenten (Mullis et al. 1986; Saiki et al. 1988). Dabei werden drei Schritte: Denaturierung, Anlagerung der Primer und Elongation mehrfach wiederholt. Die Denaturierung erfolgt bei 95°C und führt zur Auftrennung der Doppelstrang-DNA. Nur so können im nächsten Schritt die Primer bei der jeweils optimalen Anlagerungstemperatur (vgl. Tab. 13) an die DNA binden. Die Elongation, d.h. das Binden von komplementären Nukleotiden an die Primer, erfolgt bei 72°C, dem Temperaturoptimum der Thermus

aquaticus(Taq)-DNA-Polymerase. Endprodukt der PCR ist die zwischen den Primern gelegene DNA-Sequenz (s. Abb. 4).

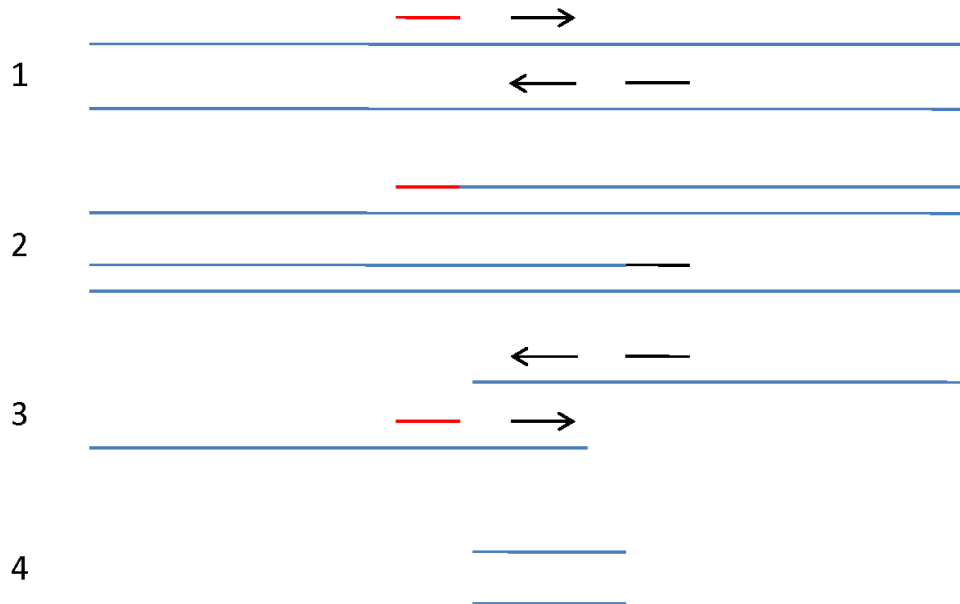


Abbildung 4:

Die PCR verfielfältigt die zwischen den Primern gelegenen DNA-Abschnitte. **1:** Die Primer (roter und schwarzer Strich) binden an die DNA (lange blaue Striche). Von den Primern aus beginnt die Polymerisation (schwarze Pfeile), die im nächsten Bild **(2)** abgeschlossen ist (blaue Striche, die direkt an die Primer anschließen). Diese neu entstandenen DNA-Stränge werden nun **(3)** vom jeweils anderen Primer (schwarzer und roter Strich) gebunden. Nach erneuter Polymerisation entstehen schließlich **(4)** die Endprodukte – die zwischen den Primern gelegenen DNA-Sequenzen.

5µl 1:10 verdünnte cDNA bzw. Aqua pura (für die Wasserkontrolle) wurden zusammen mit 15µl Master-Mix (4µl PCR-Puffer, 0,4µl dNTPs, 0,1µl Taq-Polymerase, 0,5µl Vorwärts-Primer, 0,5µl Rückwärts-Primer, 9,5µl Aqua pura) in einen Thermocycler (T3, Biometra) gegeben, worauf 30-40 Zyklen à 90 sec (30 sec/Schritt) durchgeführt wurden. Am Ende wurde eine 10minütige Elongationsphase angeschlossen.

Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA- bzw. RNA-Fragmente der Größe nach aufzutrennen, verwendeten wir die Agarose-Gelelektrophorese (Voytas 2001). Agarose ist ein aus Algen gewonnenes Polysaccharid, das nach Erhitzen in einem Puffer je nach Konzentration ein grob- bis feinporiges Netz ausbildet. An dieses wird eine elektrische Spannung angelegt und DNA und RNA wandern aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung Anode. Größere Fragmente wandern langsamer als kleinere. Ethidiumbromid dient der Sichtbarmachung der Auftrennung. Es interkaliert mit der DNA bzw. RNA und fluoresziert unter UV-Licht.

Wir verwendeten ein 2%iges Agarose-Gel (2g Agarose auf 100ml TBE-Puffer). Die Agarose und der Puffer wurden in der Mikrowelle bei 800 W für 2-3 min aufgeköcht bis die Agarose vollständig gelöst war. Nun wurden 8µl Ethidiumbromid hinzugegeben und gut vermischt, woraufhin das Gel in eine Flachbettkammer mit Kamm gegossen wurde. Sobald das Gel erstarrt war, wurde es in die Elektrophoresekammer gelegt und nach Entfernung des Kamms mit Puffer übergossen. Die Taschen wurden mit je 10µl PCR-Produkt bzw. 5µl des Größenmarkers (100 Basenpaar-Leiter) beschickt. Die Laufzeit betrug bei 120 Volt 30 min. Das RNA-Gel unterschied sich insofern, als dass ausschließlich RNasefreie Instrumente und Chemikalien verwendet wurden und dass 3µl der Probe und 1µl 6xLadepuffer (Blue Orange) in die Geltaschen gegeben wurden. Die Laufzeit betrug bei 70 Volt 50 min.

2.2.3 Zellkultur: Proliferations- und Zelltodexperimente an CG4-Zellen mit und ohne Östrogen- bzw. Progesteronpräinkubation

Sämtliche Zellkulturexperimente wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Zellkulturbank durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5%-CO₂-Sättigung in einem Inkubator.

CG4-Zellen

Alle Zellkulturexperimente wurden an CG4-Zellen durchgeführt (vgl. 1.2). Die CG-4-Zellen wurden zu Oligodendrozyten differenziert, indem sie für 24 h mit Differenzierungsmedium (s. 2.2.1) inkubiert wurden.

Im undifferenzierten Zustand wurden die Zellen mit Erhaltungsmedium (s. 2.2.1) in Zellkulturflaschen inkubiert. Etwa alle 4 Tage mussten die Zellen passagiert, d.h. von einer Flasche in eine andere überführt werden, damit das Wachstum durch zu nahe Zellkontakte nicht gehemmt wird. Dafür wurden die Zellen durch 20minütige Inkubation mit dem Enzym Biotase vom Boden gelöst und anschließend für 5 min bei 1200 rpm (Runden pro Minute) zentrifugiert. Das verbrauchte Medium wurde abgesaugt, die Zellen kurz aufgekratzt und in frischem Erhaltungsmedium resuspendiert. Nach Befüllen der neuen Flaschen mit Erhaltungsmedium wurden ca. 3-4 Tropfen der Suspension hinzugegeben. Die neuen Flaschen wurden am Vortag mit Poly-L-Ornithin (PLO) beschichtet (steriles Wasser:PLO, 5:1), um die Adhärenz zu fördern und vor dem Passagieren dreimal mit sterilem Wasser gewaschen und für 10 min mit UV-Licht bestrahlt, um einer Kontamination vorzubeugen. Es wurden Zellen bis zur 56. Passage verwendet.

Um die Zellen für die Experimente auszuplattieren, wurden die Zellen wie zum Passagieren gelöst und zentrifugiert und dann, wenn sie vorher differenziert worden waren in Differenzierungsmedium, sonst in Erhaltungsmedium resuspendiert. Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden 10µl der Suspension entnommen, mit 40µl des Farbstoffs Trypan Blue gemischt und 10µl davon in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Es wurden 8 Felder ausgezählt. Zur Bestimmung der Zellzahl pro Quadratmillimeter, teilten wir die Zellzahl durch 8 und multiplizierten sie mit dem Verdünnungsfaktor 5 und dem Neubauer-Faktor 10.000. Ausplattiert wurden je 25.000 Zellen/well (*well* = Kavität einer Zellkulturplatte) auf mit PLO vorbeschichteten 24well-Platten.

Behandlung der Zellen mit Östrogen und Progesteron

Um den Einfluss von weiblichen Geschlechtshormonen auf die Oligodendrozytenproliferation zu untersuchen, inkubierten wir differenzierte CG4-Zellen mit zellkulturgetestetem Östrogen (17β-Östradiol) bzw. Progesteron. Es kamen Konzentrationen von 0,2 bis 500nM Östrogen bzw. von 1 bis 200nM Progesteron zum Einsatz. Pro Konzentration standen 3 wells à 40.000 Zellen zur Verfügung. Die Konzentrationen entsprechen den Dosierungen anderer Veröffentlichungen (Marin-Husstege et al. 2004; Takao et al. 2004). Das Östrogen wurde in Aqua dest, das Progesteron in Ethanol gelöst. Anschließend wurden die Hormone mit Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium (DMEM) auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die Inkubation betrug 24 bzw. 48 h für die Differenzierungs- und 48 h für die Zelltodexperimente.

Behandlung der Zellen mit Staurosporin bzw. dem NO - Donator SNAP

Um den Einfluss von Zelltodinduktoren (s. 1.2.1) auf zu Oligodendrozyten differenzierte CG4-Zellen zu untersuchen, setzten wir die Zellen Konzentrationen von 10 bis 500nM Staurosporin bzw. von 0,5 bis 2,5mM SNAP aus. Pro Konzentration standen 3 wells à 40.000 Zellen zur Verfügung. Die Konzentrationen sind in unserem Labor etabliert und wurden durch Dosis-Effekt-Kurven (hier nicht gezeigt) ermittelt. Sowohl Staurosporin als auch SNAP wurden mit DMEM auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die Inkubation betrug jeweils 24 h.

MTT-Test

5mg MTT-Reagenz (MTT = 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid) wurden in 1ml PBS gelöst, steril filtriert und anschließend 1:10 mit Differenzierungsmedium verdünnt. Das verbrauchte Medium wurde von den Zellen vorsichtig abgesaugt und in jedes well 0,5ml des verdünnten MTT-Reagenz gegeben. Dieses wurde für mindestens 30 min (maximal eine Stunde) belassen, wobei mikroskopisch auf die Violettfärbung der Zellen sowie die Bildung von Kristallen geachtet wurde. Nach Einsetzen der Kristallbildung wurde das Medium abgesaugt und die wasserunlöslichen Salze in 250µl Isopropanol plus Salzsäure gelöst. Zur weiteren Homogenisierung wurde die Platte für 15 min auf einen Schüttler gestellt, woraufhin die Auswertung erfolgte.

2.2.4 Auswertung

RT-PCR

Um das Ergebnis der RT-PCR darzustellen, benutzten wir die Agarose-Gelelektrophorese (s.o.). Die DNA wird der Größe nach aufgetrennt und durch das Ethidiumbromid unter UV-Licht in Form von Banden sichtbar. Die Fragmentgröße, bzw. Basenpaarlänge kann durch standardisierte Größenmarker abgeschätzt werden. Die Negativkontrolle (statt der Probe wird Aqua pura verwendet) dient dazu, Kontaminationen aufzudecken und ist bei den hier dargestellten Ergebnissen stets negativ ausgefallen. Die Positivkontrolle hat hingegen immer positiv auszufallen, sie dient dem Vergleich und hilft falsch-negative Ergebnisse auszuschließen. Die photographische Dokumentation erfolgte mit dem Fluor-S MultiImager (BioRad, München).

Das RNA-Gel wurde auf das Vorhandensein von zwei Banden untersucht, die durch die 18S bzw. 28S ribosomale RNA hervorgerufen werden. Bei der Überprüfung der RNA-Qualität zeigten unsere Proben ausnahmslos zwei abgesetzte Banden.

Zellkultur

Zur Quantifizierung der Parameter Zellproliferation und Zelltod verwendeten wir den MTT-Test (vgl. 2.2.3, MTT-Test), der die mitochondriale Atmung von lebenden Zellen misst. Dieser beruht auf der mitochondrialen Reduktion des schwach gelblichen Tetrazoliumsalzes MTT in das stark violette Formazansalz. Die Farbentwicklung ist hierbei proportional der

Menge der lebenden Zellen (Mosmann 1983) und lässt sich photometrisch quantifizieren, indem man die zunehmende Extinktion eines UV-Lichtstrahls mithilfe eines Spektrophotometers misst.

Im Anschluss an die oben beschriebenen Schritte wurden aus jedem well zweimal 100 μ l (Doppelbestimmung) entnommen und in eine 96well-Platte überführt. In einem Spektrophotometer wurde schließlich nach vorangegangener Leerproben-Kalibrierung bei 540nm die Extinktion gemessen.

Die elektronische Datenverarbeitung erfolgte mit Microsoft Excel 2007 (Microsoft, Unterschleißheim), die statistische Analyse und graphische Veranschaulichung mit GraphPad Prism 5 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Als statistischer Test kam der Studentsche t-Test (vgl. 2.1.3) zum Einsatz. Das Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$ (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$).

3 Ergebnisse

3.1 Die Anzahl der Oligodendrozyten und OPCs im gesunden Corpus callosum ist unabhängig von Geschlecht und Alter

Um herauszufinden, ob es geschlechtsabhängige Unterschiede in der Oligodendrozyten- bzw. Oligodendrozyten-Vorläuferzellen(OPCs)-Dichte in für MS typischen Regionen gibt, untersuchten wir die Corpora callosa (C.c.) von 23 neuropathologisch unauffälligen Gehirnen. Dies waren je fünf Gehirne von Frauen und Männern, die im Alter von 21-30 Jahren verstorben waren sowie sechs Gehirne von Frauen und sieben Gehirne von Männern, die im Alter von 71-80 Jahren verstorben waren. Im Durchschnitt waren in den 23 C.c. 660,0 Zellen/mm² OLIG2-positiv. Davon waren 93,4% (616,4 Zellen/mm²) schwach positiv und wurden als adulte Oligodendrozyten gezählt, 6,6% (43,6 Zellen/mm²) waren stark positiv und wurden als OPCs gewertet.

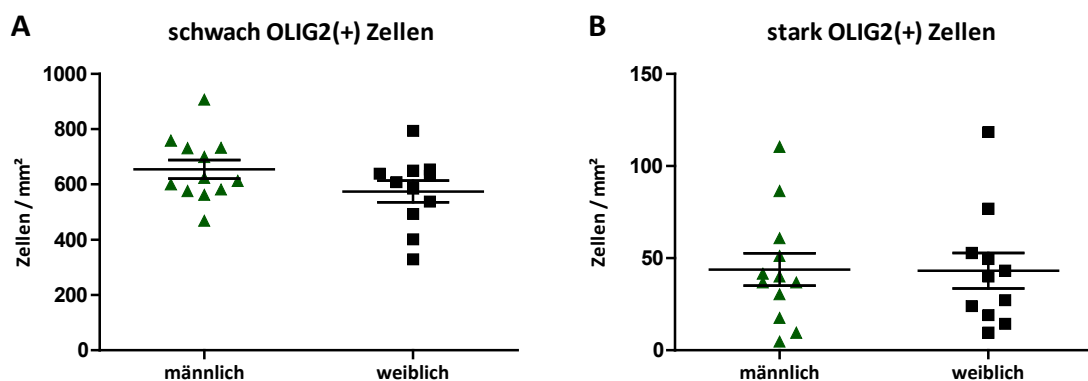


Abbildung 5:

Die Anzahl von Oligodendrozyten und OPCs ist unabhängig vom Geschlecht. **A:** Die Dichte an Oligodendrozyten im C.c. ist unabhängig vom Geschlecht der Patienten ($p=0,1326$); männlich $n=12$, weiblich $n=11$. **B:** Auch die Dichte an OPCs im C.c. ist unabhängig vom Geschlecht der Patienten ($p=0,9596$); männlich $n=12$, weiblich $n=11$.

Das Geschlecht hat keinen Einfluss auf die Oligodendrozytendichte: bei den männlichen Gehirnen war die durchschnittliche Anzahl der adulten Oligodendrozyten im C.c. zwar höher als bei den weiblichen Gehirnen (654,7 zu 574,7 schwach OLIG2-positive Zellen/mm²). Der Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ($p=0,1326$). Dies änderte sich auch nicht, wenn nach Altersgruppen getrennt untersucht wurde (Daten hier nicht gezeigt). Die Streuung war bei beiden Geschlechtern sehr ausgeprägt (s. Abb. 5A). Die Dichte der OPCs war bei Frauen und Männern fast identisch: durchschnittlich 43,9 Zellen/mm² bei den

männlichen und 43,2 Zellen/mm² bei den weiblichen Gehirnen ($p=0,9596$), die Streuung war ferner auch hier auffallend hoch (s. Abb. 5B).

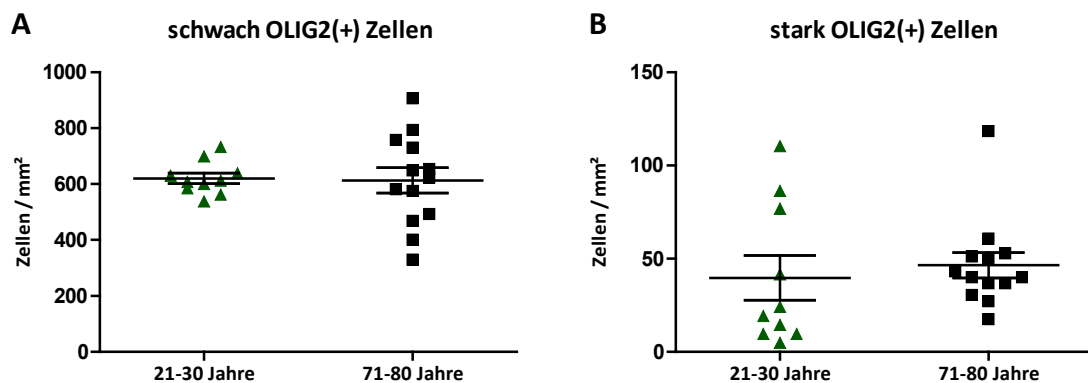


Abbildung 6:

Die Anzahl von Oligodendrozyten und OPCs ist unabhängig vom Alter. **A:** Die Dichte an Oligodendrozyten im C.c. ist unabhängig vom Alter der Patienten ($p=0,8880$); 21–30 Jahre $n=10$, 71–80 Jahre $n=13$. **B:** Auch die Dichte an OPCs im C.c. ist unabhängig vom Alter der Patienten ($p=0,6044$); 21–30 Jahre $n=10$, 71–80 Jahre $n=13$.

