

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

Die Auswirkung von verschiedenen Proteasom-Inhibitoren auf die
Wallersche Degeneration peripherer Nerven *in vitro* und *in vivo*

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

vorgelegt von
Stefan Christoph Denninger
aus Bremen

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

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

II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Lingor

III. Berichterstatter: Prof. Dr. med. dent. Mausberg (Promotor-Vertretung)

Tag der mündlichen Prüfung: 04.09.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Wallersche Degeneration	1
1.1.1	Begriffsklärung und allgemeiner Ablauf.....	1
1.1.2	Beteiligung der Makrophagen	3
1.1.3	Beteiligung der Schwann-Zellen.....	5
1.2	Proteinabbau.....	6
1.3	Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS).....	8
1.3.1	Aufbau des Proteasoms	8
1.3.2	Ubiquitin	10
1.3.3	Funktionen des UPS	10
1.3.4	Proteasom-Inhibition	11
1.3.5	Charakteristika der Proteasom-Inhibitoren MG132 und Lactacystin ...	12
1.3.6	Proteasom-Inhibitoren im klinischen Einsatz.....	12
1.4	<i>In-vitro</i> -Modell der Wallerschen Degeneration	13
1.5	Ziel der Arbeit.....	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Versuchstiere	14
2.2	<i>In-vitro</i> -Methode	14
2.2.1	Vorbereitung.....	14
2.2.2	Präparation der Makrophagen.....	14
2.2.3	Präparation der Ischiasnerven	15
2.2.4	Behandlung der Zellkulturen	15
2.2.5	Präparation der Nervensegmente für die Lichtmikroskopie.....	17
2.3	<i>In-vivo</i> -Axotomie.....	20
2.3.1	Applikation der Inhibitoren.....	20
2.3.2	Zusammensetzung der Inhibitor-Lösungen.....	21
2.4	Morphometrie	22
2.5	Statistik.....	23
3	Ergebnisse	24

3.1	Wallersche Degeneration <i>in vitro</i>	24
3.1.1	Erhaltenes Myelin und erhaltene Axone vom zweiten bis achten Kulturtag	26
3.1.2	Anzahl und Größe der Makrophagen vom zweiten bis achten Kulturtag 27	
3.1.3	Menge des phagozytierten Myelins in den Makrophagen vom zweiten bis achten Kulturtag.....	29
3.2	Wallersche Degeneration <i>in vitro</i> nach Verwendung von Proteasom-Inhibitoren	30
3.2.1	Erhaltenes Myelin und erhaltene Axone <i>in vitro</i> nach Verwendung von Proteasom-Inhibitoren	31
3.2.2	Anzahl und Größe der Makrophagen <i>in vitro</i> nach Verwendung von Proteasom-Inhibitoren	32
3.2.3	Menge des phagozytierten Myelins <i>in vitro</i> nach Verwendung von Proteasom-Inhibitoren	34
3.3	Wallersche Degeneration <i>in vivo</i> nach Anwendung von Proteasom-Inhibitoren	36
3.3.1	Myelin- und Axonparameter <i>in vivo</i> nach Applikation von Proteasom-Inhibitoren.....	37
3.3.2	Makrophagenparameter <i>in vivo</i> nach Applikation von Proteasom-Inhibitoren.....	39
4	Diskussion	41
4.1	Validität des <i>in-vitro</i> -Modells.....	41
4.2	Zeitverlauf der Wallerschen Degeneration	41
4.3	Der protektive Einfluss der Proteasom-Inhibitoren auf Axone während der Wallerschen Degeneration <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	43
4.4	Der protektive Einfluss der Proteasom-Inhibitoren auf Myelin und Schwann-Zellen während der Wallerschen Degeneration	48
4.5	Der Einfluss der Proteasom-Inhibitoren auf Makrophagen während der Wallerschen Degeneration.....	50
4.6	Proteasom-Inhibitoren in der klinischen Medizin	55
5	Zusammenfassung.....	61

6	Anhang	63
6.1	Abkürzungen	63
6.2	Tabellen	65
7	Literaturverzeichnis	82

1 Einleitung

1.1 Wallersche Degeneration

1.1.1 Begriffsklärung und allgemeiner Ablauf

Die Wallersche Degeneration ist eine elementare Reaktionsweise des Nervensystems und bezeichnet den Untergang des distalen Axonanteils nach Kontinuitätsunterbrechung des Axons. Dabei ist es gleichgültig, wie diese Unterbrechung zustande gekommen ist (chemisch, toxisch oder physikalisch). In dem in dieser Arbeit beschriebenen Modell wird die Nervenfasern mechanisch durchtrennt und mit ihr die enthaltenen Axone. Dieser Vorgang wird als Neurotomie bzw. Axotomie bezeichnet. Benannt wurde diese Form der Neurodegeneration im Jahre 1850 nach ihrem Erstbeschreiber Augustus Waller, einem englischen Physiologen (Waller 1850).

Betroffen von der Wallerschen Degeneration sind Axone und die sie umgebenden Myelinscheiden sowie die myelinbildenden Schwann-Zellen des peripheren Nervensystems (PNS). Durch das Zusammenbrechen ihrer Integrität verliert die Nervenfasern schließlich die Kapazität zur Weiterleitung von Aktionspotentialen.

Eine Kontinuitätsunterbrechung der Nervenfasern führt innerhalb der ersten Stunden zu einem intraaxonalen Kalziumanstieg. Dadurch werden Proteasen aktiviert, die in der Folge Zytoskelett-Proteine abbauen (Griffin und Hoffman 1993). An den Schmidt-Lantermannschen Einkerbungen und am Perikaryon der Schwann-Zellen beginnt die Fragmentierung der Myelinscheiden (Griffin und Hoffman 1993). Die Myelinscheiden brechen in kurze Stücke und erscheinen nun als die charakteristischen Myelinovoide. Die myelinbildenden Schwann-Zellen vermindern ihre mRNA-Synthese für Myelin-Proteine und ziehen ihr Zytoplasma aktiv vom Axon zurück (Beuche und Friede 1984; Thomson et al. 1991; Griffin und Hoffman 1993).

Die degenerierenden Myelin-Ovoide werden später zum größten Teil von eingewanderten hämatogenen Makrophagen phagozytiert (Beuche und Friede 1984). Bis dahin übernehmen die Schwann-Zellen die Fragmentierung des Myelins und wandeln dieses in die beschriebenen Ovoide um (Stoll et al. 1989b). Die Makrophagen-Invasion beginnt zwischen dem zweiten und vierten Tag nach Axotomie und ist spezies- sowie altersabhängig (Stoll et al. 1989b; Stoll et al. 1989a; Brück 1997). In den ersten Tagen nach Durchtrennung des Nervs kann man eine

Proliferation der Schwann-Zellen beobachten. Die Schwann-Zellen bilden in späteren Phasen die sog. Hanken-Büngner-Bänder. Diese dienen als Basis für eine Wiederverbindung der getrennten Nervenanteile (Griffin und Hoffman 1993). Die einzelnen Abläufe bei der Wallerschen Degeneration sind in Abbildung 1 gezeigt.

Abfolge der zellulären Ereignisse bei der peripheren Wallerschen Degeneration

Unterbrechung des Axons durch traumatische, toxische, degenerative oder metabolische Schädigungen

Innerhalb der ersten 24 Stunden:

- Intraaxonaler Kalziumanstieg
- Kalzium-abhängige axonale Degeneration mit Auseinanderbrechen des Zytoskeletts
- Verlust von Aktionspotentialen
- Rückzug von Schwann-Zell-Zytoplasma von der Myelinscheide
- Herunterregulation der Myelin-mRNA-Synthese von Schwann-Zellen
- Bildung von Myelin-Ovoiden

Tag 1 – 4:

- Intensive Proliferation von Schwann-Zellen
- Einwanderung von im Blut zirkulierenden (hämatogenen) Phagozyten
- Oponierung des degenerierenden Myelins durch aktivierte Komplementfaktoren ohne Ausbildung von „Membran-Angriffs-Komplexen“

Tag 3 – 8:

- Entfernung des degenerierenden Myelins durch hämatogene oder residente Makrophagen und Schwann-Zellen

Tag 10 – 20 und später:

- Bildung von Hanken-Büngner-Bändern durch Schwann-Zellen

Abbildung 1: Abfolge der zellulären Ereignisse bei der peripheren Wallerschen Degeneration im peripheren Nervensystem (nach Brück 1997)

1.1.2 Beteiligung der Makrophagen

Lange Zeit wurden viele verschiedene Zelltypen für die Myelin-Degradation während der Wallerschen Degeneration verantwortlich gemacht. Hiefür wurden unter anderem Schwann-Zellen, residente und hämatogene Makrophagen, endoneurale Fibroblasten und auch mesenchymale Zellen in Betracht gezogen (Schubert und Friede 1981). 1984 konnten Beuche und Friede zeigen, dass Makrophagen die Haupteffektorzellen der Myelinphagozytose während der Wallerschen Degeneration sind (Beuche und Friede 1984).

Makrophagen sind die am weitesten differenzierten Zellen des Mononukleären Phagozytensystems (MPS). Dieses System umfasst Monoblasten und Promonozyten im Knochenmark, periphere Blutmonozyten, sowie Gewebemakrophagen. Die Monozyten verlassen das Knochenmark und zirkulieren anschließend ca. 60 – 70 Stunden im peripheren Blut. Mit 15 – 20 μm sind sie dort die größten Zellen. Nach Migration in bestimmte Gewebe oder Organe differenzieren sie dort zu residenten Gewebemakrophagen. Diese Population ist nicht konstant, sondern wird ständig mit aus dem Blut rekrutierten Makrophagen erneuert. Im zentralen Nervensystem (ZNS) hingegen formieren die Mikroglia-Zellen bereits in der frühen Phylogenese eine stabile Zellpopulation, welche sich nur zu einem geringen Teil durch Zellteilung regeneriert (Prinz und Mildner 2011). Zentrale Funktionen der Makrophagen sind Phagozytose, Stimulation und Regulation von Immunreaktionen, zytotoxische Aktivität, sowie die Sekretion von verschiedenen Zytokinen, Enzymen, Arachidonsäure-Metaboliten, Sauerstoff-Radikalen, aber auch Wachstumsfaktoren, wie dem Nervenwachstumsfaktor NGF. Außerdem spielen sie eine Rolle bei der Antigen-Präsentation sowie bei der Stimulation und Regulation von Reparaturvorgängen (Coleman 1986; Nathan 1987; Perry et al. 1987; Gordon et al. 1988).

Wie bereits erwähnt, zeigten Beuche und Friede 1984, dass Makrophagen die Haupteffektorzellen der Myelinphagozytose während der Wallerschen Degeneration im peripheren Nerven sind (Beuche und Friede 1984). Sie untersuchten die Ischiasnerven von Mäusen. Diese wurden in Kammern mit Poren verschiedener Größe (0,22 μm und 5,0 μm) gebracht. Die Kammern wurden anschließend Mäusen intraperitoneal implantiert. Diffusionskammern mit einer Porengröße von 0,22 μm sind für alle Körperflüssigkeiten durchlässig, jedoch nicht für Zellen. Die in dieser Gruppe untersuchten Nervensegmente zeigten zwar eine Ballonierung und kollabierte Myelinscheiden, aber keinerlei Anzeichen für Phagozytose. Nur in der Gruppe mit Kammern der Porengröße von 5 μm war eine

Leukozyteninvasion mit anschließender Phagozytose und Myelinabbau zu beobachten. Unter den Leukozyten waren neben den phagozytierenden Makrophagen auch Zellen, die nicht an der Myelinphagozytose beteiligt waren. Dies waren Mastzellen, Granulozyten und Lymphozyten (Beuche und Friede 1984, 1986).

Ihre Hypothese, dass Makrophagen während der Wallerschen Degeneration das Myelin phagozytieren, konnten Beuche et al. und Scheidt et al. in den darauf folgenden Jahren durch die immunzytochemische Identifikation von Mac-1 und Fc-Rezeptor-positiven Zellen bestätigen (Beuche und Friede 1986; Scheidt et al. 1986; Scheidt und Friede 1987).

Zur Klärung der Frage, ob nun residente oder eingewanderte, hämatogene Makrophagen das Myelin abbauen, wurden weitere Experimente durchgeführt. Zur selektiven Zerstörung von Makrophagen *in vivo* entwickelte van Rooijen 1989 eine Technik, die es fortan ermöglichte die komplexen Funktionen der Makrophagen genauer zu studieren (van Rooijen 1989). Nach Injektion von Dichlormethylen-Diphosphonat (Cl₂MDP)-haltigen Liposomen kam es zu deren Phagozytose durch Makrophagen. Durch eine phospholipasevermittelte Disruption der Liposomenmembran wurde Cl₂MDP intrazellulär freigesetzt. Dies führte zur selektiven Zerstörung der Makrophagen und einer signifikant verminderten Myelinphagozytose auf Grund einer verminderten Makrophageninvasion in die Nervenstümpfe (van Rooijen 1989; van Rooijen und Sanders 1994). Mit Hilfe dieser Technik konnte nachgewiesen werden, dass nicht residente, sondern eingewanderte, hämatogene Makrophagen die Myelinphagozytose im Rahmen der Wallerschen Degeneration *in vivo* leisten.

