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

# Stickoxidmetabolite als Ursache einer differentiellen Myelingenexpression in MS-Läsionen?

# **INAUGURAL-DISSERTATION**

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

vorgelegt von

# Anna Katharina Beck

aus Zeven

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

- I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Brück
- II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Simons

Tag der mündlichen Prüfung: 03. Mai 2011

# **Inhaltsverzeichnis**

Abkürzungsverzeichnis	IV
<u>1 Einleitung</u>	1
1.1 Multiple Sklerose (MS)	1
1.2 Das Myelin	3
<b>1.3 Die Myelinproteine.</b> -       1.3.1 MBP.         -       1.3.2 PLP.         -       1.3.3 MAG.         -       1.3.4 MOG.	<b>4</b> 4 5 5 6
- 1.3.5 CNP	6 7
- 1.4.1 CG-4 - 1.4.2 OLN-93	7 7 7
1.5 Zelltodinduktoren	8
<ul> <li>1.5.1 Stickoxid und Peroxynitrit.</li> <li>1.5.2 Fas.</li> <li>1.5.3 TRAIL.</li> <li>1.5.4 Staurosporin.</li> </ul>	8 9 11 12
1.6 Fragestellung und Zielsetzung	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Prinzipieller Ablauf der Versuchsreihen	14
2.2 Zellkultur	14
<ul> <li>2.2.1 Passagieren von OLN-93.</li> <li>2.2.2 Passagieren von CG-4.</li> <li>2.2.3 Zählen und Aussäen der Zellen.</li> <li>2.2.4 Primärkultur.</li> </ul>	15 15 16 16
- 2.2.5 Stimulation der Zellen	17
- 2.2.0 Emten der Zeilen.	1/

	18
2.4 TUNEL-Färbung	18
2.5 Nukleosomen-ELISA	19
2.6 RNA-Extraktion aus Zellpellets	20
2.7 Synthese der cDNA	21
2.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	22
2.9 Real Time PCR	23
2.10 Agarose-Gel-Elektrophorese	24
<ul> <li>2.11 Medien und Puffer.</li> <li>2.11.1 Zellkulturmedien.</li> <li>2.11.2 Puffer.</li> </ul>	<b>25</b> 25 26
2.12 Primer	28
2.13 Materialien	29
<u>3 Ergebnisse</u>	33
3 Ergebnisse 3.1 Untersuchung des Effektes von Fas-Ligand, TRAIL, Staurosporin und Stickoxidmetaboliten auf die Zelllinien CG-4 und OLN-93 sowie PMGC-Zellen	<b>33</b> <b>34</b> 34 35 39 41
3 Ergebnisse 3.1 Untersuchung des Effektes von Fas-Ligand, TRAIL, Staurosporin und Stickoxidmetaboliten auf die Zelllinien CG-4 und OLN-93 sowie PMGC-Zellen	<b>33</b> <b>34</b> 34 35 39 41 42
<ul> <li>3 Ergebnisse</li> <li>3.1 Untersuchung des Effektes von Fas-Ligand, TRAIL, Staurosporin und Stickoxidmetaboliten auf die Zelllinien CG-4 und OLN-93 sowie PMGC-Zellen</li></ul>	<b>33</b> 34 35 39 41 42 <b>43</b> <b>43</b> <b>44</b> 44

- 3.3.3 MBP und MAG	47
4 Diskussion	49
4.1 Wirkung der Zelltodinduktoren TRAIL, FasL und Staurosporin auf oligodendrogliale Zellkulturen	49
- 4.1.1 TRAIL	49
- 4.1.2 Fas	50
- 4.1.3 Staurosporin	52
4.2 Wirkung von reaktiven Stickstoffmetaboliten auf oligodendrogliale Zellkulturen	52
4.3 Veränderung des Genexpressionsmusters der Myelinproteine unter Zugabe toxischer Faktoren	53
<u>5 Zusammenfassung</u>	57
6 Literaturverzeichnis	59

# Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ASK1	Apoptosis-signal-regulating kinase 1
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
Bid	BH3 Interacting Domain Death Antagonist
B16	Black 6 Mäuse
Вр	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Caspase	Cysteinyl-Asparaginsäure-Protease
CD95	Cell Death Receptor 95
cDNA	Complementary Desoxyribonucleotide Acid
CHX	Cycloheximid
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CNP	2',3' Cyclic Nucleotide 3' Phosphodiesterase
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAXX	Death Domain-associated Protein
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DIG-DNA	Digoxigenin gebunden an Nukleotide
DISC	Death Inducing Signal Complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EAE	Experimentielle autoimmune
	Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent-Assay
eNOS	Endotheliale Stickoxidsynthase
et al.	et alii
Ethidiumbromid	3,8-Diamino-5-ethyl-6-
	phenylphenanthridiniumbromid
FADD	Fas Associated Death Domain

FasL	Fas Ligand
FasR	Fas Rezeptor
FCS	Fetal Calf Serum
FDR	Fas Decoy Rezeptor
g	Gramm
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
h	Hora, Stunde
HBSS (Hanks')	Hanks' Balanced Salt Solution
IgG	Immunglobulin G
iNOS	Induzierbare Stickoxidsynthase
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
kDa	Kilodalton
1	Liter
L-MAG	Long MAG
μl	Mikroliter
μΜ	Mikromolar
μm	Mikrometer
M.	Morbus
MAG	Myelin Associated Glycoprotein
MBP	Myelin Basic Protein
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOG	Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MS	Multiple Sklerose
MTT	3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-
	diphenyltetrazoliumbromid
NBT	4-nitro-blue tetrazolium chloride
ΝΓκΒ	Nuclear Factor "kappa-light-chain-enhancer"
	of activated B-cells
ng	Nanogramm
NHS	Normal Horse Serum
nM	Nanomolar
nNOS	Neuronale Stickoxidsynthase
NO	Stickoxid
NOS	Stickoxidsynthase

ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrit
OPG	Osteoprotegerin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia Hydrogenii
РКС	Proteinkinase C
PLAD	Pre-ligand assembly domain
PLL	Poly-L-Lysin
PLO	Poly-L-Ornithin
PLP	Proteolipidprotein
PMGC	Primary mixed glial culture
PNS	Peripheres Nervensystem
POD	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RIP	receptor interacting protein
RNS	Radikale Stickstoffspezies
rpm	revolutions per minute
sFas	Soluble Fas
S-MAG	Short MAG
SNAP	S-nitroso-N-acetylpenicillamin
Taq Polymerase	Polymerase aus Thermophilus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	TRIS-Buffered-Saline
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAIL	TNF Related Apoptosis Inducing Ligand
TRIS	TRIS(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	TdT-mediated X-dUTP nick end labelling
UV	Ultra-violett
V	Volt
W	Watt
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

# **1** Einleitung

## 1.1 Multiple Sklerose (MS)

Bei der Multiplen Sklerose handelt es sich um eine entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), bei welcher sich demyelinisierte Läsionen in Gehirn und Rückenmark finden. Sie verläuft individuell sehr variabel, wobei typische Symptome Paresen, Parästhesien, Sehstörungen, Doppelbilder, Schwindel und Blasenfunktionsstörungen sind. Frauen sind häufiger betroffen als Männer.

Man unterscheidet vier verschiedene mögliche Krankheitsverläufe (Lublin und Reingold 1996): Beim schubförmig-remittierenden Verlauf bilden sich die Symptome nach der Phase der akuten Verschlechterung entweder ganz oder zumindest teilweise zurück.

Der sekundär progrediente Krankheitsverlauf zeichnet sich durch eine kontinuierliche Verschlechterung der Symptome aus. Diese Form der MS schließt sich an einen Zeitraum mit schubförmig-remittierendem Verlauf an.

Bei Patienten, die von Beginn der Erkrankung an eine dauerhafte, stetige Verschlechterung zeigen, ohne dass eine klare Abgrenzung in Schübe möglich ist, spricht man von einem primär progredienten Verlauf.

Relativ selten ist die progredient-schubförmige MS, bei welcher sich bei kontinuierlicher Verschlechterung zeitlich begrenzte Phasen finden, in denen der Erkrankungsgrad des Patienten noch weiter zunimmt.

Insgesamt sind die schubförmigen Verläufe mit ca. 80% der Fälle am häufigsten.

Die Ätiologie der MS ist bislang nicht vollständig geklärt. Man vermutet sowohl eine polygenetische Disposition als auch exogene Einflüsse wie z.B. virale oder bakterielle Infektionen im Kindesalter, welche zu einer fehlgeleiteten Immunantwort gegen Autoantigene führen können.

Auch die Pathogenese der MS ist noch nicht in allen Einzelheiten geklärt.

In der Literatur werden sowohl eine (auto)-immunbedingte Genese als auch eine primäre Schädigung von Oligodendrozyten als Auslöser für die Erkrankung diskutiert (Prat und Antel 2005). Die erste Hypothese geht davon aus, dass aktivierte, gegen ein bisher unbekanntes Antigen gerichtete CD4<sup>+</sup>-T-Zellen über die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS gelangen, wo sie über Zytokinsekretion phagozytierende Zellen rekrutieren und B-Lymphozyten zur Antikörperbildung stimulieren. Es entsteht eine Entzündungsreaktion, welche Gewebe und Blut-Hirn-Schranke schädigt.

Veränderungen, die für die zweite Hypothese sprechen könnten, werden ebenfalls bei der Entstehung von MS-Läsionen beobachtet: Der Zelltod der Oligodendrozyten als initiales Ereignis, evt. nach Infektionen oder Ischämie, führt zu sekundärer Rekrutierung von Immunzellen (Barnett und Prineas 2004).

Histopathologisch weisen alle MS-Läsionen einen Verlust des Myelins, ein entzündliches Infiltrat, einen relativen axonalen Schaden sowie eine reaktive Gliose auf. Bezieht man allerdings Ort der Läsion, die Größe, das Expressionsmuster der Myelinproteine, die Art der Zerstörung der Oligodendrozyten, das Vorhandensein von Immunglobulinen und die Komplementaktivierung mit ein, findet sich ein heterogenes Bild (Lucchinetti et al. 2000). Anhand ihrer Ergebnisse teilten Lucchinetti et al. die akuten MS-Läsionen in vier verschiedene Demyelinisierungsmuster ein. Dabei zeigen Patienten mit mehreren Herden immer das gleiche histologische Muster.

Muster I und II zeigen ein ähnliches histologisches Bild, von dem man annimmt, dass autoimmune Prozesse bei seiner Entstehung eine Rolle spielen. Die demyelinisierten Läsionen finden sich perivenös. In den Läsionen finden sich Infiltrate aus Makrophagen und T-Zellen. Der wesentliche Unterschied zwischen Muster I und II besteht in der Ablagerung von aktiviertem Komplement (C9neo) und Immunglobulinen (vor allem IgG) bei Muster II. Dies geschieht in einem Maße, welches die in allen Mustern zu findende Anreicherung von Immunglobulinen auf Grund der entzündungsbedingten Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke deutlich übersteigt. Bei Muster I geht man davon aus, dass von aktivierten Makrophagen freigesetzte Substanzen wie z.B. TNF $\alpha$  die entscheidende Rolle spielen. Bei beiden Demyelinisierungsmustern kommt es in den zerstörten Myelinscheiden zu einem Verlust sämtlicher Myelinproteine. In der Studie von Lucchinetti et al. (2000) ist Muster II das am häufigsten vorkommende.

Bei Muster III und IV scheint ein degenerativer Prozess im Vordergrund zu stehen. Die Läsionen entstehen nicht durch eine Zerstörung des Myelins, sondern durch eine Degeneration der Oligodendrozyten; der Verlust des Myelins ist also ein sekundärer Prozess. Auch in Muster III zeigt sich wie in den beiden ersten ein aus Makrophagen und T-Zellen sowie Mikroglia bestehendes entzündliches Infiltrat, allerdings fehlen Komplement- und Antikörperablagerungen. Die Herde sind unscharf begrenzt. Auffällig bei Muster III ist vor allem eine andere Ausprägung der Myelinproteine in den zerstörten Scheiden als bei den übrigen Mustern: Es findet sich hier der fast ausschließliche Verlust der Myelinproteine MAG und CNP, während die anderen Proteine weiterhin vorhanden oder sogar verstärkt nachweisbar sind. An der Grenze der aktiven Plaque findet sich eine verstärkte Degeneration von Oligodendrozyten, z.T. sogar bis in die angrenzende, normal erscheinende weiße Substanz; im Inneren der Plaque befinden sich kaum noch Oligodendrozyten. Als mögliche Ursache für dieses Muster wird eine distal bedingte Oligodendrogliopathie diskutiert.

Das vierte Demyelinisierungsmuster, das bisher nur in einer geringen Anzahl von Patienten mit einem primär-progredienten Krankheitsverlauf gefunden worden ist, ist durch eine primäre Zerstörung der Oligodendrozyten am Rand der Läsionen in der weißen Substanz sowie durch einen fast vollständigen Verlust von Oligodendrozyten im Läsionszentrum gekennzeichnet. Entzündungsvermittelnde Zellen sind auch hier T-Zellen; außerdem spielen aktivierte Makrophagen und Mikroglia eine Rolle. Anlagerungen von Antikörpern und Komplement wird nicht gefunden.

# 1.2 Das Myelin

Die Oligodendrozyten bilden und erhalten im ZNS die Markscheiden. Diese bestehen aus Myelin, einer stark lipidhaltigen Membran, mit welcher die Oligodendrozyten Axone umwickeln und sie elektrisch isolieren, um die saltatorische Erregungsüberleitung zu garantieren.

Die Entwicklung von myelinisierten Nervenfasern stellt eine besondere evolutionäre Errungenschaft dar. Ohne sie wäre eine Ausbildung höher entwickelter Nervensysteme nicht möglich gewesen: Auf Grund der fehlenden saltatorischen Erregungsleitung erreichen unmyelinisierte Axone lediglich Leitungsgeschwindigkeiten von 1 m/s. Da physikalisch gesehen die Fortleitungsgeschwindigkeit der Erregung dem Radius des Axons proportional ist, benötigen unmyelinisierte Axone also einen erheblich größeren Raum- und Energieaufwand, um ähnliche Fortleitungsgeschwindigkeiten wie myelinisierte Axone, welche 100 m/s schnell leiten, zu erreichen.

Der Aufbau von Myelin unterscheidet sich von dem anderer Membranen. Im Myelin macht der Lipidanteil über 70% aus (Trockengewicht), während der Proteinanteil mit nur 30% (Trockengewicht) im Vergleich zu anderen Membranen relativ gering ist.

Auf die verschiedenen Myelinproteine wird in dieser Arbeit in einem gesonderten Kapitel eingegangen.

Entsprechend den unmyelinisierten Nodien, die auch als Ranviersche Schnürringe bezeichnet werden und an denen das Potential der saltatorischen Erregungsleitung generiert wird, bezeichnet man die myelinisierten Bereiche des Axons als Internodien. Im Gegensatz zum peripheren Nervensystem (PNS), wo die Schwannzellen immer nur ein Axon myelinisieren, ist ein Oligodendrozyt in der Lage, viele Markscheiden auszubilden. Die Internodien bestehen aus kompaktem Myelin; d.h. der Fortsatz des Oligodendrozyten wickelt sich hier so fest um das Axon, dass elektronenmikroskopisch im Querschnitt eine Spirale entsteht, in der die ohne Zytoplasma direkt einander anliegenden Membranen zwei Linien bilden. Die aufeinander liegenden extrazellulären Seiten der Plasmamembran bilden die sogenannte *"intraperiod line"*, die zytoplasmatischen Seiten die *"major dense line"*. Die Kompaktierung des Myelins beginnt schon, während sich die ersten beiden Spiralen bilden.

Die unterschiedlichen Strukturen des Myelins zeigen bereits, dass es sich beim Myelin nicht einfach um eine Erweiterung der Plasmamembran der Oligodendrozyten handelt, sondern dass es ein komplexeres System darstellt. Von großer Wichtigkeit in diesem System ist die korrekte Sortierung der verschiedenen Proteine, welche zum Teil nur an ganzen bestimmten Orten benötigt werden wie z.B. das PLP (Proteolipidprotein) im kompakten Myelin.

## **1.3 Die Myelinproteine**

#### 1.3.1 MBP (Myelin Basic Protein)

Die MBPs machen 30-40% des Proteinbestandteils im Myelin aus. Sie bilden eine Familie bestehend aus verschiedenen Isoformen, welche durch alternatives splicing der mRNA entstehen. Dabei unterscheidet man zwei Untergruppen der Proteine: die classic MBPs und die golli MBPs. Beim Menschen liegt das sogenannte "golli-MBP" Gen auf Chromosom 18. Die Gruppe der classic MBPs besteht aus mindestens sechs verschieden gespleißten Isoformen zwischen 14 und 21 kDa, welche sich aus verschiedenen Kombinationen von sieben Exons zusammensetzen. In höchster Konzentration in den myelinbildenden Zellen ist die 18,5-kDa-Form der classic **MBPs** vorhanden. Die Expression ist

entwicklungsstadienabhängig.

Die drei golli MBPs werden im Gegensatz zu den classic MBPs nicht nur in myelinbildenden Zellen des ZNS und PNS gebildet, sondern auch z.B. von einigen Neuronen oder Zellen des Immunsystems. Sie scheinen keine Rolle bei der Strukturerhaltung des Myelins zu haben, dagegen ist eine Funktion bei Remyelinisierungsversuchen und Fortsatzbildung wahrscheinlich (Filipovic et al. 2002; Campagnoni AT und Campagnoni CW 2004).

Die Funktion des classic MBP liegt in der Aufrechterhaltung der Struktur der Myelinscheiden. Da diese Aufgabe aber auch eine einzige Isoform bewältigen kann (Kimura et al. 1998), ist der Grund für die Expression unterschiedlicher Proteine unklar.