Um festzustellen, ob die Oligodendrozytendichte altersabhängig ist, stellten wir dem Kollektiv „junge Patienten“ (Altersgruppe 21-30 Jahre, $n=10$) das Kollektiv „alte Patienten“ (Altersgruppe 71-80 Jahre, $n=13$) gegenüber. In den jüngeren Gehirnen fanden sich durchschnittlich 620,8 adulte Oligodendrozyten/mm², bei den älteren Gehirnen waren es 613,1. Die Streuung war bei den älteren Gehirnen signifikant höher als bei den jüngeren ($p=0,0046$, vgl. Abb. 6A). In den jüngeren Gehirnen fanden wir durchschnittlich 39,7 OPCs/mm², bei den älteren 46,5 OPCs/mm². Der Unterschied in der Abweichung vom Mittelwert (Streuung) war hier zwischen alt und jung nicht statistisch signifikant ($p=0,1612$, vgl. Abb. 6B). Insgesamt konnten wir keinen altersabhängigen Unterschied in der durchschnittlichen Dichte von Oligodendrozyten bzw. OPCs im C.c. feststellen.

3.2 Es gibt keinen Unterschied zwischen Gesunden und MS-Kranken bezüglich Oligodendrozyten- und OPC-Anzahl im Corpus callosum, die MS-Verlaufsform beeinflusst die Anzahl der Oligodendrozyten, diejenige der OPCs bleibt unbeeinflusst

Um herauszufinden, ob es zwischen an MS Erkrankten und neuropathologisch unauffälligen Gehirnen einen Unterschied in der Oligodendrozyten- bzw. OPC-Dichte gibt, untersuchten wir 10 läsionsfreie Schnitte des C.c. von 9 an MS erkrankten Patienten und verglichen die Ergebnisse mit denen von 3.1.1. Von einem Patienten lagen uns zwei Blöcke aus dem C.c.

vor. Hier werteten wir beide Lokalisationen aus und verwendeten für die statistischen Analysen den arithmetischen Mittelwert aus beiden Blöcken. Zu sieben der neun Patienten lagen uns Informationen zum klinischen Verlauf vor (vgl. Tab. 5).

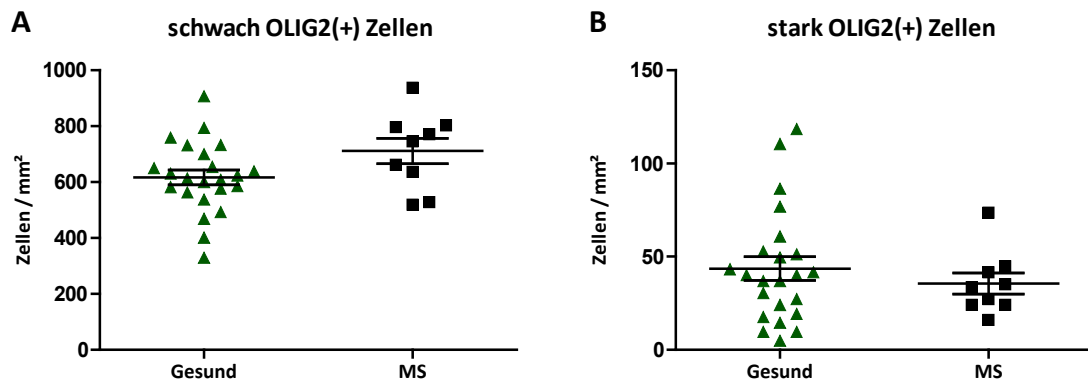


Abbildung 7:

Es gibt keinen Unterschied zwischen Gesunden und MS-Kranken bezüglich Oligodendrozyten- und OPC-Anzahl im C.c.. A: Im läsionsfreien C.c. ist in der Oligodendrozytendichte kein Unterschied zwischen MS-Kranken und neuropathologisch unauffälligen Gehirnen feststellbar ($p=0,0728$), Gesund $n=23$, MS $n=9$. B: Es ist auch kein Unterschied in der OPC-Dichte feststellbar ($p=0,4652$), Gesund $n=23$, MS $n=9$.

Im Durchschnitt fanden sich bei an MS Erkrankten in der läsionsfreien weißen Substanz (NAWM) des C.c. 711,0 Oligodendrozyten/mm², in den neuropathologisch unauffälligen Gehirnen zählten wir an dergleichen Lokalisation 616,4 Oligodendrozyten/mm² (vgl. Abb. 7A). Dieser Unterschied war mit $p=0,073$ knapp außerhalb der statistischen Signifikanz. Die Streuung war mit $p=0,7110$ ähnlich stark ausgeprägt. An OPCs zählten wir in der NAWM des C.c. bei MS-Kranken durchschnittlich 35,6, bei Gesunden 43,6 Zellen. Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p=0,4652$, vgl. Abb. 7B), ebensowenig wie die Streuung, die sich nicht signifikant unterschied ($p=0,0917$).

Bei genauerer Betrachtung stellten sich sowohl die MS-Fälle als auch die gesunden Gehirne in der Oligodendrozytenanzahl als sehr heterogen dar. Es stellte sich heraus, dass, wenn nach der Verlaufsform unterschieden wird, die Anzahl der Oligodendrozyten bei SPMS (Krankheitsdauer $\bar{\sigma}24,3$ Jahre) signifikant über derjenigen bei PPMS (Krankheitsdauer $\bar{\sigma}7,3$ Jahre) liegt ($p=0,0122$, s. Abb. 8A), mit einem Mittel von 827,2 Oligodendrozyten/mm² bei SPMS und 605,6 bei PPMS. Die Streuung war hier jeweils gering. Die OPCs hingegen waren gleich verteilt (s. Abb. 8B, SPMS: $\bar{\sigma}37,2$ Zellen/mm², PPMS: $\bar{\sigma}40$ Zellen/mm²). Die Streuung war bei SPMS höher als bei PPMS, der Unterschied erreichte aber keine statistische Signifikanz ($p=0,0981$).

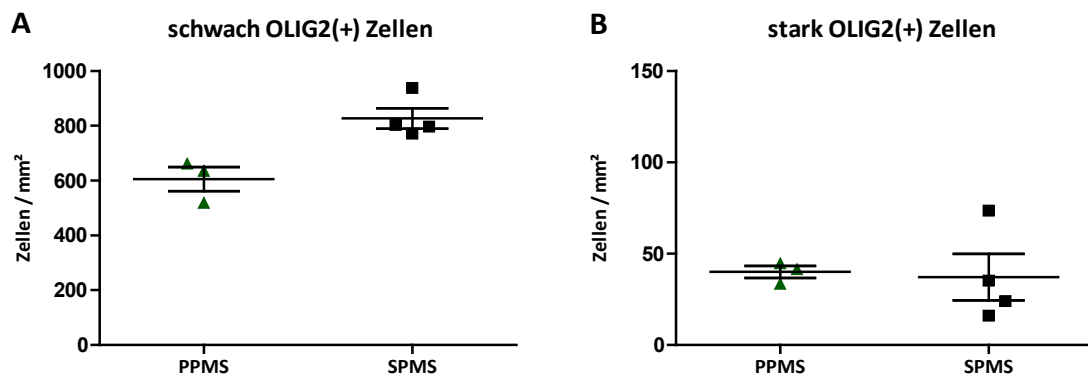


Abbildung 8:

Die MS-Verlaufsform beeinflusst die Oligodendrozyten-, aber nicht die OPC-Dichte. **A:** Bei SPMS finden sich signifikant mehr Oligodendrozyten in der NAWM des C.c. als bei PPMS ($p=0,012$), PPMS $n=3$, SPMS $n=4$. **B:** Zwischen PPMS und SPMS gibt es keine Unterschiede bezüglich der OPC-Dichte in der NAWM im C.c. ($p=0,8624$), PPMS $n=3$, SPMS $n=4$.

3.3 Es gibt keinen Geschlechtsunterschied in der Remyelinisierungskapazität chronisch demyelinisierter Läsionen bei MS, auch die MS-Verlaufsform hat hierauf keinen Einfluss

Wir untersuchten 174 chronisch inaktive MS-Läsionen von 36 Autopsiefällen (19 männliche und 17 weibliche Gehirne, Krankheitsdauer zwischen 3 und 41 Jahren, \bar{x} 18 Jahre) auf das Ausmaß ihrer Remyelinisierung. Auf Score 0 entfielen 39,7%, auf Score 1 34,5%, auf Score 2 12,6% und auf Score 3 13,2% aller Läsionen (s. Abb. 9A, zum Score: s. Abb. 3). Wir teilten sämtliche Läsionen in männliche und weibliche ein und verglichen den Remyelinisierungsgrad. Wir konnten eine leichte Tendenz dahingehend feststellen, dass weibliche Läsionen häufiger ausgeprägt remyelinisierten als männliche (Score 2 und 3 bei Frauen: 32,5%, bei Männern 20,6%, vgl. Abb. 9B). Diese Tendenz erreichte aber keine statistische Signifikanz ($p=0,0774$). Durchschnittlich lag der Remyelinisierungsgrad bei beiden Geschlechtern etwa bei Score 1 ($p=0,5113$), der Median lag jeweils bei 1. Auch die Verteilung auf die einzelnen Scores war statistisch nicht signifikant unterschiedlich (Mann-Whitney-U-Test: $p=0,7728$, vgl. Abb. 9B). Um die Hypothese zu testen, dass gonadale Hormone ursächlich sind für geschlechtsabhängige Remyelinisierungsunterschiede, verglichen wir diejenigen Läsionen, die von Frauen stammten, die vor dem 40. Lebensjahr gestorben und wahrscheinlich prämenopausal waren (vgl. 1.2.2) mit den männlichen Läsionen. Klinische Angaben zur Menopause lagen uns nicht vor. 14 Läsionen von zwei Frauen erfüllten diese Kriterien. Auch hier erreichte der Unterschied (ausgeprägte vs. geringe

Remyelinisierung) keine statistische Signifikanz ($p=0,0684$, hier nicht gezeigt). Wir konnten folglich keine geschlechtsabhängigen Unterschiede in der Remyelinisierungskapazität chronisch inaktiver Läsionen nachweisen. Auch der klinische Verlauf der Krankheit zeigte keinen Einfluss auf die Remyelinisierungskapazität. Die Läsionen verteilten sich auf die Scores unabhängig von der Verlaufsform (s. Abb. 9C, Mann-Whitney-U-Test: $p=0,3135$).

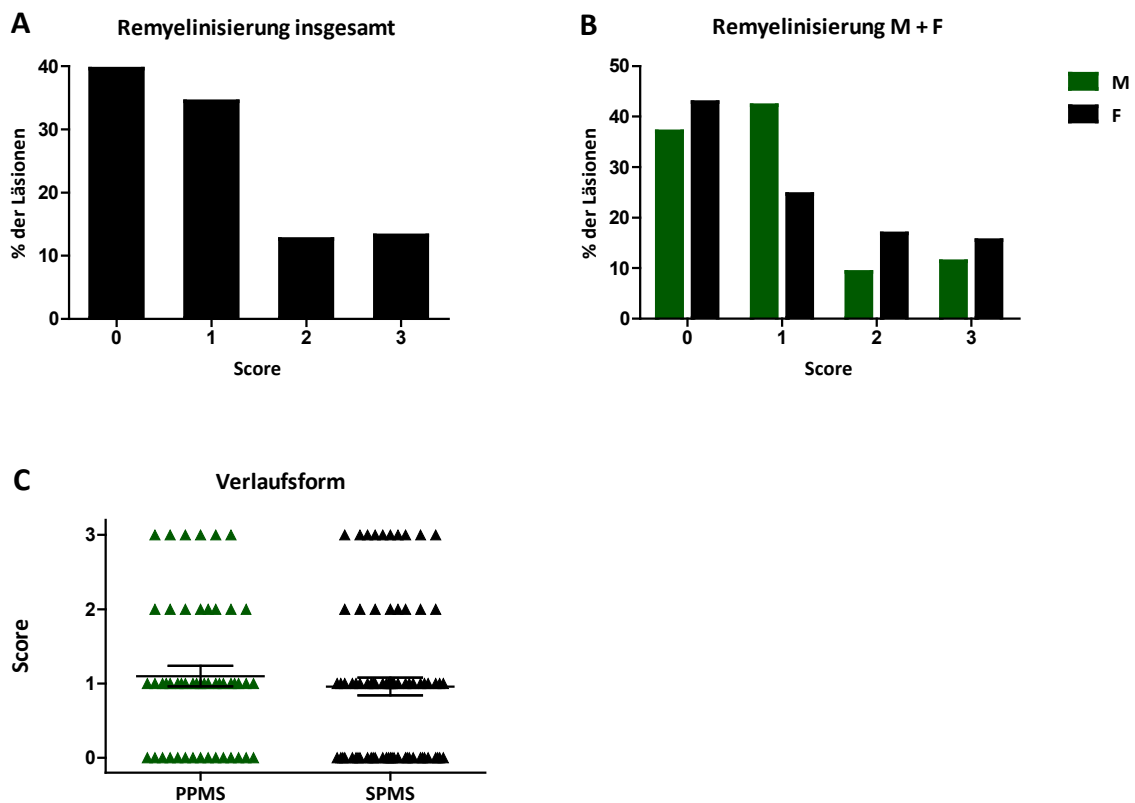


Abbildung 9:

Es gibt keinen geschlechtsabhängigen Unterschied in der Remyelinisierung von MS-Läsionen, auch die Verlaufsform hat keinen Einfluss auf die Remyelinisierung. **A:** Bei den 174 Läsionen (nicht unterschieden nach Geschlecht) fanden sich am häufigsten Score 0- und Score 1-Läsionen (zusammen 74,14%), Score 3-Läsionen fanden sich nur in 13,22%. **B:** Betrachtet man die Läsionen der Frauen ($n=77$) und der Männer ($n=97$) separat, so sind keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung auf die Scores feststellbar ($p=0,5085$, Mediane jeweils bei 1). **C:** Der durchschnittliche Remyelinisierungsgrad liegt bei beiden Verläufen etwa bei Score 1 ($p=0,4490$, Mediane jeweils bei 1) M = männlich, F = weiblich, PPMS $n=50$, SPMS $n=75$.

3.4 Die Remyelinisierungskapazität ist intraindividuell heterogen, die Krankheitsdauer und das Todesalter haben keinen Einfluss auf den Remyelinisierungsgrad der Läsionen

Um festzustellen, inwieweit sich das Ausmaß der Remyelinisierung zwischen verschiedenen Läsionen eines Patienten unterscheidet, wählten wir diejenigen Personen aus, bei denen uns fünf und mehr Läsionen vorlagen (♀: neun, ♂: zehn, vgl. Abb. 10). Es zeigte sich, dass die

meisten Läsionen eines Individuums unterschiedlich stark remyelinisiert waren. Auch dies war unabhängig vom Geschlecht. Bei 12 der 19 Patienten waren die Läsionen drei oder vier verschiedenen Scores zuzuordnen (s. Abb. 10A,B), d.h. einige Läsionen zeigten geringe oder abwesende (Score 0 und 1), andere dagegen ausgeprägte oder vollständige Remyelinisierung (Score 2 und 3). Bei 7 der 19 Personen war die Remyelinisierung eher homogen. Sämtliche Läsionen waren entweder ausgeprägt/vollständig (Score 2 und 3) oder geringgradig/nicht (Score 0 und 1) remyelinisiert (vgl. Abb. 10A,B). Das Todesalter und die Krankheitsdauer zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Remyelinisierung (s. Abb. 10C,D).

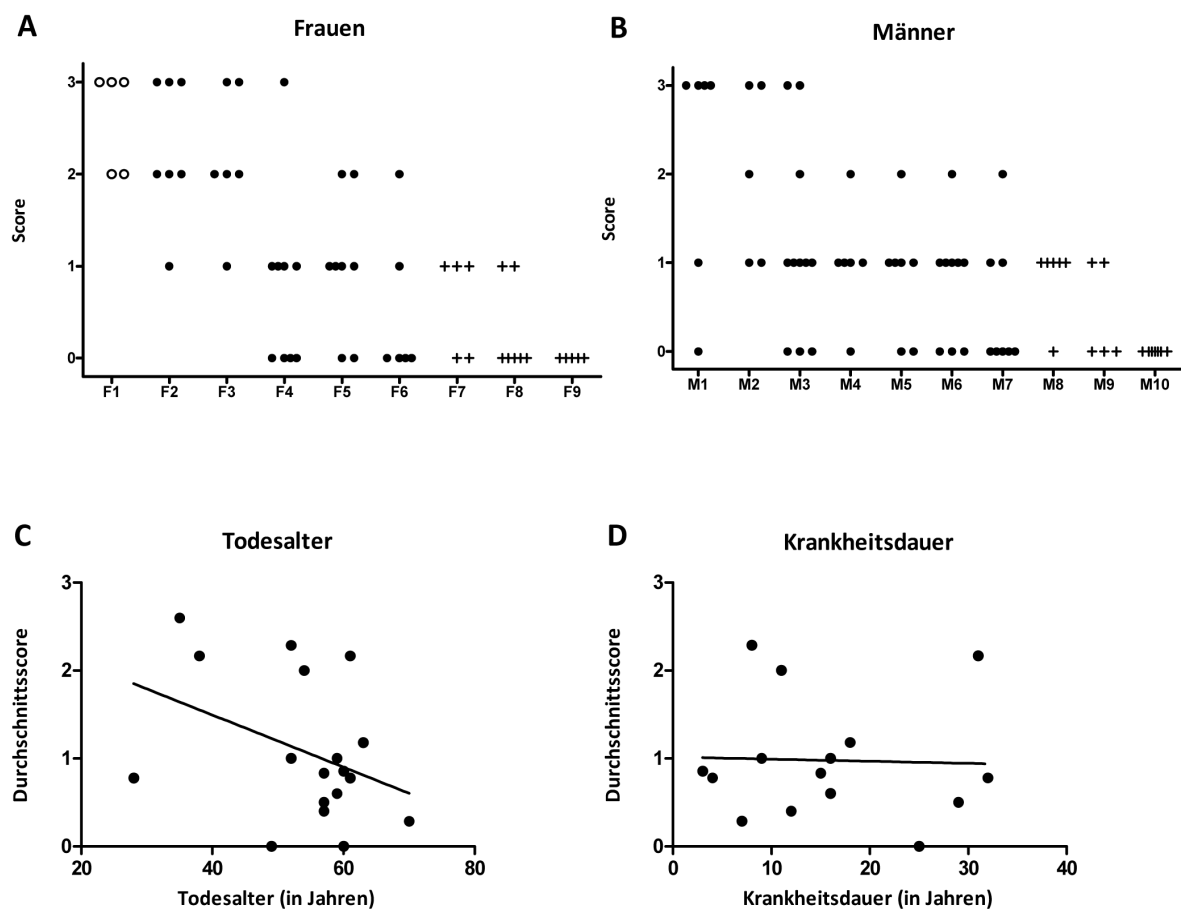


Abbildung 10:

Intraindividuell stellt sich die Remyelinisierung überwiegend heterogen dar. Es gibt keine signifikante Korrelation zwischen Todesalter bzw. Krankheitsdauer und Remyelinisierung. **A:** Unter den weiblichen Gehirnen war eines, das in allen untersuchten Läsionen über 50% Remyelinisierung aufwies (Kreise), die übrigen remyelinisierten heterogen (schwarze Punkte) oder eingeschränkt bis nicht (Pluszeichen). **B:** Bei den männlichen Gehirnen war die Remyelinisierung entweder heterogen (schwarze Punkte) oder eingeschränkt/abwesend (Pluszeichen). **C:** Auf der x-Achse ist das Todesalter der Patienten dargestellt, die schwarzen Punkte entsprechen dem Durchschnittsscore sämtlicher Läsionen eines Patienten (mindestens 5 Läsionen/Patient). Die Regressionsgerade fällt ab vom jüngeren zum älteren Todesalter, ohne dass eine signifikante Korrelation zwischen Todesalter und Remyelinisierung vorläge ($p=0,1134$). **D:** Auf der x-Achse ist die Krankheitsdauer der Patienten abgebildet, die schwarzen Punkte entsprechen dem Durchschnittsscore sämtlicher Läsionen eines Patienten (mindestens 5 Läsionen/Patient). Die Regressionsgerade verläuft nahezu horizontal, es liegt keine Korrelation zwischen Krankheitsdauer und Remyelinisierung vor ($p=0,8713$).