Makrophagen verfügen über zwei grundsätzlich verschiedene Basismechanismen der Phagozytoseaktivierung. Zum einen gibt es den Opsonin-abhängigen Weg über Fc- oder Komplementrezeptoren. Zum anderen gibt es Opsonin-unabhängige Wege über verschiedene Kohlehydrat-Rezeptoren (Sharon 1984). Brück und Friede konnten zeigen, dass es ohne den Serum-Komplementfaktor C3 zu keiner Invasion in die degenerierenden Nerven kam (Brück und Friede 1991). C3-Antikörper reduzierten sowohl die Rekrutierung von Makrophagen als auch deren Myelinphagozytose (Lunn et al. 1989; Brück und Friede 1991). Bereits 1990 konnte nachgewiesen werden, dass Makrophagen ihre Fähigkeit zur Myelinphagozytose *in vitro* komplett verlieren, wenn sie dem Enzym L-fucosidase ausgesetzt wurden (Brück und Friede 1990a). Es wurde angenommen, dass dies durch eine spezifische Interaktion dieses Enzyms mit einem Zellmembranrezeptor bedingt sein könnte (Brück 1997).

Hämatogene Makrophagen spielen also eine essenzielle Rolle in der Myelinaufnahme während der Wallerschen Degeneration. Sie sind die Haupteffektorzellen des Myelinabbaus.

1.1.3 Beteiligung der Schwann-Zellen

Schwann-Zellen sind die Gliazellen des peripheren Nervensystems. Sie umhüllen das periphere Axon in seinem Verlauf und bilden bei Wirbeltieren eine elektrisch isolierende Schicht um das Axon.

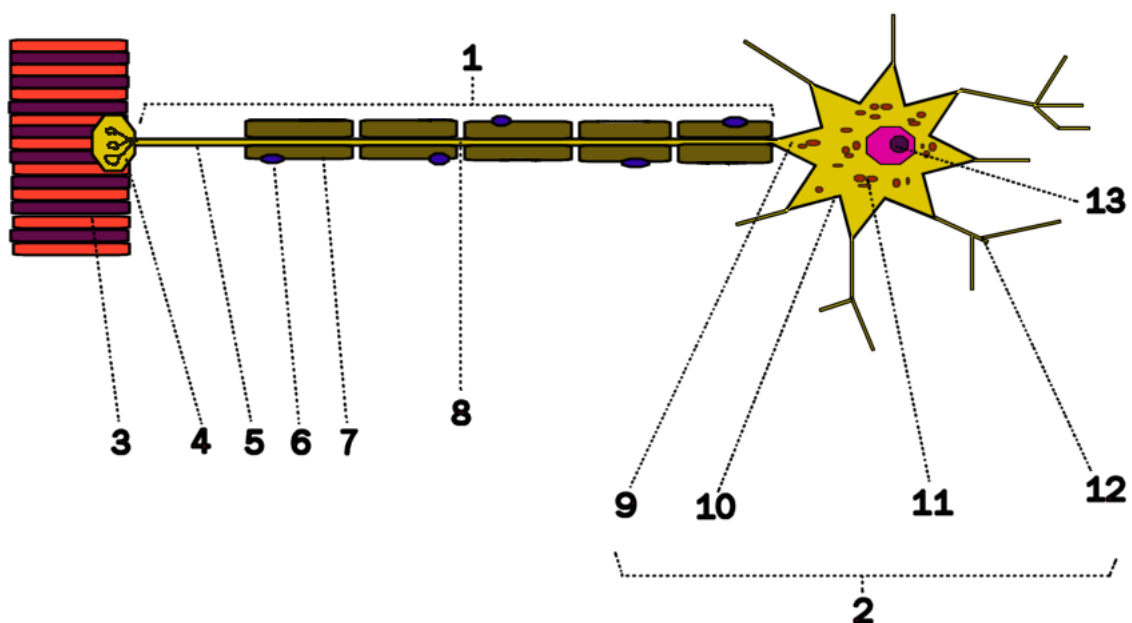


Abbildung 2: vereinfachte Darstellung eines peripheren, motorischen Neurons (modifiziert nach Silbermagl und Despopoulos 2003, S. 43).

Legende: 1. Axon (Neurit), 2. Perikaryon oder Zelleib des Neurons, 3. quergestreifte Skelettmuskelfasern, 4. motorische Endplatte, 5. marklose Nervenfasern, 6. Zellkern einer Schwann-Zelle, 7. Myelinscheide, 8. Ranvier-Schnürring, 9. Axonhügel (Ursprungskegel des Neurits), 10. Plasmamembran des Perikaryons, 11. Nissl-Schollen (endoplasmatisches Retikulum) im Plasma des Neurons, 12. Dendriten, 13. Zellkern mit Nucleolus

Diese Isolation wird durch eine mehrfache Umwicklung des Axons mit der Plasmamembran (Lipid-Doppelschicht) der Schwann-Zellen erreicht. Dadurch entsteht die so genannte Myelinscheide. Entlang eines Axons kann es zwischen benachbarten Schwann-Zellen zu Unterbrechungen der Myelinscheide kommen. Diese Unterbrechungen werden Ranvier-Schnürringe, die dazwischen liegenden Abschnitte Internodien genannt. Die Schnürringe finden sich im Abstand von ca. 0,2 – 1,5 mm. Im Bereich dieser kurzen Einschnürungen der

Myelinscheide kommt es zur saltatorischen Erregungsleitung. Das Aktionspotential wird nicht kontinuierlich über die Länge des Axons geleitet, sondern „springt“ von Schnürring zu Schnürring.

Während der Wallerschen Degeneration sind auch die Schwann-Zellen am Myelinabbau beteiligt (Stoll et al. 1989b; Fernandez-Valle et al. 1995). Wie bereits in Kapitel 1.1.1 erwähnt, wurde gezeigt, dass sie nach Axotomie proliferieren und Myelinovoide bilden (Clemence et al. 1989; Komiyama et al. 1991; Liu HM et al. 1995). Myelinovoide enthalten degradierte Axone und Myelin. Sie sind somit ein Zeichen für den Myelinabbau (Lee HK et al. 2009). Außerdem konnten Azzarelli et al. 1993 nachweisen, dass Schwann-Zellen während der Wallerschen Degeneration Antigene ausbilden, die sonst nur auf der Oberfläche von Gewebemakrophagen gefunden wurden (Azzarelli et al. 1993). Die Arbeitsgruppe um Reichert et al. zeigte 1994, dass Schwann-Zellen nach Nervenverletzung zwei Makrophagen-Phänotypen ausbilden können (Reichert et al. 1994). Unter normalen Bedingungen scheint ihr Beitrag zum Myelinabbau aber gering zu sein (Brück 1997).

Verletzungen eines peripheren Nervs führen neben der axonalen Degeneration auch zu reaktiven Veränderungen an der Schwann-Zelle. Jessen und Mirsky nannten diese Veränderungen Dedifferenzierung (Jessen und Mirsky 2008, 2010). Zusammengefasst werden mit dieser Terminologie eine Herunterregulation der Myelin-Gen-Expression und die Hochregulation von einigen für junge Schwann-Zellen typischen Genen. Beispielhaft seien hier das Gen für den *Nerve growth factor* (NGF)-Rezeptor (p75) und das *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) genannt (Lemke und Chao 1988; Lee HK et al. 2009). Die Induktion des p75-Rezeptors scheint für die Remyelinisierung von regenerierenden Axonen essenziell zu sein (Tomita et al. 2007).

1.2 Proteinabbau

Makrophagen und in geringerem Umfang auch Schwann-Zellen sind also für den Myelinabbau verantwortlich. Myelinabbau und Nervendegeneration bedeuten immer auch einen erheblichen Anteil an intrazellulärem Proteinabbau. Deshalb sollen im Folgenden die grundsätzlichen Vorgänge des Proteinabbaus kurz beschrieben werden.

Der intrazelluläre Proteinabbau, also die Proteolyse im Allgemeinen, erfolgt durch sog. Peptidasen. Diese sind Hydrolasen, welche in substratspezifische Exopeptidasen und nicht substratspezifische Endopeptidasen unterteilt werden. Exopeptidasen bauen das Substrat vom C- oder N-Terminus her ab und werden folglich als Carboxy- oder Amino-peptidasen

bezeichnet. Endopeptidasen hingegen spalten Peptidbindungen innerhalb der Aminosäurekette, ohne damit an einem Ende der Kette beginnen zu müssen.

Der intrazelluläre Proteinabbau kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen (Ciechanover 2005). Zum einen gibt es einen ATP-unabhängigen Weg über das Lysosom, die andere Möglichkeit führt zum Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und benötigt ATP.

Die lysosomale Proteolyse wird auch als Autophagie bezeichnet. Lysosomen sind Zellorganellen in eukaryotischen Zellen. Sie bestehen aus einer Ansammlung verschiedener hydrolysierender Enzyme (z.B. Proteasen, Nukleasen, Lipasen), welche von einer Biomembran umgeben sind (De Duve und Wattiaux 1966). Innerhalb dieser Membran herrscht ein pH von 4,5-5. Nur in diesem sauren Milieu erreichen die enthaltenen Enzyme eine hohe Aktivität. Sollte das Lysosom aus irgendeinem Grund zerstört werden, so wären die ins Zytosol gelangten Enzyme auf Grund des dort herrschenden pH-Wertes inaktiv. Dadurch ist die Zelle in gewissem Umfang vor einer Schädigung durch die lysosomalen Enzyme geschützt (Maggi und Hart 1973).

Das zur Autophagie bestimmte Substrat wird den Lysosomen über drei verschiedene Wege zugeführt. Bei der Makroautophagie formt sich innerhalb des Zytosols ein von einer Lipiddoppelmembran umgebenes Vesikel, welches mit dem Lysosom verschmelzen kann und so das enthaltene Substrat ins Lysosom freisetzt. Mikroautophagie hingegen bezeichnet eine Einstülpung der lysosomalen Membran um das Substrat herum. Ein Vesikel aus einer Lipiddoppelmembran ist hier also nicht nötig bzw. wird letztere direkt vom Lysosom gestellt. Die dritte Möglichkeit der Substratbereitstellung wird durch Chaperone vermittelt. Chaperone im Zytosol der Zelle erkennen hierbei Substratproteine und bringen sie direkt an die Oberfläche der Lysosomen. Dort bindet das Protein an einen lysosomalen Rezeptor, der daraufhin einen Translokationskomplex bildet und schließlich das Substrat ins Lumen des Lysosoms überführt (Wong und Cuervo 2010).

Wie bereits erwähnt, wird neben dem Lysosom eine ATP-abhängige Form der Proteolyse durch das UPS realisiert. Dieses System wird detailliert in Kapitel 1.3 beschrieben.

Bisher ging man davon aus, dass die beiden proteolytischen Systeme Lysosom und Proteasom ihren Anteil an der Proteolyse unabhängig voneinander verrichten. Neuere Erkenntnisse weisen aber darauf hin, dass es durchaus Überschneidungen zwischen lysosomaler Autophagie und dem UPS gibt. So konnte gezeigt werden, dass Ubiquitin auch eine Rolle bei der lysosomalen Autophagie spielt. Unter bestimmten Umständen werden ubiquitinierte Substrate, die normalerweise vom UPS abgebaut werden, auch durch lysosomale Autophagie abgebaut (Fuertes et al. 2003b; Fuertes et al. 2003a; Rubinsztein 2007; Yue 2007; Geetha und

Wooten 2008; Bedford et al. 2009). Außerdem wurde gezeigt, dass die Makroautophagie hochreguliert wurde, wenn man das UPS blockierte. Dies wird als eine Art Kompensationsmechanismus angesehen, um der Zelle den Abbau von sich anhäufenden UPS-Substraten zu ermöglichen (Ding et al. 2007; Hoyer-Hansen und Jaattela 2007; Pandey et al. 2007). Die Arbeitsgruppe um Korolchuk et al. konnte 2009 zeigen, dass eine verminderte lysosomale Autophagieleistung zu einer ebenfalls verminderten Degradation von gewissen UPS-Substraten führte (Korolchuk et al. 2009b; Korolchuk et al. 2009a, 2010). Qiao und Zhang machten 2009 ähnliche Beobachtungen (Qiao und Zhang 2009). Anscheinend sind die beiden proteolytischen Systeme UPS und Lysosom gemeinsam für die zelluläre Proteinhomeostase verantwortlich (Korolchuk et al. 2010; Wong und Cuervo 2010). Näheres zur Interaktion der beiden Systeme und den Auswirkungen von Proteasom-Inhibitoren auf die Proteolyse soll detailliert in Kapitel 4.5 diskutiert werden.