#### **1.3.2 PLP (Proteolipid Protein)**

Ebenso wie beim MBP existieren auch beim PLP verschiedene Isoformen. Hier handelt es sich um das PLP selbst und um die kleinere Isoform DM20, welche durch alternatives *splicing* in Exon 3 entsteht. DM20 wird von oligodendroglialen Vorläuferzellen exprimiert, während PLP sich in reifen Oligodendrozyten findet (Schindler et al. 1990)

Das Gen, das für die beiden Proteine codiert, liegt auf dem X- Chromosom und ist somit ein sogenanntes *single copy gene*, d.h. dass für ein Protein, welches mengenmäßig ungefähr die Hälfte der Myelinproteine ausmacht, nur ein Allel vorhanden ist.

Außer im ZNS findet sich das Genprodukt noch in PNS, Herz, Milz, Thymus und Lymphknoten (Campagnoni AT und Skoff 2001).

Neben der Fähigkeit zur Membranstabilisierung im Myelin wird weiterhin ein Zusammenhang zwischen der Expression von PLP und der Apoptoserate von Oligodendrozyten diskutiert (Skoff et al. 2004 a), wobei bei Zellen, die nur wenig oder kein PLP exprimieren, die Apoptoserate geringer ist als bei Kontrollen mit normaler Expressionsrate.

#### **1.3.3 MAG (Myelin-Associated Glycoprotein)**

Das Gen für MAG liegt beim Menschen auf Chromosom 19, bei der Maus auf Chromosom 7. Durch alternatives Spleißen entstehen die beiden Isoformen S-MAG und L-MAG, welche sich in der Länge des C- terminalen Endes unterscheiden. L-MAG findet sich vor allem im ZNS, während im PNS S-MAG dominiert.

MAG findet sich in myelinbildenden Zellen nach Beginn der Kompaktierung des Myelins lediglich periaxonal und nur in geringer Konzentration im nicht-kompakten Myelin (Bartsch U et al. 1989).

MAG scheint eine Funktion ganz zu Beginn der Myelinisierung zu haben, da es als erstes Protein in die Fortsätze der Zelle transportiert wird und dieser Transport noch vor Kontakt mit dem Axon stattfindet. Tiere, denen das MAG-Gen fehlt, zeigen einen verzögerten Beginn der Myelinisierung im ZNS und es findet sich sowohl überflüssiges Myelin als auch eine gesteigerte Anzahl an unmyelinisierten Axonen mit einem reduziertem axonalen Durchmesser (Bartsch S et al. 1997, Montag et al. 1994). Bei diesen Tieren zeigen auch die Oligodendrozyten Veränderungen: Es kommt zu einer Dystrophie der Fortsätze (Lassmann et al. 1997; Weiss et al. 2000). Diese Veränderungen sind evt. Ursache der gestörten Kommunikation zwischen Axonen und Oligodendrozyten.

#### 1.3.4 MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein)

MOG macht mit 0,05-1% den geringsten Anteil des Myelinproteingehaltes aus.

Das Gen für dieses Myelinprotein liegt beim Menschen auf Chromosom 6 und enthält 8 Exone. Durch alternatives Spleißen entstehen verschiedene mRNA-Varianten.

MOG befindet sich in der äußersten Schicht der Myelinlamellen an der Oberfläche (Brunner et al. 1989). Die Funktion von MOG ist bislang unklar. Mausmutanten mit fehlender Expression von MOG zeigen eine normale Entwicklung sowie einen regelrechten Aufbau des Myelins und der Axone (Delarasse et al. 2003). Auch die Frage nach einer Rezeptorfunktion stellt sich im Angesicht einer extrazellulären und einer hochkonservierten zytoplasmatischen Domäne. Ein Ligand für den potentiellen MOG-Rezeptor ist allerdings noch nicht gefunden worden.

Von großem Interesse im Hinblick auf demyelinisierende Erkrankungen des ZNS ist die extrazelluläre Ig-ähnliche Domäne. Während die anderen Myelinproteine gegen die Bindung von Antikörpern schon durch ihre Lage entweder im kompakten Myelin oder in den zum Axon hin gelegenen Lamellen geschützt sind, ist hier ein direkter Angriff auf die Myelinscheide durch Antikörper möglich.

In weiteren Experimenten zeigte sich, dass durch Sensibilisierung mit MOG bei verschiedenen Säugern eine experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) mit T-Zell- und demyelinisierender Antikörperantwort auslösbar ist (Storch et al. 1998). Diese Form der EAE ist ein sehr häufig benutztes Tiermodell für die MS.

#### 1.3.5 CNP (2',3' Cyclic Nucleotide 3' Phosphodiesterase)

CNP wird wegen seiner hohen Spezifität als Marker für Oligodendrozyten und Myelin eingesetzt. Es existieren zwei Isoformen: CNP 1 und CNP 2.

CNP findet sich zum einen im Zytoplasma, wo eine Verbindung mit Bestandteilen des Zytoskeletts wie Aktinnetzwerken (DeAngelis und Braun 1996) und Mikrotubuli (Bifulco et al. 2002) beschrieben wurde. Des Weiteren wird CNP 2 in die Mitochondrien transportiert und ist hier wahrscheinlich an der Metabolisierung von RNA und Nukleotiden beteiligt (Lee J et al. 2006). Das Protein zeigt eine strukturelle Ähnlichkeit mit RNA-prozessierenden Enzymen.

Beide Isoformen zeigen enzymatische Aktivität; sie hydrolysieren 2'-3'-zyklische Mononukleotide zu 2'-Nukleotiden.

Weitere Funktionen scheinen außerdem wahrscheinlich, da CNP früh in der Entwicklung in den Vorläufern der myelinisierenden Zellen sowie mit geringerer Expression auch in nichtmyelinisierenden Zellen wie z.B. Erythrozyten exprimiert wird.

#### **1.4 Zelllinien**

Die Versuche für diese Arbeit wurden außer an primären Mauskulturen auch an den Zelllinien CG-4 und OLN-93 durchgeführt, die in diesem Kapitel kurz näher beschrieben werden sollen.

#### 1.4.1 CG-4

Die Zelllinie CG-4 wurde erstmals 1992 von J. Louis beschrieben. Sie ist spontan aus bipotentialen Vorläuferzellen aus Primärkulturen des Ratten-ZNS entstanden, welche sowohl zu Oligodendrozyten als auch zu Typ-II-Astrozyten differenzieren können. Man bezeichnet diese Vorläuferzellen deshalb als O-2A-Zellen.

Undifferenzierte CG-4-Zellen sind bipolar, mit steigender Dichte und sinkender Wachstumsrate werden sie multipolar. Wie die O-2A-Zellen differenzieren die CG-4-Zellen zu multipolaren A2B5- und GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) - positiven Typ-II-Astrozyten, wenn sie in Medium kultiviert werden, welches hohe Konzentrationen Serum oder CNTF (*ciliary neuronotrophic factor*) enthält (Hughes et al. 1988). Ohne Serum bzw. mit nur geringen Serumkonzentrationen kultiviert und ohne die Zugabe von proliferationsfördernden Medienzusätzen (wie z.B. dem Überstand der neuronalen Zelllinie B104), differenzieren sie zu Oligodendrozyten. Die Zellen bilden verzweigte Fortsätze aus und während der Oberflächenmarker A2B5 weniger stark exprimiert wird, finden sich nun Galactocerebroside und verschiedene Myelinproteine.

Man findet bei den CG-4-Zellen einen normalen Karyotyp; außerdem spricht die Tatsache, dass die Zellen ohne Zusatz von Mitogenen wie B104-Medium nicht proliferieren, dafür, dass es sich bei CG-4-Zellen nicht um transformierte Tumorzellen handelt.

Die in-vitro-Experimente der vorliegenden Arbeit wurden an zu Oligodendrozyten differenzierten CG-4-Zellen durchgeführt, welche nach 24h mit dem jeweiligen Zelltodinduktor versetzt worden sind.

#### 1.4.2 OLN-93

Die Zelllinie OLN-93 wurde 1996 von Richter-Landsberg und Heinrich etabliert. In glialen Rattenhirnprimärkulturen traten spontan transformierte Zellen auf, welche morphologisch den

7

bipolaren O-2A-Zellen ähneln. Bei geringer Dichte kultiviert, zeigen sie ein bipolares Aussehen mit langen Ausläufern; mit zunehmender Dichte entstehen Zellhaufen, welche durch lange dünne Fortsätze verbunden sind.

Die Zellen haben keine astrozytären Eigenschaften, so werden z.B. weder das Intermediärfilamentprotein Vimentin noch GFAP exprimiert. Auch der Oberflächenmarker A2B5 wurde nicht nachgewiesen. Oligodendrozytäre Eigenschaften zeigen sich in der Expression von Galactocerebrosiden sowie verschiedener Myelinproteine des ZNS wie z.B. einer Isoform von MBP und des Weiteren L-MAG, S-MAG, PLP und DM20.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei der Zelllinie OLN-93 um Zellen handelt, die von der Entwicklung her zwischen O-2A-Zellen und reifen Oligodendrozyten liegen. Sie exprimieren bereits verschiedene Myelinproteine, diese verteilen sich aber noch diffus. Sie entsprechen etwa 5-10 Tage (postnatal) alten Rattenoligodendrozyten.

#### 1.5 Zelltodinduktoren

Im Rahmen dieser Arbeit sind Zellstimulationen mit fünf Reagenzien durchgeführt worden, von denen man annimmt, dass sie eine Rolle beim oligodendroglialen Zelltod in MS-Läsionen spielen könnten. Die Zelllinien CG-4 und OLN-93 sowie primäre gemischte Gliazellkulturen sind mit den reaktiven Stickstoffverbindungen Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit, den Apoptoseliganden TRAIL und Fas sowie dem Proteinkinasehemmer Staurosporin behandelt worden.

#### 1.5.1 Stickoxid und Peroxynitrit

Stickstoffmonoxid (NO; auch Stickoxid) und Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) gehören zu den reaktiven Stickstoffverbindungen (RNS: *reactive nitrogen species*). Sie haben neben vasodilatatorischen Eigenschaften und Funktionen als Neurotransmitter (beides durch NO vermittelt) einen toxischen Effekt auf eine Vielzahl von unterschiedlichen Zellen.

Stickoxid entsteht aus der Reaktion der Aminosäure L-Arginin mit molekularem Sauerstoff, wobei Citrullin und ein Molekül Stickoxid entsteht. Diese Oxidation wird durch das Enzym Stickoxidsynthase (NOS) katalysiert (Knowles und Moncada 1994). Es sind bisher drei Isoformen dieses Enzyms bekannt: Die endotheliale Isoform (eNOS), die neuronale Isoform (nNOS) und die induzierbare Isoform (iNOS). Man findet letztere u.a. in Zellen des Immunsystems wie Makrophagen und Mikroglia, in denen das Enzym Calcium-unabhängig

große Mengen NO auf Reize wie Entzündungen hin produziert, wie sie z.B. in MS-Läsionen auftreten (Liu et al. 2001, Jack et al. 2007).

In vitro führte NO über morphologische Veränderungen, mitochondriale Dysfunktion und DNA-Schäden zu Zelltod von Rattenoligodendrozyten (Mitrovic et al. 1994). In der EAE konnte eine erhöhte Expression der iNOS nachgewiesen werden (Cross et al. 1996). Durch Messung der Nitrit- und Nitratwerte im Hirnparenchym und Liquor von MS-Patienten konnte gezeigt werden, dass bei ihnen die Produktion von NO im Vergleich zu Gesunden erhöht ist (Brundin et al. 1999, Rejdak et al. 2004). Post mortem zeigte sich in MS-Läsionen eine erhöhte iNOS-Konzentration (Bagasra et al. 1995) sowie Nitrotyrosinkonzentration (Cross et al. 1998; Bagasra et al. 1995), was ein Hinweis für erhöhte Peroxynitritkonzentrationen ist.

Die Wirkung von NO beruht u.a. auf einer reversiblen Hemmung des Komplexes IV der Atmungskette (Zytochrom-C-Oxidase). Dies führt zu einer vermehrten Produktion von Superoxidanionen und es kommt zur Bildung von Peroxynitrit (NO +  $O_2^- \rightarrow ONOO^-$ ). Physiologischerweise entstehen Superoxidanionen auch an den Komplexen I (NADH-Dehydrogenase) und III (Zytochrom-Reduktase) der Atmungskette sowie u.a. bei phagozytierenden Zellen und Fibroblasten an membranassoziierten NADPH-Oxidasen.

Die Atmungskette der Zelle wird irreparabel geschädigt, da Peroxynitrit die Komplexe I, II und III irreversibel hemmt (Lizasoain et al. 1996).

Es kommt neben der Schädigung von Enzymen mit Eisen-Schwefel-Zentrum zur Nitrierung von Tyrosinresten. Außerdem werden Lipide durch Peroxidation geschädigt (van der Veen et al. 1997).

Eine Beteiligung von Stickoxid und Peroxynitrit bei Entstehung und Verlauf der MS ist durchaus denkbar, da NO bzw. Peroxynitrit viele molekulare und zelluläre Vorgänge beeinflussen können, die bei der MS eine Rolle spielen könnten wie die direkte Schädigung der Oligodendrozyten, die Modulation des Immunsystems und mögliche Effekte auf die Blut-Hirn-Schranke.

#### 1.5.2 Fas

Der Fas-Rezeptor (FasR), an den der dreiteilige Fas-Ligand (FasL) bindet, besteht aus drei Domänen: Vom N-terminalen Ende aus gezählt stehen die zweite und dritte Domäne in Kontakt mit dem Liganden, während die erste eine sogenannte *pre-ligand assembly domain* (PLAD) bildet, welche man auch beim TRAIL-Rezeptor findet und die für eine Verbindung einzelner Rezeptoren zu (im Fall von TRAIL und Fas) Homo- z.T. auch Heterotrimeren sorgt, bevor der eigentliche Ligand gebunden wird. Nach Bindung des Liganden rekrutiert der Rezeptor verschiedene Adapterproteine (s. Review von Choi und Benveniste 2004). Zu ihnen gehört FADD (*Fas Associated Death Domain*). Das Protein trägt N-terminal eine Todesdomäne (DD), mit welcher es an die DD des Rezeptors bindet und C-terminal eine DED (*Death Effector Domain*), über welches es Procaspase 8 rekrutiert, die ebenfalls eine DED besitzt. Die Procaspase wird nach Dimerisierung autokatalytisch in ein aktives heterodimeres Enzym gespalten und aktiviert die Caspase-Kaskade sowie den mitochondrialen Signalweg über die Spaltung von Bid (Li H et al. 1998).

Neben dem u.a. Apoptose auslösenden Rezeptor finden sich drei weitere FasL bindende Rezeptoren: Zum einen ein durch alternatives Spleißen entstehender löslicher Rezeptor, so genanntes *soluble Fas* (sFas) (Cascino et al. 1995), außerdem ein Decoy-Rezeptor (TR6), dessen Aktivierung keine Apoptose auslöst (Connolly et al. 2001). Als drittes gibt es den sogenannten Fas-Decoy-Rezeptor (FDR), welcher evt. mit den anderen Typen gemischte Rezeptorkomplexe bildet und dadurch die Apoptoseeinleitung hemmt, da er zwar die gleiche extrazelluläre Domäne ausbildet, aber keine DD besitzt (Jenkins et al. 2000). Alle treten somit als kompetitive Inhibitoren für die FasR-vermittelte Apoptose in Erscheinung.

Neben der Apoptose-auslösenden Signalkaskade über die Caspasen wird durch den FasR über DAXX und ASK1 der JNK-Signalweg aktiviert, sowie über RIP der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B. Die Aktivierung von NF $\kappa$ B findet sich ebenfalls durch TRAIL und zeigt bereits, dass neben dem viel diskutierten apoptotischen Effekt von FasR noch weitere Funktionen vorhanden sind wie z.B. die Synthese anti-apoptotischer Proteine.

Während der FasR von vielen verschiedenen Zellen exprimiert wird, wird der FasL mit juxtakriner Aktivität zumeist von Zellen des Immunsystems wie aktivierten T-Zellen und NK-Zellen freigesetzt und spielt z.B. eine Rolle bei der durch zytotoxische T-Zellen vermittelten Eliminierung von virusinfizierten Zellen. Da sich auch im ZNS einige wenige T-Zellen finden, könnte die Expression von FasL im ZNS Teil des Schutzmechanismus des ZNS vor potentiell autoreaktiven Immunzellen sein. Die Expression von FasL auf Endothelzellen verhindert eventuell die Migration von Entzündungszellen in das ZNS (Walsh und Sata 1999).

Oligodendrozyten sind wie die meisten Zellen des ZNS sensibel für Fas und sterben nach Aktivierung des FasR.

Nach Zugabe von FasL kommt es z.B. bei der Oligodendrozytenzelllinie MO3.13 zu einer Aktivierung der extrinsischen apoptotischen Signalkaskade und zu einem caspaseabhängigen

Zelltod (Li W et al. 2002). Mäuse, in denen FasR selektiv in Oligodendrozyten fehlt, erweisen sich als relativ resistent gegen EAE, einem Tiermodell der Multiplen Sklerose (Hövelmeyer et al. 2005). In MS-Läsionen ist die Expression von FasR in Oligodendrozyten erhöht (D'Souza et al. 1996).

Bei der Multiplen Sklerose spielt Fas wahrscheinlich zwei verschiedene Rollen: Im entzündlich veränderten Gehirn sorgt es einerseits für die Apoptose von T-Zellen, deutlich zu sehen auch in Versuchen, in denen es nach Injektion von FasL durch Tod der T-Zellen zur Verbesserung der EAE kam (Zhu et al. 2002); andererseits können den FasR exprimierende Gliazellen, wie z.B. die Oligodendrozyten, ebenfalls durch Binden des FasL geschädigt werden.

#### **1.5.3 TRAIL**

TRAIL (*Tumour necrosis factor apoptosis inducing ligand*) ist ein Apo-2 Ligand und gehört zur gleichen Familie wie die TNF-Liganden und der Fas-Ligand, mit welchem es stark homolog ist. Der dreiteilige Aufbau des Rezeptors ist jenem für Fas sehr ähnlich.