3.5 Die anatomische Lokalisation von MS-Läsionen korreliert mit dem Ausmaß der Remyelinisierung

Um zu prüfen, ob die Lokalisation das Remyelinisierungsausmaß beeinflusst, unterteilten wir die Läsionen in fünf anatomisch distinkte Gruppen (s. Abb. 11) und verglichen anschließend die einzelnen Gruppen hinsichtlich des Remyelinisierungsausmaßes der Läsionen (s. Abb. 12).

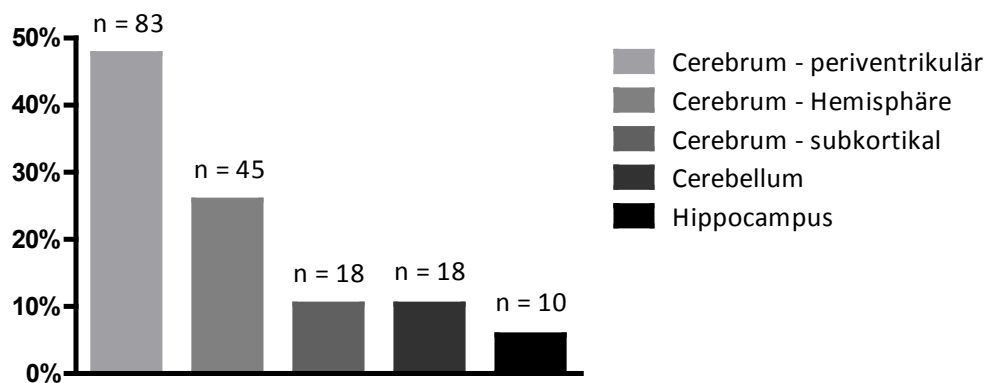


Abbildung 11:

Fünf anatomisch distinkte Lokalisationen: Von den insg. 174 Läsionen lag etwa die Hälfte (47,70%) periventrikulär, ein Viertel (25,86%) hemisphärisch (weder periventrikulär noch subkortikal), jede zehnte Läsion (10,34%) befand sich subkortikal, ebenfalls jede zehnte (10,34%) zerebellär und etwa jede zwanzigste (5,75%) hippocampal.

Es zeigte sich, dass die Lokalisation einen Einfluss auf die Remyelinisierung hat. Die Verteilung auf die einzelnen Scores unterschied sich statistisch signifikant, wenn zwischen den Läsionen mit Lokalisation im Kleinhirn (weiße und graue Substanz) und nicht im Kleinhirn lokalisierten Läsionen differenziert wurde (Mann-Whitney-U-Test: $p=0,0112$). Bei den übrigen Lokalisationen erreichten die Unterschiede in der Verteilung der Scores in Bezug auf die restlichen Läsionen keine statistische Signifikanz. Vergleicht man jedoch isoliert die Anteile der komplett re- bzw. demyelinisierten Läsionen der einzelnen Lokalisationen miteinander, so scheinen weitere lokalisationsabhängige Unterschiede wahrscheinlich (s. Abb. 12). So waren 28% der subkortikalen und 20% der hemisphärischen bzw. hippocampalen Läsionen komplett remyelinisiert, im Gegensatz zu weniger als 10% der periventrikulären bzw. zerebellären Läsionen. Komplette Demyelinisierung (Score 0) lag etwa gleich häufig in periventrikulären, subkortikalen und hippocampalen (zwischen 30 und 33%), etwas häufiger in hemisphärischen (44%) und am häufigsten in zerebellären (72%) Läsionen vor. D.h. periventrikuläre und zerebelläre Läsionen waren im Vergleich zu den übrigen Lokalisationen

seltener komplett remyelinisiert und zerebelläre Läsionen waren zudem noch besonders häufig komplett demyelinisiert. Subkortikale Läsionen remyelinisierten am häufigsten vollständig.

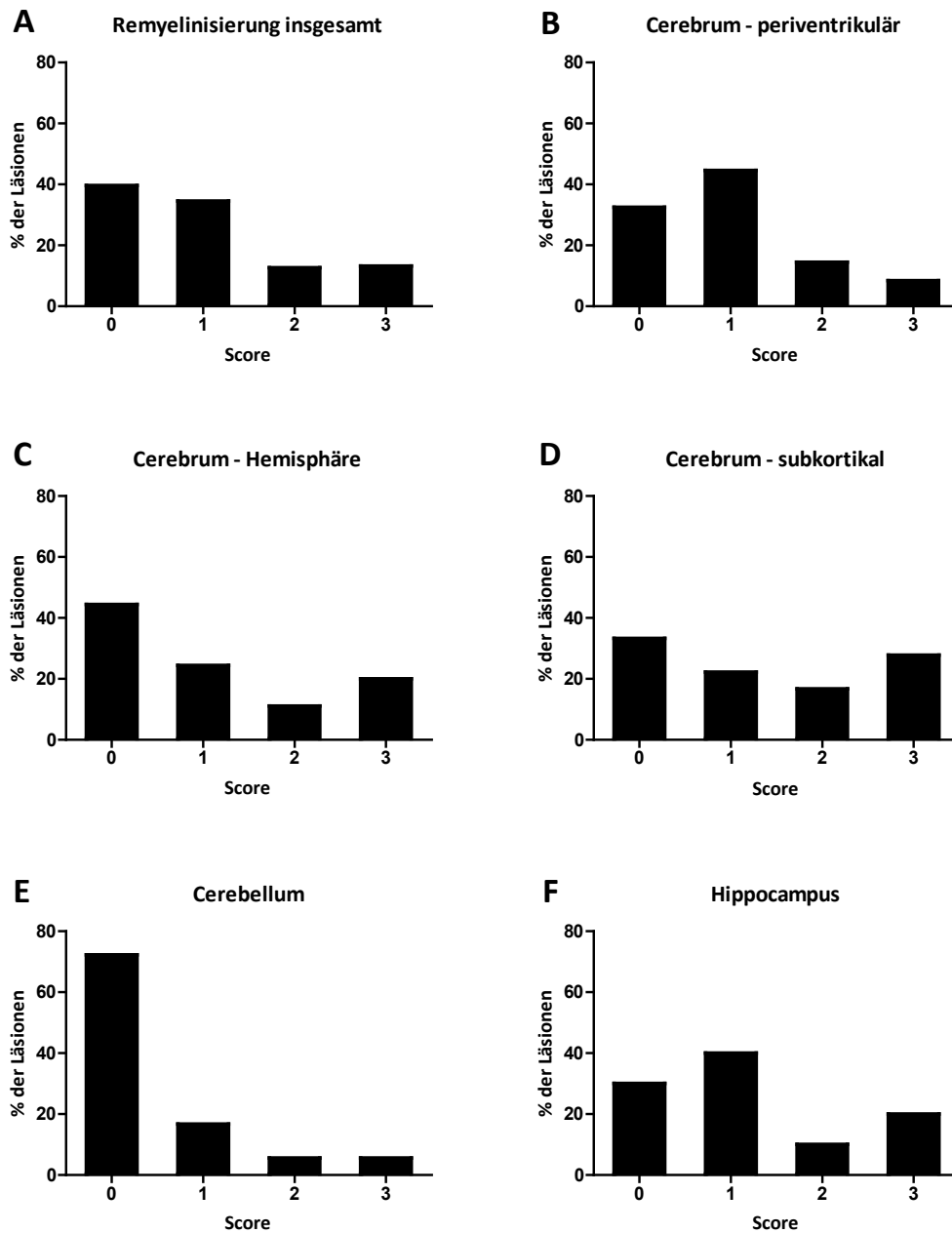


Abbildung 12:

Die Lokalisation der Läsionen beeinflusst deren Remyelinisierung. **A:** Entspricht Abb. 6A. **B-F:** Auffällig ist, dass hemisphärische (**C**), subkortikale (**D**) und hippocampale (**F**) Läsionen häufiger vollständig remyelinisieren als periventrikuläre (**B**) oder zerebelläre (**E**). Letztere sind in 72,22% der Fälle komplett demyelinisiert (Score 0). Betrachtet man dagegen alle ausgewerteten Läsionen (**A**), so sind nur 39,66% komplett demyelinisiert.

3.6 ER β ist bei an MS erkrankten und gesunden Gehirnen in der weißen Substanz nachweisbar, ER α wird nur im Kortex exprimiert; PR findet sich in der gesunden weißen und grauen und variabel in der weißen Substanz MS-Kranker

Um die gliale Rezeptorexpression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren beim erwachsenen Menschen – bei MS und neuropathologisch unauffälligen Kontrollen – festzustellen, untersuchten wir cDNA mittels RT-PCR auf das Vorhandensein der Sequenzen für ER α , ER β und PR. Die cDNA gewannen wir aus der RNA von zwei Autopsien von MS-Patienten (Geschlecht nicht bekannt) und aus zwei neuropathologisch unauffälligen Autopsien (männlich und weiblich). Bei den MS-Autopsien entnahmen wir das Material aus der hemisphärischen weißen Substanz: entweder aus der nicht befallenen weißen Substanz (NAWM) oder aus makroskopisch sichtbaren Läsionen. Das Gewebe der neuropathologisch unauffälligen Kontrollen wurde auf die gleiche Weise gewonnen. Die männliche Probe stammte dabei ebenfalls aus der hemisphärischen weißen Substanz, die weibliche Probe aus dem frontalen Kortex (graue Substanz).

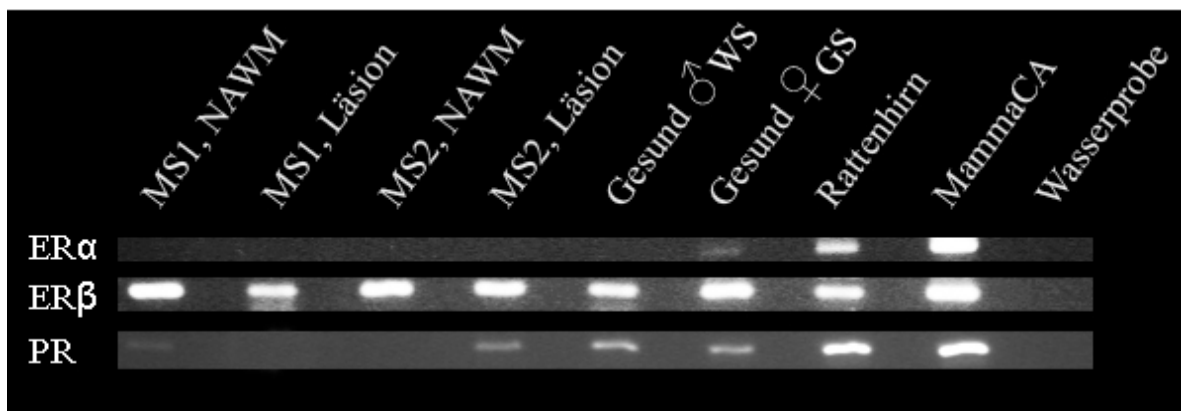


Abbildung 13:

Menschliche Gehirne – MS und Gesund – variieren in der Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression. ER α ließ sich außer in den Positivkontrollen nur in der kortikalen humanen Kontrolle (Gesund ♀ GS) nachweisen, ER β war in allen Proben vertreten, PR wurde in gesunder weißer und grauer und variabel in der weißen Substanz der MS-Fälle exprimiert. Ausschnitte aus 3 PCR-Gelen mit Primern für ER α , ER β bzw. PR. Von rechts nach links: Negativkontrolle, Positivkontrollen – cDNA einer rezeptorpositiven Mamma-CA-Zelllinie und cDNA aus einem Rattenhirn (GS + WS). Graue (kortikale) Substanz eines weiblichen Menschen. Die restlichen Proben entstammen der weißen Substanz des Menschen. Das housekeeping-Gen hARP wurde für jede Probe positiv getestet (hier nicht gezeigt). Sämtliche Proben (außer MammaCA) lagen in gleicher Konzentration vor und wurden in gleicher Menge aufgetragen. WS = Weiße Substanz, GS = Graue Substanz.

Es zeigte sich, dass die gliale Rezeptorexpression von ER α zwischen weißer und grauer Substanz und diejenige von PR zwischen den erkrankten Proben variierte (s. Abb. 13). Wir konnten ER α in den Positivkontrollen (MammaCA, Ratten-ZNS) sowie in der grauen

Substanz einer der humanen Kontrollen nachweisen, wobei das Signal hier sehr schwach war. PR war in beiden humanen Kontrollproben sowie in einem MS-Fall in der NAWM (auch hier sehr schwach), im anderen Fall innerhalb der Läsion exprimiert. ER β war in allen unseren Proben vertreten.

3.7 Humane Oligodendrozyten zeigen eine starke Bande für ER β , für ER α besteht eine schwache, für PR keine Bande.

Um festzustellen, welchen Anteil die Oligodendrozyten an der glialen Östrogen- und Progesteron-Rezeptorexpression haben, untersuchten wir aufgereinigte, jeweils nur einem glialen Zelltyp zugehörige humane cDNA mittels PCR auf das Vorhandensein der jeweiligen Rezeptorsequenz. Uns standen zwei Proben von Astrozyten von je einem Feten und je eine cDNA-Probe von Mikroglia und Oligodendrozyten aus adulten Gehirnen zur Verfügung. Zu Alter und Geschlechtszugehörigkeit lagen uns keine Angaben vor.

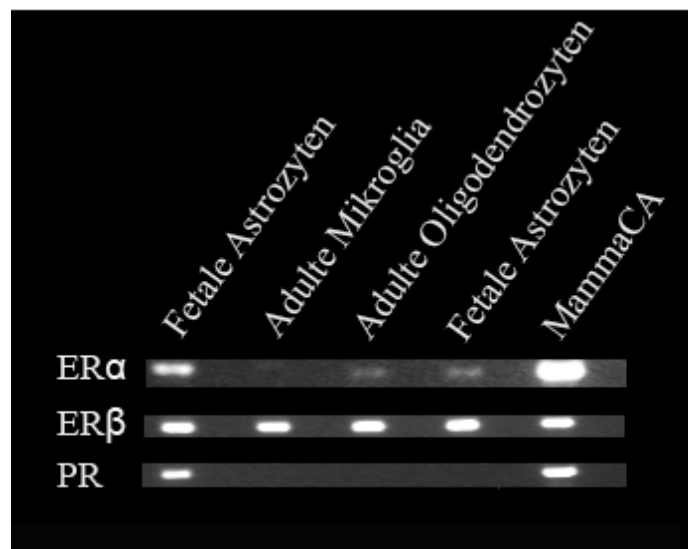


Abbildung 14:

Humane gliale Zellen unterscheiden sich in ihrer Rezeptorexpression. Adulte Oligodendrozyten zeigen Banden für ER β und schwach für ER α . Ausschnitte aus 3 PCR-Gelen mit Primern für ER α , ER β bzw. PR. Rechts außen befindet sich die Positivkontrolle – die cDNA einer MammaCA-Zelllinie. Es ist für ER α , ER β und PR positiv. Die Negativkontrolle war stets negativ, das housekeeping-Gen hARP stets positiv (hier nicht gezeigt). Die glialen Zellen unterscheiden sich hinsichtlich der Rezeptoren: ER α wird von allen Gliazellen außer Mikroglia exprimiert, ER β ausnahmslos von allen glialen Zellen und PR ist nur in einer der Proben von fetalen Astrozyten nachweisbar. Sämtliche Proben (außer MammaCA) lagen in gleicher Konzentration vor und wurden in gleicher Menge aufgetragen.

Die adulten Oligodendrozyten zeigten Banden für ER β und ER α , aber nicht für PR. Die fetalen Astrozyten zeigten Banden für ER α , ER β und PR, wobei bei einer der Proben die Bande für ER α schwächer imponierte und die Bande für PR sogar fehlte. Die adulten Mikrogliazellen hatten nur bei ER β eine Bande (s. Abb. 14).

3.8 CG4-Zellen zeigen Banden für rER β und rPR, aber nicht für rER α

Bevor wir den Effekt von Östrogen und Progesteron auf oligodendrogliale Zelllinien bestimmen konnten, mussten wir sicherstellen, dass unsere Zelllinien Östrogen- und Progesteronrezeptoren exprimieren. Wir untersuchten deshalb die cDNA der CG4-Zelllinie auf die Präsenz der für Ratten bekannten Östrogen- und Progesteronrezeptoren (rER α , rER β , rPR). Differenzierte CG4-Zellen zeigten Banden sowohl für rER β als auch für rPR (s. Abb. 15).

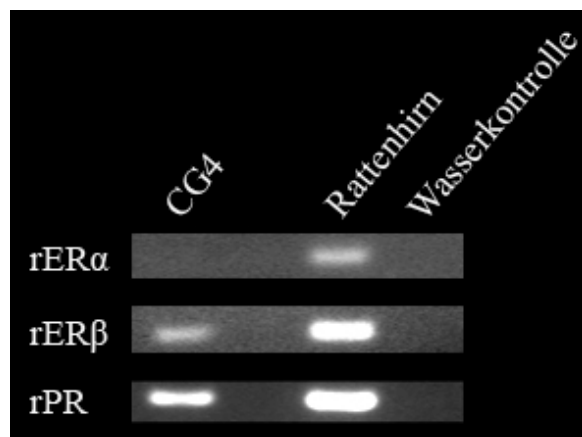


Abbildung 15:

CG4-Zellen zeigen Banden für rER β und rPR. Ausschnitte aus 3 PCR-Gelen mit Primern für rER α , rER β bzw. rPR. Positivkontrolle: Rattenhirn (cDNA aus weißer und grauer Substanz). Sämtliche Proben lagen in gleicher Konzentration vor und wurden in gleicher Menge aufgetragen.