1.3 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

1.3.1 Aufbau des Proteasoms

Das Proteasom ist ein ubiquitäres Zellprotein. Es macht ca. 1% der zellulären Gesamtproteinmasse aus und enthält multiple, katalytische Enzyme, welche für den Abbau der meisten Zellproteine verantwortlich sind (Hendil 1988). Eukaryonten verfügen über ein 26S-Proteasom, das aus einer 20S- und zwei 19S-Untereinheiten besteht. Diese 19S-Untereinheiten werden auch PA700-Proteasomenaktivator genannt (DeMartino et al. 1996). Die 20S-Untereinheit ist eine zylindrische Struktur aus vier aufeinander gestapelten Ringen. Diese Ringe bestehen jeweils wiederum aus 7 Untereinheiten. Die inneren Ringe werden β -Ringe genannt, die äußeren α -Ringe (Lowe et al. 1995; Groll et al. 1997; Bochtler et al. 1999). Die α -Untereinheiten sind katalytisch inaktiv und stabilisieren den 20S-Komplex. Außerdem binden sie die 19S-Untereinheiten. Auf den beiden β -Einheiten liegen jeweils drei katalytische Einheiten.

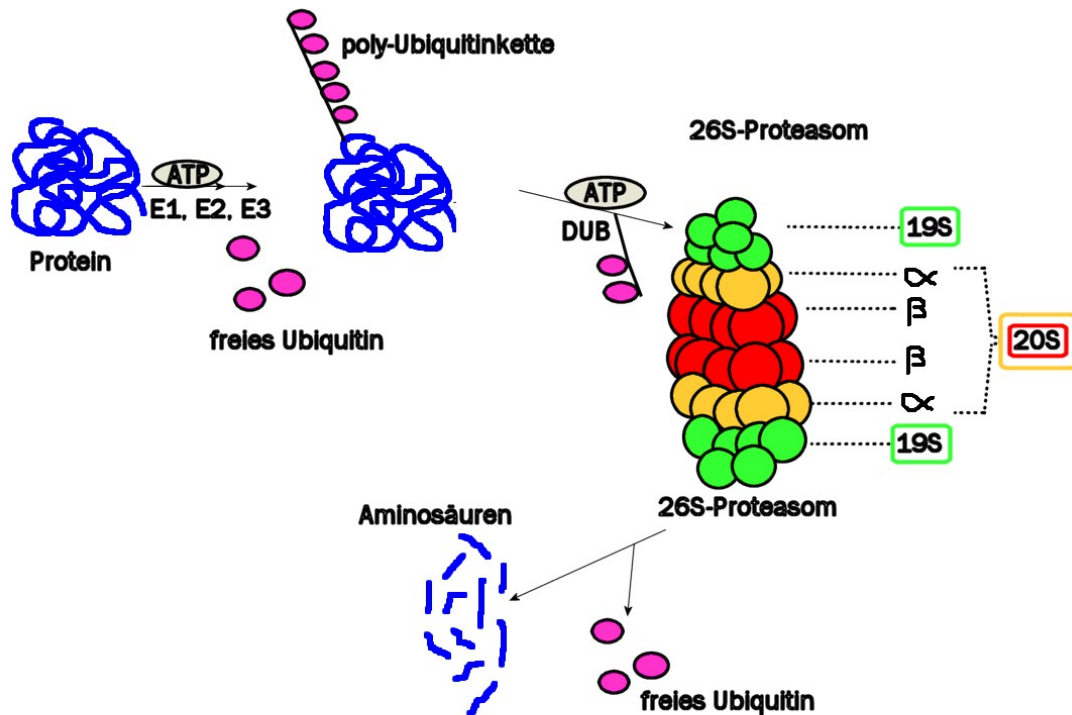


Abbildung 3: Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) nach (Lee DH und Goldberg 1998), S. 398

Das abzubauenende Protein wird durch ubiquitinierende Enzyme (E1, E2, E3) mit Ubiquitin-Molekülen "markiert". Dieser Schritt und die ebenso mögliche De-Ubiquitinierung durch DUBs (de-ubiquitinierende Enzyme) sind ATP-abhängig. Das markierte Protein wird anschließend in das 19S-Proteasom eingeschleust und anschließend entfaltet. Daraufhin wird es in das katalytische Zentrum des 20S-Proteasoms verbracht und dort zu verschiedenen langen Aminosäureketten degradiert. Dabei wird das vorher angehängte Ubiquitin wieder frei.

Eine Trypsin-ähnliche Einheit auf der β 2-Untereinheit spaltet hinter basischen Aminosäuren. Die Chymotrypsin-ähnliche Einheit liegt auf der β 5-Untereinheit und spaltet nach hydrophoben Resten. Die dritte proteolytische Einheit spaltet Bindungen nach sauren Resten und wird Caspase-ähnliche oder Peptidyl-Glutamyl-Peptid-Hydrolase-ähnliche Einheit genannt. Sie befindet sich auf der β 1-Untereinheit (Wilk und Orłowski 1983; Orłowski M und Wilk 2000).

Auf den beiden Öffnungen des zylindrischen 20S-Komplexes sitzen die beiden 19S-Komplexe auf. Die Funktion der 19S-Untereinheiten besteht aus der Erkennung des polyubiquitinierten Substrats und Entfalten dieses Substrates, denn Proteine passen nur entfaltet in den 20S-Zylinder. Danach folgen die Freisetzung der Polyubiquitin-Kette und die Translokation des entfalteten Substrates in das geöffnete katalytische Zentrum, wo schließlich die eigentliche Proteindegradation stattfindet (Orłowski M und Wilk 2000).

1.3.2 Ubiquitin

Ubiquitin ist ein kleines, aus 76 Aminosäuren bestehendes Polypeptid. Es kommt in allen eukaryotischen Zellen reichlich vor. Die meisten Proteine, welche kontrolliert abgebaut werden sollen, werden zunächst ubiquitiniert. Das heißt, dass verschieden lange Ketten von aneinander gereihten Ubiquitin-Molekülen kovalent an das jeweilige Protein gebunden und damit die abzubauenen Proteine gekennzeichnet werden. Die Bindung eines C-terminalen Glycin-Restes des Ubiquitins erfolgt entweder an eine α -Aminogruppe eines N-terminalen Aminosäurerestes oder an einen Lysin-Rest des Substratproteins (Ciechanover et al. 1999). Ubiquitinmoleküle können auch untereinander über Lysin-Reste binden. Durch diese Poly-Ubiquitinierung entstehen die erwähnten Ubiquitin-Ketten. Die Kettenbildung durch Poly-Ubiquitinierung erfolgt durch eine Enzymkaskade von drei verschiedenen Carrier-Enzymen (E1, E2, E3) und ist ATP-abhängig. E1 ist das so genannte Ubiquitin-aktivierende Enzym. Unter ATP-Verbrauch wird Ubiquitin zu einem energiereichen Thiolester aktiviert. Die E2-Enzyme konjugieren Ubiquitin. E3 und E4 verlängern schließlich die Ubiquitinkette, was als oligo- bzw. poly-Ubiquitinierung bezeichnet wird (Hershko und Ciechanover 1998).

Die nun mit Polyubiquitin markierten Proteine werden vom 26S-Proteasom erkannt und gebunden. Anschließend werden sie in kleine Peptide gespalten (Wojcik 2002). Im Anschluss an die Peptidabspaltung werden die nun nicht mehr benötigten Ubiquitin-Ketten gespalten und zwar von sogenannten DUBs (*deubiquitinating enzymes*). Diese scheinen wichtig zu sein, um erneut verwendbares Ubiquitin wieder herzustellen und für erneute Reaktionen zur Verfügung zu stellen. Außerdem wird ihnen, im Fall der Abspaltung der Ubiquitinkette von bereits ubiquitinierten Proteinen, eine modifizierende oder sogar „rettende“ Funktion zugesprochen (Wilkinson 1997; D'Andrea und Pellman 1998).

1.3.3 Funktionen des UPS

Das Proteasom baut nicht nur selektiv spezifische Regulatorproteine ab, sondern ist auch für den Hauptteil der intrazellulären Proteolyse verantwortlich (Rock et al. 1994). Ein geregelter und gezielter Abbau von intrazellulär anfallenden Proteinen scheint allerdings nur mit Hilfe des UPS im Zusammenspiel mit der lysosomalen Proteolyse möglich zu sein.

1.3.4 Proteasom-Inhibition

Die in Kapitel 1.3.1 erwähnte Chymotrypsin-ähnliche Einheit auf der β -Untereinheit des 20S-Proteasoms ist der limitierende Faktor für den Proteinabbau (Wojcik 1997). Die meisten Proteasom-Inhibitoren wirken deshalb auf diese Untereinheit. Proteasom-Inhibitoren können Apoptose in Zellen initiieren, die gegen andere Medikamente resistent geworden sind. So induziert Lactacystin programmierten Zelltod in humanen Leukämiezellen (U937-Zellen) (Imajoh-Ohmi et al. 1995) und auch MG132 ist in der Lage Apoptose in humanen leukämischen B-Zellen zu induzieren. Diese Induktion findet in allen Stadien der Erkrankung statt und sogar in solchen Zellen, die gegen alle anderen konventionellen Chemotherapeutika resistent geworden sind (Almond et al. 2001).

Es war nicht weiter überraschend, dass die Blockade des Proteasoms Apoptose induziert, denn es ist bereits seit langem bekannt, dass die fein geregelten Abläufe in vielen biochemischen Vorgängen, wie auch beim Zellzyklus und bei der Genexpression von einer intakten Funktion des UPS abhängig sind (Wojcik 2002; Coleman und Ribchester 2004). Es wurde jedoch beobachtet, dass das Ausmaß der Empfindlichkeit für Apoptose abhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen war. So konnte beispielsweise an der Retina von neugeborenen Ratten gezeigt werden, dass MG132 nur in bestimmten Zellen Apoptose auslöst. In späteren Stadien der Entwicklung hatte MG132 aber keine pro-apoptotische Wirkung mehr (Neves et al. 2001). Diese Beobachtung hat klinische Bedeutsamkeit, da Proteasom-Inhibitoren eine relativ geringere pro-apoptotische Wirkung auf gesunde, differenzierte Zellen haben als z.B. auf leukämische CD34-positive Zellen. Der Grund hierfür liegt darin, dass gesunde CD34(+)-Zellen einen bestimmten Transkriptionsfaktor (NF κ B) normalerweise nicht exprimieren, leukämische Zellen hingegen schon. Proteasom-Inhibitoren verhindern seine Aktivierung (Guzman et al. 2001). Die Anhäufung von ubiquitinierten Proteinen nach Proteasom-Inhibition wird als ein möglicher Trigger für die Apoptoseinduktion gesehen (Wojcik 1997; Johnston et al. 1998).

Für die Wallersche Degeneration stellten Zhai et al. (2003) fest, dass eine Blockade des UPS mit spezifischen Inhibitoren alle Schritte dieser Degenerationsprozesse verzögerte. In ihren Experimenten untersuchten sie unter anderem die Wirkung der Proteasom-Inhibitoren Lactacystin und MG132 auf kultivierte Dorsalwurzelganglien der Ratte. Dabei wurde der Abbau von axonalen Mikrotubuli durch die Anwendung von Proteasom-Inhibitoren verzögert. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass ein geregelter Ablauf der Wallerschen Degeneration von einem intakten UPS abhängig sei (Zhai et al. 2003).

Auch Lee HK et al. beschrieben 2009 eine Rolle des UPS bei Myelinabbau und Axondegeneration (Lee HK et al. 2009). Sie stellten in Ihren Experimenten fest, dass die Blockade der Proteasomen mit MG132 (2 μ M) oder Lactacystin (50 μ M) eine signifikante Reduktion von Myelinovoiden in Schwann-Zellen herbeiführte. Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, dass das UPS für die Bildung der Ovoide benötigt wird. Außerdem führte die Proteasom-Inhibition zu einem Stopp im Zellzyklus bei kultivierten Schwann-Zellen. Die in Kapitel 1.1.3 beschriebene Dedifferenzierung der Schwann-Zellen konnte durch Anwendung von Proteasom-Inhibitoren *in vivo* und *in vitro* unterdrückt werden, wie Lee HK et al. (2009) zeigen konnten.

1.3.5 Charakteristika der Proteasom-Inhibitoren MG132 und Lactacystin

An dieser Stelle sollen die von uns verwendeten Proteasom-Inhibitoren MG132 und Lactacystin näher beschrieben werden.

Das synthetische MG132 gehört, wie bereits erwähnt, zur Gruppe der Peptid-Aldehyde und bindet reversibel an das Proteasom. Lactacystin kommt aus der Gruppe der natürlich vorkommenden β -Lactone und bindet kovalent. Seine Wirkung wird daher als irreversibel bezeichnet. Neben der Proteasom-inhibierenden Wirkung zeigen MG132 und Lactacystin auch eine Hemmung von Cathepsin- und Calpainproteasen, wobei die Wirkung auf das Proteasom jedoch ausgeprägter zu sein scheint (Fenteany et al. 1995; Myung et al. 2001).