Beim Menschen finden sich bislang fünf Rezeptoren: DR 4 und 5, DcR 1 und 2 sowie Osteoprotegerin.

DR 4 (TRAIL-R1) und DR 5 (TRAIL-R2) weisen eine fast 60% ige Homologie auf. DR 5 wird in vielen Geweben exprimiert, besonders stark in aktivierten Lymphozyten und nach Therapie mit DNA-schädigenden Krebsmedikamenten oder  $\gamma$ -Strahlen. Beide Rezeptoren lösen nach Bindung des Liganden sowohl in entarteten als auch in vielen gesunden Zellpopulationen, wie z.B. in Oligodendrozyten, Zelltod aus.

Zwei weitere Rezeptoren sind so genannte "*decoy receptors* 1 und 2" (TRAIL-R3 und TRAIL-R4). Diese Rezeptoren können zwar TRAIL binden, aufgrund einer fehlenden funktionellen Todesdomäne jedoch keinen Zelltod auslösen (Kimberley und Screaton 2004) Der fünfte Rezeptor ist Osteoprotegerin (OPG), welches die Entwicklung und Aktivität von Osteoklasten reguliert. Seine Funktion als Rezeptor für TRAIL ist bislang unverstanden. TRAIL scheint nach bisherigen Erkenntnissen ähnliche intrazelluläre Signalwege wie TNF-und Fas-Liganden über die Rezeptoren mit intrazellulärer Todesdomäne zu aktivieren. Die Bildung des *Death Inducing Signaling Complex* (DISC) und die nachfolgende Aktivierung der Caspase-Kaskade führen zum Zelltod (Kischkel et al. 2000). Allerdings sind zellspezifische Signalwege nicht auszuschließen.

Weiterhin sind noch andere Signalkaskaden beschrieben worden, welche die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NFkB einschließen und nicht zu Zelltod führen müssen (Kimberley und Screaton 2004).

In humanen Oligodendrozyten wird Zelltod über TRAIL-R1 ausgelöst (Matysiak et al. 2002) und es kommt vor der Dysfunktion der Mitochondrien zur Aktivierung des JNK-Signalweges (Jurewicz et al. 2002)

Neben der Möglichkeit, dass TRAIL bei Erkrankungen wie der MS nach der Freisetzung aus z.B. Makrophagen direkt die Oligodendrozyten schädigt, bleibt die zweite These von dem indirekten Einfluss auf das Krankheitsgeschehen in Form eines inhibitorischen Effektes auf aktivierte T-Zellen bei der EAE und somit evt. Ausübung einer protektiven Funktion bei autoimmunbedingten Entzündungen im ZNS (Hilliard et al. 2001)

#### 1.5.4 Staurosporin

Staurosporin wurde 1977 aus Streptomyces staurosporeus isoliert (Nakano und Omura 2009) und hat eine apoptotische Wirkung auf viele verschiedene Zellarten. Des Weiteren zeigt es antifungale, nicht aber antibakterielle Eigenschaften.

Das Molekül besteht aus einer Zuckereinheit sowie einer planaren heterozyklischen Indol-Carbazol-Untereinheit. Staurosporin hat eine inhibitorische Wirkung auf Proteinkinasen durch Bindung an die katalytischen Anteile. Es kommt somit zur kompetitiven Hemmung und Blockade der Enzyme.

Zu nennen sind in diesem Zusammenhang die Hemmung der Proteinkinase C (PKC), welche durch verminderte Spaltung von Bid in Fas-stimulierten Zellen diese vor Apoptose schützt (Scaffidi et al. 1999). Außerdem hemmt Staurosporin die I $\kappa$ B-Kinase, einen Regulator des anti-apoptotischen Proteins NF $\kappa$ B (Peet und Li 1999). Auch eine Hemmung der Akt/PKB, welche die Kaspase-Kaskade auf verschiedenen Leveln hemmt (Masure et al. 1999), ist beschrieben worden (Stepczynska et al. 2001).

In dieser Arbeit ist Staurosporin als Kontrolle verwendet worden.

# **1.6 Fragestellung und Zielsetzung**

Aus früheren Arbeiten der Abteilung für Neuropathologie der Universität Göttingen ist bekannt, dass es nach Zugabe von NO oder ONOO<sup>-</sup> zu der Zelllinie OLN-93 zu einer Heraufregulation von PLP-mRNA und einer Herunterregulation von CNP-mRNA kommt (Höff 2006). Eine ähnliche differenzielle Expression von Myelinproteinen kann auch in einer Subgruppe von MS-Läsíonen gefunden werden. In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragen geklärt werden:

- 1. <u>Führen andere potentiell schädigende Faktoren, wie z.B. TRAIL, FasL oder</u> <u>Staurosporin zu Zelltod in den Zelllinien OLN-93 und CG-4 sowie primären</u> <u>gemischten glialen Zellkulturen?</u>
- 2. <u>Wie verändert sich die Expression von PLP und CNP sowie anderer Myelinproteine</u> (MAG, MOG, MBP) nach Zugabe dieser zelltodauslösenden Faktoren?
- Sind diese Veränderungen spezifisch f
  ür OLN-93-Zellen oder lassen sie sich auch in anderen oligodendroglialen Zelllinien (CG-4-Zellen) oder prim
  ären gemischten glialen Kulturen der Maus nachweisen?

# 2 Material und Methoden

# 2.1 Prinzipieller Ablauf der Versuchsreihen

Die zu behandelnden Zellen sind in Kavitäten (Wells) für MTT-Test, Nukleosomen-ELISA und TUNEL-Färbung bzw. in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) für RNA- und Proteinextraktion ausgesät worden. Nach Stimulation wurden die Zellen für 24, 48 oder 72 Stunden (abhängig vom Zelltodinduktor) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit sind die entsprechenden Tests zur Untersuchung der mitochondrialen Respiration und des Zelltodes durchgeführt bzw. die Zellen geerntet worden.

Aus den Zellpellets wurden die RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mit dieser cDNA PCRs durchgeführt: Zunächst PCRs, um festzustellen, ob die gewünschte mRNA exprimiert wurde; danach bei positivem Ergebnis quantitative Real Time PCRs.

# 2.2 Zellkultur

Die in der Zellkultur durchgeführten Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Zellkulturbank durchgeführt. Verwendete Gegenstände und Substanzen waren entweder steril verpackt oder wurden sterilisiert bzw. autoklaviert.

Im Folgenden soll eine kurze Übersicht über die verwendeten Zellen und ihre Kulturbedingungen gegeben werden. Versuche sind mit CG-4-Zellen, welche 24 Stunden mit Differenzierungsmedium inkubiert worden waren, sowie OLN-93-Zellen und primären murinen Gliazellkulturen (Mäuse: C57Black 6 (C57Bl/6); 0 bis 3 Tage alt) durchgeführt worden.

# CG-4-Zellen:

CG-4-Zellen sind im undifferenzierten Zustand gehalten und passagiert worden. Ihr Medium bestand aus 70% N1-Medium mit Biotin und 30% Medium der neuronalen Zelllinie B104. Wie die differenzierten Zellen sind sie bei 37 °C mit einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% inkubiert worden.

Experimente mit CG-4-Zellen sind durchgeführt worden, nachdem die Zellen für 24 Stunden mit dem Differenzierungsmedium versetzt worden waren. Dieses bestand aus N1-Medium mit Biotin plus 2% FCS (fetales Kälberserum). Die ausgesäte Zellzahl betrug 40 000 Zellen/Kavität der 24er Platte sowie 1 500 000 Zellen/Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>).

#### OLN-93-Zellen:

OLN-93-Zellen sind im Inkubator bei 37 °C mit 10% CO<sub>2</sub>-Gehalt inkubiert worden. Ihr Medium beruht auf einer DMEM-Basis plus 10% FCS plus 1% Penicillin/Streptomycin. Ausgesät wurden 6250 Zellen/Kavität einer 24er Platte und 234 370 Zellen/Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>).

#### Primäre gemischte Gliazellkulturen:

Vorgehen zur Herstellung: s. unten.

Die Zellen sind bei 37 °C mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert worden. Ihr Medium bestand aus DMEM plus 10% NHS (normal horse serum) plus 1% Penicillin/Streptomycin. Zum Differenzieren wurde DMEM Medium plus Additive verwendet (genaue Angaben s. "Medien und Puffer").

#### 2.2.1 Passagieren von OLN-93

Das verbrauchte Medium wird aus der Flasche abgezogen und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Nach dem Absaugen von PBS werden die Zellen für ca. 1 min mit 1 ml Trypsin versetzt und während dieser Zeit in den Inkubator gestellt. Das Trypsin wird nach Ablauf der Inkubationszeit mit Medium verdünnt und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vom Boden der Flasche gelöst. Sie werden in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Dann wird der Überstand abgesaugt, die Zellen werden durch kurzes Aufkratzen aus dem Pelletverband gelöst und in frischem Medium resuspendiert. Nach Befüllen der neuen Flasche mit 5 ml Medium werden 1-2 Tropfen der Zellsuspension in die neue Flasche gegeben.

#### 2.2.2 Passagieren von CG-4

Die neuen Flaschen werden über Nacht mit PLO beschichtet (Verhältnis steriles Aqua bidest: PLO 5:1). Vor dem Passagieren werden sie dreimal mit sterilem Aqua bidest gewaschen und anschließend für 10 min mit UV-Licht bestrahlt.

Die CG-4-Zellen werden nach Abziehen des Mediums mit Hilfe des Enzyms Biotase vom Boden gelöst. Sie werden dafür für ca. 20 min inkubiert. Dann wird das Enzym mit Medium verdünnt, die Zellen in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das verbrauchte Medium wird abgesaugt, die Zellen werden kurz aufgekratzt und in frischem Medium resuspendiert. Nach Befüllen der neuen Flaschen mit Medium werden ca. 3-4 Tropfen Suspension dazu gegeben.

#### 2.2.3 Zählen und Aussäen der Zellen

Die Zellen werden wie beim Passagieren vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und für 5 min bei 1200 rpm in einem 50-ml-Zentrifugenröhrchen zentrifugiert. Sie werden in frischem Medium resupendiert und die Suspension gut gemischt.

Zum Zählen der Zellen werden 10 µl der Suspension entnommen und in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß mit 40 µl Trypan Blue gemischt. Je 10 µl werden auf die beiden Seiten der vorbereiteten Neubauer Zählkammer gegeben. Am Mikroskop werden die 8 mal 16 Quadrate ausgezählt.

Zur Bestimmung der Zellzahl pro ml wird gezählte Zellzahl durch acht dividiert und dann mit fünf (Verdünnungsfaktor) und 10 000 multipliziert:

 $Zellzahl / 8 = y \ge 5 \ge 10000 = Zellzahl/ml.$ 

Die errechnete Zellzahl pro ml wird nun durch die gewünschte Zellzahl pro ml geteilt. Das gewünschte Volumen wird durch den im vorigen Schritt errechneten Verdünnungsfaktor geteilt. Man erhält die Angabe des Volumens der Zellsuspension und zieht diese vom insgesamt gewünschten Volumen ab, um den Mediumanteil zu berechnen.

Die Suspension wird mit Hilfe der Auslaufpipetten in die Kavitäten bzw. Zellkulturflaschen gegeben.

#### 2.2.4 Primärkultur

Zur Gewinnung von primären murinen Oligodendrozyten werden die Gehirne von neugeborenen Mäusen (C57Bl6; Tag 0-3) entnommen, mit einer Rasierklinge zerschnitten und in 23 ml HBSS auf Eis gesammelt. Nach Zugabe von 1 ml DNase und Papain wird die Suspension mit einer 1000-µl-Eppendorf-Pipette luftblasenfrei trituiert und für 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Dann wird die Suspension zwei Mal mit einer 200-µl-Eppendorf-Pipette luftblasenfrei trituiert und wieder für 10 min im Wasserbad inkubiert.

Es werden 10 ml Primärmedium dazugegeben und die Suspension durch ein 40-µm-Netz laufengelassen. Der Durchfluss wird für 7 min bei 2000 rpm zentrifugiert und das entstehende Pellet in HBSS gelöst. Die Suspension wird auf vier Zentrifugenröhrchen mit je 35 ml HBSS verteilt und für 7 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 12 ml Primärkulturmedium gelöst und verteilt. Hierbei lassen sich mit 5 Mäusehirnen acht Kavitäten einer 6er Platte füllen sowie mit einem Hirn 10 Kavitäten einer 24er Platte.

Die Kavitäten sind vor dem Aussäen der Zellen für 1-2 Stunden mit PLL beschichtet, mit Wasser gespült und unter UV-Licht getrocknet worden.

Nach 24 Stunden wird das Medium abgesaugt und neues Primärkulturmedium zugegeben. Nach einer Woche werden die Zellen mit DMEM plus Additive zum Differenzieren versetzt und 48 Stunden später stimuliert.

#### 2.2.5 Stimulation der Zellen

OLN-93-Zellen sind für die Versuche der vorliegenden Arbeit 24 Stunden nach dem Aussäen stimuliert worden; bei den CG-4-Zellen ist nach 24h erst ein Mediumwechsel zum Differenzieren der Zellen durchgeführt worden, nach weiteren 24h erfolgte die Stimulation mit dem jeweiligen Zelltodinduktor.

Folgende Konzentrationen von Zelltodinduktoren sind verwendet worden:

*Staurosporin* (Stimulation für 24h): Kontrolle; 10; 100; 250; 500 nM *SNAP* (Stimulation für 48h): Kontrolle, 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5 mM *ONOO*<sup>-</sup> (Stimulation für 24h): Kontrolle; 10; 100; 250; 500 μM

Mit jeder Konzentration wurden die CG-4- bzw. OLN-93-Zellen in 24er Kavitäten (für den MTT-Test) und in zwei Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) (eine Flasche für RNA-, eine für eine spätere Proteinextraktion) stimuliert.

Weitere Zelltodinduktoren:

TRAIL (Stimulation für 24, 48, 72h): Kontrolle; 100; 500 ng/ml

Fas (Stimulation für 24h): Kontrolle; 0,1; 1; 10; 100 ng/ml

(Stimulation für 48h): Kontrolle; 100; 500 bzw. 1000 ng/ml

## 2.2.6 Ernten der Zellen

Zelltodinduktorabhängig sind die Zellen nach 24h oder 48h aus den Zellkulturflaschen geerntet worden.

Das Medium wird aus der Flasche entnommen und aufgehoben. Mit einem Zellschaber werden die Zellen sorgfältig vom Boden der Flasche gekratzt und die Flasche mit dem aufgehobenen Medium gespült. Die Suspension wird in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen übertragen und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Dann wird das Medium abgesaugt, die

Zellen in 1 ml PBS resuspendiert und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Sie werden als nächstes für 4 min bei 4 °C und 6000 rpm zentrifugiert. Dann wird der Überstand abgesaugt und das Pellet sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und schließlich bei -80 °C gelagert.

# 2.3 MTT-Test

Der MTT-Test misst die mitochondriale Respiration von lebenden Zellen und wird somit bei der Untersuchung von Zellproliferation sowie Zelltod eingesetzt.

Der Test beruht auf der Reduktion von Tetrazoliumsalzen (in diesem Fall 3- [4,5dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium-bromid) in den Mitochondrien lebender Zellen zu farbigen, wasserunlöslichen Formazansalzen. Bei dieser Reaktion wird NADH zu NAD<sup>+</sup> oxidiert. Die entstehenden Salze werden gelöst und die Extinktion in einem ELISA-Reader gemessen. Die Farbentwicklung ist der Menge der lebenden Zellen proportional.

Durchführung:

- Das MTT-Reagenz wird in der Konzentration 5g/ml in PBS gelöst. In dieser Form ist es lichtgeschützt bei 4 °C haltbar.
- 2. Zur Durchführung des Tests wird das gelöste MTT-Reagenz 1:10 mit Medium verdünnt. Das verbrauchte Medium wird von den Zellen abgesaugt und in jede Kavität der 24er Platte 0,5 ml des verdünnten MTT-Reagenz gegeben. Die Zellen werden für mindestens 30 min, höchstens eine Stunde inkubiert, wobei mikroskopisch auf die Blaufärbung der Zellen sowie die Bildung von Kristallen geachtet wird. Nach dem Einsetzen der Kristallbildung wird die Inkubationsphase beendet.
- Das Medium wird abgesaugt und die wasserunlöslichen Salze werden mit 250 μl Isopropanol plus 37% Salzsäure gelöst. Die Platte wird für 15 min auf den Schüttler gestellt (Geschwindigkeit 30).
- Dann werden aus jedem Well zweimal je 100 μl des Überstandes (Doppelbestimmung) in die 96-Kavitäten-Platte für den ELISA-Reader überführt.
- 5. Die Extinktion wird bei der Wellenlänge 540 nm (Referenzwellenlänge 655 nm) gemessen.

# 2.4 TUNEL-Färbung (TdT-mediated X-dUTP nick end labeling)

Die TUNEL-Färbung ist eine Methode zur Bestimmung des Zelltods einzelner Zellen. Bei dieser Methode macht man sich die Tatsache zunutze, dass es während des Vorgangs der Apoptose einer Zelle zur DNA-Degradierung mit der Bildung von Fragmenten (Mono- und Oligonukleosomen) kommt. An die freien 3'-OH-Enden dieser Stücke werden durch eine Terminal-Desoxynukleotidyl-Transferase modifizierte Nukleotide angebaut. An die Nukleotide ist Digoxigenin gebunden, welches durch einen Antikörper (hier Anti-Digoxigenin-Alkalische-Phosphatase) markiert wird. Die an den Antikörper gebundene Alkalische Phosphatase (AP) sorgt durch Umsatz ihres Substrates NBT/BCIP für die Farbentwicklung.