Auch die Primerpaare für die menschlichen Rezeptoren konnten die Rattenrezeptoren nachweisen und viceversa, sie erzeugten dabei aber mehrere Banden (hier nicht gezeigt), was für zusätzliche Bindungsstellen und eine nicht 100%ige Homologie der Rezeptoren von Mensch und Ratte spricht. Dennoch wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit der kleine Buchstabe weggelassen und nur noch von ER α , ER β und PR die Rede sein.

3.9 Östrogen fördert die Proliferation von oligodendroglialen Zellen, Progesteron zeigt keinen proliferativen Effekt

Um zu überprüfen, ob Östrogen bzw. Progesteron einen Effekt auf die Proliferation von oligodendroglialen Zellen haben, inkubierten wir differenzierte CG4-Zellen über 24 bzw. 48 h mit verschiedenen Konzentrationen von Östrogen bzw. Progesteron und verglichen die resultierende Zellzahl mit derjenigen ohne Zusatz von Hormonen (s. Abb. 16). Als Indikator für die Zellzahl diente uns die mitochondriale Respiration, gemessen unmittelbar nach alkoholischer Zelllyse.

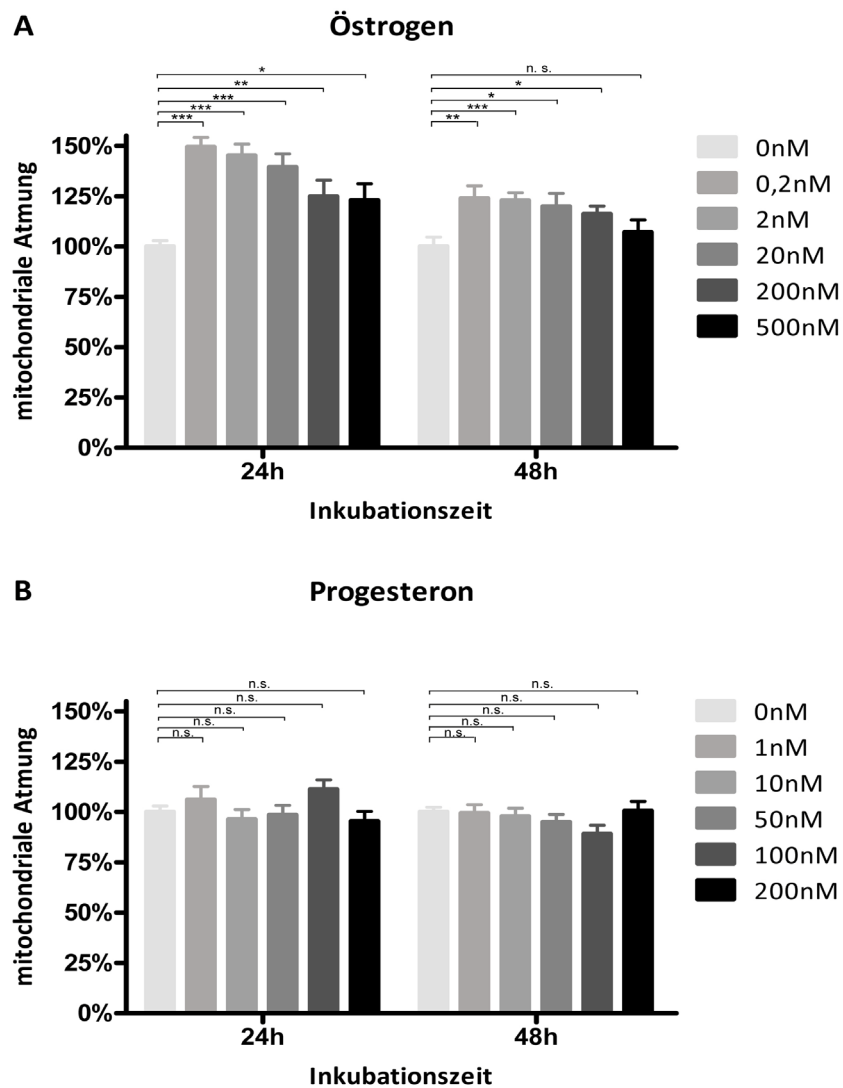


Abbildung 16:

Östrogen fördert die Proliferation von differenzierten CG4-Zellen, Progesteron hat keinen Effekt auf die Proliferation. **A+B:** Der helle Balken ganz links ist auf 100% gesetzt und stellt die nicht hormonbehandelten CG4-Zellen dar. **A:** Unter Inkubation mit Östrogen kommt es zur Zellproliferation. Die 24 h-Inkubation ist der 48 h-Inkubation überlegen, die Wirkung lässt mit steigender Konzentration nach, der Versuch wurde dreimal wiederholt. **B:** Unter Inkubation mit Progesteron ist kein Effekt darstellbar, Inkubationszeit und Konzentrationsmenge haben keinen Einfluss, der Versuch wurde viermal wiederholt. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, n.s. = $p > 0,05$.

Es zeigte sich, dass Östrogen einen positiven Effekt auf die Proliferation von differenzierten CG4-Zellen hat. Der Effekt war besonders markant bei einer Inkubationszeit von 24 h und einer Konzentration im Bereich von 0,2 bis 2nM (s. Abb. 16A). Mit zunehmender Konzentration und zunehmender Inkubationszeit nahm der Effekt auf die Proliferation ab. Dieses Experiment wurde dreimal durchgeführt.

Progesteron zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation (s. Abb. 16B), dieser Versuch wurde viermal durchgeführt.

3.10 Progesteron wirkt protektiv auf oligodendrogliale Zellen bei Anwesenheit von SNAP, Östrogen zeigt keinen protektiven Effekt

Um zu untersuchen, ob Östrogen bzw. Progesteron das Überleben von oligodendroglialen Zellen gegenüber toxischen Einflüssen beeinflusst, inkubierten wir differenzierte CG4-Zellen für 24 h mit 2nM Östrogen bzw. 50nM Progesteron und setzten sie anschließend für weitere 24 h den Zelltodinduktoren Staurosporin bzw. SNAP aus (s. Abb. 17 und 18). Sämtliche Versuche wurden zweimal durchgeführt. Als Indikator für das Zellüberleben diente uns die mitochondriale Atmung unmittelbar nach alkoholischer Zellyse.

Die Präinkubation mit Östrogen hatte keinen Einfluss auf das Überleben von CG4-Zellen nach Zelltodinduktion mit Staurosporin oder SNAP (s. Abb. 17A,B). Die Präinkubation mit Progesteron zeigte ebenfalls keinen Effekt nach Zelltodinduktion mit Staurosporin (s. Abb. 18A), die Gabe des NO-Donors SNAP hingegen wirkte weniger toxisch nach Präinkubation mit Progesteron verglichen mit unbehandelten Kontrollen (s. Abb. 18B). Dieser Effekt war unabhängig von der SNAP-Konzentration.

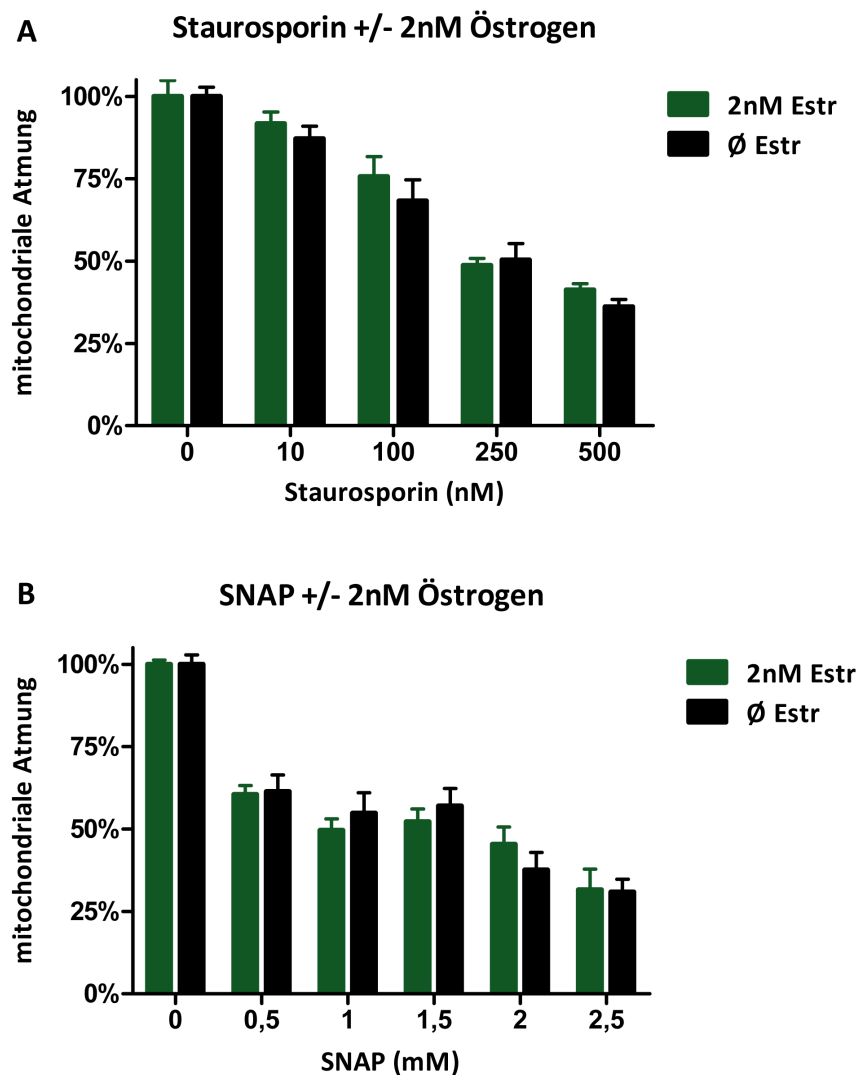


Abbildung 17:

Die Präinkubation mit Östrogen beeinflusst das Zellüberleben von oligodendroglialen Zellen nach Gabe von Staurosporin und SNAP nicht (Abschätzung des Zellüberlebens durch Messung der mitochondrialen Atmung).

A+B: Die CG4-Zellen wurden mit 2nM Östrogen (grüne Balken) oder ohne Östrogenzusatz (schwarze Balken) 24 h inkubiert und anschließend weitere 24 h verschiedenen Konzentrationen von Staurosporin und SNAP ausgesetzt. Die mitochondriale Atmung ohne Staurosporin- bzw. SNAP-Zugabe wurde gleich 100% gesetzt. Die Versuche wurden jeweils zweimal durchgeführt. Estr = Östrogen. **A:** Nach Gabe von Staurosporin (10-500nM) war kein Unterschied in der mitochondrialen Atmung zwischen behandelten und unbehandelten Zellen zu erkennen. **B:** Auch nach Gabe von SNAP (0,5-2,5mM) war kein Unterschied in der mitochondrialen Atmung zwischen behandelten und unbehandelten Zellen festzustellen.

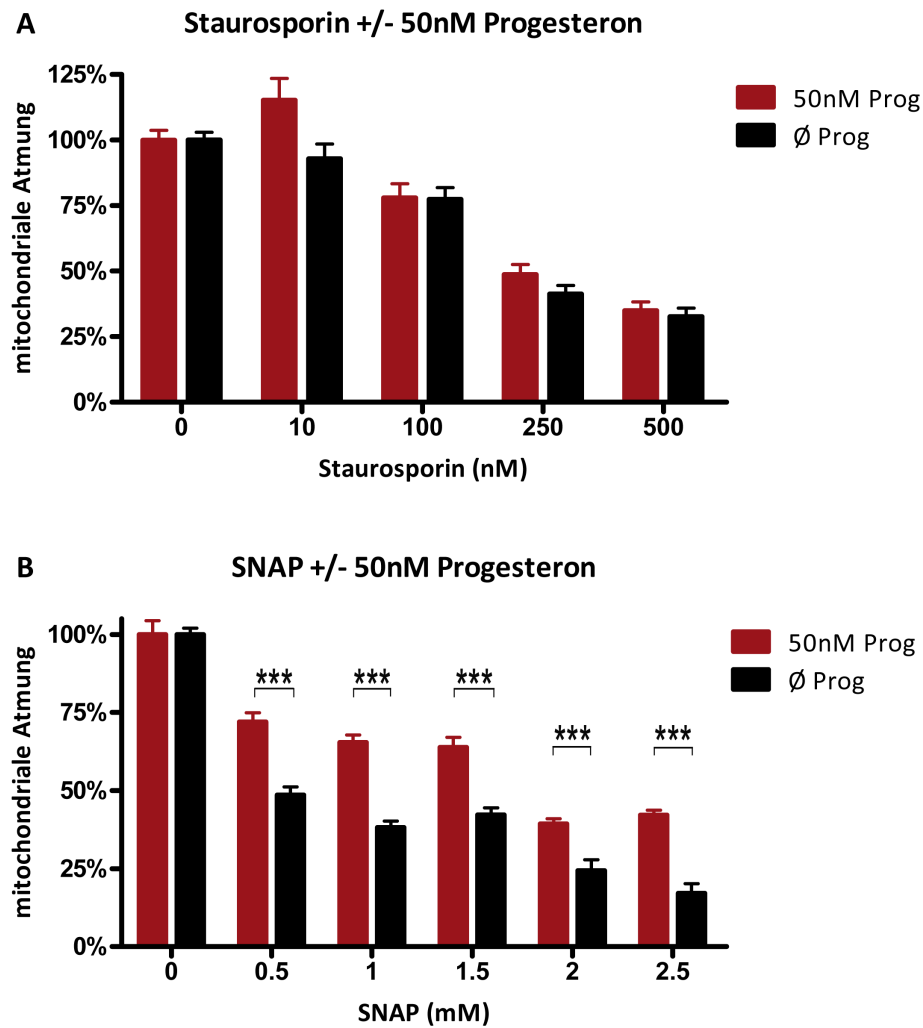


Abbildung 18:

Die Präinkubation mit Progesteron beeinflusst das Zellüberleben von oligodendroglialen Zellen nach Gabe von Staurosporin nicht, das Zellüberleben nach Gabe von SNAP wird hingegen signifikant gesteigert (Abschätzung des Zellüberlebens durch Messung der mitochondrialen Atmung). **A+B:** Die CG4-Zellen wurden mit 50nM Progesteron (rote Balken) oder ohne Progesteronzusatz (schwarze Balken) 24 h inkubiert und dann weitere 24 h verschiedenen Konzentrationen von Staurosporin und SNAP ausgesetzt. Die mitochondriale Atmung ohne Staurosporin- bzw. SNAP-Zugabe wurde gleich 100% gesetzt. Die Versuche wurden jeweils zweimal durchgeführt. Prog = Progesteron. **A:** Nach Gabe von Staurosporin (100-500nM) war kein Unterschied in der mitochondrialen Atmung zwischen behandelten und unbehandelten Zellen zu erkennen. Der Anstieg der mitochondrialen Atmung nach Gabe von 10 nM Staurosporin nach Präinkubation mit Progesteron wurde als Ausreißer gewertet, da er nur bei einer der beiden Durchführungen des Experimentes auftrat. **B:** Nach Gabe von SNAP (0,5-2,5mM) war die mitochondriale Atmung der mit Progesteron vorbehandelten CG4-Zellen hoch signifikant weniger beeinträchtigt als diejenige der unbehandelten Zellen. *** = $p < 0,001$.

3.11 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es folgt zur besseren Übersicht eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse:

1. Die Anzahl der Oligodendrozyten und OPCs im C.c. des Menschen ist unabhängig von Geschlecht und Alter und davon, ob MS vorliegt oder nicht (3.1 u. 3.2). Die MS-Verlaufsform beeinflusst die Oligodendrozytendichte: bei SPMS findet man in der NAWM mehr Oligodendrozyten als bei PPMS (3.2).
2. Die Remyelinisierungskapazität chronischer MS-Läsionen ist unabhängig von Geschlecht, Menopause, MS-Verlaufsform, Todesalter und Krankheitsdauer (3.3 u. 3.4). Sie stellt sich intraindividuell überwiegend heterogen dar (3.4) und zeigt eine Lokalisationsabhängigkeit (3.5).
3. In der hemisphärischen weißen Substanz ist beim Menschen ER β und PR, aber kein ER α nachweisbar (3.6). Zwischen MS-Kranken und Gesunden gibt es bezüglich ER-Expression keine, bezüglich PR-Expression variable Unterschiede (3.6). Menschliche Oligodendrozyten zeigen eine Bande für ER β , eine schwache Bande für ER α und keine Bande für PR (3.7). Unsere CG4-Zellen zeigen Banden für PR und ER β , aber nicht für ER α (3.8).
4. Östrogen fördert die Proliferation von Oligodendrozyten, Progesteron beeinflusst die Proliferation nicht (3.9). Progesteron wirkt protektiv auf Oligodendrozyten gegenüber dem NO-Donor SNAP, nicht aber gegenüber Staurosporin; Östrogen zeigt keinen protektiven Effekt auf das Überleben von CG4-Zellen nach Inkubation mit Staurosporin oder SNAP (3.10).

4 Diskussion

4.1 Einflussfaktoren der Oligodendrozyten- und OPC-Dichte

Unsere Ergebnisse können die These, dass die Oligodendrozytenanzahl beim Menschen geschlechtsabhängig ist, nicht erhärten. Wie Cerghet und Kollegen (Cerghet et al. 2006) untersuchten auch wir das Corpus callosum (C.c.). Im Durchschnitt lag die Zellzahl/mm² der Männer 14 % über derjenigen der Frauen, doch der Unterschied erreichte wegen einer hohen Streubreite keine statistische Signifikanz. Die Höhe der Streubreite korrelierte dabei mit dem Alter der Patienten. Ein hohes Alter (71 – 80 Jahre) war mit einer ausgeprägten Streuung, ein junges Alter (21 – 30 Jahre) mit einer geringen Streuung assoziiert. Dies geht konform mit älteren Studien an neuronalen und glialen Zellen, die ebenfalls altersabhängig hohe Streubreiten beobachten konnten (Monagle und Brody 1974; Leuba und Garey 1989). Auch innerhalb der verschiedenen Altersgruppen waren keine geschlechtsabhängigen Unterschiede in der Zellzahl auszumachen. Ebenso wenig zeigte sich die OPC-Dichte geschlechts- oder altersabhängig. Unsere Ergebnisse lassen indes keine Aussage darüber zu, ob beim Menschen die Lebensdauer weiblicher Oligodendrozyten herabgesetzt oder die Apoptoserate erhöht ist (vgl. 1.3). Um dies weiter zu untersuchen, müssten Zellkulturexperimente an primären menschlichen Oligodendrozyten zur Untersuchung der Lebensdauer und eine Analyse gesunden menschlichen Hirngewebes hinsichtlich Apoptosemarkern erfolgen.