1.3.6 Proteasom-Inhibitoren im klinischen Einsatz

Einige Proteasom-Inhibitoren sind heutzutage schon im klinischen Einsatz. So war Bortezomib 2004 der erste zugelassene Proteasom-Inhibitor und wird seitdem zur Therapie des malignen Myeloms eingesetzt. Es zeigte sich, dass maligne Plasmazellen um ein vielfaches sensitiver für die pro-apoptischen Effekte von Bortezomib waren, als gesunde mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (Hideshima et al. 2001). An unspezifischen Nebenwirkungen wurden vor allem gastrointestinale Symptome wie Übelkeit, Erbrechen und Durchfälle beobachtet. Typisch waren jedoch auch periphere Neuropathien und neuropathische Schmerzen (Richardson et al. 2006). Präklinische Studien zeigten, dass Bortezomib nicht nur das Tumorwachstum hemmt und pro-apoptisch wirkt, sondern auch die Angiogenese behindert und eine Resistenz gegenüber anderen Chemotherapeutika und ionisierender Strahlung überwindet, was letztendlich zur Indikation von Bortezomib bei

Patienten mit bereits erfolgloser Anwendung herkömmlicher Therapieoptionen führte (Richardson et al. 2003; Jagannath et al. 2004).

1.4 *In-vitro*-Modell der Wallerschen Degeneration

Hann-Bonnekoh et al. etablierten das für die vorliegende Arbeit benutzte *in-vitro*-Modell für die Wallersche Degeneration (Hann-Bonnekoh et al. 1989). Sie entwickelten Co-Kulturen aus Segmenten peripherer Ischiasnerven und Peritonealmakrophagen der Maus. Um die *in-vivo*-Bedingungen möglichst realitätsgetreu nachzubilden, mussten der pH-Wert 7,4 und die Kalziumkonzentration zwischen 1 und 2,5 mM betragen. In dieser Kultur beobachtete man eine massive Einwanderung von Phagozyten in die Nervenstücke. Immunzytochemisch wurden diese eingewanderten Phagozyten als Fc-Rezeptor-positive, Mac-1-positive Makrophagen identifiziert. In den Nervenstücken phagozytierten sie das degenerierende Myelin. Mikroskopisch konnten Makrophagen beobachtet werden, die Lipidtropfen und Myelinbruchstücke enthielten (vgl. Abb. 6, Seite 27). Die enthaltenen Schwann-Zellen zeigten hingegen keine signifikante Myelinphagozytose (Hann-Bonnekoh et al. 1989).

Dieses *in-vitro*-Modell erlaubt nun detaillierte Untersuchungen der Vorgänge, die zur Invasion der Makrophagen in degenerierendes Nervengewebe führen (Cragg und Blakemore 1986; Hann-Bonnekoh et al. 1989).

1.5 Ziel der Arbeit

Mit der vorgelegten Arbeit sollen die Effekte der Proteasom-Inhibitoren MG132 und Lactacystin auf die Wallersche Degeneration im peripheren Nervensystem der Maus untersucht werden. Als Korrelate der fortschreitenden Degeneration werden insbesondere die Anzahl der Myelinscheiden und der darin enthaltenen Axone, sowie die Größe der Makrophagen und das von ihnen phagozytierte Myelin betrachtet. Experimentell werden hierzu sowohl *in-vitro*-Kulturen als auch *in-vivo*-Axotomien des Nervus ischiadicus untersucht. Die Auswertung der durchtrennten Nerven oder der Makrophagen-Nerven-Co-Kulturen erfolgt an Semi-Dünnschnitten des Nervus ischiadicus durch computergestützte Messung und Auszählung von lichtmikroskopisch angefertigten Fotos.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Tierversuche wurden vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit in Braunschweig unter den Nummern 33.42502-05-A-006/07 (*in-vitro*-Versuche) und 509.42502/01-G-15.04 (*in-vivo*-Versuche) genehmigt.

Es wurden männliche und weibliche Mäuse des Stammes C57BL/6N benutzt (Charles River, Sulzfeld). Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Untersuchung acht bis zehn Wochen alt und wogen ca. 20 Gramm.

2.2 *In-vitro*-Methode

Als Basis für die *in-vitro*-Versuche zur Wallerschen Degeneration wurde das von Hann-Bonnekoh et al. (1989) etablierte Modell verwendet.

Bei den *in-vitro*-Versuchen wurden Co-Kulturen aus Peritonealmakrophagen und Nervensegmenten hergestellt, die im Folgenden noch genauer beschrieben werden. Diese Co-Kulturen wurden dann jeweils mit unterschiedlichen Konzentrationen der Proteasom-Inhibitoren MG 132 und Lactacystin behandelt.

2.2.1 Vorbereitung

Zunächst erhielten die Tiere eine intraperitoneale Injektion von 500 µl einer 2,9%igen Thioglykollatlösung. Diese Lösung sollte die intraperitonealen Makrophagen stimulieren und somit ihre Zellzahl stark erhöhen. Vier Tage später wurden die Tiere in tiefe Ethernarkose versetzt und durch Dekapitation getötet.

2.2.2 Präparation der Makrophagen

Anschließend folgte die Eröffnung der Bauchhöhle. Die stimulierten Makrophagen wurden durch eine Lavage mit eisgekühlter, phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; pH 7,4) gewonnen. Die weiteren Schritte folgten der von Hann-Bonnekoh et al. (1989) beschriebenen *in-vitro*-Methode. Die gewonnene Makrophagensuspension wurde für zehn Minuten bei

1800U/min und 4 °C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das verbliebene Zellpellet mit Kulturmedium resuspendiert.

Das Kulturmedium setzte sich folgendermaßen zusammen:

- Dulbecco's minimal essential medium (DMEM)
- + 10 % fetales Kälberserum (FCS)
- + 100 U / ml Penicillin
- + 100 µg / ml Streptomycin
- + 58 mg % Glutamin
- + 10 mM Cytosinarabinosid (Ara-C)
- + versuchsabhängige Zugabe von MG132 bzw. Lactacystin in verschiedenen Konzentrationen oder Vehikel-Lösung als Kontrolle.

Anschließend wurden die Makrophagen in Kulturschalen mit gasdurchlässigem Membranboden, "Lumox™-Dish" genannte (Fa. Greiner) (früher: Petriperm, N.C. Heraeus, Hanau) Petrischalen übertragen. Dabei musste auf eine konstante Zahl von 2×10^6 Zellen pro Milliliter geachtet werden.

2.2.3 Präparation der Ischiasnerven

Für die Co-Kulturen wurden den Mäusen jeweils beide Ischiasnerven herauspräpariert. Die Präparation erfolgte ausgehend von der Coxa bis hinab zur Trifurkation des Nerven auf Höhe des Knies. Die Nerven wurden danach in kurze Stücke geschnitten, so dass aus jedem Nerv ca. 8 Segmente entstanden. Das Perineurium wurde unter sterilen Bedingungen mit feinen Pinzetten abgezogen, und die Nervenstücke auf sterile Glas-Deckgläschen aufgelegt, diese umgedreht und gleichmäßig in den bereit gestellten Lumox-Schalen mit Makrophagen verteilt.

2.2.4 Behandlung der Zellkulturen

Diese Nervensegmente wurden anschließend für 8 Tage mit Makrophagen co-kultiviert. Innerhalb der Kulturschalen befanden sich dabei jeweils sechs bis acht Nervensegmente, die mit Hilfe der Deckgläschen fixiert wurden. In jeder Schale wurden die Segmente nur eines Nerven ausgelegt. Grundsätzlich wurden zwei Versuchsreihen angelegt, wovon die eine die

Nervenstücke plus die gewonnenen Makrophagen enthielten, die anderen jedoch nur Nervenstücke, ohne Makrophagen.

In jede dieser Schalen wurden die in Tabelle 1 angegebenen Konzentrationen MG132 oder Lactacystin zugegeben. Verwendet wurden Substanzen des Herstellers ALEXIS (MG132 ALEXIS # ALX 260-092; Lactacystin ALEXIS # ALX 350-245). Von den beiden Inhibitoren war nur Lactacystin in einer wasserlöslichen Modifikation verfügbar, weshalb es in PBS gelöst (Ausgangslösung 4,5 mM) zu den Kulturen gegeben werden konnte. Die Substanz MG132 ist nicht wasserlöslich und musste daher zuerst in DMSO gelöst werden (4,4 mM in DMSO) und wurde dann mit PBS weiterverdünnt.

Zusätzlich zu den Inhibitor-Versuchen wurden noch Kontrollschalen ohne Zugabe von Inhibitoren angelegt. Diese Kontrollschalen erhielten äquivalente Mengen an DMSO (Dimethylsulfoxid, Lösungsmittel für MG132) oder PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung 0,1 M, Lösungsmittel für Lactacystin).

Tabelle 1: Konzeption der *in-vitro*-Versuche

Die Nervenstücke wurden mit Inhibitoren kultiviert. Es wurden dabei jeweils Kulturen mit und ohne Zugabe von Makrophagen angefertigt. Außerdem erfolgte die Untersuchung entsprechender Kontrollen ohne Zugabe von Inhibitoren, aber mit Zugabe der Lösungsmittel DMSO und PBS

Inhibitor	verwendete Konzentrationen	Nerven + Makrophagen	Nerven ohne Makrophagen
Lactacystin	2 µM	+	+
MG132	0,2 µM; 2 µM	+	+
Kontrolle	DMSO/PBS	+	+
Kontrolle	PBS	+	+

Tabelle 2: Zeitlicher Ablauf der *in-vitro*-Versuche

Jeden zweiten Tag wurden Segmente entnommen und daraus die lichtmikroskopisch untersuchten Präparate angefertigt. Hieraus wurde ein vergleichender zeitlicher Ablauf der Degeneration mit und ohne zugesetzte Makrophagen erstellt.

Zeitreihe / Entnahmetag	Nerven + Makrophagen	Nerven ohne Makrophagen
2	+	+
4	+	+
6	+	+
8	+	+

Jeden zweiten Tag wurden zwei bis drei Segmente aus der Kulturschale für die Aralditeinbettung entnommen. Anschließend erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums. Die Gesamtdauer des Experiments erfolgte bis zum achten Kulturtag.

Aus Präparaten, die jeden zweiten Tag entnommen wurden, wurde eine Zeitreihe erstellt. Diese diente zum Vergleich zwischen den Medien mit und ohne Zugabe von Makrophagen mit jenen Medien, welche zusätzlich mit Proteasom-Inhibitoren behandelt wurden.

2.2.5 Präparation der Nervensegmente für die Lichtmikroskopie

Die Nervenstücke wurden vorsichtig unter sterilen Bedingungen aus der Kulturschale entnommen, ohne den empfindlichen Membranboden zu zerstören. Danach wurde das jeweils entnommene Segment in PBS gewaschen, wobei die gesamte Aufarbeitung den beschriebenen Schritten folgte:

1. Fixierung der Segmente

- Auswaschen in Puffer (PBS) für 5 min
- Fixierung in 3%igem Glutaraldehyd (verdünnt in PBS) für mindestens 1-2 h im Kühlschrank
- Erneutes Waschen in PBS für 5 min.

2. Nachfixierung

- in PBS-verdünntem 1%igen Osmiumtetroxid für 1 h im Kühlschrank

- zweimaliges Waschen mit PBS für jeweils 5 min.

3. Dehydrieren der Proben

- in 50%igem Alkohol für 10 min
- in 70%igem Alkohol mit 0,5%igem Uranylacetat für 1 h im Kühlschrank
- in 80%igem Alkohol für 10 min
- in 96%igem Alkohol für 10 min
- in 100%igem Alkohol zweimal für je 15 min.

4. Einbettung

- in Araldit und Propylenoxid im Verhältnis 1:1 für 35 min
- in Araldit und Propylenoxid im Verhältnis 2:1 für 35 min
- in reinem Araldit für 1 h, davon 40 min im Brutschrank bei 40 °C.

Danach wurden vorgetrocknete Flachformen mit Araldit gefüllt und die Nervensegmente entsprechend der Längsachse der Formen eingelegt. Dabei musste auf eine möglichst gerade Einbettung geachtet werden. Außerdem sollten die Segmente vollkommen mit Araldit bedeckt sein. Anschließend mussten die Blöcke dann bei 60 °C für mindestens 48 h aushärten.

Die ausgehärteten Blöcke wurden zunächst mit einer Rasierklinge von Hand grob in eine passende Form getrimmt. Dies geschah unter optischer Kontrolle mit den Okularen des Ultramikrotoms (Leica Ultracut UCT – Leica MZ6-Optik). Anschließend begann die Feintrimmung der Blöcke mit einem Glasmesser am Ultramikrotom. Sobald die Tiefe des Schnittes geeignet erschien, wurden Semidünnschnitte mit einer Dicke von ca. 350 nm angefertigt. Die vom Aralditblock gelösten Schnitte kamen auf der Wasseroberfläche einer am Glasmesser angebrachten Wasserwanne zu liegen. Sobald etwa zehn geeignete Schnitte aus einem Aralditblock entstanden, wurden diese auf einen vorher mit Alkohol gereinigten Objektträger übertragen. Dort schwammen die Schnitte auf einem Wassertropfen zweifachdestillierten Wassers und mussten anschließend für ca. 1 h Stunde abgedeckt auf einer Heizplatte bei 60 °C trocknen. Das langsame Trocknen hatte zusätzlich den Effekt, dass sich die Schnitte auf dem Objektträger gleichmäßig strecken und entfalten konnten.