Um eine TUNEL-Färbung durchführen zu können, werden die Zellen auf Deckgläschen in den Kavitäten einer 24er Platte ausgesät. Nach Ende der Inkubationszeit mit dem jeweiligen Zelltodinduktor werden die Zellen nach Absaugen des Mediums für 25 min mit 4%igem PFA fixiert und danach dreimal mit PBS gewaschen. Mit PBS versetzt sind sie so bei 4 °C haltbar.

TUNEL Mix (1x): 14 μl Tailing Puffer 2,8 μl CoCl<sub>2</sub> 0,7 μl DIG-DNA 0,35 μl terminale Transferase 52,15 μl Aqua bidest.

Für die Färbung werden die Deckgläschen aus den Kavitäten entnommen, in eine 4er Gewebekulturschale überführt und viermal mit TBS-Puffer gespült. Auf jedes Deckgläschen werden 70 µl des TUNEL-Mixes aufgetragen und diese für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Dann werden die Deckgläschen fünfmal mit TBS-Puffer gespült.

Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase wird 1:1000 verdünnt und 50 µl auf jedes Deckgläschen pipettiert. Die Inkubationszeit beträgt eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Spülen mit TBS-Puffer wird die Färbung mit NBT/BCIP Lösung entwickelt. Zur Gegenfärbung werden die Deckgläschen 10 min mit Kernechtrot versetzt.

Zur Fixierung auf einem Objektträger wird Aquamount verwendet.

## 2.5 Nukleosomen-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent-Assay)

Zur Untersuchung der Zellen auf Zelltod wurde in den Versuchen dieser Arbeit ein Nukleosomen-ELISA durchgeführt. Für diesen ELISA wurde der "*Cell Death Detection ELISA*" Kit von Roche verwendet. Von der Art her handelt es sich bei dem durchgeführten ELISA um die Messung von Antigenen nach dem sogenannten "Sandwich Prinzip". Hierbei ist nicht das Antigen, sondern der verwendete Antikörper enzymmarkiert.

Im ersten Schritt des ELISA binden die Antigene (in diesem Fall Nukleosomen) aus den lysierten Zellen an den im Überschuss am Boden der ELISA-Platte fixierten Antikörper. In der zweiten Immunreaktion bindet ein weiterer enzymmarkierter Antikörper an eine andere Bindungsstelle des Antigens und es entsteht der Sandwichkomplex. Als Enzym wird zumeist eine aus Meerrettich gewonnene Peroxidase (POD) verwendet, welche im letzten Schritt nach Zugabe von Substrat und dem Chromogen ABTS für die Farbentwicklung sorgt, welche mit Hilfe eines ELISA-Readers gemessen wird. Zwischen der Farbintensität und der Antigenkonzentration der Probe besteht eine proportionale Beziehung.

#### Durchführung:

- Aus den Kavitäten wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit 150 μl Lysispuffer/Kavität f
  ür 30 min bei Raumtemperatur lysiert.
- Das Lysat wird in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 10 000 Umdrehungen zentrifugiert.
- Jeweils 20 μl des Überstands werden in die Kavitäten der ELISA-Platte überführt. Dazu kommen für die Positiv- sowie für die Negativkontrolle je zwei Kavitäten.
- In jede Kavität werden 80 μl des Immunomix gegeben. Einfacher Ansatz der Reaktionslösung:
- 72 µl Inkubationspuffer
- 4 µl Anti-Histon-Biotib Antikörper
- 4 µl Anti-DNA-POD Antikörper
- 5. Die Platte wird mit Folie bedeckt und zwei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt.
- Die Reaktionslösung wird aus den Kavitäten entfernt und diese dreimal mit 250 μl/Kavität Inkubationspuffer gewaschen und danach jeweils ausgeschüttelt.
- In jede Kavität wird 100 µl der ABTS-Lösung pipettiert. Die Farbentwicklung wird bei der Wellenlänge 405 nm mit Referenzwellenlänge 490 nm im ELISA Reader gemessen. Die Messung erfolgt alle 5 min für einen Zeitraum von 20-30 min.

# 2.6 RNA-Extraktion aus Zellpellets

Die RNA-Extraktion aus den eingefrorenen Zellpellets erfolgte mit dem "*RNeasy Mini*" Kit von Qiagen. Im Kit sind neben den Säulen, auf die die RNA gebunden wird, und den Sammel- und Elutionsgefäßen drei verschiedene Puffer (RLT, RW1 und RPE) sowie RNase-freies Wasser enthalten.

Durchführung:

- Zunächst wird RLT-β-Mercaptoethanol vorbereitet. Pro Probe werden 600 µl RLT-β-Mercaptoethanol benötigt. Zu jedem ml später verwendetem RLT werden unter dem Abzug 10 µl β-Mercaptoethanol gegeben.
- Die Proben werden in 600 μl RLT-β-Mercaptoethanol gelöst, gut gevortext und mit Hilfe einer Insulin-Spritze durch mehrmaliges Aufziehen lysiert.
- Die Suspension wird mit 600 µl 70%igem Ethanol versetzt, gemischt und zweimal je 600 µl Lysat auf der im Kit enthaltenen Säule durch Zentrifugieren (30 s bei 12 000 rpm) gebunden. Der Durchfluss wird jeweils verworfen.
- Die S\u00e4ulen werden mit 700 μl RW1 gewaschen und zentrifugiert (30 s bei 12 000 rpm).
- Die Säulen werden in ein neues Sammelröhrchen überführt und mit 500 μl RPE gewaschen. Nach dem Zentrifugieren (30 s bei 12 000 rpm) wird der Durchfluss verworfen.
- Die S\u00e4ulen werden ein zweites Mal mit 500 μl RPE gewaschen und zwei Minuten bei 13 200 rpm zentrifugiert.
- Die Säule wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für eine Minute bei 13 200 rpm trocken zentrifugiert.
- Die S\u00e4ulen werden in die Elutionsgef\u00e4\u00dfe gesetzt und die RNA mit 30 μl RNAsefreiem Wasser (aus dem Kit) eluiert. Zentrifugieren bei 12 000 rpm f\u00fcr eine Minute.
- 9. Nach Bestimmung von Quantität und Qualität wird die RNA bei -80 °C gelagert.

# 2.7 Synthese der cDNA

Da mit Hilfe der PCR nur DNA amplifiziert werden kann, muss RNA vorher durch reverse Transkription mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase in cDNA umgeschrieben werden.

Zur Denaturierung der RNA werden zu RNase-freiem Wasser 500 ng RNA zugegeben (insgesamt 12  $\mu$ l). Das Gefäß wird für 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Der RNase-Inhibitor wird 1:4 mit kaltem RT-Puffer verdünnt.

Ansatz des Mastermix (insgesamt 8 µl):

- $2 \mu l RT$ -Puffer
- $2 \mu l dNTP-Mix$
- 2 µl Primer
- 1 µl RNase-Inhibitor
- 1 µl Reverse Transkriptase.

Nach Zugabe der vorbereiteten RNA Inkubation im Thermocycler für 60 min bei 37 °C.

# 2.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction; PCR)

Die PCR ist ein Verfahren, das eine exponentielle Vervielfältigung eines bestimmten Bereiches eines DNA-Moleküls ermöglicht. Der zu amplifizierende Bereich wird durch zwei Primer festgelegt, von denen der eine identisch mit dem 5'-Ende, der andere komplementär zum 3'-Ende des Abschnitts gewählt wird. Von diesen Primern aus synthetisiert eine DNA -Polymerase den jeweils komplementären DNA-Strang aus zugegebenen Nukleotiden. Für die PCR verwendet man eine thermostabile DNA-Polymerase, die sogenannte Taq-Polymerase, die aus Thermophilus aquaticus, einem in heißen Quellen lebenden Bakterium, gewonnen wird.

Im ersten Schritt der PCR werden die beiden Stränge des DNA-Moleküls bei 95 °C denaturiert und getrennt. Daraufhin wird die Temperatur auf die vom jeweiligen Primerpaar abhängige sogenannte *annealing* (Anlagerungs-) Temperatur abgesenkt. Bei dieser Temperatur lagern sich die Primer an ihre komplementären Sequenzen an. Nun beginnt die Synthesephase: Bei 72 °C, dem Temperaturoptimum des Enzyms, verlängert die Taq-Polymerase von den Primern aus in 5'-3'-Richtung die Stränge komplementär zum Matrizenstrang. Danach ist der erste Zyklus beendet und die Temperatur wird wieder auf 95 °C erhöht, um die Stränge zu trennen. Im folgenden Zyklus dienen nun auch die neu synthetisierten Stränge als Vorlage und es entstehen Stränge mit definierter Länge; ihr 5'-Ende entspricht dem Primer, ihr 3'-Ende dem 5'-Ende des Matrizenstranges, welches ebenfalls durch einen Primer definiert ist. Es kommt also mit steigender Zyklenzahl zu einer exponentiellen Vermehrung der Stränge mit definierter Länge, während die Zahl der Stränge mit undefinierter Länge nur linear zunimmt und damit vernachlässigbar ist. Die PCRs dieser Arbeit wurden mit 30 Zyklen durchgeführt.

Einfacher Ansatz für 15 µl:

- 4 µl Puffer
- 0,4 μl dNTPs
- 0,1 μl Taq
- 0,5 µl Primer vorwärts
- 0,5 µl Primer rückwärts
- 9,5 µl Aqua pura.

Dazu werden 5µl cDNA bzw. Aqua pura für die Mastermix-Kontrolle gegeben.

# 2.9 Real Time PCR

Die Methode der Real Time PCR erlaubt die Quantifizierung der PCR-Produkte bereits während der Zyklen und damit die quantitative Untersuchung des Expressionslevels von mRNA. Man nutzt bei dieser Form der PCR die Tatsache, dass es während der ersten Zyklen der PCR zu einer exponentiellen Zunahme des Produkts kommt, später dagegen zu linearem Wachstum bzw. zu keiner Zunahme mehr. Der Mastermix für die Real Time PCR enthält einen Farbstoff (hier SYBR green I), welcher unspezifisch in die doppelsträngige DNA eingebaut wird. Das PCR-Gerät misst die Zunahme des Fluoreszenzsignals nach Anregung des Farbstoffes mit Licht einer bestimmten Wellenlänge und gibt an, in welchem Zyklus das Signal sich deutlich vom Hintergrund abhebt und die festgesetzte Schwelle überschreitet. Je mehr PCR-Produkt vorhanden ist, desto eher wird die Schwelle erreicht.

Parallel zum zu bestimmenden Gen wird ein sogenanntes *house keeping gene* amplifiziert. Für die Versuche dieser Arbeit ist hARP verwendet worden. Dieses Gen verändert sich in seiner Expression unter verschiedenen Bedingungen nicht und die Werte für seine Schwellenüberschreitung dienen als Vergleich. Die Ergebnisse werden als x-fache Veränderung der mRNA-Expression der Probe zur unbehandelten Kontrolle normalisiert zum *house keeping gene* dargestellt.

Nach Durchlauf der Zyklen wird eine Schmelzpunktbestimmung der PCR-Produkte durchgeführt. Sie dient der Untersuchung der Qualität der amplifizierten DNA.

Die Ansätze der Real Time PCR werden in lichtundurchlässige Reaktionsgefäße pipettiert, um den Farbstoff möglichst vor Lichteinwirkung zu schützen. Nach Befüllen der PCR-Reaktionsgefäße mit Ansatz und cDNA bzw. Aqua pura werden sie mit Folie verschlossen.

Einfacher Ansatz für 15 µl Ansatz: -10 µl Mastermix -0,14 µl Primer vorwärts -0,14 µl Primer rückwärts -4,72 µl Aqua pura. Dazu werden 5 µl cDNA bzw. Aqua pura für die Mastermix- Kontrolle gegeben.

# 2.10 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die PCR-Produkte werden durch Gelelektrophorese nachgewiesen. Als Trägermaterial wird Agarose verwendet, ein aus Algen gewonnenes lineares Polysaccharid, welches durch Erhitzen in Puffer gelöst wird und eine Art Netz ausbildet. Ein elektrisches Feld sorgt für die Auftrennung der PCR-Produkte nach ihrer Größe: kleine Moleküle wandern schneller durch die Maschen des Agarosenetzes zur Anode als größere.

Mit Hilfe von Ethidiumbromid, das mit der DNA interkaliert und bei Bestrahlung mit UV-Licht fluoresziert, können die Produkte auf dem Gel sichtbar gemacht und ihre Größe durch Vergleich mit einem Größenmarker abgeschätzt werden.

Durchführung:

- 1. Für ein 2%iges Agarose-Gel werden 2 g Agarose auf 100 ml TBE Puffer abgewogen.
- 2. Agarose und Puffer werden in der Mikrowelle bei 800 W für 2-3min aufgekocht, bis die Agarose vollständig gelöst ist.
- In die heiße Flüssigkeit werden 8 µl Ethidiumbromid gegeben; nach ausreichender Durchmischung wird das Gel in die vorbereitete Flachbettkammer mit Kamm gegossen.
- 4. Sobald das Gel erstarrt ist, wird es in die Elektrophoresekammer gelegt, mit Puffer übergossen und der Kamm gezogen.
- 5. Die Taschen werden mit je 5 µl PCR-Produkt bzw. 3 µl des Größenmarkers gefüllt.
- 6. Die Laufzeit beträgt 30 min bei einer Spannung von 120 V.
- 7. Nach Ende der Laufzeit werden die Banden mittels UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert.

# 2.11 Medien und Puffer

# 2.11.1 Zellkulturmedien

# N1 Medium mit Biotin:

- 500 ml DMEM
- 5 ml N1 Medium
- 5 ml Penicillin/Streptomycin
- 200 µl Biotin.

# CG-4 (undifferenziert):

- 70% N1 Medium mit Biotin
- 30% B104 Medium.

# CG-4 (differenziert):

- N1 Medium mit Biotin
- 2% FCS.

# <u>OLN-93:</u>

- 500 ml DMEM
- 50 ml FCS
- 5 ml Penicillin/Streptomycin.

# Primäre gemischte Gliazellkulturen der Maus (Primärkulturmedium):

- 500 ml DMEM
- 50 ml NHS
- 5 ml Penicillin/Streptomycin.

# Primäre gemischte Gliazellkulturen der Maus (Differenzierungsmedium):

- 94,5 ml DMEM
- 1 ml Additive1
- 1 ml N1 Medium
- 200 µl Insulin (2,5 mg/ml)
- 10 μl T3-Hormon
- 1 ml BSA (10% in Hanks')

- 1 ml Na-Pyruvat (100mM)
- 1 ml Penicillin/Streptomycin
- $100 \ \mu l \ D^+ Galactose (7,5 \ mg/ml).$

## Additive1:

- 1 mg DMPH4
- 100 mg Ascorbinsäure
- 5 mg Glutathion

In 20 ml Wasser lösen, pH auf 6 einstellen und durch einen 0,2-µm-Filter filtrieren.

## T3-Hormon:

20 mg T3 in 10 ml 0,01 M NaOH lösen und durch 0,2  $\mu$ m-Filter filtrieren. 1:10 in Hanks' plus 1% BSA verdünnen.

## Insulin:

25 mg in 10 ml H-CMF geben, pH mit HCl ansäuern, bis Insulin in Lösung geht, dann durch 0,2-µm-Filter filtrieren.

# 2.11.2 Puffer

Puffer und weitere Ansätze für die TUNEL-Färbung:

TRIS-Stammlösung:

-60,57g TRIS -400ml 1M HCl

Auf pH 7,5 einstellen und auf 1000 ml mit Aqua bidest auffüllen.

TBS:

-950 ml Aqua bidest

-50 ml TRIS-Stammlösung

- 8,766 g NaCl.

NBT/BCIP Puffer:

-12,144g TRIS

- 5,844 g NaCl

- 10,165 g MgCl<sub>2</sub>

Auf pH 9,5 einstellen und auf 1000 ml mit Aqua bidest auffüllen.

*NBT (4-nitro-blue tetrazolium chloride):* 100mg/ml in 70% Dimethylformamid (in bidest).

*BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate):* 50 mg/ml in 100% Dimethylformamid.

Ansatz des Farbsubstrates:

- 225 µl NBT

- 175 µl BCIP

In 50 ml NBT/BCIP Puffer.

Ladepuffer für die Gelelektrophorese:

## TBE:

- 108g TRIS-Base

- 55g Borsäure

- 40 ml EDTA pH 8

Ad 1 Liter.

EDTA pH 8:

- 18,61g Na<sub>2</sub> EDTA x 2 H<sub>2</sub>O

- 20 ml bidest

pH 8 ad 100 ml.