Auf der Suche nach weiteren Einflussfaktoren der Oligodendrozyten- und OPC-Dichte verglichen wir gesunde C.c. mit läsionsfreien C.c. (NAWM, vgl. 1.1.1, S.4) von chronischen MS-Patienten und konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Zellzahl feststellen. Als wir hinsichtlich der MS-Verlaufsform differenzierten, zeigte sich, dass bei SPMS eine signifikant höhere Oligodendrozytendichte vorlag als bei PPMS und Kontrollen; die OPC-Dichte unterschied sich nicht. Es ist hierbei jedoch zu betonen, dass uns nur wenige läsionsfreie C.c. von gesicherten SPMS- und PPMS-Fällen vorlagen (n=7) und größere Fallzahlen nötig sind, um unser Ergebnis zu validieren. Es gibt bislang keine Studie, die den Einfluss der MS-Verlaufsform auf die Oligodendrozytendichte in der NAWM untersucht hätte. Unser Ergebnis ist mit der Vorstellung von MS als einer Krankheit mit heterogener Histologie gut vereinbar. Die höhere Anzahl von Oligodendrozyten bei SPMS könnte dabei durch die bei SPMS höhere perivaskuläre Entzündungsaktivität (Revesz et al. 1994) zu erklären sein. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass Entzündungsmediatoren wie TNF α einen proproliferativen Effekt auf OPCs haben (Arnett et al. 2001). Jene

Entzündungsmediatoren könnten über den Blutweg die NAWM erreichen und dort zu einer Oligodendrozytenvermehrung führen. In diesem Fall wäre anzunehmen, dass mit zunehmender Krankheitsdauer die Oligodendrozytendichte zunimmt. Diese Hypothese muss durch weitere histologische Analysen überprüft werden.

Es war auffällig, dass in dieser Arbeit die OPC-Anzahl interindividuell einer großen Streubreite unterlag. Diese war unabhängig von Alter, Geschlecht und MS-Krankheit. Eine frühere Studie (Kuhlmann et al. 2008) berichtete bei Hirnbiopsien von Epilepsiepatienten (n=6) über eine nur geringe Streuung bei gleicher Färbemethode. Der Unterschied bezüglich der Streuung könnte dabei mit einer höheren Färbequalität des bioptischen Materials in Zusammenhang stehen, da bei Biopsien meist eine bessere Imprägnation mit der Fixiersubstanz zu erreichen ist. Hierfür spricht, dass bei unseren Gewebeschnitten nur etwa 70% der Zellen mit Oligodendrozytenmorphologie auch OLIG2-positiv waren (Daten nicht gezeigt).

4.2 Einflussfaktoren der Remyelinisierungskapazität bei Multipler Sklerose

Unsere Ergebnisse zeigen keine Geschlechtsunterschiede in der Remyelinisierungskapazität chronischer MS-Läsionen. Wir konnten zwar bei weiblichen Läsionen gegenüber männlichen eine Tendenz zu einer ausgeprägteren Remyelinisierung (> 50% der Läsionsfläche) beobachten, doch erreichte diese Tendenz keine statistische Signifikanz. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Patrikios und Kollegen, die bei 51 Autopsien von MS-Patienten (weiblich : männlich, 1,5 : 1) keinen geschlechtsabhängigen Unterschied in der Häufigkeit vollständig remyelinisierter Läsionen feststellen konnten (Patrikios et al. 2006). Studien an Ratten kamen indessen zu einem anderen Ergebnis: nach chemischer Läsionsinduktion im ZNS remyelinisierten weibliche Tiere ausgeprägter als männliche (Li et al. 2006). Dieser Unterschied war aber nur bei älteren Tieren zu beobachten, wobei bekannt ist, dass ältere Ratten langsamer remyelinisieren als junge (Shields et al. 1999; Sim et al. 2002). Shields und Kollegen veranschlagten 9 Wochen bei älteren Ratten bis die Remyelinisierung abgeschlossen ist. Bei MS sieht man, dass Remyelinisierung bereits sehr früh, in der Hochphase der Entzündung auftritt (Raine und Wu 1993) und noch drei Monate nach Anfang der klinischen Symptome signifikant zunimmt (Prineas et al. 1993). Womöglich haben Li und Kollegen also einen geschlechtsabhängigen Unterschied in der Geschwindigkeit und nicht im Ausmaß der Remyelinisierung festgestellt als sie 8 Wochen nach Läsionssetzung die Remyelinisierung evaluierten. Ein Unterschied der Remyelinisierungsgeschwindigkeit

lässt sich an chronisch inaktiven MS-Läsionen nicht ablesen, weshalb zur Überprüfung dieser These beim Menschen weitere Untersuchungen wie zum Beispiel Voxel-basierte longitudinale MRT-Untersuchungen (Chen et al. 2007; Dwyer et al. 2009) folgen müssten. Dazu muss allerdings einschränkend gesagt werden, dass bisher die Remyelinisierung nur begrenzt mittels bildgebender Verfahren dargestellt werden kann (Zivadinov 2007).

Um die Hypothese zu prüfen, dass weibliche gonadale Geschlechtshormone die Remyelinisierung beeinflussen, verglichen wir die Remyelinisierungskapazität von prämenopausalen Frauen mit derjenigen von Männern (zu hormonellen Blutkonzentrationen vgl. Tab. 3). Wir konnten keinen statistisch signifikanten Unterschied sehen. Es muss hier aber auf die sehr kleine Stichprobe (2 Frauen, 14 Läsionen) hingewiesen werden, die der Schwierigkeit geschuldet ist, autoptisches Gewebe von prämenopausalen MS-Patientinnen zu gewinnen. Einen Unterschied hätte man aufgrund von Studien erwarten können, die über einen proremyelinisierenden Effekt von Progesteron bei Tieren berichten. So erhöht die systemische, niedrig supraphysiologische Gabe von Progesteron die Remyelinisierungsrate älterer männlicher Ratten zwar nur schwach, aber signifikant (Ibanez et al. 2004). Und auch im Cuprizone-Modell, einem Toxin-vermittelten MS-Tiermodell bei Mäusen, zeigt Progesteron in der Kombination mit Östrogen einen positiven Effekt auf die Remyelinisierung (Acs et al. 2009). Unsere Ergebnisse hingegen gehen konform mit denjenigen von Li und Kollegen, die in der oben erwähnten Studie nach Gonadenentfernung bei Ratten keine Änderung des beschriebenen Geschlechtsunterschieds und demzufolge keinen gonadalen Einfluss feststellen konnten (Li et al. 2006). Es wäre gleichwohl möglich, dass die intrazerebrale Konzentration von Progesteron trotz fehlender gonadaler Produktion durch eine hirneigene Produktion konstant gehalten wird (Schumacher et al. 2007) und Progesteron folglich doch als protektives Agens bei Männern und Frauen in Frage kommt. Hierfür sprechen die hohen intrazerebralen Konzentrationen an Steroidhormonen bei alten Menschen (Weill-Engerer et al. 2002) bei geringer gonadaler Produktion. Dagegen spricht die Studie von Bixio und Kollegen, die bei postmenopausalen Frauen intrazerebral wesentlich geringere Progesteronlevel als bei prämenopausalen Frauen gefunden hat (Bixio et al. 1997). Hier besteht weiterer Forschungsbedarf. Studien, die die Wirkung von systemischem Progesteron auf die Remyelinisierung bei MS untersuchen, liegen bislang nicht vor.

Die MS-Verlaufsformen PPMS und SPMS zeigten in unserer Stichprobe eine ähnliche Remyelinisierungskapazität. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Patrikios und Kollegen überein, die bei SPMS zwar weniger vollständig remyelinisierte Läsionen zählten als bei

PPMS, ohne aber einen statistisch signifikanten Unterschied festzustellen (Patrikios et al. 2006). Ein weiterer Hinweis für eine ähnliche Remyelinisierungskapazität ist, dass die MS-bedingte Behinderung bei SPMS- und PPMS-Patienten mit gleicher Geschwindigkeit zunimmt (Confavreux et al. 2000; Kremenchutzky et al. 2006).

Die Krankheitsdauer zeigt unseren Ergebnissen zufolge keinen Einfluss auf die Remyelinisierungskapazität chronischer MS-Läsionen. Bei Ratten nimmt die Remyelinisierungskapazität mit dem Alter ab (Gilson und Blakemore 1993; Shields et al. 1999; Sim et al. 2002). Dazu passend konnten wir eine leichte Tendenz dahingehend erkennen, dass ein höheres Todesalter mit einer abnehmenden Remyelinisierungskapazität korreliert. Diese Tendenz erreichte aber keine statistische Signifikanz und weiterhin ist Vorsicht geboten, da Patrikios und Kollegen bei MS-Patienten eine umgekehrte, nämlich positive und statistisch signifikante Korrelation zwischen Todesalter und Remyelinisierung beobachteten (Patrikios et al. 2006). Dies galt übrigens auch für die Krankheitsdauer, bei der wir, eingedenk der Ergebnisse von Goldschmidt und Kollegen (Goldschmidt et al. 2009), die teilweise auch in diese Arbeit eingehen, eher eine negative Korrelation erwartet hätten. Goldschmidt und Kollegen konnten zeigen, dass die Remyelinisierungskapazität bei chronischen MS-Läsionen geringer ist als bei akuten (s. 1.1.3, S.7). Als Erklärung für dieses Phänomen wurden z.B. wiederholte Demyelinisierungsereignisse und eine resultierende Depletion an OPCs in chronischen Läsionen diskutiert. Dies könnte bei unterschiedlicher Krankheitsdauer auch zwischen chronischen Läsionen eine Rolle spielen. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse von Patrikios und Kollegen und dieser Arbeit könnte in der Zusammensetzung der Stichproben liegen. Unser Kollektiv bestand (soweit bekannt) ausschließlich aus progredienten Verläufen, dasjenige von Patrikios und Kollegen zu 1/10 aus akuten Verläufen (Patrikios et al. 2006). Definitionsgemäß verlaufen die akuten Verläufe schnell letal (Marburg 1906) und bei Patrikios und Kollegen zeigten sie ein vergleichsweise niedriges Todesalter und eine kurze Krankheitsdauer. Da sie in jener Studie ferner ausschließlich zu der Gruppe der gering Remyelinisierenden gehörten, könnte ihre Berücksichtigung für den Unterschied zwischen den Studien verantwortlich sein. Dies spricht dafür, dass die Heterogenität von MS bei Bestimmungen allgemeiner Daten wie Todesalter und Krankheitsdauer beachtet werden sollte und dass die klinischen Verläufe dabei mit histologischen Merkmalen korrelieren können.

Unsere Ergebnisse zeigen eine intraindividuell überwiegend heterogene Remyelinisierungskapazität. Die meisten unserer Patienten (12 von 19) wiesen große

Schwankungen im Remyelinisierungsgrad der Läsionen auf. Dies stimmt mit einer Studie von Patani und Kollegen überein, die ebenfalls eine große intraindividuelle Variabilität im Ausmaß der Remyelinisierung beobachteten (Patani et al. 2007). Patrikios und Kollegen fanden hingegen ein homogeneres Remyelinisierungsprofil der einzelnen Patienten (Patrikios et al. 2006). Hier ist aber auf die unterschiedliche Methodik hinzuweisen: die meisten Patienten, die in Patrikios' Studie als besonders gute Remyelinisierer eingestuft wurden, zeigten auch komplett demyelinisierte Läsionen und hätten unseren Kriterien zufolge als heterogene Remyelinisierer gegolten. Die gänzliche Abwesenheit von Remyelinisierung war auch in jener Studie die absolute Ausnahme. Dies zeigt, dass prinzipiell die Mehrheit der Patienten die Fähigkeit zur Remyelinisierung besitzt.

Subkortikale Läsionen waren häufiger komplett remyelinisiert als periventrikuläre oder zerebelläre Läsionen. Dabei waren die zerebellären Läsionen am häufigsten komplett demyelinisiert. Dies geht konform mit den Ergebnissen von Patrikios und Kollegen, die ebenfalls eine höhere Remyelinisierungsbereitschaft subkortikaler vs. periventrikulärer Läsionen beobachteten (Patrikios et al. 2006). Unsere Ergebnisse deuten also darauf hin, dass die Läsionslokalisation den Remyelinisierungsgrad beeinflusst. Dafür sprechen auch Studien, die eine verstärkte und schnellere Remyelinisierung von Läsionen des Kortex im Vergleich zu Läsionen der weißen Substanz beschrieben haben (Merkler et al. 2006; Albert et al. 2007). Merkler und Kollegen führen dies mithilfe eines Tiermodells auf eine lokal unterschiedliche Immunreaktion zurück. Es ist hinlänglich bekannt, dass sich Art und Intensität von Entzündungsreizen auf die Remyelinisierung auswirken (Arnett et al. 2001; Bieber et al. 2003; Chari et al. 2006; Setzu et al. 2006). Auf ähnliche Weise könnten die von uns festgestellten Schwankungen in der Remyelinisierungskapazität durch lokale Unterschiede in der Immunantwort zu erklären sein. Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass die intrinsische Remyelinisierungskapazität der OPCs und Oligodendrozyten lokalisationsabhängig differiert. Für diese Hypothese spricht, dass in sich entwickelnden Mäusehirnen verschiedene Ursprünge von OPCs und damit auch der späteren Oligodendrozyten festzustellen sind (Kessaris et al. 2006; Richardson et al. 2006). Im menschlichen Gehirn konnten verschiedene Subgruppen von Oligodendrozyten im Rückenmark identifiziert werden (Kitada und Rowitch 2006), ob dies auch für das Gehirn gilt, kann vorerst nur angenommen werden. Für Unterschiede zwischen OPCs verschiedener Lokalisationen spricht ferner, dass die Genexpression menschlicher OPCs vermutlich in hohem Maß von der direkten Zellumgebung beeinflusst wird (Sim et al. 2006). Eine weitere

denkbare Erklärung für die ausgeprägtere Remyelinisierung in subkortikalen vs. periventrikulären Läsionen ist, dass subkortikal eine höhere neuronale Aktivität vorherrscht. Es konnte gezeigt werden, dass neuronale Aktivität die Myelinisierung von Axonen fördert (Demerens et al. 1996; Bradl und Lassmann 2010). Aufgrund der Länge von Axonen, die bisweilen mehrere MS-Läsionen durchqueren, ist es wahrscheinlicher, dass die neuronale Aktivität nahe den Zellkörpern und damit subkortikal intakt ist, als weiter entfernt, beispielsweise in der Hemisphäre. Ein Grund dafür, dass periventrikuläre Läsionen weniger ausgeprägt remyelinisieren, könnte der Anwesenheit von myelinreaktiven T-Zellen und demyelinisierenden Antikörpern im Liquor geschuldet sein, die das ZNS über das entzündlich veränderte Ependym erreichen und so die Remyelinisierung behindern könnten. Gegen die Lokalisationshypothese spricht, dass erwachsene Ratten im Kleinhirn nach Toxin-induzierter Demyelinisierung vollständig remyelinisieren können (Sim et al. 2002). Es werden noch weitere Studien benötigt, die die Remyelinisierungskapazität von OPCs hinsichtlich der Lokalisation und eventuelle Unterschiede bei Tieren und Menschen untersuchen.

4.3 Die gliale Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren im menschlichen ZNS

In der frontalen grauen Substanz konnten wir ER α - und ER β -mRNA nachweisen. Die ER α -Expression ist bei fehlendem Nachweis einer solchen in der weißen Substanz am ehesten auf eine neuronale ER α -Expression zurückzuführen, da man weiß, dass menschliche Neuronen sowohl ER α als auch ER β exprimieren können (Österlund et al. 2000). In der hemisphärischen weißen Substanz von Gesunden und MS-Kranken konnten wir ER β -mRNA nachweisen. Dies spricht dafür, dass zumindest eine der glialen Zellgruppen (Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia) beim erwachsenen Menschen ER β exprimiert. Als wir die glialen Zellarten einzeln untersuchten, bestätigte sich diese Annahme. ER β war in allen Zellgruppen nachweisbar. ER α zeigte zudem bei Oligodendrozyten eine schwache, bei Astrozyten eine starke und eine schwache und bei Mikrogliazellen keine Bande; somit widersprechen die PCR-Ergebnisse der einzelnen Zellpopulationen den Ergebnissen aus der gesunden weißen Substanz, in der wir keine ER α -Expression nachweisen konnten. Eine oligodendrogliale ER α - und ER β -Koexpression wurde jedoch auch im Rückenmark der Ratte (Platania et al. 2003), bei primären Rattenoligodendrozytenzelllinien (Jung-Testas et al. 1992; Takao et al. 2004) und bei einer Zelllinie humaner Oligodendrozyten (Cantarella et al. 2004) beschrieben. Eine Möglichkeit unsere PCR-Befunde aus dem humanen Gewebe zu erklären,

wäre eine lokalisationsabhängige ER α - (und ER β -) Expression wie sie bei menschlichen Neuronen beschrieben wurde (Österlund et al. 2000). Um dieser These nachzugehen, müssten Oligodendrozyten an verschiedenen Lokalisationen entnommen und bezüglich ihres Rezeptorstatus untersucht werden. Da außerdem nicht auszuschließen ist, dass bei der Oligodendrozytenaufreinigung eine Kontamination durch Astrozyten oder Mikrogliazellen aufgetreten ist (vgl. 2.2.2, S.28), könnten auch diese Zellen für den ER -Nachweis in der Oligodendrozytenprobe verantwortlich sein. Dies könnte zugleich die Schwachheit der ER α -Bande erklären. Doch auch bei den Astrozyten bzw. Mikrogliazellen müsste eine lokalisationsabhängige Expression vorliegen, damit unsere Befunde miteinander vereinbar sind. Eine solche ist bei Astrozyten und Mikrogliazellen aber durch Vorbefunde sogar wahrscheinlich: bei Rattenastrozyten variierte die ER-Expression mit der Entnahmestelle (Azcoitia et al. 1999; Mong et al. 2002; Platania et al. 2003) und desgleichen ist bei Makrophagen – Zellen gleichen Ursprungs wie Mikrogliazellen – eine lokalisationsabhängige Expression beschrieben worden (Zhao et al. 2001; Khan et al. 2005). So sollte auch hinsichtlich der ER α -Expression von Oligodendrozyten die ER α -Expression von Astrozyten und Mikrogliazellen auf eine Lokalisationsabhängigkeit hin untersucht werden. Interessant wäre auch zu klären, ob es Geschlechtsunterschiede bei der glialen ER-Expression gibt. Bei primären Rattenoligodendrozyten berichten Takao und Kollegen über eine achtmal höhere ER α -Expression bei weiblichen gegenüber männlichen Zellen (Takao et al. 2004). Beim Menschen gibt es hierzu keine Studien.