Es folgte die Färbung der Schnitte mit der Farblösung nach Richardson:

- 2 Teile 1% Azur II (Merck 1.0911.0010)
- 1 Teil 2% Methylenblau (Merck 6040)
- 1 Teil 1% Borax (di-Natriumtetraborat-10-hydrat; Merck 6308).

Mit einer Glaspipette wurden die Schnitte gut mit der Farblösung bedeckt und anschließend auf der Heizplatte bei 60 °C gelagert, bis nach ca. 2-3 Minuten ein grünlich schimmernder Randsaum auf der Farblösung erkennbar war. Es folgte das sorgfältige Abspülen der Farblösung mit zweifach destilliertem Wasser und - nach erneuter Trocknung der Objektträger - deren Versiegelung mit Araldit und einem Deckgläschen. Nach 24 h im Heizofen bei 60 °C war diese Eindeckung ausgehärtet.

2.3 *In-vivo*-Axotomie

Für die Durchtrennungsversuche wurden weibliche Tiere des Mausstammes C57BL/6N der Firma Charles River (Sulzfeld) verwendet und zwar für jede Versuchsgruppe 5 Tiere. Die Mäuse erhielten eine Narkose durch intraperitoneale Injektion von Ketaminhydrochlorid (50 mg / ml, Ketamin, Inresa) und Xylazinhydrochlorid (2 % Rompun, Bayer). Diese beiden Substanzen wurden im Verhältnis 2 : 1 gemischt. Jedem Tier (Körpergewicht ca. 20 - 40 g) wurden 60 - 70 µl dieser Mischung injiziert.

Nachdem die Tiere ein tiefes Narkosestadium erreichten, wurden die Haare am rechten Oberschenkel entfernt und mit einem Skalpell ein ca. 7 - 9 mm langer Schnitt längs zum Femur gemacht. Es folgte die Eröffnung des darunter liegenden Muskels in Längsrichtung und durch eine ca. 2 - 3 mm lange Öffnung wurde der Ischiasnerv freigelegt. Mit einer gewinkelten Castroviejo-Schere wurde der Nerv anschließend komplett durchtrennt. Durch optische Kontrolle wurde die Vollständigkeit dieser Durchtrennung sichergestellt.

Anschließend folgte der Wundverschluss, wobei zuerst der Muskel mit 1 bis 2 Stichen und danach der Hautschnitt mit 4 bis 5 Stichen vernäht wurde (Nähfaden Ethilon 0,7 metric 6-0, Nadel P-1).

Die Tiere wachten innerhalb der folgenden 3 Stunden aus der Narkose auf. Während dieser Zeit befand sich der Käfig auf einer Wärmeplatte bei 37 °C Celsius. Dieses Verfahren sollte ein durch das Narkosegemisch bedingtes Absinken der Körperkerntemperatur verhindern.

2.3.1 Applikation der Inhibitoren

Bei einer Gruppe der Tiere erfolgte eine Injektion des Inhibitors MG132 täglich bei jedem Tier und zwar intraperitoneal. Damit die Injektion des Narkosemittels mit der Inhibitorlösung am OP-Tag nicht interferierte, wurde letztere grundsätzlich am späten Nachmittag durchgeführt, während die OPs am frühen Morgen statt gefunden haben.

Bei der zweiten Versuchsgruppe wurde den Tieren eine alternative Methode zur Applikation des Inhibitors angewendet. Hierzu wurde ein sog. Gelatinekomponente ("Spongostan" Fa. Johnson&Johnson) genutzt. Dieses Hilfsmittel stellt im Prinzip einen Gelatineschwamm dar, welcher mit der Inhibitorlösung vollständig durchtränkt wurde und direkt an der Stelle der Durchtrennung des Nervs implantiert wurde.

Es folgt eine Aufstellung über die durchgeführten Injektionen bei den *in-vivo*-Versuchen.

20 µg MG132

1. Injektion	OP-Tag	Tag 0	nachmittags
2. Injektion		Tag 1	vormittags
3. Injektion		Tag 2	vormittags
4. Injektion		Tag 3	vormittags
Tiere getötet		Tag 4	vormittags

100µg MG132

1. Injektion	1 Tag vor OP	Tag -1	nachmittags
2. Injektion	OP-Tag	Tag 0	nachmittags
3. Injektion		Tag 1	nachmittags
4. Injektion		Tag 2	nachmittags
5. Injektion		Tag 3	nachmittags
Tiere getötet		Tag 4	nachmittags

Die Kontrolltiere erhielten Injektionen nach demselben Schema. Diese Injektionen enthielten jedoch lediglich ein Gemisch aus DMSO und PBS, welches in seiner Zusammensetzung genau dem Verhältnis der Lösungen mit Inhibitor entsprach.

2.3.2 Zusammensetzung der Inhibitor-Lösungen

Der verwendete Proteasom-Inhibitor MG 132 wurde unter der Bezeichnung "ALX 260-092" von der Firma ALEXIS Biochemicals, (zu Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach) bezogen. Das MG 132 wurde zunächst in Dimethylsulfoxid (DMSO) als Stammlösung gelöst und dann vor jeder Injektion frisch in phosphat-gepufferter Saline (PBS) weiter verdünnt. Die Verdünnungsansätze sind in Tabelle 3 ablesbar.

Tabelle 3: Verdünnungen von MG132 für die *in-vivo*-Versuche

Der Inhibitor MG132 wurde in DMSO gelöst und anschließend mit PBS verdünnt, um die gewünschten Molaritäten von 0,2 mM, 1 mM und 10 mM zur Applikation zu erzeugen.

Menge des Inhibitors MG132	Verdünnung mit PBS	resultierende Molarität
20 µg	200 µl	0,2 mM
100 µg	200 µl	1 mM
50 µg (Gelfoam-Gruppe)	10 µl	10 mM

Bei der anschließenden Vorbereitung der Nervensegmente für die Lichtmikroskopie wurde nach demselben Protokoll verfahren, welches bereits in Kapitel 2.2.5 beschrieben wurde.

2.4 Morphometrie

Die Präparate wurden mit einem Lichtmikroskop (Olympus BX 51) mit angeschlossener Digitalkamera (Olympus DP71) bei einer 100-fachen Vergrößerung unter Ölimmersion mit einem Computerprogramm (Cell[^]F, Fa. Olympus) fotografiert. Je nach Größe des Präparates entstanden auf diese Weise im Durchschnitt ca. 10 Fotos. Die Bilder wurden mit einer Auflösung von 2040x1536 Pixel bei einer Vergrößerung von 100x und einem Kameravorsatz von 0,5x erstellt. Daraus resultierte eine Bildgröße von 172,6 µm x 129,9 µm.

Die Bilder wurden anschließend mit Hilfe eines graphischen Messprogrammes (Cell[^]A, Fa. Olympus) ausgewertet. Dabei wurden verschiedene Messparameter bestimmt:

1. Fläche der phagozytierenden Makrophagen
2. Fläche des von ihnen phagozytierten Myelins
3. Anzahl der phagozytierenden Makrophagen
4. Anzahl erhaltener Myelinscheiden
5. Anzahl erhaltener Myelinscheiden mit darin erkennbaren Axonen
6. Fläche des Präparates

Die daraus entstandenen Datensätze wurden mit Microsoft Excel aufgearbeitet und entsprechend ihren Versuchsanordnungen und dem Zeitpunkt ihrer Entnahme aus den Kulturen zusammengefasst.

2.5 Statistik

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis Test oder dem Dunnett Test statistisch geprüft. Diese Tests dienen der Feststellung von signifikanten Unterschieden innerhalb der verschiedenen Versuchsgruppen. Die Tests wurden mit Hilfe des Computerprogramms "GraphPad InStat3" GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Wallersche Degeneration *in vitro*

In Kapitel 2.2 wurde bereits beschrieben, wie die *Nervi ischiadici* in einer Kontrollgruppe allein (ohne Zugabe von Makrophagen) und in einer zweiten Gruppe mit Peritonealmakrophagen co-kultiviert wurden. Die Nervenstücke zeigten im Verlaufe der acht Beobachtungstage in Kultur morphologische Veränderungen. Die Schwann-Zellen lösten sich zunehmend von den Myelinscheiden. Die Myelinscheiden zeigten zunächst tropfenförmige Einziehungen und kollabierten schließlich zum großen Teil (Abb. 4). Außerdem war mit zunehmender Dauer der Experimente die Degeneration vieler Myelinscheiden zu fettartigen Abbauprodukten zu beobachten (Abb. 5). Die in den ersten Tagen meist noch gut erkennbaren Axone verschwanden zunehmend aus den degenerierenden Myelinscheiden. Die Größe der Makrophagen und deren phagozytierter Inhalt nahmen zu (Abb. 6).

Die beobachteten Phänomene sind insgesamt typisch für in Kultur degenerierende periphere Nervenstücke.

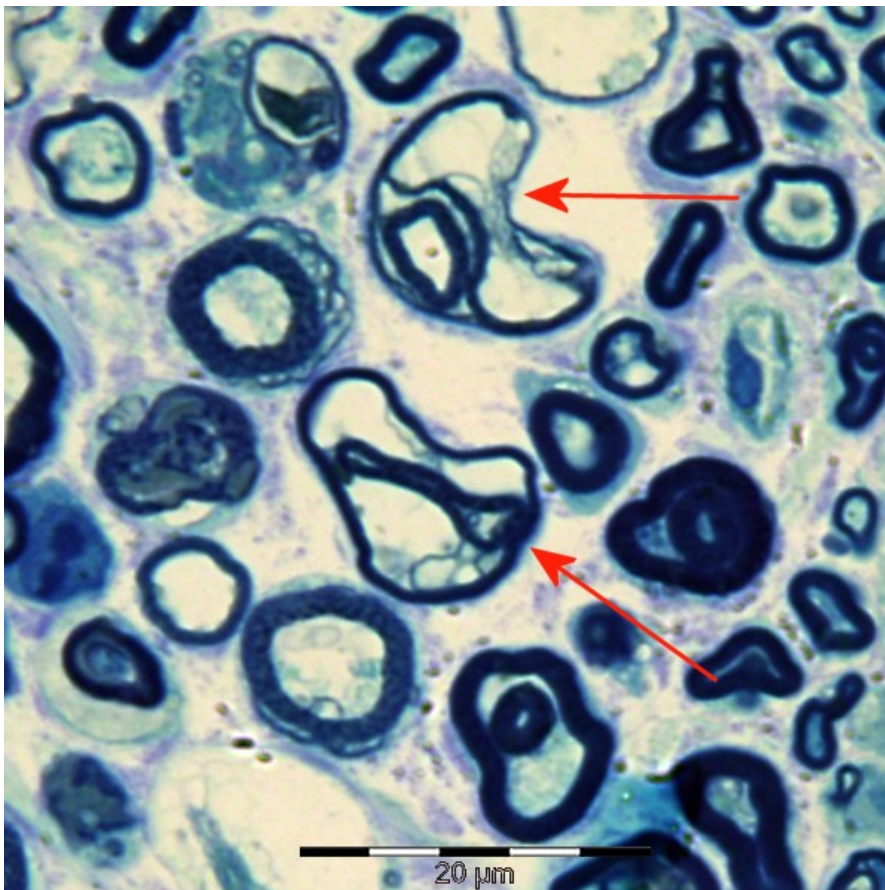


Abb. 4
In-vitro-Versuche; zweiter
Kulturtag;
kollabierende
Myelinscheiden im
peripheren Nerven (rote
Pfeile)
Vergrößerung: 100x