## 2.12 Primer

<u>hARP</u> (Anlagerungstemperatur: 53-61 °C; 109 Basenpaare) vorwärts: CGA-CCT-GGA-AGT-CCA-ACT-AC rückwärts: ATC-TGC-TGC-ATC-TGC-TTG

<u>MBP (Ratte)</u> (Anlagerungstemperatur 58,8 °C; 150 Basenpaare) vorwärts: AAG-AAC-TAC-CCA-CTA-CGG-CTC-C rückwärts: CTA-AAT-CTG-CTG-AGG-GAC-AGG-C

<u>MBP (Maus)</u> (Anlagerungstemperatur 55 °C; 123 Basenpaare) vorwärts: GTA-CAA-GGA-CTC-ACA-CAC-GAG-A rückwärts: GTT-CGA-GGT-GTC-ACA-ATG-TTC-T

<u>PLP</u> (Anlagerungstemperatur: 52 °C; 265 Basenpaare) vorwärts: CAA-GAC-CTC-TGC-CAG-TAT-AG rückwärts: AGA-TCA-GAA-CTT-GGT-GCC-TC

<u>MAG</u> (Anlagerungstemperatur 54 °C; 159 Basenpaare) vorwärts: ACC-GCC-TTC-AAC-CTG-TCT-GT rückwärts: CTC-GTT-CAC-AGT-CAC-GTT-GC

<u>MOG</u> (Anlagerungstemperatur 52 °C; 141 Basenpaare) vorwärts: CCC-TTC-TAC-TGG-ATC-AAC-CCT-G rückwärts: GAG-ATT-CTC-GAC-TTC-TGC-ACG-G

<u>CNP</u> (Anlagerungstemperatur 54 °C; 246 Basenpaare) vorwärts: TGG-AGG-AGC-TGG-GAA-ATC-ACA-A rückwärts: TCA-CAA-AGA-GGG-CAG-AGA-TGG-A

<u>TRAIL-R2</u> (Anlagerungstemperatur für CG-4 Zellen 53,3 °C, für OLN-93 Zellen 46,6 °C; 220 Basenpaare) vorwärts: CAA-AGG-CAA-ACC-GGA-AGT-GTG-T rückwärts: GCG-TCC-AAG-AGA-GAT-AAA-CCC-A
<u>FasR</u> (Anlagerungstemperatur 68,5 °C; 420 Basenpaare) vorwärts: ACC-CGG-ACC-CAG-AAT-ACC-AAG-TGC rückwärts: GGG-GCT-GTT-GTG-CTC-GAT-CTC-ATC

# 2.13 Materialien

## Zellkultur Geräte und Verbrauchsmaterialien

Auslaufpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht		
Reaktionsgefäße (1,5ml; 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht		
Falcons (50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht		
Gefrierschränke (-20°C; -80°C)	Liebherr Comfort, Biberach an der Riss;		
	Sanyo, München		
Inkubatoren	Hera Cell 150 Heraeus;		
	Cellstar Nunc GmbH Wiesbaden		
Kühlschränke (4°C)	Liebherr Comfort, Biberach an der Riss		
Mediumflaschen (Glas; verschiedene	Schott Duran, St. Gallen, Schweiz		
Größen)			
Pasteurpipetten 250 ml	WU, Mainz		
Pipettierhilfe "Accu-jet"	Brand, Wertheim		
Wasserbäder	Köttermann, Uetze/Hänigsen		
6, 24, 96 Kavitätenplatten ("Wells")	Cellstar Greiner Bio-one GmbH,		
	Frickenhausen		
Zählkammer nach Neubauer	"Assistent" Karl Hecht, Sondheim/Rhön		
Zellkulturbank	Microflow Medical Safety Cabinet, Andover,		
	Hants, UK		
Zellkulturflaschen "Cell Star" 75 cm2	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen		
Zellschaber (25 cm)	Sarstedt, Nümbrecht		
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg		

# Zellkultur Chemikalien

Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim	
Biotase	Biochrom, Berlin	
Biotin	Sigma-Aldrich, Steinheim	
BSA	Serva, Heidelberg	
DNase	Roche, Mannheim	
DMEM with Sodium Pyruvate, with L-	PAA, Pasching, Österreich	
Glutamine; high Glucose (4,5 g/l)		
DMPH4	Aldrich Chem., Milwaukee	
Fas Ligand	Alexis, Grünberg	
FCS	Biochrom, Berlin	
Galaktose (D+ Galaktose)	Sigma-Aldrich, Steinheim	
Glutathion	Sigma-Aldrich, Steinheim	
HBSS	PAA, Pasching, Österreich	
Insulin	Sigma-Aldrich, Steinheim	
NaOH	Merck, Darmstadt	
Natrium-Pyruvat	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe	
NHS	Biochrom, Berlin	
N1-Medium	Sigma-Aldrich, Steinheim	
ONOO <sup>-</sup>	Calbiochem EMD Biosciences, Inc., San	
	Diego, USA	
Papain	Sigma-Aldrich, Steinheim	
PBS	Biochrom, Berlin	
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin	
PLL	Biochrom, Berlin	
PLO	Sigma-Aldrich, Steinheim	
SNAP	Sigma-Aldrich, Steinheim	
Staurosporin	Sigma-Aldrich, Steinheim	
TRAIL Ligand	Biozol, Eching	
Trijodthyronin (T3)	Sigma-Aldrich, Steinheim	
TRIS	Sigma-Aldrich, Steinheim	
Trypan Blue	Sigma-Aldrich, Steinheim	

Biochrom, Berlin

## Geräte und Chemikalien für Zellproliferation- und Zelltod-Tests

BCIP	Roche, Mannheim	
Cell Death Detection ELISA Plus	Roche, Mannheim	
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, Steinheim	
Ethanol mit HCl	Merck, Darmstadt	
HCl (1M)	Merck, Darmstadt	
MgCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, Steinheim	
Microplate Reader Model 680	BioRad, Hercules CA, USA	
MTT Reagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim	
NaCl	Merck, Darmstadt	
NBT	Roche, Mannheim	
PFA	Merck, Darmstadt	
TRIS	Sigma-Aldrich, Steinheim	

## Verbrauchsmaterialien und Chemikalien für RNA-Extraktion

β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Insulinspritzen	Braun, Melsungen
Photometerküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

## Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien für PCRs

Agarose	Merck, Darmstadt	
Aqua pura	Roth, Karlsruhe	
PCR-Maschine	Biometra T3 Thermocycler, Göttingen	
Gelanalyse-System "Chemidoc"	BioRad, München	
dNTPs	Roche, Mannheim	

Elektrophoresekammer SUB-CELL GT	BioRad, München	
Reaktionsgefäße (braun)	Sarstedt, Nümbrecht	
Ethidiumbromid	Roche, Mannheim	
Flachbettkammern	BioRad, München	
Folie	BioRad, München	
iCycler	BioRad, München	
Master Mix Real-Time-PCR	ABgene, Epsom, Surrey, UK	
PCR-Puffer	Promega, Madison, USA	
PCR-Reaktionsgefäße 8er Kette	Sarstedt, Nümbrecht	
Real-Time-PCR Reaktionsgefäße (96-Well	Sarstedt, Nümbrecht	
Multiply-PCR Plate)		
Pipetten Eppendorf Research (2,5 µl; 20 µl;	Eppendorf, Hamburg	
200 µl; 1000 µl)		
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht	
Netzgerät "Power Pac 300"	BioRad, München	
Primer	MWG, Ebersberg	
Taq-Polymerase	Promega, Madison, USA	
Waage	Sartorius analytic, Göttingen	

# 3 Ergebnisse

Die Ergebnisse einer vorherigen Arbeit aus dem Institut für Neuropathologie der Universität Göttingen (Höff 2006) zeigen eine Heraufregulation der mRNA-Expression des Myelinproteins PLP in der oligodendroglialen Zelllinie OLN-93 unter dem Einfluss der schädigenden Substanzen SNAP und Peroxynitrit.

Dies korreliert mit dem Ergebnis von immunhistochemischen Färbungen von MS-Läsionen mit dem Demyelinisierungsmuster III. So findet sich in diesen Läsionen ein verstärktes Signal für PLP in den geschädigten, demyelinisierten Arealen im Vergleich zur normal erscheinenden angrenzenden weißen Substanz, während andere Myelinproteine wie z.B. CNP in der Läsion deutlich herunterreguliert sind (Abb. 1). OLN-93-Zellen, die mit SNAP oder Peroxynitrit behandelt werden, zeigen ein ähnliches Reaktionsmuster: Während die mRNA-Spiegel für PLP heraufreguliert werden, kommt es zu einer Herunterregulation von CNP.







Abb. 1: Die LFB-PAS-Färbung (a) einer MS-Läsion vom Demyelinisierungsmuster Typ III zeigt das demyelinisierte Areal der Läsion mit normal erscheinender angrenzender weißer Substanz in der Mitte. Immunhistochemische Färbungen der gleichen Läsion zeigen ein erhöhtes Signal für PLP in der Läsion im Vergleich zur Umgebung (b), während das Signal für CNP in der normal erscheinenden weißen Substanz sich deutlich von dem der Läsion abhebt (c). Die Fragestellung dieser Arbeit begründet sich auf der Frage, ob das in OLN-93-Zellen beobachtete Phänomen der verstärkten Expression der PLP-mRNA für diese Zelllinie und die gewählten Zelltodinduktoren spezifisch ist oder ob es sich auch in anderen Zellpopulationen unter anderen schädigenden Einflüssen findet und somit weiterführend ein Zusammenhang zu dem charakteristischen Expressionsmuster der Myelinproteine in den MS-Läsionen zu untersuchen und zu diskutieren ist.

# 3.1 Untersuchung des Effektes von Fas-Ligand, TRAIL, Staurosporin und Stickoxidmetaboliten auf die Zelllinien CG-4 und OLN-93 sowie PMGC-Zellen

Vor diesem Hintergrund wurde zunächst der Einfluss der ausgewählten potentiell schädigenden Substanzen auf Zellen der beiden Zelllinien CG-4 und OLN-93 sowie auf murine primäre gemischte Gliazellkulturen (*Primary mixed glial cultures*; PMGC) untersucht. Der letale Effekt von Peroxynitrit und des Stickoxid-Donors SNAP auf die oligodendrogliale Zelllinie OLN-93 ist bereits bekannt (Jack et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde weiterführend der Einfluss von Staurosporin, einem Induktor des klassischen Apoptosewegs, sowie der beiden Mitglieder der TNF-Familie TRAIL und Fas untersucht.

#### 3.1.1 Fas

Mittels PCR haben wir vor Beginn der Versuche nachgewiesen, dass die von uns verwendeten Zelllinien den Fas-Rezeptor exprimieren (Abbildung nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, inwiefern FasL einen schädigenden Einfluss auf die beiden oligodendroglialen Zelllinien CG-4 und OLN-93 hat, wurden die Zellen für 24 und 48 Stunden verschiedenen Konzentrationen von FasL ausgesetzt. Dabei wurde das Experiment parallel an Zellen durchgeführt, deren Nährmedium zusätzlich 10 ng/ml Cycloheximid (CHX) enthielt. Hierbei handelt es sich um einen Inhibitor der Proteinsynthese, der in mehreren Studien eingesetzt wurde, um die Zellen anfälliger für die Wirkung der Liganden zu machen. Vor Stimulation der Zellen mit FasL wurden diese Zellen zwei Stunden in CHX-haltigem Medium vorinkubiert.

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde der MTT-Test durchgeführt. Die Diagramme zeigen die Ergebnisse des MTT-Tests nach 48 Stunden Inkubationszeit. Die Ergebnisse des



MTT-Tests nach 24 Stunden zeigen keine Veränderung der mitochondrialen Respiration im Vergleich zur Kontrolle (Abbildungen nicht gezeigt).

Abb. 2: Zu sehen sind die Ergebnisse der MTT-Tests von CG-4 und OLN-93 nach Inkubation mit Fas-Liganden für 48 Stunden. Es ist die Veränderung der mitochondrialen Respiration in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Zellpopulation (100% mitochondriale Respiration) in Abhängigkeit von der Konzentration von Fas-Ligand im Medium aufgetragen. Es zeigt sich außer bei OLN-93 nach Vorinkubation mit CHX und Inkubation mit der höchsten Konzentration Fas bei keiner der beiden Zellpopulationen eine signifikante Abnahme der mitochondrialen Respiration im Vergleich zur Kontrolle, sondern bei CG-4 sogar eine Zunahme. Auch die zusätzliche Behandlung mit CHX führt zu keiner deutlichen Abnahme im Vergleich zu den nur mit Fas-Ligand behandelten Zellen.

\*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001 im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle.

# # P < 0,01 im Vergleich zur nicht mit CHX vorbehandelten Kultur, die mit der gleichen Konzentration Fas versetzt wurde.

Die mitochondriale Respiration nimmt bei CG-4 nicht signifikant ab; auch nach Vorinkubation mit CHX bzw. Durchführung des Versuches mit CHX-haltigem Medium zeigen sich nur bei der höchsten Konzentration von FasL signifikante Unterschiede bei OLN-93. Während die Zahl der Zellen mit intakter mitochondrialer Respiration sich im Versuch mit OLN-93 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle kaum verändert, zeigt sich nach Behandlung von CG-4 im Gegensatz dazu sogar eine Zunahme der mitochondrialen Respiration.

#### **3.1.2 TRAIL**

Vor Beginn der Versuchsreihe wiesen wir mit PCRs nach, dass die beiden Zelllinien den TRAIL-Rezeptor exprimieren (Abbildung nicht gezeigt).

Zellen der beiden Zelllinien CG-4 und OLN-93 wurden für 24, 48 und 72 Stunden mit TRAIL stimuliert, wobei ebenso wie bei FasL das Experiment parallel an Zellen durchgeführt wurde, deren Medium zusätzlich 10 ng/ml CHX enthielt. Bereits zwei Stunden vor

Stimulation mit TRAIL wurde eine Vorinkubation mit dem CHX-haltigen Medium durchgeführt.

Gezeigt werden hier die Ergebnisse der Versuche mit einer Inkubationszeit von 48 Stunden (OLN-93) und 72 Stunden (CG-4). Nach den anderen ausgewählten Inkubationszeiten kam es im MTT-Test zu nur geringfügig von den gezeigten Werten abweichenden Raten für die mitochondriale Respiration (Abbildungen nicht gezeigt).

Die durchgeführten MTT-Tests zeigen eine Abnahme der mitochondrialen Respiration. Bei OLN-93 ist diese bei den nicht-vorinkubierten Zellen sowie bei der höchsten Konzentration TRAIL und Vorinkubation mit CHX signifikant im Vergleich zur Kontrolle.



Abb. 3: Die Diagramme zeigen die Veränderung der mitochondrialen Respiration in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Zellpopulation (100% mitochondriale Respiration) in Abhängigkeit von der Konzentration von TRAIL im Medium. Nach 48 Stunden Inkubation mit TRAIL enthaltendem Medium finden sich signifikant weniger OLN-93-Zellen mit intakter mitochondrialer Respiration als in der unbehandelten Kontrolle. Dieser Effekt tritt ebenfalls nach Vorinkubation bzw. Versuchsdurchführung mit CHX-haltigem Medium bei OLN-93 auf. Bei CG-4 ist auch eine Abnahme erkennbar; diese ist aber nicht signifikant.

\*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001 im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle.

# P < 0.05 im Vergleich zur nicht mit CHX vorbehandelten Kultur, die mit der gleichen Konzentration TRAIL versetzt wurde.

Um zu untersuchen, ob die beobachtete Abnahme der mitochondrialen Respiration nach Inkubation mit TRAIL-haltigem Medium mit apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen in Zusammenhang steht, wurde jeweils ein Nukleosomen-ELISA und die TUNEL-Färbung durchgeführt.

Der Nukleosomen-ELISA zeigt weder bei OLN-93-Zellen nach 48 Stunden noch bei CG-4-Zellen nach 72 Stunden ein Verhältnis an apoptotischen Zellen, welches über das normalerweise in kultivierten oligodendroglialen Zellinien zu erwartende Maß hinausgeht. Die ermittelten Werte reichen nicht an die von der Positiv-Kontrolle erreichten Werte heran.



Abb. 4: Aufgetragen sind in den beiden Diagrammen jeweils die Ergebnisse der Messung im ELISA-Gerät in relativen Einheiten in Abhängigkeit zur Konzentration von TRAIL im Nährmedium. Für den ELISA wurde ebenfalls eine Zellpopulation zusätzlich zu den verschiedenen Konzentrationen TRAIL mit 10 ng/ml CHX behandelt. Zu sehen sind die Ergebnisse nach Behandlung von CG-4 für 72 Stunden und OLN-93 für 48 Stunden. Es zeigt sich in allen Zellgruppen keine Zunahme der Zelltodrate nach Behandlung mit TRAIL. Die Werte der Positivkontrollen (im Versuch mit OLN-93 "3" (relative Einheit); im Versuch mit CG-4 "2" (relative Einheit)) werden in keinem Experiment erreicht.

Auch die TUNEL-Färbung zeigt keine apoptotischen Zellen. Hier werden nur die Ergebnisse für die höchste Konzentration TRAIL (500 ng/ml) ohne und mit CHX-haltigem Medium gezeigt, da sich nach Inkubation der Zellen mit den anderen Konzentrationen von TRAIL ohne und mit CHX-haltigem Medium in der TUNEL-Färbung dasselbe Bild zeigte.

Im Vergleich zur Kontrolle sind die Zellen ebenso dicht gewachsen und zeigen keine sichtbaren morphologischen Unterschiede.



Abb. 5: Die Bilder a, b und c zeigen die TUNEL-Färbung von CG-4-Zellen. In (a) sind die unbehandelten Kontrollzellen zu sehen; (b) und (c) zeigen die Zellen nach Behandlung mit 500 ng/ml TRAIL, bei (c) in CHX-haltigem Medium. Es finden sich in (b) und (c) keine TUNEL-positiven apoptotischen Zellen. Außerdem ergeben sich keine deutlichen Veränderungen in Zellzahl und Morphologie.

Die Bilder (d), (e) und (f) zeigen die entsprechenden Experimente mit OLN-93-Zellen. Abb. 5d zeigt die Kontrollzellen. Nach Stimulation mit der höchsten Konzentration TRAIL in (e) und (f) sind auch hier keine TUNEL-positiven Zellen zu sehen. Unter Zugabe von CHX zeigt sich in (f) eine Reduktion der Zellzahl.

#### 3.1.3 Staurosporin

Mit Hilfe des MTT-Tests wurde die Wirkung von Staurosporin auf die beiden Zelllinien sowie die Primärkulturzellen untersucht. Der Test ist nach 24 Stunden Inkubationszeit gemacht worden. Hier zeigt sich bei allen drei Zellpopulationen eine sehr deutliche, z.T. fast lineare signifikante Abnahme der mitochondrialen Respiration mit steigenden Konzentrationen Staurosporin. Nach Behandlung der Zellen mit der höchsten Konzentration sinkt die mitochondriale Respiration auf Werte unter 50%; bei CG-4-Zellen sogar auf unter 10%. Bereits lichtmikroskopisch zeigte sich hier eine deutliche Schädigung der Zellen. Sie waren morphologisch verändert und kaum noch auf dem Boden der Zellkulturflasche fixiert.