Wir konnten keinen Unterschied zwischen gesunder weißer Substanz und derjenigen von MS-Kranken in bezug auf die ER-Expression nachweisen. Eine quantitative Aussage bezüglich der ER β -Expression erlauben unsere Ergebnisse aber nicht zu treffen, sodass eine Rezeptorhoch- oder Runterregulation bei MS hiermit noch nicht ausgeschlossen ist. Es ist bekannt, dass es bei Steroidrezeptoren auch über den Umweg von Koaktivatoren und Korepressoren zu einer Transkriptionsänderung kommen kann (Horwitz et al. 1996) und dass das Kofaktorenprofil die Rezeptorwirkung erheblich beeinflusst (Jenster 1998). Bislang wurden Veränderungen der Kofaktoren nur bei Tumorerkrankungen wie Meningeomen dokumentiert (Carroll et al. 2000), doch könnten sie auch eine Rolle in anderen neurologischen Erkrankungen spielen. Ebenso scheint die intrazelluläre Lokalisation der Östrogenrezeptoren ihre Funktion zu beeinflussen (Vasudevan und Pfaff 2007), weshalb zumindest Quantität, Kofaktorenprofil und Lokalisation der Östrogenrezeptoren bei Gesunden und MS-Patienten noch untersucht werden müssten, bevor eine gleiche Wirkung von

Östrogen bei MS und Gesunden postuliert werden kann. Analoges gilt für den Progesteronrezeptor (Horwitz et al. 1996; Jenster 1998; Carroll et al. 2000; Brinton et al. 2008).

PR-mRNA konnten wir in gesundem Hirngewebe sowohl in der weißen als auch in der grauen Substanz nachweisen. Die Präsenz von PR-mRNA in der weißen Substanz spricht dafür, dass beim Menschen zumindest eine gliale Zellgruppe den PR exprimiert. Dazu passt auch der Nachweis von PR-mRNA in einer der Astrozytenkulturen. In den MS-Fällen – je zwei Proben aus der weißen Substanz, aus der NAWM und intraläsional – zeigte jeweils nur eine der Proben eine PR-Expression. Dabei war der Unterschied in der Expression unabhängig davon, ob die Gewebeprobe der NAWM oder der Läsion entstammte, sodass sich als Erklärung hierfür weniger eine MS-spezifische als eine allgemeine Variabilität der glialen PR-Expression anbietet. Dass wir bei zwei Proben von Astrozyten von verschiedenen Feten nur in einer PR-mRNA detektieren konnten, spricht ebenfalls für eine Variabilität der PR-Expression. Inwiefern diese Variabilität lokalisationsabhängig ist, ist durch größere Fallzahlen und durch verschiedene standardisierte Entnahmestellen zu überprüfen. Ein Mechanismus könnte dabei die Östrogen-Induzierbarkeit des PR sein (Jung-Testas et al. 1991). Bei Neuronen konnte eine Lokalisationsabhängigkeit der Induzierbarkeit dargestellt werden. Im Hypothalamus der Ratte waren intraneuronale PRs durch Östrogen induzierbar (Guerra-Araiza et al. 2000), im Großhirnkortex nicht (Guerra-Araiza et al. 2001). So könnte auch bei Gliazellen eine Heterogenität der PR-Induzierbarkeit vorliegen. Eine andere Erklärung wäre, dass durch hirneigene Östrogenproduktion (vgl. 1.2.2, S.9-10) örtlich verschieden hohe Östrogenkonzentrationen erreicht werden und via Rezeptorinduktion dies zu Unterschieden in der PR-Expression führt.

In menschlichen Oligodendrozyten konnten wir keine PR-mRNA nachweisen. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen bei der Ratte, wo in primären Oligodendrozyten aus dem Großhirn (Jung-Testas et al. 1992) und in zerebellären Kulturen (Ghoumari et al. 2003) PR nachgewiesen wurde. Diese Unterschiede sprechen für eine Speziesdifferenz in der Expression von PR in Oligodendrozyten. Aber auch eine Lokalisations- oder Geschlechtsabhängigkeit (wie oben diskutiert) wäre mit unserem Ergebnis vereinbar. Über die Verteilung der funktionell unterschiedlichen Splicevarianten – PR-A und PR-B – können wir im Übrigen keine Aussage treffen, da wir die RNA-Sequenz des gemeinsamen Teils der beiden Varianten bestimmt haben.

Abschließend muss darauf hingewiesen werden, dass die RT-PCR nur eine vorläufige Methode sein kann, um die Expression eines Rezeptors zu untersuchen. Die mRNA ist gleichsam der Bauplan eines Proteins und der Nachweis des Bauplans beweist noch nicht, dass das Protein (hier: der Rezeptor) tatsächlich exprimiert wird (Bartlett 2002). Es werden folglich noch weitere Untersuchungen und zusätzliche Methoden wie die Immunzytochemie benötigt, um das gliale Expressionsmuster der Rezeptoren ER α , ER β und PR beim Menschen endgültig zu klären.

4.4 Die Wirkung von Östrogen und Progesteron auf oligodendrogliale CG4-Zellen

In der CG4-Zelllinie konnten wir sowohl ER β als auch PR, aber kein ER α nachweisen. In früheren Studien hatten CG4-Zellen neben ER β auch ER α (Takao et al. 2004) oder weder ERs noch PRs exprimiert (Cadepond et al. 2002). Diese Unterschiede lassen sich möglicherweise durch unterschiedliche Zellkulturbedingungen erklären. Wir verwendeten wie Takao und Kollegen (keine Angaben bei Cadepond et al.) Phenolrot im Zellkulturmedium. Phenolrot wirkt wie ein schwaches Östrogen agonistisch auf ERs (Berthois et al. 1986) und führt dosisabhängig zu einer Expression des PR (Rajendran et al. 1987). Inwiefern Östrogenrezeptoren durch weitere Unterschiede in der Zusammensetzung der Zellkulturmedien induziert werden können, muss durch zusätzliche Studien untersucht werden.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Östrogen die Proliferation von CG4-Zellen fördert. Konzentrationen von 0,2 - 20nM waren proliferativ am wirksamsten; waren die Konzentrationen noch höher, so nahm der Effekt auf die Proliferation ab. Die besonders wirkungsvollen Konzentrationen entsprechen dabei interessanterweise den hormonellen Blutkonzentrationen von Männern und prämenopausalen Frauen (vgl. Tab. 3). Dies spricht für eine hohe proproliferative Wirkung von physiologischen und schwangerschaftstypischen Blutleveln von Östrogen und dafür, dass supraphysiologische, nur pharmakologisch erreichbare Blutlevel eine geringere proproliferative Wirkung haben. Hierbei gilt es aber zu bedenken, dass die Hormonkonzentration innerhalb eines Gewebes von der Blutkonzentration erheblich abweichen kann (Schumacher et al. 2007). Konzentrationsabhängig unterschiedliche Wirkungen wurden bei Östrogen bereits häufig beschrieben (Calabrese 2001). So konnten beispielsweise Experimente an humanen T-Zellen zeigen, dass Östrogen in niedrigen Dosierungen pro- und in hohen schwangerschaftstypischen Dosierungen antiinflammatorisch wirkt (Gilmore et al. 1997). Der zugrundeliegende Mechanismus ist nicht

klar. Über die klassische nukleäre Rezeptorenbindung ist der Effekt jedenfalls nicht zu erklären, da gezeigt werden konnte, dass *in vitro* bei Östrogenkonzentrationen zwischen 0,1 und 500nM durchgehend eine maximale Transkriptionsinduktion besteht (Moosmann und Behl 1999). Es könnten hier also die Membranrezeptoren, die über andere Mechanismen wirken (Hammes und Levin 2007), eine Rolle spielen. Dass der Effekt bei 48stündiger Inkubation geringer ausfällt als bei 24stündiger, könnte trotz geringer initialer Zelldichte über eine Wachstumshemmung durch zunehmenden Zellkontakt und eine dadurch abnehmende Nährstoffversorgung bedingt sein (Holley und Kiernan 1968). Dagegen, dass die Östrogen-spezifische Wirkung am zweiten Tag abnimmt, spricht eine ältere Studie, die bei 100nM Östrogen eine über 20 Tage stabile proliferative Wirkung auf primäre Oligodendrozyten feststellte (Jung-Testas et al. 1992). In jener Studie waren die Zellen positiv für ER α , auf eine ER β -Expression wurde nicht getestet. Da unsere Zellen nur ER β exprimierten, ist es wahrscheinlich, dass es sich bei Proliferation um eine ER β -vermittelte Wirkung handelt. Ob auch der ER α -Rezeptor diese Wirkung vermitteln kann, müsste untersucht werden.

Wir konnten keine protektive Wirkung von Östrogen auf oligodendrogliale CG4-Zellen nachweisen. Die Präinkubation über 24 oder 48 h konnte die CG4-Zellen weder vor dem NO-Donor SNAP noch vor Staurosporin schützen. Der Einfluss auf die Proliferation wurde herausgerechnet, indem bei der Östrogen-behandelten und bei der Kontrollgruppe jeweils die unbehandelten Zellen auf 100% festgelegt wurden. Bei einem anderen NO-Donor, der im Gegensatz zu SNAP zu vermehrter Peroxynitritbildung führt (SIN-1), hat sich Östrogen protektiv gegenüber primären Rattenoligodendrozyten und CG4-Zellen gezeigt (Takao et al. 2004). Es wäre nun interessant zu untersuchen, wie genau die protektive Wirkung von Östrogen zustande kommt und ob durch den Wirkmechanismus der Unterschied zwischen NO und Peroxynitrit zu erklären ist. Eine andere Erklärung für die unterschiedliche Wirkung von Östrogen auf SNAP- und SIN-1-Toxizität wäre bei den Oligodendrozyten selbst zu suchen. Bei Takao und auch bei Canterella und Kollegen (vgl. 1.2.2, S.11) exprimierten die primären Oligodendrozyten beide ERs (Canterella et al. 2004; Takao et al. 2004), in dieser Arbeit hingegen nur ER β . In einem Tiermodell für MS, der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE), wirkt Östrogen protektiv, in dem es den Krankheitsausbruch hinauszögert und den Verlauf abschwächt (Offner 2004). Es konnte gezeigt werden, dass für diese Wirkung die ER α -Expression der Lymphozyten entscheidend ist (H. B. Liu et al. 2003; Polanczyk et al. 2003; Elloso et al. 2005). In der Zusammenschau spricht dies dafür, dass ER α die protektive Wirkung von Östrogen vermittelt. Um dies weiter zu verfolgen, müssten unsere

Experimente mit Oligodendrozyten, die lediglich ER α exprimieren, wiederholt werden, damit ausgeschlossen werden kann, dass Wechselwirkungen zwischen den ERs (Cowley et al. 1997; Hall und McDonnell 1999; Scobie et al. 2002) für die Wirkung relevant sind.

Progesteron zeigte keinen Effekt auf die Proliferation von CG4-Zellen. In einer älteren Studie konnte nach mehreren Tagen bei 100nM sogar ein negativer Effekt auf die Proliferation primärer Rattenoligodendrozyten gezeigt werden (Jung-Testas et al. 1992). Vielversprechend ist die hoch signifikant protektive Wirkung von Progesteron auf CG4-Zellen gegenüber dem NO-Donor SNAP. Dieses Ergebnis zeigt erstmals eine direkt protektive Wirkung von Progesteron auf eine oligodendrogliale Zelllinie. NO kann über verschiedene Wege zytotoxisch auf Oligodendrozyten wirken (Mitrovic et al. 1995), in MS-Läsionen spielt NO eventuell eine Rolle bei der Entstehung von Typ-III-Läsionen (Lassmann 2003; Mahad et al. 2008). Einen wichtigen Hinweis auf den Wirkmechanismus von Progesteron könnte das Ausbleiben der Wirkung bei Staurosporin liefern. Staurosporin induziert eine Apoptose nicht durch direkte Einwirkung auf mitochondriale Enzyme, sondern vermutlich indirekt über einen intrazellulären Calciumanstieg (vgl. 1.2.1, S.9). Erst in der Folge führt dieser zu einer Apoptosekaskade und einer Einbeziehung der Mitochondrien. Bei NO ist ein bekannter Schädigungsmechanismus die Hemmung von mitochondrialen Enzymen durch NO bzw. Peroxynitrit, wobei die Hemmung des Komplex IV im Vordergrund zu stehen scheint (Brown und Cooper 1994; Bolanos et al. 1997), die Komplexe I-III aber auch wichtig sein könnten (Lizasoain et al. 1996). Ähnliche mitochondriale Schädigungen konnten auch in intraläsionellen Oligodendrozyten bei MS beobachtet werden (Mahad et al. 2008). Die protektive Wirkung von Progesteron könnte also weniger in der Beeinflussung von Apoptosekaskaden, sondern vielmehr in der allgemeinen Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktionalität liegen. Für diese Hypothese spricht ebenfalls, dass Progesteron (und Östrogen) die Aktivität des Komplex IV der mitochondrialen Atmung erhöht (Irwin et al. 2008). Möglicherweise wird über diesen Mechanismus die NO-Empfindlichkeit gesenkt. Dies und die Wirkung von Progesteron auf die Komplexe I-III sollten durch weitere Studien geklärt werden. Bei diesen Überlegungen muss aber berücksichtigt werden, dass die SNAP-Gabe möglicherweise zu von NO abweichenden Wirkungen führen kann (Y. Zhang und Hogg 2005). Eine Wiederholung mit anderen NO-Donoren wäre daher anzustreben. Ebenso wäre es ratsam noch weitere Zelltodassays anzuwenden, um Messmethodeneinflüsse zu minimieren (Y. Liu et al. 1997). Ein interessanter zusätzlicher Ansatz wäre die Untersuchung von Wechselwirkungen von

Östrogen und Progesteron in bezug auf die Zytoprotektion. Eine synergistische Wirkung der beiden Hormone wurde bei der Remyelinisierung im Cuprizonmodell (Acs et al. 2009), eine antagonistische Wirkung bei der mitochondrialen Atmung (Irwin et al. 2008) beschrieben.

Es stellt sich die Frage, inwiefern unsere Zellkulturergebnisse auf den Menschen übertragbar sind. Dieser Arbeit zufolge exprimieren menschliche Oligodendrozyten im Gegensatz zu CG4-Zellen wahrscheinlich keine PRs (vgl. 4.3). Es müsste unser Versuch also an PRnegativen Zellen wiederholt werden, um festzustellen, ob die protektive Wirkung über den PR vermittelt wird. Als Alternative käme beispielsweise ein funktionell noch nicht gut verstandener, strukturell abweichender Progesteron-Membranrezeptor in Betracht (Zhu et al. 2003; Thomas 2008). Ein Hinweis, dass Progesteron auch beim Menschen protektive Effekte auf Oligodendrozyten haben könnte, ist eventuell aus Studien abzuleiten, die zeigen, dass während der Schwangerschaft die Schubinzidenz bei an RRMS erkrankten Frauen signifikant sinkt (Confavreux et al. 1998). Dies ist besonders markant gegen Ende der Schwangerschaft, wenn die Progesteronlevel Höchstwerte erreichen. Bei Einnahme von oralen Kontrazeptiva (Östrogen und Progesteron) konnte ferner ein protektiver Kurzeiteffekt nachgewiesen werden (Alonso et al. 2005). Als Erklärung für diese Phänomene wird meist der Einfluss von Progesteron auf das Immunsystem herangezogen (Elenkov et al. 2001; Nicot 2009). Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, dass Progesteron auch eine direkte protektive Wirkung auf menschliche Oligodendrozyten hat.

5 Zusammenfassung

Im letzten Jahrzehnt zeigte sich mehr und mehr, dass MS sich nicht nur klinisch, sondern auch histologisch heterogen verhält. Es gilt seitdem als wahrscheinlich, dass eine primäre Oligodendrozytenschädigung die Ursache einiger (Typ-III- und -IV-Läsionen), vielleicht sogar sämtlicher MS-Läsionen (Neurodegenerationshypothese) darstellt. Diese Arbeit richtet ihren Fokus auf die Zellgruppe der Oligodendrozyten und testet Einflüsse auf die Zellzahl, die Funktion (hier: Remyelinisierung), die Proliferation und die Vulnerabilität. Als potentielle Einflussfaktoren werden das Geschlecht, das Alter, MS und die MS-Verlaufsform, die anatomische Lokalisation und die Hormone Östradiol und Progesteron untersucht. Es gibt viele Studien, die dem weiblichen Geschlecht und den weiblichen Geschlechtshormonen einen protektiven Effekt bei MS bescheinigen. Hier wurde untersucht, inwiefern dieser Effekt mit einer Wirkung auf die Oligodendrozyten erklärbar ist.

Bei Gesunden und MS-Kranken konnten wir keinen Einfluss des Geschlechts auf die Anzahl der Oligodendrozyten feststellen. Die MS-Verlaufsform indessen beeinflusste die Anzahl: SPMS hatte eine höhere Zelldichte als PPMS und Kontrollen. Die Remyelinisierungskapazität zeigte keine Geschlechtsabhängigkeit. Dafür konnten wir eine Lokalisationsabhängigkeit beobachten: subkortikale Läsionen remyelinisierten besser als periventrikuläre. Zerebellär gelegene Läsionen remyelinisierten am seltensten vollständig. Die meisten Patienten wiesen eine starke Heterogenität im Remyelinisierungsgrad der Läsionen auf.

Östradiol wirkte in physiologischen Dosierungen proproliferativ auf Oligodendrozyten (CG4-Zellen). Einen protektiven Effekt gegenüber SNAP und Staurosporin konnten wir bei alleiniger ER β -Expression nicht nachweisen. Da bei ER α - und ER β -Koexpression eine Protektion beschrieben wurde, spricht unser Ergebnis dafür, dass die zytoprotektive Wirkung von Östradiol ER α -vermittelt ist. Progesteron hatte keinen Einfluss auf die Proliferation von PRpositiven Oligodendrozyten, zeigte jedoch einen stark protektiven Effekt bei Anwesenheit des NO-Donors SNAP. Dieser Effekt war bei Staurosporin nicht nachzuweisen, weshalb eine NO-spezifische Wirkung von Progesteron angenommen werden kann. Da NO auch bei MS eine Rolle zu spielen scheint, ist dies eine vielversprechende Entdeckung. Inwiefern die Wirkung PR-vermittelt ist, muss noch weiter untersucht werden. Bei humanen Oligodendrozyten konnten wir ER β - und fraglich ER α -mRNA nachweisen. PR-mRNA fanden wir nicht. Eine lokalisationsabhängige Heterogenität in der Rezeptorexpression muss allerdings noch geprüft und eine protektive Wirkung von Östrogen und Progesteron auf menschliche Oligodendrozyten kann im Moment lediglich vermutet werden.