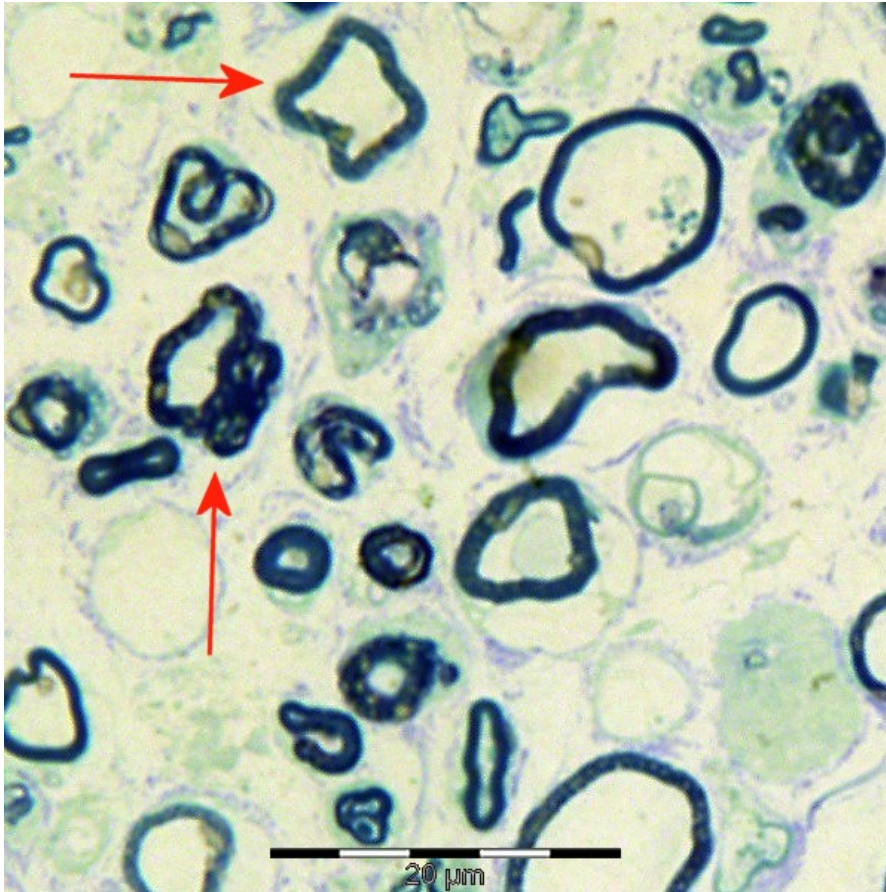


Abb. 5
In-vitro-Versuche; zweiter
 Versuchstag;
 Myelinolyse und Entstehung
 fettartiger Abbauprodukte
 der Myelinscheiden (rote
 Pfeile)
 Vergrößerung: 100x

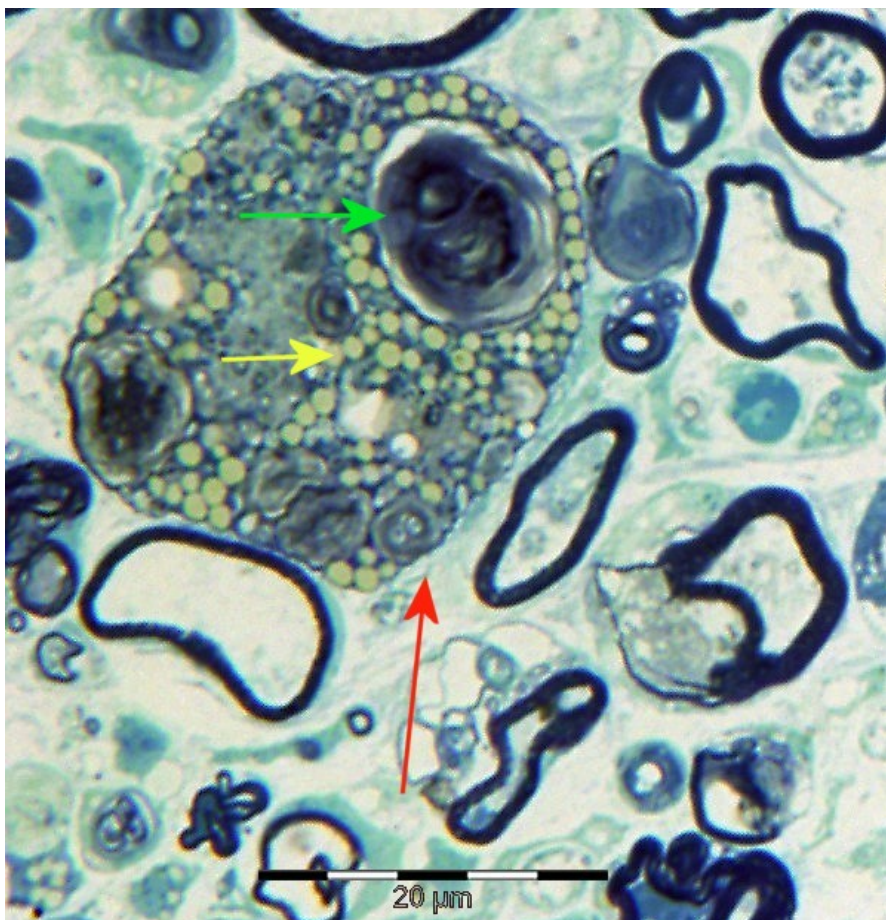


Abb. 6
In-vitro-Versuche; achter
 Versuchstag;
 Makrophage (roter Pfeil) mit
 phagozytiertem Myelin. Das
 phagozytierte Myelin
 (grüner Pfeil) ist teilweise
 schon in Fettvakuolen
 umorganisiert (gelber Pfeil).
 Vergrößerung: 100x

3.1.1 Erhaltenes Myelin und erhaltene Axone vom zweiten bis achten Kulturtag

Die Versuche zur Darstellung der zeitlichen Abfolge der Wallerschen Degeneration in den Gewebekulturen ohne pharmakologische Beeinflussung zeigten folgende Ergebnisse.

Bei der Auswertung des noch vorhandenen Myelins erkennt man, dass sich seine Menge in allen Nervenstücken während der Versuchsdauer konstant verringerte. Dieser Verlust war in beiden Versuchsreihen im Vergleich vom zweiten zum achten Versuchstag signifikant (Abb. 7). In den Kulturen ohne Peritonealmakrophagen war die Menge des erhaltenen Myelins im Vergleich zu den Kulturen mit Makrophagen an allen Versuchstagen signifikant höher (Anhang, Tab. 4). An den Tagen zwei, sechs und acht war dieser Unterschied sogar extrem signifikant (Anhang, Tab. 4).

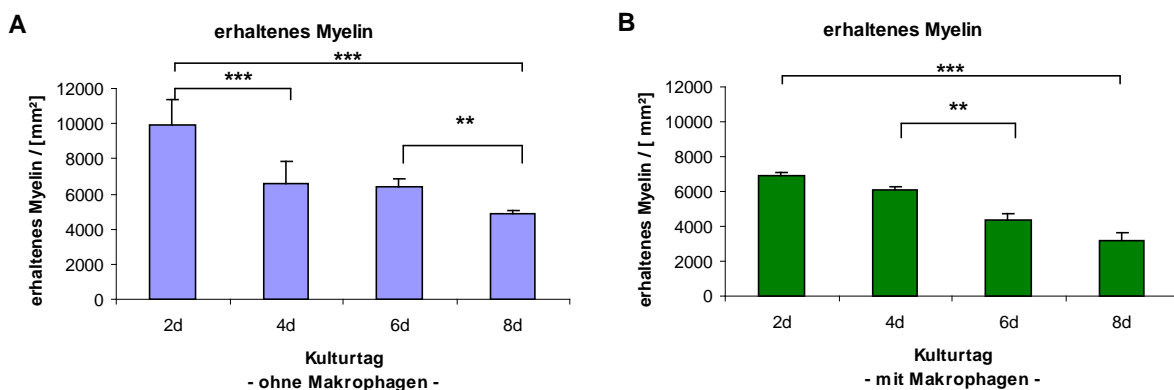


Abb. 7: erhaltene Myelinscheiden nach 2 bis 8 Kulturtagen. A) Kulturen ohne Makrophagen B) Co-Kulturen mit Makrophagen. Die Menge des erhaltenen Myelins verringert sich in der zeitlichen Abfolge konstant. (Statistische Auswertung mit Kruskal-Wallis-Test) Nervenstücke ohne Makrophagen (blau) enthalten mehr Myelin als Nerven, die zusammen mit Makrophagen kultiviert wurden (grün).

** signifikant, *** sehr signifikant

Tabelle 4 im Anhang

In den Kulturen ohne Makrophagen schreitet die Myelindegeneration also weniger stark voran als in Kulturen mit Makrophagen.

Ähnliche Ergebnisse ergaben sich für Myelinscheiden, welche noch Axone enthielten (Abb. 8). Deren Anzahl verringerte sich ebenfalls stark während der Versuchsdauer. Dieser Verlust an Axonen war sogar stärker ausgeprägt als der Verlust an Myelinscheiden (Abb. 7). In allen Kulturen mit Makrophagen zeigten sich signifikant geringere Mengen erhaltener Axone als in den entsprechenden Kontrollkulturen ohne Makrophagen (Tab. 5). Insgesamt blieben in weniger als 10% der oben beschriebenen, erhaltenen Myelinscheiden noch Axone erhalten.

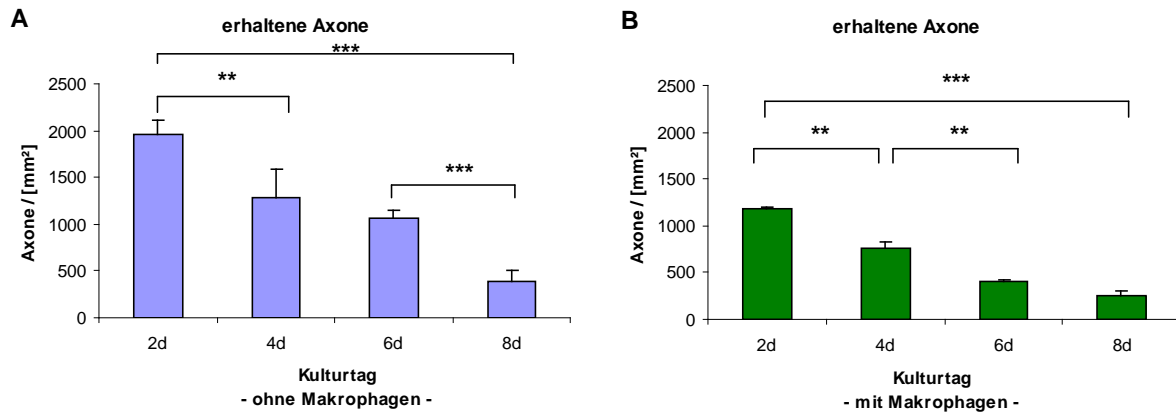


Abb. 8: Mengen erhaltener Axone nach 2 bis 8 Kulturtagen. A) Kulturen ohne Makrophagen B) Co-Kulturen mit Makrophagen. Der Verlust an Axonen vom zweiten bis zum achten Versuchstag ist in beiden Versuchen sehr signifikant (Kruskal-Wallis-Test); Nervenstücke ohne Makrophagen (A, blau) enthalten mehr Axone als Nerven, die zusammen mit Makrophagen (B, grün) kultiviert wurden.

** signifikant, *** sehr signifikant

Tabelle 5 im Anhang

3.1.2 Anzahl und Größe der Makrophagen vom zweiten bis achten Kulturtag

Bei den kultivierten Nervenstücken ohne Zugabe von Makrophagen besteht zunächst eine Ausgangszahl von residenten Makrophagen (150 Zellen/mm²) die sich bis zum 4. Kultivierungstag sogar erhöht und danach bis zum achten Kulturtag wieder abnimmt (Abb. 9 A). Ähnlich ist der Verlauf in den Nervenstücken mit Makrophagen, nur dass deren Gesamtzahl während der gesamten Versuchszeit höher war als in den Kontrollkulturen (Abb. 9 B). In den Kulturen mit Zugabe von Makrophagen zeigte sich am sechsten und achten Versuchstag eine signifikant höhere Anzahl dieser Zellen als in Kulturen ohne Makrophagen (Abb. 9 und Tabelle im Anhang). Dieser Befund ist durch das langsam fortschreitende Eindringen der co-kultivierten Peritonealmakrophagen in die Nervenstücke zu erklären. Diese Invasion scheint eine gewisse Zeit in Anspruch zu nehmen.