Abb. 6: Die Diagramme zeigen den Verlauf der mitochondrialen Respiration in Prozent bei den drei mit Staurosporin behandelten Zellpopulationen in Abhängigkeit von der Konzentration. Zu sehen ist die signifikante Abnahme der mitochondrialen Respiration bei CG-4, OLN-93 und PMGC nach 24-stündiger Behandlung bei z.T. bereits niedrigen Konzentrationen Staurosporin. \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.



Ergänzend wurde eine TUNEL-Färbung durchgeführt, um apoptotische Zellen nachweisen zu können.

Exemplarisch werden hier die Bilder der TUNEL-Färbung von CG-4-Zellen gezeigt, welche für 24 Stunden mit 5 nM Staurosporin behandelt wurden. Deutlich zu sehen sind die charakteristisch gefärbten schwarzen TUNEL-positiven Zellen (Pfeile).



Abb. 7: Bild (a) zeigt unbehandelte CG-4-Zellen, die zur Kontrolle gefärbt wurden. In (b) und (c) sind CG-4-Zellen nach 24 Stunden Behandlung mit 5 ng/ml Staurosporin zu sehen. Es findet sich eine deutliche Abnahme der Zellzahl und bereits in der schwächsten Vergrößerung (b) fallen die zahlreichen dunklen Zellen auf, welche sich in stärkerer Vergrößerung (c) deutlich als TUNEL-positive apoptotische Zellen darstellen (Pfeile).

#### 3.1.4 SNAP

Mit den folgenden Versuchen konnten wir zeigen, dass neben Staurosporin auch SNAP Zelltod in unseren Zellpopulationen auslöst.



Abb. 8: Die Diagramme zeigen die Ergebnisse des MTT-Tests nach Inkubation der beiden Zelllinien CG-4 und OLN-93 sowie primärer gemischter Gliazellkulturen (PMGC) mit SNAP für 48 Stunden. Es ist die Veränderung der mitochondrialen Respiration in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Zellpopulation (100% mitochondriale Respiration) in Abhängigkeit von der Konzentration von SNAP im Medium aufgetragen. Man erkennt in allen drei Diagrammen eine signifikante Abnahme des Anteils von Zellen mit intakter mitochondrialer Respiration. Die Ergebnisse der Inkubation von OLN-93 mit SNAP basieren auf Versuchen, welche im Rahmen einer vorhergegangenen Arbeit durchgeführt worden sind (Höff 2006). \* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

#### 3.1.5 Peroxynitrit

Nach Stimulation mit Peroxynitrit kommt es bei höheren Konzentrationen zu einer signifikanten Abnahme von CG-4- und OLN-93-Zellen mit intakter mitochondrialer Respiration. PMGC-Zellen zeigen keine signifikante Veränderung.



Abb. 9: Dargestellt sind die Ergebnisse des MTT-Tests von CG-4, OLN-93 und primären gemischten Gliazellkulturen (PMGC) nach Inkubation mit Peroxynitrit für 24h. Es ist die Veränderung der mitochondrialen Respiration in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Zellpopulation (100% mitochondriale Respiration) in Abhängigkeit von der Konzentration von Peroxynitrit im Medium aufgetragen. Die Inkubation der Zelllinien CG-4 und OLN-93 mit Peroxynitrit für 24 Stunden führt im MTT-Test zu einer signifikanten Abnahme der Zellen mit intakter mitochondrialen Respiration. PMGC-Zellen zeigen keine signifikante Abnahme. Die Ergebnisse der Inkubation von OLN-93 mit Peroxynitrit basieren auf Versuchen, welche im Rahmen einer vorhergehenden Arbeit durchgeführt worden sind (Höff 2006).

\*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Nachdem die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass sowohl Fas-Ligand als auch TRAIL in den beiden Zelllinien keinen Zelltod auslösen, wurden für den zweiten Teil der Arbeit die Zelltodinduktoren SNAP, Peroxynitrit und Staurosporin gewählt.

Dieser Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, inwiefern die ausgewählten Zelltodinduktoren zu einer Veränderung der mRNA-Expression der Myelinproteingene in den beiden Zelllinien und in PMGC-Zellen führen.

# 3.2 Analyse der Expression verschiedener Myelingene in unbehandelten CG-4-, OLN-93- und primären glialen Zellkulturen

In einem den quantitativen Real Time PCRs vorangehenden Experiment wurde zunächst mit Hilfe von PCRs untersucht, welche der ausgewählten Myelinproteingene in den unbehandelten Zellen exprimiert werden. OLN-93-Zellen exprimieren nur PLP und CNP, während CG-4-Zellen und PMGC neben diesen beiden außerdem MBP und MAG exprimieren. Wir haben in keiner der drei Zellpopulationen eine Expression von MOG gefunden. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle zusammengefasst.

	CG-4	OLN-93	PMGC
PLP	+	+	+
CNP	+	+	+
MBP	+	-	+
MAG	+	-	+
MOG	-	-	-

Tabelle 1: Mittels PCR ist die Expression der Myelinproteingene PLP, CNP, MBP, MAG und MOG in den beiden Zellinien CG-4 und OLN-93 sowie in PMGC-Zellen untersucht worden. Es zeigt sich, dass CG-4 und PMGC-Zellen alle ausgewählten Gene bis auf MOG exprimieren, während OLN-93-Zellen nur PLP und CNP exprimieren.

# 3.3 Effekte von Staurosporin, SNAP und Peroxynitrit auf die mRNA-Spiegel verschiedener Myelingene in CG-4, OLN-93 und primären glialen Zellen

Entsprechend den gefundenen Expressionsmustern sind für die jeweils exprimierten Gene Real Time PCRs nach Behandlung der Zellen mit den schädigenden Substanzen durchgeführt worden. Die folgenden Abschnitte beschreiben die Veränderung der mRNA-Expression von PLP, CNP, MBP und MAG in den drei Zellpopulationen jeweils für die verschiedenen Zelltodinduktoren (SNAP, Peroxynitrit, Staurosporin).

#### 3.3.1 PLP

Der bereits vorher beobachtete starke Anstieg der Expression der PLP-mRNA in OLN-93-Zellen nach Behandlung mit SNAP und Peroxynitrit findet sich im Rahmen dieser Arbeit ebenso nach Inkubation der Zelllinie mit Staurosporin (Abb. 10). Es scheint sich hierbei um ein Phänomen zu handeln, welches unabhängig vom Zelltodinduktor ist.

Im Gegensatz dazu ist der beobachtete Anstieg der PLP-mRNA-Expression weder in CG-4-Zellen noch in PMGC-Zellen zu finden (Abb. 10), die mit den gleichen Konzentrationen des Zelltodinduktors für den gleichen Zeitraum inkubiert wurden. Diese beiden Zellpopulationen zeigen entweder keine Veränderung im Expressionsmuster oder sie exprimieren geringfügig weniger PLP-mRNA. In keinem Experiment kommt es dagegen zu einem Anstieg der Expression von dem in OLN-93-Zellen beobachteten Ausmaß.



Abb. 10: Die drei Diagramme zeigen die mittels quantitativer Real Time PCR ermittelte Veränderung der mRNA-Expression von PLP jeweils für die drei Zellpopulationen CG-4 (rosa Kurve), OLN-93 (blaue Kurve) und PMGC (grüne Kurve) in Abhängigkeit von der Konzentration des jeweiligen Zelltodinduktors Staurosporin, SNAP und Peroxynitrit.

Deutlich zu sehen ist der Anstieg der PLP-mRNA-Expression in OLN-93-Zellen unabhängig vom Zelltodinduktor. Dagegen zeigt sich eine ähnliche Zunahme weder in CG-4-Zellen noch in PMGC unter den gleichen Bedingungen.

\* P < 0,05; \*\* P < 0,01 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

#### 3.3.2 CNP

Nachdem vorher neben den Veränderungen der PLP-mRNA- Expression zum Vergleich auch die Expression von CNP untersucht wurde, ist der Frage nach der Veränderung der CNP-mRNA-Expression auch im Rahmen dieser Arbeit weiterführend nachgegangen worden. Unabhängig vom Zelltodinduktor kommt es hier in CG-4-Zellen und in PMGC-Zellen zu einer gleich bleibenden oder verminderten Expression wie bereits in OLN-93-Zellen beobachtet.



Abb. 11: Gezeigt wird die Veränderung der mRNA-Expression von CNP in den drei Zellpopulationen in Abhängigkeit von den Konzentrationen der Zelltodinduktoren Staurosporin, SNAP und Peroxynitrit. Unabhängig vom Zelltodinduktor zeigt sich in allen Experimenten eine z.T. signifikante Abnahme der mRNA-Expression von CNP bei höheren Konzentrationen.

\* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

#### 3.3.3 MBP und MAG

Weiterführend sind neben den Veränderungen der Expression von PLP und CNP auch MBP und MAG untersucht worden. Beide Gene werden nur von CG-4-Zellen und PMGC-Zellen exprimiert (s. Tabelle 1). Die gefundenen Ergebnisse ähneln in beiden Fällen jenen von CNP; auch hier ändert sich die Expression nur geringfügig. In den meisten Experimenten findet sich eine Abnahme der Expression vor allem bei höheren Konzentrationen. Nur nach Behandlung mit 100 µM Peroxynitrit exprimieren PMGC-Zellen verstärkt MAG-mRNA (Abb. 13). Dieser beobachtete Anstieg ist allerdings im Vergleich zu den hohen Werten in OLN-93-Zellen für PLP nur gering und nicht signifikant.



Abb. 12: In den Diagrammen wird die Veränderung der mRNA-Expression von MBP in der Zelllinie CG-4 und den PMGC- Zellen unter Einfluss von den Zelltodinduktoren Staurosporin, SNAP und Peroxynitrit dargestellt. Es zeigt sich, dass die Expression in allen Experimenten abnimmt, z.T. signifikant bereits bei niedrigen Konzentrationen des jeweiligen Zelltodinduktors, z.T. erst bei höheren Konzentrationen.

\* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.



Abb. 13: Gezeigt werden die Veränderungen der mRNA-Expression von MAG in CG-4-Zellen und in PMGC-Zellen nach Behandlung mit den drei ausgewählten Zelltodinduktoren. Die Expression von MAG-mRNA in CG-4-Zellen ändert sich in allen Experimenten kaum oder nimmt geringfügig ab. PMGC-Zellen exprimieren unter Einfluss von bereits niedrigen Konzentrationen Staurosporin und SNAP deutlich weniger MAG-mRNA; nach Behandlung mit Peroxynitrit steigt die Expression bei Inkubation mit Werten um 100  $\mu$ M leicht an. \*\*\* P < 0,001 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

#### **4 Diskussion**

Nachdem im Rahmen von vorhergehenden Ergebnissen (Höff 2006) eine veränderte Expression der Myelinproteingene PLP und CNP in der oligodendroglialen Zelllinie OLN-93 nach Inkubation mit Peroxynitrit und dem NO-Donor SNAP beobachtet worden ist, wird im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht, ob es sich dabei um eine spezifische Reaktion von Oligodendrozyten auf schädigende Substanzen handelt.

# 4.1.Wirkung der Zelltodinduktoren TRAIL, FasL und Staurosporin auf oligodendrogliale Zellkulturen

Um zu untersuchen, inwieweit die beiden Mitglieder der TNF-Familie Fas und TRAIL sowie Staurosporin Zelltod in den Kulturen auslösen, wurden nach Beendigung der Inkubationszeit die mitochondriale Respiration und das Ausmaß des Zelltodes untersucht.

#### 4.1.1 TRAIL

Es zeigte sich nach Inkubation der oligodendroglialen Zelllinien OLN-93 und CG-4 mit TRAIL bei höheren Konzentrationen im MTT-Test eine Abnahme der mitochondrialen Respiration.

Hierbei scheint es sich aber augenscheinlich nicht um eine erhöhte Zelltodrate zu handeln, da weder der Nukleosomen-ELISA zu einem positiven, auf verstärkten Zelltod im Vergleich zur Kontrolle hinweisenden Ergebnis führte, noch in der TUNEL-Färbung die charakteristisch gefärbten apoptotischen Zellen zu sehen waren. Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse scheint sich die Abnahme der mitochondrialen Respiration trotz des Nachweises des TRAIL-R2-Rezeptors auf mRNA-Ebene also nicht mit verstärktem Zelltod erklären zu lassen, sondern sie deutet auf einen durch TRAIL ausgelösten Wachstumsstopp hin, so dass sich im Vergleich mit der weiterhin proliferierenden Zellpopulation der Kontrolle relativ gesehen geringere Werte ergeben.

In humanen Oligodendrozyten wird der TRAIL-mediierte Zelltod vor allem durch TRAIL-R1 ausgelöst (Matysiak et al. 2002). Mäuse besitzen im Gegensatz zum Menschen nur einen zelltodinduzierenden TRAIL-Rezeptor, nämlich ein Homolog zum humanen TRAIL-R2. Dieser Rezeptor konnte auch bei Ratten nachgewiesen werden. Auf mRNA-Ebene finden sich bei Mäusen zwei weitere Rezeptoren (DcR1 und 2); diese besitzen allerdings nicht die zytoplasmatische Todesdomäne (Schneider et al. 2003).

Für unsere Ergebnisse gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten: Trotz vorhandener Transkription des TRAIL-R2-Gens könnte die Translation des Proteins unvollständig ablaufen. Auch ein gestörter Transport des Proteins vom Golgi-Apparat zur Zelloberfläche ist nicht auszuschließen. Dann würde es sich bei der TRAIL-induzierten Inhibition der Proliferation um ein unspezifischen, nicht TRAIL-Rezeptor vermittelten Effekt handeln.

Eine zweite, attraktivere Hypothese ist, dass es sich um eine spezifisch durch den TRAIL-Rezeptor vermittelte Inhibition der Proliferation handelt. In der Literatur finden sich zahlreiche Publikationen, die neben der vielbeschriebenen apoptotischen Wirkung von TRAIL auf mögliche nicht-apoptotische Funktionen hinweisen, darunter auch Hemmung der Aktivierung von humanen T-Zellen ohne Auslösung von Apoptose (Lünemann et al. 2002) sowie anti-proliferative Wirkungen durch Zellzyklusarrest in Lymphozyten (Song et al. 2000).

Ähnliches ist möglicherweise auch in den oligodendroglialen Zelllinien denkbar; ein Zellzyklusarrest würde die verminderte Proliferation in Abwesenheit von apoptotischen oder nekrotischen Zellen erklären. Um zu bestimmen, ob es sich bei der durch die TRAIL-Zugabe ausgelösten Inhibition der Proliferation um einen spezifischen, rezeptorvermittelten Effekt handelt, sind weitere Experimente, wie z.B. die Zelltodinduktion bei gleichzeitiger Blockade des TRAIL-Rezeptors mit blockierenden Antikörpern notwendig.

#### 4.1.2 Fas

Ebenso führte auch die Inkubation der Zellpopulationen mit FasL nicht zu einer erhöhten Zelltodrate. In diesem Fall fand sich selbst bei sehr hohen Konzentrationen nur bei OLN-93 nach Vorinkubation mit CHX eine signifikante Abnahme der mitochondrialen Respiration, ansonsten entweder keine Veränderung der Rate oder sogar eine Zunahme im Versuch mit CG-4.

Für dieses Phänomen kommen mehrere Erklärungsmöglichkeiten in Betracht:

Nach erfolgreichem Nachweis des Fas-Rezeptors mittels PCR stellt sich als erstes die Frage nach einem möglichen Problem bei der Stimulation von Rattenzelllinien mit humanem Fas-Liganden. Unterschiede bei Ligand oder Rezeptor zwischen den beiden Spezies sind denkbar, welche entweder zu keiner regelrechten Bindung führen oder nach erfolgter Bindung zu keiner oder fehlerhafter Aktivierung der nachfolgenden Kaskade führen.

Fas scheint des Weiteren neben einer Rolle beim Zelltod auch eine Vielzahl anderer Funktionen zu besitzen, wie z.B. die Regulation von Regeneration und Proliferation von Zellen. Diese nicht-apoptotischen Funktionen sind bei verschiedenen Zellpopulationen beobachtet worden: z.B. exprimieren Hepatozyten den FasR und Bindung des FasL führt im Rahmen vieler Experimente zur Apoptose der Zellen. Allerdings zeigte sich bei Mäusen nach einer partiellen Hepatektomie eine verstärkte Leberregeneration nach Aktivierung von Fas durch eine Injektion eines anti-FasR Antikörpers, also ein proliferationsfördernder Effekt (Desbarats und Newell 2000). Bei den operierten Tieren kam es zu im Gegensatz zu den Kontrolltieren nicht zu einer Herunterregulation von FLIP, einem Protein, welches die Auslösung von Apoptose durch Bindung an die FADD hemmt.

Weitere nicht-apoptotische Effekte sind in anderen Zellpopulationen, wie z.B. neuronalen Stammzellen (Tamm et al. 2004) und Neuronen (Desbarats et al. 2003, Zuliani et al. 2006) gefunden worden. In verschiedenen Experimenten zeigte sich eine Beteiligung von Fas an vermehrtem Wachstum von Neuriten und verstärkter Regeneration der Neurone nach Schäden bzw. zu verlangsamter Heilung in Abwesenheit von Fas (Desbarats et al. 2003).

Unklar ist weiterhin, wie es genau entweder zu einer pro-apoptotischen oder zu einer nichtapoptotischen Antwort der Zelle nach Aktivierung des FasR kommt und wo die Schnittstellen zwischen den beiden Wegen liegen. Teile der DISC wie FADD, Caspase 8 und c-FLIP könnten hierbei eine Rolle spielen (Park et al. 2005).

Weiterhin könnten posttranslationale Modifikationen für die Auslösung der apoptotischen oder nicht-apoptotischen Kaskade eine Rolle spielen (Chakrabandhu et al. 2006).

Für die Auslösung von Apoptose scheint vor allem die Fähigkeit der Internalisierung des Rezeptors nach Ligandenbindung wichtig zu sein. In Zellen, bei welchen die Internalisierung des Rezeptors nicht möglich ist, werden nach Bindung des FasL proliferationsfördernde Signalwege aktiviert (Lee KH et al. 2006).