6 Literaturverzeichnis

- Acs P, Kipp M, Norkute A, Johann S, Clarner T, Braun A, Berente Z, Komoly S und Beyer C (2009): 17beta-estradiol and progesterone prevent cuprizone provoked demyelination of corpus callosum in male mice. *Glia* 57, 807-14
- Adams RD und Kubik CS (1952): The morbid anatomy of the demyelinating disease. *Am J Med* 12, 510-46
- Albert M, Antel J, Brück W und Stadelmann C (2007): Extensive cortical remyelination in patients with chronic multiple sclerosis. *Brain Pathol* 17, 129-38
- Alonso A und Hernan MA (2008): Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology* 71, 129-35
- Alonso A, Jick SS, Olek MJ, Ascherio A, Jick H und Hernan MA (2005): Recent use of oral contraceptives and the risk of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 62, 1362-5
- Aranda A und Pascual A (2001): Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81, 1269-304
- Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK und Ting JP (2001): TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 4, 1116-22
- Azcoitia I, Sierra A und Garcia-Segura LM (1999): Localization of estrogen receptor beta-immunoreactivity in astrocytes of the adult rat brain. *Glia* 26, 260-7
- Bansil S, Lee HJ, Jindal S, Holtz CR und Cook SD (1999): Correlation between sex hormones and magnetic resonance imaging lesions in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 99, 91-4
- Barnett MH und Prineas JW (2004): Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* 55, 458-68
- Barnett MH und Sutton I (2006): The pathology of multiple sclerosis: a paradigm shift. *Curr Opin Neurol* 19, 242-7
- Barnett MH, Henderson AP und Prineas JW (2006): The macrophage in MS: just a scavenger after all? Pathology and pathogenesis of the acute MS lesion. *Mult Scler* 12, 121-32
- Bartlett JM (2002): Approaches to the analysis of gene expression using mRNA: a technical overview. *Mol Biotechnol* 21, 149-60
- Baulieu EE (1997): Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog Horm Res* 52, 1-32
- Baumann N und Pham-Dinh D (2001): Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81, 871-927
- Berthois Y, Katzenellenbogen JA und Katzenellenbogen BS (1986): Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 2496-500
- Bieber AJ, Kerr S und Rodriguez M (2003): Efficient central nervous system remyelination requires T cells. *Ann Neurol* 53, 680-4
- Bixo M, Andersson A, Winblad B, Purdy RH und Backstrom T (1997): Progesterone, 5alpha-pregnane-3,20-dione and 3alpha-hydroxy-5alpha-pregnane-20-one in specific regions of the human female brain in different endocrine states. *Brain Res* 764, 173-8
- Blakemore WF und Franklin RJ (2008): Remyelination in experimental models of toxin-induced demyelination. *Curr Top Microbiol Immunol* 318, 193-212
- Bolanos JP, Almeida A, Stewart V, Peuchen S, Land JM, Clark JB und Heales SJ (1997): Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 68, 2227-40

- Bonfoco E, Krainc D, Ankarcona M, Nicotera P und Lipton SA (1995): Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7162-6
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM und van der Noordaa J (1990): Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28, 495-503
- Bradl M und Lassmann H (2010): Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 37-53
- Brandenberger AW, Tee MK, Lee JY, Chao V und Jaffe RB (1997): Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the midgestational human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 3509-12
- Brinton RD (2001): Cellular and molecular mechanisms of estrogen regulation of memory function and neuroprotection against Alzheimer's disease: recent insights and remaining challenges. *Learn Mem* 8, 121-33
- Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, Baudry M, Wang J, Finch CE, Morgan TE, Pike CJ, Mack WJ, Stanczyk FZ et al. (2008): Progesterone receptors: form and function in brain. *Front Neuroendocrinol* 29, 313-39
- Brown GC und Cooper CE (1994): Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett* 356, 295-8
- Brownell B und Hughes JT (1962): The distribution of plaques in the cerebrum in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 25, 315-20
- Brück W, Schmied M, Suchanek G, Bruck Y, Breitschopf H, Poser S, Piddlesden S und Lassmann H (1994): Oligodendrocytes in the early course of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 35, 65-73
- Brück W, Porada P, Poser S, Rieckmann P, Hanefeld F, Kretzschmar HA und Lassmann H (1995): Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 38, 788-96
- Cadepond F, Massaad C, Trousson A, Grenier J, Groyer G, Baulieu E und Schumacher M (2002): Steroid receptors in various glial cell lines expression and functional studies. *Ann N Y Acad Sci* 973, 484-7
- Calabrese EJ (2001): Estrogen and related compounds: biphasic dose responses. *Crit Rev Toxicol* 31, 503-15
- Cantarella G, Risuglia N, Lombardo G, Lempereur L, Nicoletti F, Memo M und Bernardini R (2004): Protective effects of estradiol on TRAIL-induced apoptosis in a human oligodendrocytic cell line: evidence for multiple sites of interactions. *Cell Death Differ* 11, 503-11
- Carroll RS, Brown M, Zhang J, DiRenzo J, Font De Mora J und Black PM (2000): Expression of a subset of steroid receptor cofactors is associated with progesterone receptor expression in meningiomas. *Clin Cancer Res* 6, 3570-5
- Carswell HV, Dominiczak AF, Garcia-Segura LM, Harada N, Hutchison JB und Macrae IM (2005): Brain aromatase expression after experimental stroke: topography and time course. *J Steroid Biochem Mol Biol* 96, 89-91
- Cerghet M, Skoff RP, Bessert D, Zhang Z, Mullins C und Ghandour MS (2006): Proliferation and death of oligodendrocytes and myelin proteins are differentially regulated in male and female rodents. *J Neurosci* 26, 1439-47
- Charcot JM: Sixième Leçon, De la sclérose en plaques disséminées- anatomie pathologique; in: Oeuvres complètes de J.-M. Charcot, Leçons sur les Maladies du Système nerveux; hrsg. v. Bourneville DM; 1. Band; A. Delahaye & E. Lecrosuier, Paris 1886, 189-220

- Chari DM, Zhao C, Kotter MR, Blakemore WF und Franklin RJ (2006): Corticosteroids delay remyelination of experimental demyelination in the rodent central nervous system. *J Neurosci Res* 83, 594-605
- Chen JT, Kuhlmann T, Jansen GH, Collins DL, Atkins HL, Freedman MS, O'Connor PW und Arnold DL (2007): Voxel-based analysis of the evolution of magnetization transfer ratio to quantify remyelination and demyelination with histopathological validation in a multiple sclerosis lesion. *Neuroimage* 36, 1152-8
- Chomczynski P und Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-9
- Compston A und Coles A (2002): Multiple sclerosis. *Lancet* 359, 1221-31
- Confavreux C und Vukusic S (2006): Age at disability milestones in multiple sclerosis. *Brain* 129, 595-605
- Confavreux C, Hutchinson M, Hours MM, Cortinovis-Tourniaire P und Moreau T (1998): Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. *N Engl J Med* 339, 285-91
- Confavreux C, Vukusic S, Moreau T und Adeleine P (2000): Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343, 1430-8
- Cornil CA, Ball GF und Balthazart J (2006): Functional significance of the rapid regulation of brain estrogen action: where do the estrogens come from? *Brain Res* 1126, 2-26
- Coulam CB, Adamson SC und Annegers JF (1986): Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 67, 604-6
- Courtney AM, Treadaway K, Remington G und Frohman E (2009): Multiple sclerosis. *Med Clin North Am* 93, 451-76, ix-x
- Cowley SM, Hoare S, Mosselman S und Parker MG (1997): Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *J Biol Chem* 272, 19858-62
- Cross AH, Manning PT, Keeling RM, Schmidt RE und Misko TP (1998): Peroxynitrite formation within the central nervous system in active multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 88, 45-56
- Curry JJ, 3rd und Heim LM (1966): Brain myelination after neonatal administration of oestradiol. *Nature* 209, 915-6
- Dawson MR, Levine JM und Reynolds R (2000): NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors? *J Neurosci Res* 61, 471-9
- De Groot CJ, Ruuls SR, Theeuwes JW, Dijkstra CD und Van der Valk P (1997): Immunocytochemical characterization of the expression of inducible and constitutive isoforms of nitric oxide synthase in demyelinating multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 10-20
- Del Popolo G, Panariello G, Del Corso F, De Scisciolo G und Lombardi G (2008): Diagnosis and therapy for neurogenic bladder dysfunctions in multiple sclerosis patients. *Neurol Sci* 29 Suppl 4, S352-5
- Demerens C, Stankoff B, Logak M, Anglade P, Allinquant B, Couraud F, Zalc B und Lubetzki C (1996): Induction of myelination in the central nervous system by electrical activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9887-92
- Djebaili M, Guo Q, Pettus EH, Hoffman SW und Stein DG (2005): The neurosteroids progesterone and allopregnanolone reduce cell death, gliosis, and functional deficits after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 22, 106-18
- Duncan ID, Brower A, Kondo Y, Curlee JF, Jr. und Schultz RD (2009): Extensive remyelination of the CNS leads to functional recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6832-6
- Dwyer M, Bergsland N, Hussein S, Durfee J, Wack D und Zivadinov R (2009): A sensitive, noise-resistant method for identifying focal demyelination and remyelination in

- patients with multiple sclerosis via voxel-wise changes in magnetization transfer ratio. *J Neurol Sci* 282, 86-95
- Elenkov IJ, Wilder RL, Bakalov VK, Link AA, Dimitrov MA, Fisher S, Crane M, Kanik KS und Chrousos GP (2001): IL-12, TNF-alpha, and hormonal changes during late pregnancy and early postpartum: implications for autoimmune disease activity during these times. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 4933-8
- Elloso MM, Phiel K, Henderson RA, Harris HA und Adelman SJ (2005): Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis using estrogen receptor-selective ligands. *J Endocrinol* 185, 243-52
- Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjold M und Gustafsson JA (1997): Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 4258-65
- Evangelou N, Esiri MM, Smith S, Palace J und Matthews PM (2000): Quantitative pathological evidence for axonal loss in normal appearing white matter in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 47, 391-5
- Evans JJ, Sin IL und Aickin DR (1987): Comparison of successive pregnancies provides evidence for a maternal component in determining circulating steroid concentrations. *Clin Chem* 33, 1476
- Filipek PA, Richelme C, Kennedy DN und Caviness VS, Jr. (1994): The young adult human brain: an MRI-based morphometric analysis. *Cereb Cortex* 4, 344-60
- Franklin RJ und ffrench-Constant C (2008): Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat Rev Neurosci* 9, 839-55
- Franklin RJ, Bayley SA, Milner R, ffrench-Constant C und Blakemore WF (1995): Differentiation of the O-2A progenitor cell line CG-4 into oligodendrocytes and astrocytes following transplantation into glia-deficient areas of CNS white matter. *Glia* 13, 39-44
- Ganter P, Prince C und Esiri MM (1999): Spinal cord axonal loss in multiple sclerosis: a post-mortem study. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25, 459-67
- Garay L, Deniselle MC, Lima A, Roig P und De Nicola AF (2007): Effects of progesterone in the spinal cord of a mouse model of multiple sclerosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 107, 228-37
- Garcia-Segura LM, Wozniak A, Azcoitia I, Rodriguez JR, Hutchison RE und Hutchison JB (1999): Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience* 89, 567-78
- Ghoumari AM, Ibanez C, El-Etr M, Leclerc P, Eychenne B, O'Malley BW, Baulieu EE und Schumacher M (2003): Progesterone and its metabolites increase myelin basic protein expression in organotypic slice cultures of rat cerebellum. *J Neurochem* 86, 848-59
- Gilmore W, Weiner LP und Correale J (1997): Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J Immunol* 158, 446-51
- Gilson J und Blakemore WF (1993): Failure of remyelination in areas of demyelination produced in the spinal cord of old rats. *Neuropathol Appl Neurobiol* 19, 173-81
- Goldschmidt T, Antel J, König FB, Brück W und Kuhlmann T (2009): Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. *Neurology* 72, 1914-21
- Goldstein JM, Seidman LJ, Horton NJ, Makris N, Kennedy DN, Caviness VS, Jr., Faraone SV und Tsuang MT (2001): Normal sexual dimorphism of the adult human brain assessed by in vivo magnetic resonance imaging. *Cereb Cortex* 11, 490-7

- Goto N (1987): Discriminative staining methods for the nervous system: luxol fast blue--periodic acid-Schiff--hematoxylin triple stain and subsidiary staining methods. *Stain Technol* 62, 305-15
- Gu C, Casaccia-Bonnel P, Srinivasan A und Chao MV (1999): Oligodendrocyte apoptosis mediated by caspase activation. *J Neurosci* 19, 3043-9
- Guerra-Araiza C, Cerbon MA, Morimoto S und Camacho-Arroyo I (2000): Progesterone receptor isoforms expression pattern in the rat brain during the estrous cycle. *Life Sci* 66, 1743-52
- Guerra-Araiza C, Reyna-Neyra A, Salazar AM, Cerbon MA, Morimoto S und Camacho-Arroyo I (2001): Progesterone receptor isoforms expression in the prepuberal and adult male rat brain. *Brain Res Bull* 54, 13-7
- Hall JM und McDonnell DP (1999): The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140, 5566-78
- Hammes SR und Levin ER (2007): Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev* 28, 726-41
- He J, Evans CO, Hoffman SW, Oyesiku NM und Stein DG (2004): Progesterone and allopregnanolone reduce inflammatory cytokines after traumatic brain injury. *Exp Neurol* 189, 404-12
- Hein T und Hopfenmuller W (2000): [Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany]. *Nervenarzt* 71, 288-94
- Hoffman GE, Le WW, Murphy AZ und Koski CL (2001): Divergent effects of ovarian steroids on neuronal survival during experimental allergic encephalitis in Lewis rats. *Exp Neurol* 171, 272-84
- Hohlfeld R und Wekerle H (2004): Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: from pipe dreams to (therapeutic) pipelines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2, 14599-606
- Holley RW und Kiernan JA (1968): "Contact inhibition" of cell division in 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 60, 300-4
- Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Richer JK, Takimoto GS und Tung L (1996): Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol* 10, 1167-77
- Ibanez C, Shields SA, El-Etr M, Baulieu EE, Schumacher M und Franklin RJ (2004): Systemic progesterone administration results in a partial reversal of the age-associated decline in CNS remyelination following toxin-induced demyelination in male rats. *Neuropathol Appl Neurobiol* 30, 80-9
- Ikuta F und Zimmerman HM (1976): Distribution of plaques in seventy autopsy cases of multiple sclerosis in the United States. *Neurology* 26, 26-8
- Irvine KA und Blakemore WF (2008): Remyelination protects axons from demyelination-associated axon degeneration. *Brain* 131, 1464-77
- Irwin RW, Yao J, Hamilton RT, Cadenas E, Brinton RD und Nilsen J (2008): Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria. *Endocrinology* 149, 3167-75
- Jack C, Antel J, Brück W und Kuhlmann T (2007): Contrasting potential of nitric oxide and peroxynitrite to mediate oligodendrocyte injury in multiple sclerosis. *Glia* 55, 926-34
- Jenster G (1998): Coactivators and corepressors as mediators of nuclear receptor function: an update. *Mol Cell Endocrinol* 143, 1-7
- Jose Sa M (2008): Psychological aspects of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 110, 868-77

- Jover T, Tanaka H, Calderone A, Oguro K, Bennett MV, Etgen AM und Zukin RS (2002): Estrogen protects against global ischemia-induced neuronal death and prevents activation of apoptotic signaling cascades in the hippocampal CA1. *J Neurosci* 22, 2115-24
- Jung-Testas I und Baulieu EE (1998): Steroid hormone receptors and steroid action in rat glial cells of the central and peripheral nervous system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65, 243-51
- Jung-Testas I, Renoir JM, Gasc JM und Baulieu EE (1991): Estrogen-inducible progesterone receptor in primary cultures of rat glial cells. *Exp Cell Res* 193, 12-9
- Jung-Testas I, Renoir M, Bugnard H, Greene GL und Baulieu EE (1992): Demonstration of steroid hormone receptors and steroid action in primary cultures of rat glial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41, 621-31
- Kato J, Hirata S, Nozawa A und Yamada-Mouri N (1994): Gene expression of progesterone receptor isoforms in the rat brain. *Horm Behav* 28, 454-63
- Keirstead HS und Blakemore WF (1999): The role of oligodendrocytes and oligodendrocyte progenitors in CNS remyelination. *Adv Exp Med Biol* 468, 183-97
- Kessarlis N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M und Richardson WD (2006): Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci* 9, 173-9
- Khan KN, Masuzaki H, Fujishita A, Kitajima M, Sekine I, Matsuyama T und Ishimaru T (2005): Estrogen and progesterone receptor expression in macrophages and regulation of hepatocyte growth factor by ovarian steroids in women with endometriosis. *Hum Reprod* 20, 2004-13
- Kitada M und Rowitch DH (2006): Transcription factor co-expression patterns indicate heterogeneity of oligodendroglial subpopulations in adult spinal cord. *Glia* 54, 35-46
- Kowaluk EA und Fung HL (1990): Spontaneous liberation of nitric oxide cannot account for in vitro vascular relaxation by S-nitrosothiols. *J Pharmacol Exp Ther* 255, 1256-64
- Kremenutzky M, Rice GP, Baskerville J, Wingerchuk DM und Ebers GC (2006): The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 9: observations on the progressive phase of the disease. *Brain* 129, 584-94
- Kruman I, Guo Q und Mattson MP (1998): Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells. *J Neurosci Res* 51, 293-308
- Kuhlmann T, Miron V, Cui Q, Wegner C, Antel J und Brück W (2008): Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain* 131, 1749-58
- Kuhlmann T, Goldschmidt T, Antel J, Wegner C, König F, Metz I und Brück W (2009): Gender differences in the histopathology of MS? *J Neurol Sci* 286, 86-91
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S und Gustafsson JA (1997): Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138, 863-70
- Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, Schmidbauer M, Parisi JE und Lassmann H (2005): Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* 128, 2705-12
- Lasiene J, Shupe L, Perlmutter S und Horner P (2008): No evidence for chronic demyelination in spared axons after spinal cord injury in a mouse. *J Neurosci* 28, 3887-96
- Lassmann H (2003): Hypoxia-like tissue injury as a component of multiple sclerosis lesions. *J Neurol Sci* 206, 187-91