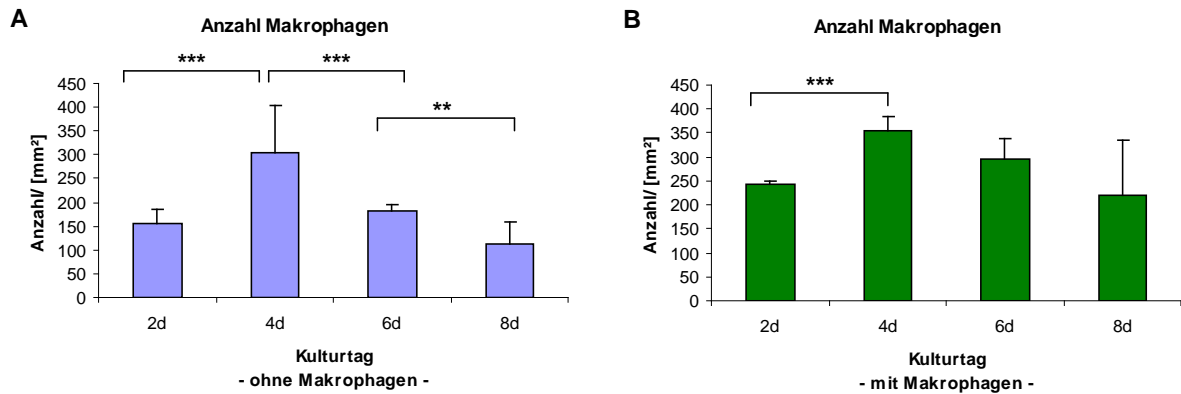


Abb. 9: Anzahl Makrophagen nach 2 bis 8 Kulturtagen. A) Kulturen ohne Makrophagen B) Co-Kulturen mit Makrophagen. Nervenstücke, die ohne Makrophagen co-kultiviert wurden (A, blau) enthalten nur residente Makrophagen. Bei Nerven, die zusammen mit Makrophagen (B, grün) kultiviert wurden, besteht eine höhere Ausgangszahl dieser Zellen. Am achten Versuchstag finden sich signifikant mehr Makrophagen in Nerven mit co-kultivierten Makrophagen durch fortschreitenden Invasion in die Nervenstücke (Kruskal-Wallis-Test); ** signifikant, *** sehr signifikant

Tabelle 6 im Anhang

Hinsichtlich der Größe der gezählten Makrophagen in den reinen Nerv-Kulturen ohne Makrophagen fiel auf, dass sich diese residenten Makrophagen (Abb. 10 A) an sämtlichen Kulturtagen signifikant kleiner darstellten als Makrophagen in den Co-Kulturen (Abb. 10 B) - im Mittel meist unter 50 μm^2 . In den Kulturen mit Makrophagen waren die Makrophagen bereits am zweiten Kulturtag viel größer (über 60 μm^2) und ein besonders großer Sprung bei der Größenzunahme fällt am sechsten Kulturtag auf (Abb. 10 B). Danach behalten die Zellen ihre Größe bis zum 8. Kulturtag ungefähr bei.

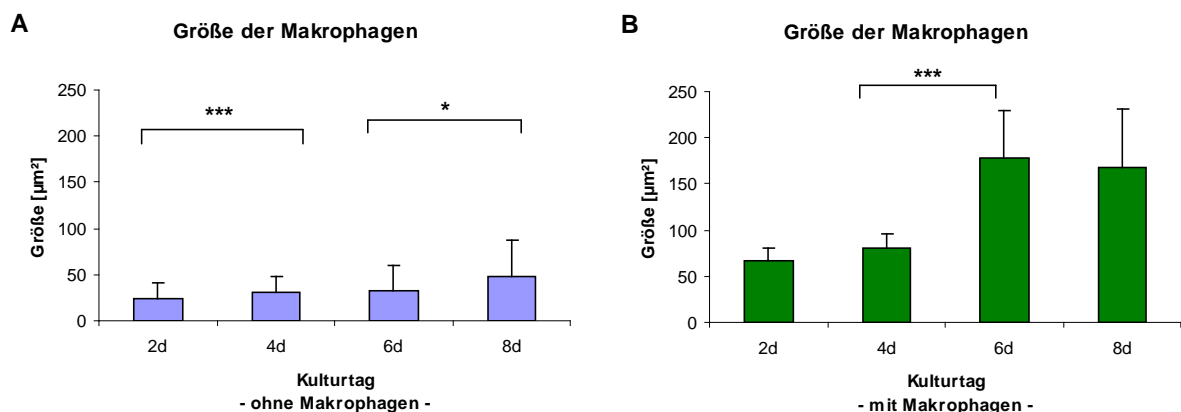


Abb. 10: Größe der Makrophagen nach 2 bis 8 Kulturtagen. A) Kulturen ohne Makrophagen B) Co-Kulturen mit Makrophagen. Die Makrophagen in den Co-Kulturen (B, grün) sind zu jedem Zeitpunkt signifikant größer als die residenten Makrophagen in Nervenstücken ohne co-kultivierte Makrophagen. (Kruskal-Wallis-Test); * leicht signifikant, *** sehr signifikant

Tabelle 7 im Anhang

Bei den residenten Makrophagen (Abb. 10 A) beobachteten wir eine zwar konstante, jedoch viel geringer ausgeprägte Größenzunahme im zeitlichen Verlauf. Interessanterweise nahm gleichzeitig ihre Anzahl bis zum sechsten Versuchstag zu und fiel dann zum achten Tage wieder stark ab (Abb. 9 A).

Die Größenzunahme der Makrophagen, welche besonders bei den Kulturen mit zugesetzten Peritonealmakrophagen deutlich wird, erklärt sich mit der ansteigenden Menge phagozytierten Myelins (nächstes Kapitel, 3.1.3) und mit der Verringerung von Myelinscheiden und erhaltenen Axonen in den degenerierenden Nervenstücken, welche im gleichen Zeitraum sinken (siehe Abb. 7 und Abb. 8). Dieser Zusammenhang wird jedoch in Kapitel 4 noch ausführlicher diskutiert.

3.1.3 Menge des phagozytierten Myelins in den Makrophagen vom zweiten bis achten Kulturtag

In beiden Versuchsreihen nahm die Menge des phagozytierten Myelins im zeitlichen Verlauf stark zu. Die Menge des phagozytierten Myelins in den Makrophagen war in den Co-Kulturen zu jedem Zeitpunkt größer als in den Kontrollkulturen ohne Makrophagen (Abb. 11). Auch dieser Unterschied war zu jedem Zeitpunkt signifikant (Anhang, Tab. 8). In der Zusammenschau mit den vorher erwähnten Größenverhältnissen der Makrophagen spricht dies für eine höhere Phagozytoseaktivität der invadierten Peritonealmakrophagen im Vergleich zur residenten Zellpopulation.

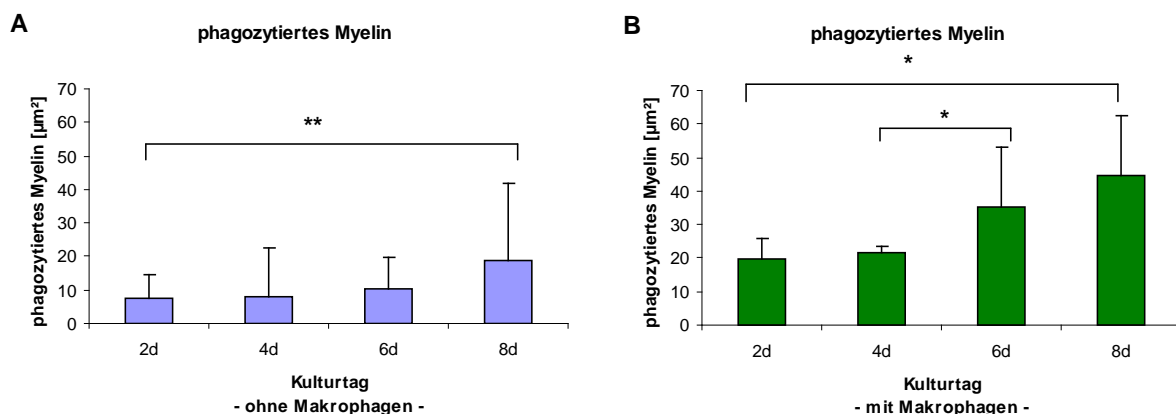


Abb. 11: Menge des phagozytierten Myelins nach 2 bis 8 Kulturtagen. A) Kulturen ohne Makrophagen B) Co-Kulturen mit Makrophagen. Deutliche Zunahme des phagozytierten Myelins bei beiden Versuchen im zeitlichen Verlauf. Die Menge des phagozytierten Myelins in den Co-Kulturen (grün) war zu jedem Zeitpunkt signifikant höher als in Nervenstücken ohne co-kultivierte Makrophagen (blau). (Kruskal-Wallis-Test);

* leicht signifikant, ** signifikant

Tabelle 8 im Anhang

3.2 Wallersche Degeneration *in vitro* nach Verwendung von Proteasom-Inhibitoren

Wie zuvor bei den Experimenten zum Zeitverlauf wurden Nervensegmente des N. ischiadicus über 8 Tage mit Makrophagen co-kultiviert. Es wurden die Proteasom-Inhibitoren MG132 (0,2 μ M und 2 μ M) oder Lactacystin (2 μ M) zugegeben. Außerdem wurde jeweils eine Kontrolle ohne Inhibitoren durchgeführt.

Alle im Folgenden aufgeführten Ergebnisse beziehen sich auf den achten und damit letzten Kulturtag. In den Ergebnissen zur Zeitreihe treten zu diesem Zeitpunkt im Normalfall in den Kulturen eine hohe Zahl von Makrophagen mit hohen Mengen von phagozytiertem Myelin auf und die Myelin- und Axondegeneration in den Nervensegmenten ist weit fortgeschritten.

In den Abbildungen 12 und 13 erkennt man im linken Bildrand jeweils einen Teil des Nervus ischiadicus. Rechts davon sieht man Makrophagen, die sich in ihrer Morphologie von Abb. 12 zu Abb. 13 stark unterscheiden. Das Fehlen von pseudopodienartigen Fortsätzen bei den Makrophagen in Abb. 13 ist auf die Wirkung des Proteasom-Inhibitors MG132 zurückzuführen. Die Zellen sind inaktiv und zeigen geringe Anzeichen von Migration.

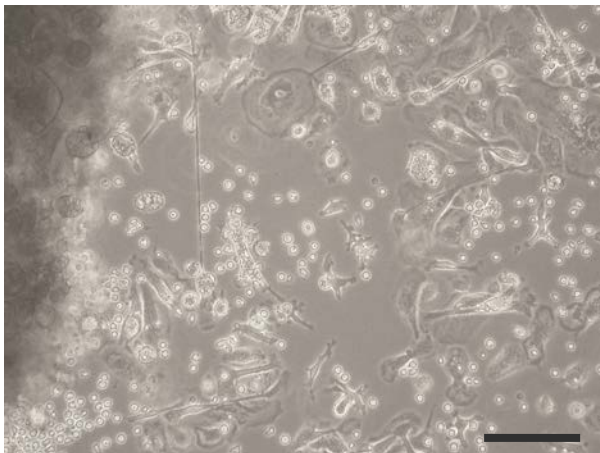


Abb. 12: Kontrolle ohne Behandlung, achter Tag
Links im Bild erkennt man ein Stück des Nervus ischiadicus. Rechts davon zahlreiche amöboide Makrophagen. Die pseudopodienartigen Fortsätze lassen auf hohe Aktivität und Migrationsfähigkeit schließen.
Balken 100 μ m

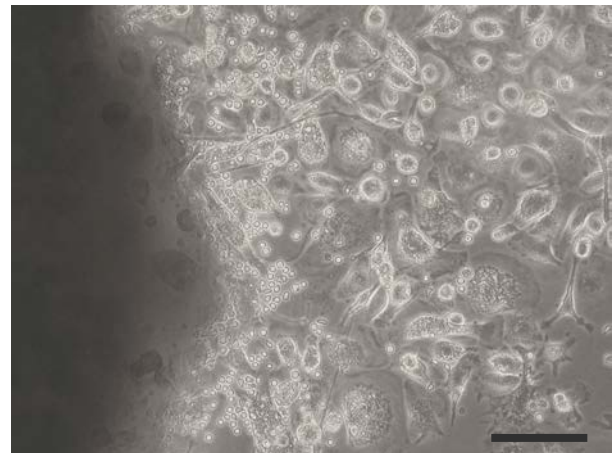


Abb. 13: Co-Kultur mit MG132 in einer Molarität von 0,2 μ M, achter Tag
Links im Bild ein Stück des Nervus ischiadicus. Rechts daneben große, flache, sessile Zellen. Die Morphologie dieser Zellen lässt auf wenig Aktivität und geringe Migration schließen.
Balken 100 μ m

3.2.1 Erhaltenes Myelin und erhaltene Axone *in vitro* nach Verwendung von Proteasom-Inhibitoren

Hinsichtlich der Myelinerhaltung zeigten sich in beiden inhibitorbehandelten Zellkulturen mit oder ohne Zugabe von Makrophagen signifikant höhere Werte für erhaltenes Myelin als in den unbehandelten Kontrollen (Abb. 14). Die höhere Konzentration von 2 μM MG132 erzielte dabei die stärkste Wirkung auf den Erhalt der Myelinscheiden und zwar unabhängig davon, ob die Nervenstücke allein oder mit Makrophagen kultiviert wurden. Für beide Kulturansätze (mit oder ohne Makrophagen) fällt auf, dass die äquimolare Menge von Lactacystin ähnlich effektiv ist wie die geringere Dosierung von MG132 (0,2 μM).