Die Frage, wann und unter welchen Umständen der Apoptose-auslösende Signalweg aktiviert wird und wann nicht, lässt sich z.Z. noch nicht vollständig beantworten. Wahrscheinlich werden die verschiedenen Signalkaskaden gleichzeitig aktiviert und es kommt nur unter bestimmten Umständen zur Auslösung von Apoptose. In diesem Zusammenspiel tragen neben Rezeptor-inhibierenden Proteinen und der Hochregulation von protektiven Proteinen auch ungenügende Konzentrationen der Apoptose-auslösenden Proteine zum endgültigen Signal bei (Peter et al. 2007).

Auch hier sind weitere Experimente, z.B. mit FasR blockierenden Antikörpern notwendig, um herauszufinden, ob es sich bei der durch FasL ausgelösten Proliferation in der CG-4-Zelllinie um einen spezifischen, Fas-vermittelten Effekt handelt.

#### 4.1.3 Staurosporin

Im Gegensatz zu Fas und TRAIL löste Staurosporin in den behandelten Zellpopulationen erwartungsgemäß schon in geringen Konzentrationen Zelltod aus und es zeigte sich eine zum Teil fast lineare Abnahme der Zellzahl und der mitochondrialen Respiration bei steigenden Konzentrationen. Bereits nach Stimulation mit 5 ng/ml Staurosporin zeigte die TUNEL-Färbung viele charakteristisch angefärbte apoptotische Zellen.

# 4.2 Wirkung von reaktiven Stickstoffmetaboliten auf oligodendrogliale Zellkulturen

SNAP ist ein NO-Donor; das freigesetzte Stickoxid bildet zusammen mit Superoxidanionen Peroxynitrit. Durch Nitrierung von Tyrosinresten und S-Nitrosylierung von Enzymen mit Eisenschwefelzentrum unterbricht Peroxynitrit Signaltransduktionswege und hemmt die Enzyme der Atmungskette. Die mögliche Rolle von Peroxynitrit in der Pathogenese von Erkrankungen der weißen Substanz wie neurodegenerativen Erkrankungen, MS und Ischämie ist ungeklärt.

Bei der MS werden histologisch vier verschiedene Subtypen der Läsionen unterschieden. Vor allem im Demyelinisierungsmuster III findet sich massiver Zelltod von Oligodendrozyten und eine differentielle Regulation der Myelinproteingene. Die Ursache des Zelltods ist bislang unklar; es wird die Möglichkeit eines initialen Ereignisses diskutiert (Barnett und Prineas 2004). Bekannt ist, dass Oligodendrozyten anfällig sind für eine Vielzahl von unterschiedlichen Entzündungsmediatoren, Zelltodliganden, Neurotransmittern (z.B. Glutamat) sowie bei oxidativem Stress entstehende Metabolite. So führt zum Beispiel in vitro die Freisetzung von Peroxynitrit durch aktivierte Mikrogliazellen zum Zelltod von Oligodendrozyten (Li J et al. 2005). Dabei exprimieren die Mikrogliazellen die induzierbare NO-Synthase (iNOS). Die Expression dieses Enzyms ist auch in akuten MS-Läsionen in Mikrogliazellen und Astrozyten heraufreguliert (Oleszak et al. 1998).

Neuere Studien aus dem Institut für Neuropathologie der Universität Göttingen in Zusammenarbeit mit der McGill University, Montreal, Kanada zeigen allerdings, dass die Heraufregulation der iNOS in MS-Läsionen nicht mit dem Nachweis oder dem Ausmaß des oligodendroglialen Zelltodes korreliert (Jack et al. 2007). In Einzelfällen ließ sich Nitrotyrosin in untergehenden Oligodendrozyten nachweisen, was darauf hinweisen könnte, dass Peroxynitrit und nicht NO zum oligodendroglialen Zelltod beiträgt (Jack et al. 2007).

Während sich in dieser Studie von Jack et al. humane adulte Oligodendrozyten als relativ resistent gegenüber NO-induziertem Zelltod zeigten, kam es bei den Versuchen mit den

52

beiden Zelllinien im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowohl nach Inkubation mit Peroxynitrit als auch mit SNAP zu einer signifikant erhöhten Zelltodrate. Dies ist bereits in vitro bei primären glialen Kulturen beobachtet worden (Mitrovic et al. 1994).

Auch in vivo konnte gezeigt werden, dass der Peroxynitrit-Donor SIN-1 nach Injektion zu Schäden an Axonen und Myelin führt (Touil et al. 2001). Die von uns kultivierten primären murinen Gliazellkulturen zeigten dagegen keine Abnahme der mitochondrialen Respiration nach Inkubation mit Peroxynitrit.

Da sich aber in allen anderen Versuchskonstellationen eine signifikante Abnahme zeigte, sind sowohl SNAP bzw. Stickoxid als auch Peroxynitrit geeignet, die von uns als Oligodendrozyten-Modell verwendeten Zellen zu schädigen, um so zu untersuchen, ob diese beiden Substanzen eine differentielle Myelinproteingenregulation hervorrufen wie wir sie in den MS-Läsionen Demyelinisierungsmuster III gesehen haben.

# 4.3 Veränderung des Genexpressionsmusters der Myelinproteine unter

#### **Zugabe toxischer Faktoren**

Mit den nachfolgenden Experimenten wurde die Veränderung der Myelinproteingene in den drei Zellpopulationen unter dem Einfluss schädigender Substanzen untersucht. Nachdem weder TRAIL noch Fas zu einer Zelltodrate führten, welche über der erwarteten Rate in kultivierten Oligodendrozyten liegt, wurden folglich die beiden bereits vorher verwendeten Zelltod-induzierenden Substanzen Peroxynitrit und SNAP sowie das ebenfalls in den oligodendroglialen Zelltinien Zelltod auslösende Staurosporin benutzt.

Initiale Experimente zeigten eine Heraufregulation von PLP und eine Herunterregulation von CNP auf mRNA-Ebene nach Inkubation der oligodendroglialen Zelllinie OLN-93 mit Stickoxid und Peroxynitrit.

Es zeigte sich, dass dieses Phänomen bei OLN-93 unabhängig vom Zelltodinduktor ist, da auch unter Einfluss des klassischen Apoptoseinduktors Staurosporin OLN-93-Zellen mit einer verstärkten Expression von PLP-mRNA und einer Herunterregulation von CNP-mRNA reagierten.

Für alle anderen Gene fanden wir unabhängig von Zelllinie und Zelltodinduktor eine Herunterregulation. Dass wir in PMGC-Zellen nach Inkubation mit Peroxynitrit zumeist keine signifikante Veränderung der mRNA-Expression fanden, ist nicht überraschend, da sich bereits im MTT-Test keine signifikante Abnahme der mitochondrialen Respiration fand und die Zellen somit nicht geschädigt zu werden scheinen.

Eine differentielle Regulation von Genen, wie die, die wir in der OLN-93-Zelllinie für PLP und CNP im Rahmen dieser und vorangegangener Arbeiten beobachtet haben, findet man auch bei der sogenannten dying back oligodendrogliopathy. Sie beschreibt eine Degeneration nur der distalen, periaxonalen Fortsätze der Oligodendrozyten bei intaktem Zellkörper und wurde zuerst 1981 von Ludwin und Johnson im Cuprizone-Modell beschrieben. In diesem Modell kommt es zum Verlust von Oligodendrozyten und zu Demyelinisierung. Sehr ähnliche Veränderungen sind auch in aktiven MS-Plaques Demyelinisierungsmuster III zu finden (Lucchinetti et al. 2000). Der molekulare Mechanismus der dying back oligodendrogliopathy ist nicht geklärt. Chronische metabolische Störungen verschiedener Ätiologie im Stoffwechsel der Oligodendrozyten scheinen eine Rolle zu spielen wie z.B. Entzündungen oder Viren. Sie führen dazu, dass die beeinträchtigte Zelle bei eingeschränktem Stoffwechsel nicht in der Lage ist, die distalsten Bereiche (bei den Oligodendrozyten also den direkt dem Axon anliegenden Bereich) zu versorgen und diese somit am anfälligsten für weitere Schäden sind. Die differentielle Regulierung der Myelinproteine ist nicht spezifisch für die MS, sondern ist ein im Rahmen verschiedener Krankheiten beschriebenes Phänomen, wie z.B. bei Ischämie (Aboul-Enein et al. 2003).

Unsere in-vitro-Daten bezüglich der verstärkten PLP-Expression bieten in Zusammenschau mit der Literatur eine interessante Erklärungsmöglichkeit für die Genese einer differentiellen Expression von Myelingenen in MS-Läsionen. Um zu untersuchen, ob sich diese differentielle Myelingenexpression auch in anderen oligodendroglialen Zelllinien bzw. in primären Oligodendrozyten der Maus nach Inkubation mit Zelltodinduktoren nachweisen lassen, wurden entsprechende in-vitro-Experimente durchgeführt.

Dabei stellte sich heraus, dass die differentielle Expression nur in OLN-93-Zellen, jedoch nicht in der Zellinie CG-4 oder primären Oligodendrozyten der Maus zu beobachten ist. Es handelt sich also um ein OLN-93-spezifisches Phänomen. Somit ist es unwahrscheinlich, dass der durch Stickoxid oder Peroxynitrit ausgelöste Zelltod ein Erklärungsmodell für die differentielle Regulation der Myelingene in MS-Läsionen ist. Der Entstehungsmechanismus dieses histologischen Subtyps ist also nach wie vor ungelöst.

Es stellt sich allerdings die Frage, welche Funktion bzw. Konsequenz eine Heraufregulation von PLP, einem Strukturprotein im Myelin, in OLN-93-Zellen hat, welche durch Inkubation mit der jeweiligen zelltodauslösenden Substanz geschädigt worden sind.

Zelltod von Oligodendrozytenvorläuferzellen findet sich auch noch postpartal in dem Zeitraum, in dem die Zellen ihre späteren Bestimmungsorte finden. Die ursprüngliche Zellzahl ist sehr viel größer als später Zellen benötigt werden, so dass z.B. im Sehnerv bis zu 50% der Oligodendrozytenvorläuferzellen Zelltod begehen. Ein Grund dafür könnte ein physiologischer Mangel an Wachstumsfaktoren wie PDGF sein (Campagnoni AT und Skoff 2001). Der Zelltod fällt zusammen mit einer verstärkten Expression von PLP und DM20, so dass hier eine Verbindung vermutet werden könnte. Neben diesem physiologischen Zelltod sind Experimente in vitro und in vivo mit Zellen durchgeführt worden, welche zu viel PLP exprimieren.

Die Überexpression von PLP scheint schwerere Auswirkungen zu haben als der Verlust des Proteins: In Versuchstieren mit übermäßiger Expression von PLP kommt es zu Zelltod der Oligodendrozyten. Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür wäre, dass die PLP-Expression direkt die Apoptose beeinflusst oder aber, dass die gestörte Myelinformation den Stoffwechsel der Zelle derart schädigt, dass sie Apoptose begeht (Skoff et al. 2004a).

PLP/DM20 überexprimierende Ratten bekommen eine Leukodystrophie, bei der die reifen Oligodendrozyten sterben und die unreifen Oligodendrozyten in einem Stadium verbleiben, welches der Myelinbildung vorausgeht (Bradl et al. 1999). Auch Punktmutationen im Gen können zu toxischen Produkten mit nachfolgendem Zelltod der Oligodendrozyten führen wie z.B. beim M. Pelizaeus-Merzbacher.

Wird dagegen von Oligodendrozyten kein PLP exprimiert, steigt die Zellzahl in Kultur im Vergleich zur Kontrolle um das siebenfache durch verlängerte Überlebenszeit der Zellen bei aber geringerem Differenzierungsgrad (Yang und Skoff 1997). PLP-null-Mäuse zeigen geringe strukturelle Veränderungen im Myelin bei fast normaler Lebenserwartung und Verhalten (Klugmann et al. 1997), wobei allerdings der axonale Transport beeinträchtigt ist und es zu Degeneration der Axone kommt, wie man sie z.B. bei der spastischen Paraplegie findet, für welche die PLP-null-Mäuse ein geeignetes Modell darstellen. Diese Störungen lassen sich evt. mit dem posttranskriptionalen Verlust von SIRT-2, einem Myelinbestandteil bisher unbekannter Funktion, an dessen Transport ins ZNS PLP beteiligt sein könnte, erklären. Der Transport ins ZNS durch PLP könnte von wesentlicher Bedeutung für die unbeeinträchtigte Funktion der Axone sein (Werner et al. 2007).

Auch für nicht-neurale Zellen konnte gezeigt werden, dass eine Parallelität zwischen der Höhe der Expression von PLP und der Apoptoserate besteht, wobei die erhöhte Apoptoserate der PLP überexprimierenden Zellen mit einer starken Ansäuerung der Extrazellulärflüssigkeit erklärbar sein könnte (Skoff et al. 2004 b). Zusammenfassend stellt sich also die Frage nach einer potentiellen Rolle für PLP außerhalb der Myelinisierung; vor allem vor dem Hintergrund, dass das Protein embryonal bereits ca. einer Woche vor Beginn der Myelinisierung exprimiert wird.

Die oben genannten Studien scheinen mit unseren Ergebnissen für die Zelllinie OLN-93 zu korrelieren, wobei sich die Frage nach dem Ursache-Wirkungs-Prinzip stellt. Zumeist wird eine erhöhte Apoptoserate nach Erhöhung der Expression von PLP beobachtet. In unseren Experimenten reagierten die Zellen aber mit einer erhöhten Expression von PLP auf schädigende Substanzen, so dass ein direkter Vergleich hier nicht möglich ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die erhöhte Expression der PLP-mRNA nur in OLN-93-Zellen findet und weder in CG-4-Zellen noch in primären gemischten Gliazellkulturen unter den gleichen Bedingungen nachweisen läßt. Es scheint sich hierbei also um ein OLN-93-spezifisches Phänomen zu handeln, wobei eine Verbindung zwischen Zelltod und der erhöhten Expression von PLP wie bereits erwähnt in anderen Studien schon untersucht wurde und die endgültige Funktion von PLP in diesem Zusammenhang noch nicht geklärt ist.

In unseren Experimenten zeigen OLN-93-Zellen insgesamt ein von den anderen Zellpopulationen abweichendes Verhalten.

Dies betrifft eine von Oligodendrozyten sowie auch von den primären gemischten Gliazellkulturen und der Zelllinie CG-4 abweichende Expression der Myelinproteingene (Tabelle s. Ergebnisse); d.h. entweder liegt gar keine Expression vor oder eine unter veränderten Bedingungen von den anderen Populationen abweichende Expression. Somit ist eine weitere Schlussfolgerung dieser Arbeit, dass die Zelllinie OLN-93 bei Experimenten, welche die Myelinproteine betreffen, nicht zwangsläufig als Modell für primäre Oligodendrozyten geeignet ist.

56

# 5 Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) lässt sich histopathologisch in vier verschiedene Subtypen einteilen. Der Subtyp III ist gekennzeichnet durch initialen Verlust der Oligodendrozyten und Zeichen einer *dying back* Oligodendrogliopathie, bei welcher die Oligodendrozyten ihre distalen, direkt dem Axon anliegenden Anteile nicht mehr versorgen können.

In Läsionen dieses Subtyps fanden wir histologisch mittels immunhistochemischer Färbung eine differentielle Regulation der Myelinproteine mit einem verstärkten Nachweis des Myelinproteins PLP im Vergleich zur umgebenden intakten weißen Substanz, während weitere Myelinproteine wie z.B. CNP in der Läsion nur vermindert nachweisbar waren.

In Zellkulturversuchen mit der Zellinie OLN-93 nach Zugabe der Zelltod-auslösenden Substanzen SNAP und Peroxynitrit konnten wir mittels Real Time PCR ebenfalls eine Heraufregulation der PLP-mRNA-Expression zeigen.

Mit der vorliegenden Arbeit soll der Frage nachgegangen werden, ob die beobachtete verstärkte Expression der PLP-mRNA in OLN-93-Zellen eine zelltypspezifische Reaktion darstellt oder ob auch andere oligodendrogliale Zellen mit einer solchen Expression auf Zelltod-auslösende Stimuli reagieren und somit eine mögliche Erklärung für die Entstehung des Subtyps III zu finden wäre.

Wir wählten für die Experimente neben OLN-93-Zellen die Zellline CG-4 und primäre gemischte Gliazellkulturen der Maus. In initialen Versuchen zur Wahl der Zelltodauslösenden Substanzen arbeiteten wir mit TRAIL und FasL, welche aber in den von uns gewählten Zellreihen nicht zu einer gesteigerten Zelltodrate führten.

Mittels MTT-Test, Nukleosomen-ELISA und TUNEL-Färbung konnten wir dagegen Zelltod in den mit SNAP, Peroxynitrit und Staurosporin behandelten Kulturen nachweisen. Aus den mit verschiedenen Konzentrationen behandelten Zellen extrahierten wir die RNA und bestimmten mittels Real Time PCR die Expressionsrate der ausgewählten Myelinproteine PLP, CNP, MBP, MAG und MOG.

Es zeigte sich, dass in OLN-93-Zellen die verstärkte PLP-mRNA-Expression bei allen gewählten Zelltod-auslösenden Substanzen auftrat. Da sich ein ähnliches Phänomen weder bei CG-4-Zellen noch bei primären gemischten Gliazellkulturen zeigte, scheint es sich hier um ein OLN-93-spezifisches Reaktionsmuster zu handeln.

Alle anderen untersuchten Myelinproteine zeigten entweder keine Veränderung oder eine Abnahme der Expression.