- Lassmann H, Raine CS, Antel J und Prineas JW (1998): Immunopathology of multiple sclerosis: report on an international meeting held at the Institute of Neurology of the University of Vienna. *J Neuroimmunol* 86, 213-7
- Leuba G und Garey LJ (1989): Comparison of neuronal and glial numerical density in primary and secondary visual cortex of man. *Exp Brain Res* 77, 31-8
- Li WW, Penderis J, Zhao C, Schumacher M und Franklin RJ (2006): Females remyelinate more efficiently than males following demyelination in the aged but not young adult CNS. *Exp Neurol* 202, 250-4
- Liebetanz D und Merkler D (2006): Effects of commissural de- and remyelination on motor skill behaviour in the cuprizone mouse model of multiple sclerosis. *Exp Neurol* 202, 217-24
- Liu HB, Loo KK, Palaszynski K, Ashouri J, Lubahn DB und Voskuhl RR (2003): Estrogen receptor alpha mediates estrogen's immune protection in autoimmune disease. *J Immunol* 171, 6936-40
- Liu JS, Zhao ML, Brosnan CF und Lee SC (2001): Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol* 158, 2057-66
- Liu Y, Peterson DA, Kimura H und Schubert D (1997): Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* 69, 581-93
- Lizasoain I, Moro MA, Knowles RG, Darley-Usmar V und Moncada S (1996): Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose. *Biochem J* 314 (Pt 3), 877-80
- Louis JC, Magal E, Muir D, Manthorpe M und Varon S (1992): CG-4, a new bipotential glial cell line from rat brain, is capable of differentiating in vitro into either mature oligodendrocytes or type-2 astrocytes. *J Neurosci Res* 31, 193-204
- Lowenstein CJ, Dinerman JL und Snyder SH (1994): Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 120, 227-37
- Lublin FD: Multiple Sclerosis Classification and Overview; in: *Myelin Biology and Disorders*; hrsg. v. Lazzarini RA; 2. Band; Elsevier, Amsterdam 2004, 691-98
- Lublin FD und Reingold SC (1996): Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46, 907-11
- Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M und Lassmann H (2000): Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47, 707-17
- Ludwin SK und Maitland M (1984): Long-term remyelination fails to reconstitute normal thickness of central myelin sheaths. *J Neurol Sci* 64, 193-8
- Mahad D, Ziabreva I, Lassmann H und Turnbull D (2008): Mitochondrial defects in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 131, 1722-35
- Marburg O (1906): Die sogenannte 'akute multiple Sklerose' (Encephalomyelitis periaxialis scleroticans). *Jahrb Psychiat Neurol* 27, 213-311
- Marin-Husstege M, Muggironi M, Raban D, Skoff RP und Casaccia-Bonnel P (2004): Oligodendrocyte progenitor proliferation and maturation is differentially regulated by male and female sex steroid hormones. *Dev Neurosci* 26, 245-54
- Matsushima GK und Morell P (2001): The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol* 11, 107-16
- McDonald WI und Sears TA (1970): The effects of experimental demyelination on conduction in the central nervous system. *Brain* 93, 583-98

- Merkler D, Ernsting T, Kerschensteiner M, Bruck W und Stadelmann C (2006): A new focal EAE model of cortical demyelination: multiple sclerosis-like lesions with rapid resolution of inflammation and extensive remyelination. *Brain* 129, 1972-83
- Miller DH, Barkhof F, Frank JA, Parker GJ und Thompson AJ (2002): Measurement of atrophy in multiple sclerosis: pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *Brain* 125, 1676-95
- Mitrovic B, Ignarro LJ, Vinters HV, Akers MA, Schmid I, Uittenbogaart C und Merrill JE (1995): Nitric oxide induces necrotic but not apoptotic cell death in oligodendrocytes. *Neuroscience* 65, 531-9
- Monagle RD und Brody H (1974): The effects of age upon the main nucleus of the inferior olive in the human. *J Comp Neurol* 155, 61-6
- Moncada S und Erusalimsky JD (2002): Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 214-20
- Mong JA und McCarthy MM (1999): Steroid-induced developmental plasticity in hypothalamic astrocytes: implications for synaptic patterning. *J Neurobiol* 40, 602-19
- Mong JA, Nunez JL und McCarthy MM (2002): GABA mediates steroid-induced astrocyte differentiation in the neonatal rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 14, 45-55
- Moosmann B und Behl C (1999): The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8867-72
- Mosmann T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G und Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-73
- Murphy S, Simmons ML, Agullo L, Garcia A, Feinstein DL, Galea E, Reis DJ, Minc-Golomb D und Schwartz JP (1993): Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosci* 16, 323-8
- Nakano H und Omura S (2009): Chemical biology of natural indolocarbazole products: 30 years since the discovery of staurosporine. *J Antibiot (Tokyo)* 62, 17-26
- Nicot A (2009): Gender and sex hormones in multiple sclerosis pathology and therapy. *Front Biosci* 14, 4477-515
- Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M und Weinshenker BG (2000): Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343, 938-52
- Offner H (2004): Neuroimmunoprotective effects of estrogen and derivatives in experimental autoimmune encephalomyelitis: therapeutic implications for multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 78, 603-24
- Oleszak EL, Zaczynska E, Bhattacharjee M, Butunoi C, Legido A und Katsetos CD (1998): Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine are found in monocytes/macrophages and/or astrocytes in acute, but not in chronic, multiple sclerosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 5, 438-45
- Orton SM, Herrera BM, Yee IM, Valdar W, Ramagopalan SV, Sadovnick AD und Ebers GC (2006): Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol* 5, 932-6
- Österlund MK, Gustafsson JA, Keller E und Hurd YL (2000): Estrogen receptor beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid (mRNA) expression within the human forebrain: distinct distribution pattern to ERalpha mRNA. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 3840-6
- Papka RE, Storey-Workley M, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Collins JJ, Usip S, Saunders PT und Shupnik M (2001): Estrogen receptor-alpha and beta- immunoreactivity and

- mRNA in neurons of sensory and autonomic ganglia and spinal cord. *Cell Tissue Res* 304, 193-214
- Patani R, Balaratnam M, Vora A und Reynolds R (2007): Remyelination can be extensive in multiple sclerosis despite a long disease course. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33, 277-87
- Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Brück W, Lucchinetti C und Lassmann H (2006): Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain* 129, 3165-72
- Plassart-Schiess E und Baulieu EE (2001): Neurosteroids: recent findings. *Brain Res Brain Res Rev* 37, 133-40
- Platania P, Laureanti F, Bellomo M, Giuffrida R, Giuffrida-Stella AM, Catania MV und Sortino MA (2003): Differential expression of estrogen receptors alpha and beta in the spinal cord during postnatal development: localization in glial cells. *Neuroendocrinology* 77, 334-40
- Polanczyk M, Zamora A, Subramanian S, Matejuk A, Hess DL, Blankenhorn EP, Teuscher C, Vandenbark AA und Offner H (2003): The protective effect of 17beta-estradiol on experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated through estrogen receptor-alpha. *Am J Pathol* 163, 1599-605
- Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW et al. (2005): Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 58, 840-6
- Prat A und Antel J (2005): Pathogenesis of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 18, 225-30
- Prineas JW und Connell F (1979): Remyelination in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 5, 22-31
- Prineas JW, Barnard RO, Kwon EE, Sharer LR und Cho ES (1993): Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Ann Neurol* 33, 137-51
- Prineas JW, McDonald WI und Franklin RJ: Demyelinating diseases; in: Greenfield's Neuropathology; hrsg. v. Graham DI und Lantos PL; 7. Auflage; 2. Band; Arnold, London 2002, 471 - 550
- Rabe T und Runnebaum B: Hormone; in: Gynäkologische Endokrinologie; hrsg. v. Runnebaum B und Rabe T; 2. Auflage; 1. Band; Springer Verlag, Heidelberg 1994, 1-50
- Raine CS und Wu E (1993): Multiple sclerosis: remyelination in acute lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 52, 199-204
- Rajendran KG, Lopez T und Parikh I (1987): Estrogenic effect of phenol red in MCF-7 cells is achieved through activation of estrogen receptor by interacting with a site distinct from the steroid binding site. *Biochem Biophys Res Commun* 142, 724-31
- Revesz T, Kidd D, Thompson AJ, Barnard RO und McDonald WI (1994): A comparison of the pathology of primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Brain* 117 (Pt 4), 759-65
- Richardson WD, Kessaris N und Pringle N (2006): Oligodendrocyte wars. *Nat Rev Neurosci* 7, 11-8
- Rizzuto R, Pinton P, Ferrari D, Chami M, Szabadkai G, Magalhaes PJ, Di Virgilio F und Pozzan T (2003): Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene* 22, 8619-27
- Roof RL, Duvdevani R, Heyburn JW und Stein DG (1996): Progesterone rapidly decreases brain edema: treatment delayed up to 24 hours is still effective. *Exp Neurol* 138, 246-51
- Rozen S und Skaletsky H (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132, 365-86
- Ruegg UT und Burgess GM (1989): Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol Sci* 10, 218-20

- Runmarker B und Andersen O (1993): Prognostic factors in a multiple sclerosis incidence cohort with twenty-five years of follow-up. *Brain* 116 (Pt 1), 117-34
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB und Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91
- Sanfilipo MP, Benedict RH, Weinstock-Guttman B und Bakshi R (2006): Gray and white matter brain atrophy and neuropsychological impairment in multiple sclerosis. *Neurology* 66, 685-92
- Santagati S, Melcangi RC, Celotti F, Martini L und Maggi A (1994): Estrogen receptor is expressed in different types of glial cells in culture. *J Neurochem* 63, 2058-64
- Sartorius CA, Melville MY, Hovland AR, Tung L, Takimoto GS und Horwitz KB (1994): A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol Endocrinol* 8, 1347-60
- Schubert D, Heinemann S, Carlisle W, Tarikas H, Kimes B, Patrick J, Steinbach JH, Culp W und Brandt BL (1974): Clonal cell lines from the rat central nervous system. *Nature* 249, 224-7
- Schumacher M, Guennoun R, Ghoumari A, Massaad C, Robert F, El-Etr M, Akwa Y, Rajkowski K und Baulieu EE (2007): Novel perspectives for progesterone in hormone replacement therapy, with special reference to the nervous system. *Endocr Rev* 28, 387-439
- Scobie GA, Macpherson S, Millar MR, Groome NP, Romana PG und Saunders PT (2002): Human oestrogen receptors: differential expression of ER alpha and beta and the identification of ER beta variants. *Steroids* 67, 985-92
- Scolding N, Franklin RJ, Stevens S, Heldin CH, Compston A und Newcombe J (1998): Oligodendrocyte progenitors are present in the normal adult human CNS and in the lesions of multiple sclerosis. *Brain* 121 (Pt 12), 2221-8
- Setzu A, Lathia JD, Zhao C, Wells K, Rao MS, French-Constant C und Franklin RJ (2006): Inflammation stimulates myelination by transplanted oligodendrocyte precursor cells. *Glia* 54, 297-303
- Shields SA, Gilson JM, Blakemore WF und Franklin RJ (1999): Remyelination occurs as extensively but more slowly in old rats compared to young rats following gliotoxin-induced CNS demyelination. *Glia* 28, 77-83
- Shughrue PJ, Lane MV und Merchenthaler I (1997): Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 388, 507-25
- Sim FJ, Zhao C, Penderis J und Franklin RJ (2002): The age-related decrease in CNS remyelination efficiency is attributable to an impairment of both oligodendrocyte progenitor recruitment and differentiation. *J Neurosci* 22, 2451-9
- Sim FJ, Lang JK, Waldau B, Roy NS, Schwartz TE, Pilcher WH, Chandross KJ, Natesan S, Merrill JE und Goldman SA (2006): Complementary patterns of gene expression by human oligodendrocyte progenitors and their environment predict determinants of progenitor maintenance and differentiation. *Ann Neurol* 59, 763-79
- Singer CA, Rogers KL, Strickland TM und Dorsa DM (1996): Estrogen protects primary cortical neurons from glutamate toxicity. *Neurosci Lett* 212, 13-6
- Smestad C, Sandvik L, Landro NI und Celius EG (2009): Cognitive impairment after three decades of multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 7, 1-13
- Smith KJ, Blakemore WF und McDonald WI (1981): The restoration of conduction by central remyelination. *Brain* 104, 383-404

- Stoffel-Wagner B, Watzka M, Schramm J, Bidlingmaier F und Klingmüller D (1999): Expression of CYP19 (aromatase) mRNA in different areas of the human brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 70, 237-41
- Studzinski DM und Benjamins JA (2001): Cyclic AMP differentiation of the oligodendroglial cell line N20.1 switches staurosporine-induced cell death from necrosis to apoptosis. *J Neurosci Res* 66, 691-7
- Takao T, Flint N, Lee L, Ying X, Merrill J und Chandross KJ (2004): 17beta-estradiol protects oligodendrocytes from cytotoxicity induced cell death. *J Neurochem* 89, 660-73
- Takeyama J, Suzuki T, Inoue S, Kaneko C, Nagura H, Harada N und Sasano H (2001): Expression and cellular localization of estrogen receptors alpha and beta in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2258-62
- Thomas P (2008): Characteristics of membrane progesterin receptor alpha (mPRalpha) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progesterin actions. *Front Neuroendocrinol* 29, 292-312
- Tintoré M (2008): Rationale for early intervention with immunomodulatory treatments. *J Neurol* 255 Suppl 1, 37-43
- Tomassini V, Onesti E, Mainero C, Giugni E, Paolillo A, Salvetti M, Nicoletti F und Pozzilli C (2005): Sex hormones modulate brain damage in multiple sclerosis: MRI evidence. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76, 272-5
- Trapp BD (2004): Pathogenesis of multiple sclerosis: the eyes only see what the mind is prepared to comprehend. *Ann Neurol* 55, 455-7
- Vasudevan N und Pfaff DW (2007): Membrane-initiated actions of estrogens in neuroendocrinology: emerging principles. *Endocr Rev* 28, 1-19
- Voytas D (2001): Agarose gel electrophoresis. *Curr Protoc Neurosci* Appendix 1, Appendix 1N
- Vukusic S und Confavreux C (2007): Natural history of multiple sclerosis: risk factors and prognostic indicators. *Curr Opin Neurol* 20, 269-74
- Vukusic S, Ionescu I, El-Etr M, Schumacher M, Baulieu EE, Cornu C und Confavreux C (2009): The Prevention of Post-Partum Relapses with Progesterin and Estradiol in Multiple Sclerosis (POPARTMUS) trial: rationale, objectives and state of advancement. *J Neurol Sci* 286, 114-8
- Waxman SG und Sims TJ (1984): Specificity in central myelination: evidence for local regulation of myelin thickness. *Brain Res* 292, 179-85
- Wegner C und Stadelmann C (2009): Gray matter pathology and multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 9, 399-404
- Weill-Engerer S, David JP, Sazdovitch V, Liere P, Eychenne B, Pianos A, Schumacher M, Delacourte A, Baulieu EE und Akwa Y (2002): Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 5138-43
- Weiner HL (2009): The challenge of multiple sclerosis: how do we cure a chronic heterogeneous disease? *Ann Neurol* 65, 239-48
- Weinshenker BG, Rice GP, Noseworthy JH, Carriere W, Baskerville J und Ebers GC (1991): The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 3. Multivariate analysis of predictive factors and models of outcome. *Brain* 114 (Pt 2), 1045-56
- Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J und Ebers GC (1989): The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain* 112 (Pt 1), 133-46

- Weruaga E, Alonso JR, Porteros A, Crespo C, Arevalo R, Brinon JG, Velasco A und Aijon J (1998): Nonspecific labeling of myelin with secondary antisera and high concentrations of Triton X-100. *J Histochem Cytochem* 46, 109-18
- Whitacre CC (2001): Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol* 2, 777-80
- Wiendl H, Kieseier BC, Gold R, Hohlfeld R, Bendszus M und Hartung HP (2006): [Revision of McDonald's new diagnostic criteria for multiple sclerosis]. *Nervenarzt* 77, 1235, 37-45
- Wolswijk G (2002): Oligodendrocyte precursor cells in the demyelinated multiple sclerosis spinal cord. *Brain* 125, 338-49
- Wood J und Garthwaite J (1994): Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology* 33, 1235-44
- Wosik K, Antel J, Kuhlmann T, Brück W, Massie B und Nalbantoglu J (2003): Oligodendrocyte injury in multiple sclerosis: a role for p53. *J Neurochem* 85, 635-44
- Yague JG, Munoz A, de Monasterio-Schrader P, Defelipe J, Garcia-Segura LM und Azcoitia I (2006): Aromatase expression in the human temporal cortex. *Neuroscience* 138, 389-401
- Yong VW und Antel JP: Culture of Glial Cells from Human Brain Biopsies; in: *Protocols for Neural Cell Culture*; hrsg. v. Fedoroff S und Richardson A; 3. Auflage; Humana Press, New York 2001, 129-38
- Zhang Y und Hogg N (2005): S-Nitrosothiols: cellular formation and transport. *Free Radic Biol Med* 38, 831-8
- Zhang Z, Cerghet M, Mullins C, Williamson M, Bessert D und Skoff R (2004): Comparison of in vivo and in vitro subcellular localization of estrogen receptors alpha and beta in oligodendrocytes. *J Neurochem* 89, 674-84
- Zhao XJ, McKerr G, Dong Z, Higgins CA, Carson J, Yang ZQ und Hannigan BM (2001): Expression of oestrogen and progesterone receptors by mast cells alone, but not lymphocytes, macrophages or other immune cells in human upper airways. *Thorax* 56, 205-11
- Zhu Y, Bond J und Thomas P (2003): Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2237-42
- Zivadinov R (2007): Can imaging techniques measure neuroprotection and remyelination in multiple sclerosis? *Neurology* 68, S72-82; discussion S91-6
- Zwain IH und Yen SS (1999): Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* 140, 3843-52

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Tanja Kuhlmann, die mich als überaus engagierte, kompetente und sympathische erste Betreuerin mit den Fragestellungen dieser Arbeit vertraut machte und mir bei der Durchführung der Experimente und Verfassung der Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Stets war auch Herr Prof. Dr. Wolfgang Brück als Direktor der Abteilung ansprechbar und am Fortschreiten der Arbeit beteiligt. Nach der Berufung von Frau Kuhlmann nach Münster fand ich bei Herrn Brück wertvolle Unterstützung, wofür ich mich herzlich bedanken möchte.

Auch den Doktoranden und den MTAs der Abteilung Neuropathologie möchte ich für das freundliche Arbeitsklima und die bereitwillige Hilfe bei wissenschaftlichen Fragen danken. Namentlich seien erwähnt Amke Hesse, Anna Beck und Christiane Menzfeld als Doktoranden und Brigitte Maruschak, Jasmin Held und Uta Scheidt als MTAs. Des Weiteren möchte ich Frau Dr. Heike Siebert für ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit danken.

Schließlich danke ich noch ganz herzlich Dr. Jack Antel aus dem Montreal Neurological Institute der McGill-Universität in Montreal, Prof. Dr. Walter Schulz-Schaeffer aus der Abteilung Neuropathologie der UMG sowie Dr. Rainer Girgert aus der gynäkologischen Abteilung der UMG für die freundliche Bereitstellung wissenschaftlicher Proben.