Zusammenfassend konnten wir also zeigen, dass OLN-93-Zellen mit einer verstärkten PLP-Expression auf schädigende Substanzen reagieren. Eine ähnliche Reaktion fand sich bei weiteren glialen Zellreihen nicht. Somit erscheint es unwahrscheinlich, dass der in MS-Läsionen Subtyp III immunhistochemisch nachgewiesene hohe PLP-Anteil auf ein spezifisches oligodendrogliales Reaktionsmuster, ausgelöst durch oxidativen Stress oder zelltodauslösende Stimuli, zurückzuführen ist. Die genaue Entstehungsweise dieses Subtyps ist also weiterhin nicht geklärt. Es stellt sich zudem die Frage, ob die Zelllinie OLN-93 für Experimente, die die Myelinproteine betreffen, geeignet ist, da sie in unseren Experimenten deutlich abweichende Reaktionen im Vergleich zu Primärkulturen zeigt.

## 6 Literaturverzeichnis

Aboul-Enein F, Rauschka H, Kornek B, Stadelmann C, Stefferl A, Brück W, Lucchinetti C, Schmidbauer M, Jellinger K, Lassmann H (2003): Preferential loss of myelin-associated glycoprotein reflects hypoxia-like white matter damage in stroke and inflammatory brain diseases. J Neuropathol Exp Neurol <u>61(1)</u>, 25-33

Bagasra O, Michaels FH, Zheng YM, Bobroski LE, Spitsin SV, Fu ZF, Tawadros R, Koprowski H (1995): Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. Proc Natl Acad Sci USA <u>92</u>, 12041-12045

Barnett MH, Prineas JW (2004): Relapsing and remitting multiple sclerosis: Pathology of the newly forming lesion. Ann Neurol <u>55</u>, 458-468

Bartsch S, Montag D, Schachner M, Bartsch U (1997): Increased number of unmyelinated axons in optic nerves of adult mice deficient in the myelin-associated glycoprotein (MAG). Brain Res <u>762</u>, 231-234

Bartsch U, Kirchhoff F, Schachner M (1989): Immunohistological localization of the adhesion molecules L1, N-CAM and MAG in the developing and adult optic nerve of mice. J Comp Neurol <u>284</u>, 451-462

Bifulco M, Laezza C, Stingo S, Wolff J (2002): 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: A membrane-bound, microtubule-associated protein and membrane anchor for tubulin. Proc Natl Acad Sci <u>99</u>, 1807-1812

Bradl M, Bauer J, Inomata T, Zielasek J, Nave K-A, Toyka K, Lassmann H, Wekerle H (1999): Transgenic Lewis rats overexpressing the proteolipid protein gene: Myelin degeneration and its effect on T cell-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. Acta Neuropathol <u>97</u>, 595-606

Brundin L, Morcos E, Olsson T, Wiklund N, Andersson M (1999): Increased intrathekal nitric oxide formation in multiple sclerosis; cerebrospinal fluid as activity marker. Eur J Neurol <u>5</u>, 585-590

Brunner C, Lassmann H, Waehneldt TV, Matthieu JM, Linington C (1989): Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendroglial glycoprotein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats. J Neurochem <u>52</u>, 296-304

Campagnoni AT, Skoff RP (2001): The pathobiology of myelin mutants reveal novel biological functions of the MBP und PLP genes. Brain Pathol <u>11(1)</u>, 74-91

Campagnoni AT, Campagnoni CW: Myelin Basic Protein Gene; in: Myelin Biology and Disorders, Band 1; hrsg. v. Robert Lazzarini; Elsevier, San Diego, Californien, USA 2004, 387-400

Cascino I, Fiucci G, Papoff G, Ruberti G (1995): Three functional soluble forms of the human apoptosis- inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. J Immunol <u>154</u>, 2706-2713

Chakrabandhu K, Herincs Z, Huault S, Dost B, Peng L, Conchonaud F, Marguet D, He HT, Hueber AO (2006): Palmitolyation is required for efficient Fas cell death signaling. EMBO J <u>26</u>, 209-220

Choi C, Benviste EN (2004): Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses. Brain Res Brain Res Rev <u>44</u>, 65-81

Connolly K, Cho YH, Duan R, Fikes J, Gregorio T, La-Fleur DW, Okoye Z, Salcedo TW, Santiago G, Ullrich S, Wei P, Windle K, Wong E, Yao XT, Zhang YQ, Zheng G, Moore PA (2001): In vivo inhibition of Fas ligand- mediated killing by TR6, a Fas ligand decoy receptor. J Pharmacol Exp Ther <u>298</u>, 25-33

Cross AH, Keeling RM, Goorha S, San M, Rodi C, Wyatt PS, Manning PT, Misko TP (1996): Inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity correlate with disease activity in murine experimental allergic encephalomyelitis. J Neuroimmunol <u>71</u>, 145-153

Cross AH, Manning PT, Keeling RM, Schmidt RE, Misko TP (1998): Peroxynitrite formation within the central nervous system in active multiple sclerosis. J Neuroimmunol <u>88(1)</u>, 45-56

De Angelis DA, Braun PE (1996): 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase binds to actin-based cytoskeletal elements in an isoprenylation-independent manner. J Neurochem. <u>67(3)</u>, 943-51

Delarasse C, Daubas P, Mars L, Vizler C, Litzenburger T, Iglesias A, Bauer J, Della Gaspera B, Schubart A, Decker L, Roussel G, Dierich A, Amor S, Dautigny A, Liblau R, Pham-Dinh D (2003): Myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-deficient mice reveal lack of tolerance to MOG in wild-type mice. J Clin Invest <u>112</u>, 544-553

Desbarats J, Newell MK (2000): Fas engagement accelerates liver regeneration after partial hepatectomy. Nat Med <u>6</u>, 920-923

Desbarats J, Birge RB, Mimouni-Rongy M, Weinstein DE, Palerme JS, Newell MK (2003): Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. Nat Cell Biol <u>5</u>, 118-125

D'Souza SD, Bonetti B, Balasingam V, Cashman NR, Barker PA, Troutt AB, Raine CS, Antel JP (1996): Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death. J Exp Med 184, 2361-2370

Filipovic R, Rakic S, Zecevic N (2002): Expression of Golli proteins in adult human brain and in multiple sclerosis lesions. J Neuroimmunol. <u>127</u>, 1-12

Hilliard B, Wilmen A, Seidel C, Liu TT, Göke R, Chen Y (2001): Roles of TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. J Immunol <u>166</u>, 1314-1319

Höff C, Göttingen: Mündliche Mitteilung 2006.

Hövelmeyer N, Hao Z, Kranidioti K, Kassiotis G, Buch T, Frommer F, von Hoch L, Kramer D, Minichiello L, Kollias G, Lassmann H, Waisman A (2005): Apoptosis of oligodendrocytes via Fas and TNF-R1 is a key event in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol <u>175</u>, 5875-5884

Hughes SM, Lillien LE, Raff MC, Rohrer H, Sendtner M (1988): Ciliary neurotrophic factor induces type-2 astrocyte differentiation in culture. Nature <u>335</u>, 70-73

Jack C, Antel J, Brück W, Kuhlmann T (2007): Contrasting potential of nitric oxide and peroxynitrite to mediate oligodendrocyte injury in multiple sclerosis. Glia <u>55</u>, 926-934

Jenkins M, Keir M, McCune JM (2000): A membrane-bound Fas decoy receptor expressed by human thymocytes. J Biol Chem <u>275</u>, 7988-7993

Jurewicz A, Matysiak M, Andrzejak S, Selmaj K (2006): TRAIL-induced death of human adult oligodendrocytes is mediated by JNK pathway. Glia <u>53</u>, 158-166

Kimberley FC, Screaton GR (2004): Following a TRAIL: Update on a ligand and its five receptors. Cell Res <u>14(5)</u>, 359-372

Kimura M, Sato M, Akatsuka A, Saito S, Ando K, Yokoyama M, Katsuki M (1998): Overexpression of a minor component of myelin basic protein isoform (17.2 kDa) can restore myelinogenesis in transgenic shiverer mice. Brain Res <u>785</u>, 245-252

Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A et al (2000): Apo2L/TRAIL dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. Immunity <u>12</u>, 611-620

Klugmann M, Schwab MH, Puhlhofer A, Schneider A, Zimmermann F, Griffiths IR, Nave KA (1997): Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. Neuron <u>18(1)</u>, 59-70

Knowles RG, Moncada S (1994): Nitric oxide synthases in mammals. Biochem J 298, 249-258

Lassmann H, Bartsch U, Montag D, Schachner M (1997): Dying- back oligodendrogliopathy: A late sequel of myelin-associated glycoprotein deficiency. Glia <u>19</u>, 104-110

Lee J, O'Neill RC, Park MW, Gravel M, Braun PE (2006): Mitochondrial localization of CNP2 is regulated by phosphorylation of the N-terminal targeting signal by PKC: implications of a mitochondrial function for CNP2 in glial and non-glial cells. Mol Cell Neurosci <u>31(3)</u>, 446-62

Lee KH, Feig C, Tchikov V, Schickel R, Hallas C, Schutze S, Peter ME, Chan AC (2006): The role of receptor internalization in CD95 signaling. EMBO J <u>25</u>, 1009-1023

Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998): Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. Cell <u>94</u>, 491-501

Li J, Baud O, Vartanian T, Volpe JJ, Rosenberg PA (2005): Peroxynitrite generated by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. Proc Natl Acad Sci U S A, <u>102(28)</u>, 9936-9941.

Li W, Maeda Y, Ming X, Cook S, Chapin J, Husar W, Dowling P (2002): Apoptotic death following Fas activation in human oligodendrocyte hybrid cultures. J Neurosci Res <u>69</u>, 189-196

Liu JS, Zhao ML, Brosnan CF, Lee SC (2001): Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in multiple sclerosis lesions. Am J Pathol <u>158</u>, 2057-2066

Lizasoain I, Moro MA, Knowles RG, Darley-Usmar V, Moncada S (1996): Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose. Biochem J <u>314</u>, 877-880

Louis JC, Magal E, Muir D, Manthorpe M, Varon S (1992): CG-4, a new bipotential glia cell line from rat brain, is capable of differentiating in vitro into either mature oligodendrocytes or type-2 astrocytes. J Neurosci Res <u>31</u>, 193-204

Lublin FD, Reingold SC (1996): Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. Neurology <u>46(4)</u>,907-11

Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000): Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. Ann Neurol <u>47</u>, 707-717

Ludwin SK, Johnson ES (1981): Evidence of a "dying-back" gliapathy in demyelinating disease. Ann Neurol <u>9</u>, 301-305

Lünemann JD, Waiczies S, Ehrlich S, Wendling U, Seeger B, Kamradt T, Zipp F (2002): Death ligand TRAIL induces no apoptosis but inhibits activation of human (auto)antigen-specific T cells. J Immunol <u>168</u>, 4881-4888

Masure S, Haefner B, Wesselink JJ, Hoefnagel E, Mortier E, Verhasselt P, Tuytelaars A, Gordon R, Richardson A (1999): Molecular cloning, expression and characterization of the human serin/threonin kinase Akt-3. Eur J Biochem <u>265(1)</u>, 353-60

Matysiak M, Jurewicz A, Jaskolski D, Selmaj K (2002): TRAIL induces death of human oligodendrocytes isolated from adult brain. Brain <u>125</u>, 2469-2480

Mitrovic B, Ignarro LJ, Montestruque S, Smoll A, Merrill JE (1994): Nitric oxide as a potential pathological mechanism in demyelination: its differential effects on primary glial cells in vitro. Neuroscience 61(3), 575-585

Montag D, Giese KP, Bartsch U, Martini R, Lang Y, Bluthmann H, Karthigasan J, Kirschner DA, Wintergerst ES, Nave KA, Zielasek J, Toyka KV, Lipp H, Schachner M (1994): Mice deficient for the myelin-associated glycoprotein show subtle abnormalities in myelin. Neuron 13, 229-246

Nakano H, Omura S (2009): Chemical biology of natural indolocarbazole products: 30 years since the discovery of staurosporine. J Antibiot (Tokyo) <u>62(1)</u>, 17-26

Oleszak EL, Zaczynska E, Bhattacharjee C, Butunoi C, Ledigo A, Katsetos C (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 <u>5</u>, 438-445

Park SM, Schickel R, Peter ME (2005): Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules. Curr Opin Cell Biol <u>17</u>, 610-616

Peet GW, Li J (1999): IkappaB kinases alpha und beta show a random sequential kinetic mechanism and are inhibited by staurosporine and quercetin. J Biol Chem <u>274(46)</u>, 32655-61

Peter ME, Budd RC, Desbarats J, Hedrick SM, Hueber AO, Newell MK, Owen LB, Pope RM, Tschopp J, Wajant H, Wallach D, Wiltrout RH, Zörnig M, Lynch DH (2007): The CD95 Receptor: Apoptosis Revisited. Cell <u>129</u>, 447-450

Prat A, Antel J (2005): Pathogenesis of multiple sclerosis. Curr Opin Neurol <u>18(3)</u>, 225-30

Rejdak K, Eikelenboom MJ, Petzold A, Thompson EJ, Stelmasiak Z, Lazeron RH, Barkhof F, Polman CH, Uitdehaag BM, Giovannoni G (2004): CSF nitric oxide metabolites are associated with activity and progression of multiple sclerosis. Neurology <u>63</u>, 1439-1445

Richter-Landsberg C, Heinrich M (1996): OLN-93: A new permanent oligodendroglial cell line derived from primary rat brain glial cultures. J Neurosci Res <u>45</u>, 161-173

Scaffidi C, Schmitz I, Zha J, Korsmeyer SJ, Krammer PH, Peter ME (1999): Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. J Biol Chem 274(32),22532-8

Schindler P, Luu B, Sorokine O, Trifilieff E, Van Dorsselaer A (1990): Developmental Study of proteolipids in bovine brain: a novel proteolipid and DM-20 appear before proteolipid protein (PLP) during myelination. J Neurochem <u>55(6)</u>, 2079-85

Schneider P, Olson D, Tardivel A, Browning B, Lugovskoy A, Gong D, Dobles M, Hertig S, Hofmann K, Van Vlijmen H, Hsu YM, Burkly LC, Tschopp J, Zheng TS (2003): Identification of a new murine tumor necrosis factor receptor locus that contains two novel murine receptors for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). J Biol Chem <u>278(7)</u>, 5444-54

Skoff RP, Saluja I, Bessert D, Yang X (2004 a): Analyses of proteolipid protein mutants show levels of proteolipid protein regulate oligodendrocyte number and cell death in vitro and in vivo. Neurochem Res <u>29(11)</u>, 2095-2103

Skoff RP, Bessert DA, Cerghet M, Franklin MJ, Rout UK, Nave K-A, Carlock L, Ghandour MS, Armant DR (2004 b): The myelin proteolipid protein modulates apoptosis in neural and non-neural tissues. Cell Death Differ <u>11</u>, 1247-1257

Song K, Chen Y, Goke R, Wilmen A, Seidel C, Goke A, Hilliard B (2000): Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression. J Exp Med <u>191</u>, 1095-1103

Stepczynska A, Lauber K, Engels IH, Janssen O, Kabelitz D, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K (2001): Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation. Oncogene 20(10), 1193-202

Storch MK, Stefferl A, Brehm U, Weissert R, Wallstrom E, Kerschensteiner M, Olsson T, Linington C, Lassmann H (1998): Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. Brain Pathol <u>8</u>, 681-694

Tamm C, Robertson JD, Sleeper E, Enokson M, Emgard M, Orrenius S, Ceccatelli S (2004): Differential regulation of the mitochondrial and death receptor pathways in neural stem cells. Eur J Neurosci <u>19</u>, 2613-2621

Touil T, Deloire-Grassin MSA, Vitek MP, Petry KG, Brochet B (2001): In vivo damage of CNS myelin and axons induced by peroxynitrite. Neuroreport <u>12</u>, 3637-3644

Van der Veen RC, Hinton DR, Incardonna F, Hofman FM (1997): Extensive peroxynitrite activity during progressive stages of central nervous system inflammation. J Neuroimmunol  $\underline{77(1)}$ , 1-7

Walsh K, Sata M (1999): Negative regulation of inflammation by Fas ligand expression on the vascular endothelium. Trends Cardiovasc Med <u>9</u>, 34-41

Weiss MD, Hammer J, Quarles RH (2000): Oligodendrocytes in aging mice lacking myelinassociated glycoprotein are dystrophic but not apoptotic. J Neurosci Res <u>62</u>, 772-780

Werner HB, Kuhlmann K, Shen S, Uecker M, Schardt A, Dimova K, Orfaniotou F, Dhaunchak A, Brinkmann BG, Möbius W, Guarente L, Casaccia-Bonnefil P, Jahn O, Nave KA (2007): Proteolipid protein is required for transport of sirtuin 2 into CNS myelin. J Neurosci <u>27(29)</u>, 7717-30

Yang X, Skoff RP (1997): Proteolipid protein regulates the survival and differentiation of oligodendrocytes. J Neurosci <u>17</u>, 2056-2070

Zhu B, Luo L, Chen Y, Paty DW, Cynader MS (2002): Intrathecal Fas ligand infusion strengthens immunoprivilege of central nervous system and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol <u>169(3)</u>, 1561-9

Zuliani C, Kleber S, Klussmann S, Wenger T, Kenzelmann M, Schreglmann N, Martinez A, del Rio JA, Soriano E, Vodrazka P et al (2006): Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo-1). Cell Death Differ <u>13</u>, 31-40
## **Danksagung**

## Ich danke...

- Herrn Prof. Dr. med. W. Brück für die Vergabe des Themas und die Möglichkeit, in seiner Abteilung arbeiten zu dürfen.
- Frau Prof. Dr. med. Tanja Kuhlmann f
  ür ihre hervorragende Betreuung inklusive schneller Korrekturen.
- ◆ Christiane Höff, deren Ergebnisse den Grundstein meiner Arbeit bilden.
- ✤ Jasmin Held, für alles, was sie mir beigebracht hat.
- Amke Hesse für die schöne und lehrreiche gemeinsame Zeit in der Neuropathologie.
- allen anderen Doktoranden und Mitarbeitern der Abteilung, die mich so freundlich unterstützt haben.