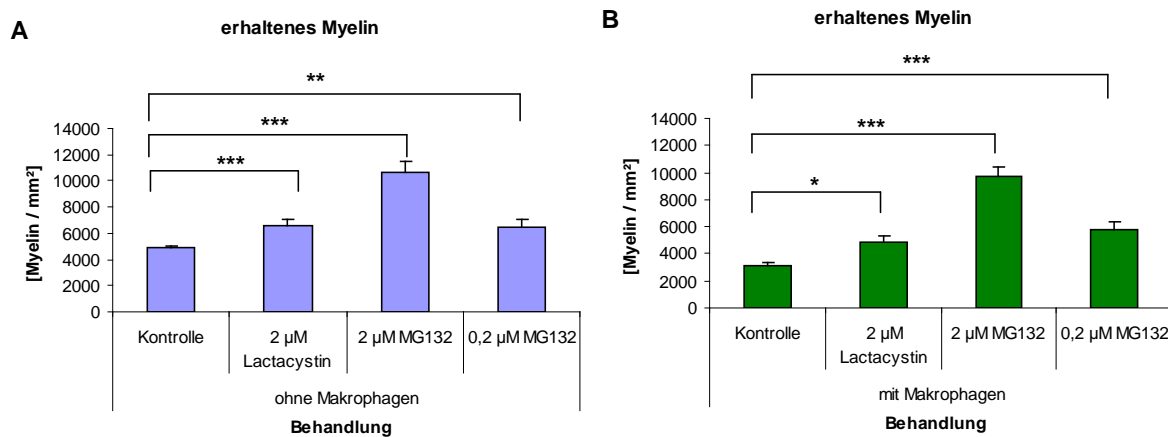


Abb. 14: Menge des erhaltenen Myelins in den Nervenstücken bei Behandlung mit Inhibitoren. Ergebnisse des achten Versuchstages. In beiden Versuchsreihen zeigte sich signifikant mehr erhaltenes Myelin bei Anwendung von MG132 in höherer Konzentration (2 μM) im Vergleich zu Kontrollen und anderen Inhibitoren.

A) Kulturen ohne Makrophagen, B) Co-Kulturen mit Makrophagen (Dunnnett-Test);

* leicht signifikant, ** signifikant, *** sehr signifikant

Tabelle 9 A, B im Anhang

Auch für die Anzahl an erhaltenen Axonen wurden signifikante Unterschiede zwischen den verwendeten Inhibitoren gefunden. Dies gilt sowohl für die Gruppe ohne Zugabe von Makrophagen als auch für die Gruppen mit co-kultivierten Peritonealmakrophagen (Abb. 15). Der Effekt der höheren Konzentration MG132 auf den Erhalt der Axone war signifikant größer als bei Verwendung der geringeren Konzentration oder des anderen Inhibitors Lactacystin. Ähnlich wie bei der Myelinerhaltung zeigte Lactacystin einen Effekt, der in etwa dem des

MG132 in einer Konzentration von 0,2µM entsprach. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigten sich beim Axonerhalt jedoch auch die Ergebnisse für das MG132 in niedriger Konzentration und Lactacystin als signifikant höher. Diese Beobachtung gilt sowohl für die reinen Nerv-Kulturen ohne Peritonealmakrophagen (Abb. 15 A), wie auch für Kulturen mit Zugabe von Makrophagen (Abb. 15 B).

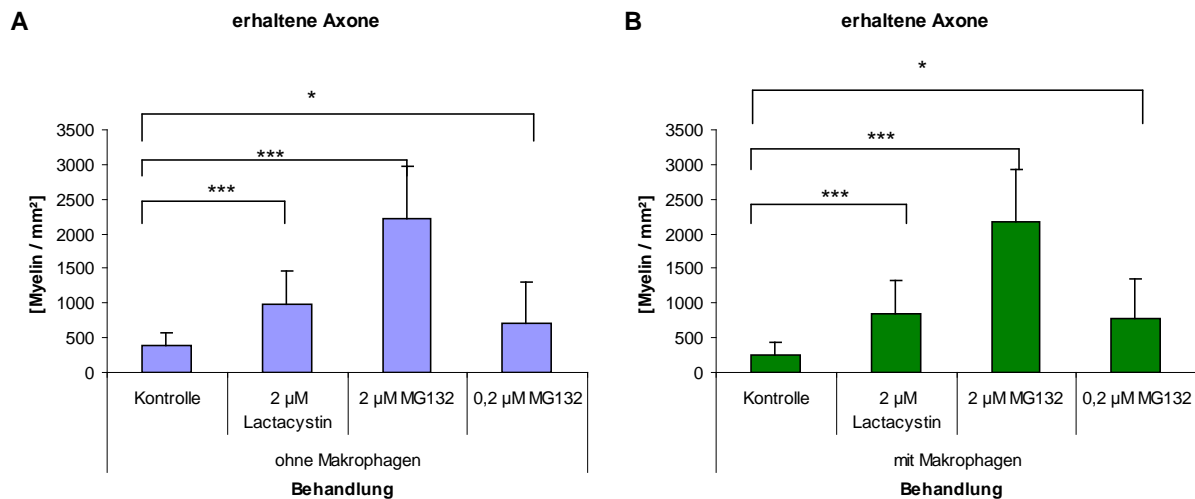


Abb. 15: Anzahl der erhaltenen Axone bei Behandlung mit Inhibitoren. Ergebnisse des achten Versuchstages. In beiden Versuchsreihen zeigten sich signifikant mehr erhaltene Axone bei Anwendung von MG132 in höherer Konzentration (2µM) im Vergleich zu der niedrigeren Konzentration und der Behandlung mit Lactacystin. (Dunnnett-Test);

A) Kulturen ohne Makrophagen, B) Co-Kulturen mit Makrophagen

* leicht signifikant, *** sehr signifikant

Tabelle 10 A, B im Anhang

3.2.2 Anzahl und Größe der Makrophagen *in vitro* nach Verwendung von Proteasom-Inhibitoren

In beiden Versuchsreihen zeigten sich bei Anwendung von MG132 in höherer Konzentration (2µM) weniger Makrophagen als bei Behandlung mit Lactacystin und den Kontrollen. Dieser Unterschied war bei den Versuchen mit co-kultivierten Peritonealmakrophagen (Abb. 16 B) sogar sehr signifikant ($p < 0,001$; Dunnnett-Test). Außerdem waren die Makrophagen bei den Inhibitor-Versuchen durchschnittlich deutlich kleiner als in den Kontrollen (Abb. 17).

Bei den Co-Kulturen aus Nervensegmenten mit Peritonealmakrophagen zeigten sich durch die Behandlung mit MG132 offenbar reziproke Effekte zwischen der Anzahl und Größe der eingewanderten Peritonealmakrophagen einerseits und den noch erhaltenen Myelinscheiden

und Axonen andererseits (vergl. Abb. 14 und 15 mit 16). Am Beispiel der höheren Konzentration MG132 wurde dies ganz deutlich: Relativ wenige, kleine Makrophagen standen einer großen Menge von erhaltenem Myelin und Axonen entgegen. Bei den Kulturen ohne Zugabe von Makrophagen sind die vorhandenen, phagozytierenden Makrophagen als residente Makrophagen anzusprechen. Sie befanden sich also schon vor der Präparation in den entsprechenden Segmenten der *Nervi ischiadici* (siehe Kapitel 3.1). Ihre Anzahl war erwartungsgemäß in allen Versuchen deutlich geringer als in den Versuchen mit zugegebenen Makrophagen und wurde durch Inhibitor-Anwendung sogar vermindert, wobei diese Wirkung jedoch nicht signifikant war (Abb. 16 A).

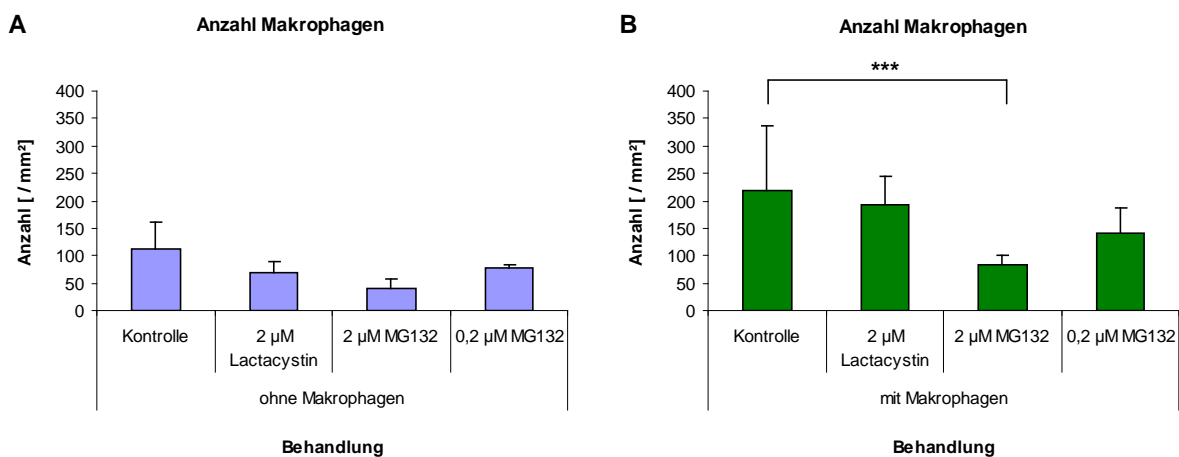


Abb. 16: Anzahl der Makrophagen bei Behandlung mit Inhibitoren. Ergebnisse des achten Versuchstages. In beiden Versuchsreihen zeigen die Inhibitor-Versuche gegenüber den Kontrollen deutlich geringere Anzahlen von Makrophagen. Die stärkste Wirkung sieht man bei Anwendung von MG132 in höherer Konzentration (2µM)

A) Kulturen ohne Makrophagen, B) Co-Kulturen mit Makrophagen

*** sehr signifikant

Tabelle 11 A, B im Anhang

Die durchschnittliche Größe der residenten Makrophagen war nach der Behandlung mit den Inhibitoren kleiner (Abb. 17 A). Nach Behandlung mit der höheren Konzentration von MG132 wurde die kleinste Zellgröße festgestellt. Hier waren die Makrophagen noch kleiner als bei der niedrigen Konzentration von MG132 oder nach Zugabe von Lactacystin. (Abb. 17 A). Bei den Co-Kulturen mit Makrophagen war die Wirkung der Inhibitoren am deutlichsten sichtbar. Während sich die Behandlung mit Lactacystin allerdings kaum auf die Größe der eingewanderten Makrophagen im Nervenstück auswirkte, war die Zellgröße bei den mit MG132 behandelten Kulturen signifikant herabgesetzt. Auch hier war die Wirkung der

höheren Konzentration (2 μM) MG132 wieder am stärksten, da die Makrophagen noch kleiner waren als nach der Behandlung mit 0,2 μM MG132 (Abb. 17 B).

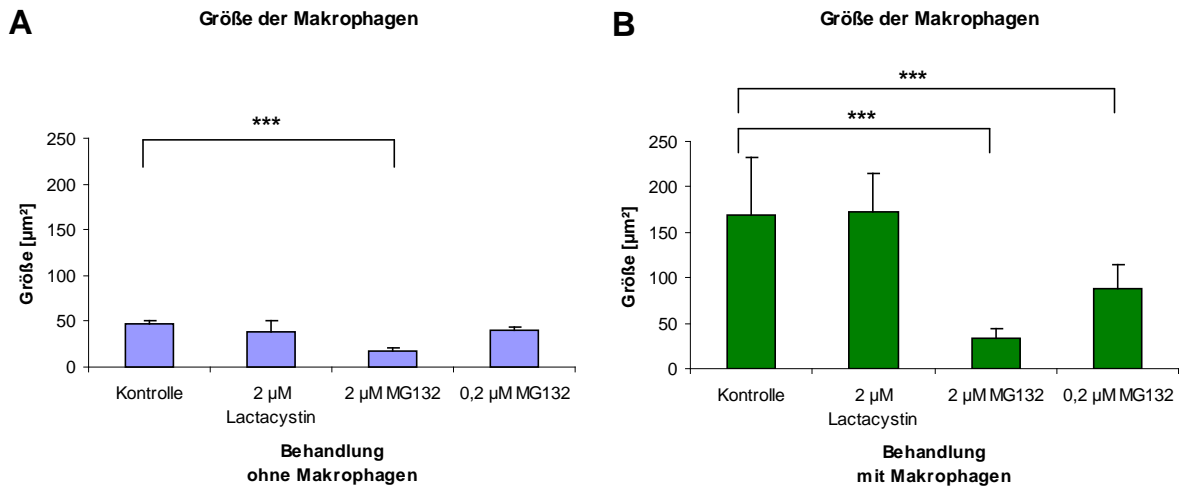


Abb. 17: Größe der Makrophagen bei Behandlung mit Inhibitoren. Ergebnisse des achten Versuchstages. In beiden Versuchsreihen zeigten sich signifikant kleinere Makrophagen im Vergleich zu den Kontrollen sowohl bei Anwendung von MG132 in niedriger (0,2 μM) als auch höherer Konzentration (2 μM) (Dunnett-Test). Die Behandlung mit MG 132 in höherer Konzentration zeigt in beiden Versuchsreihen die kleinsten Makrophagen.

A) Kulturen ohne Makrophagen, B) Co-Kulturen mit Makrophagen

*** sehr signifikant

Tabelle 12 A, B im Anhang

3.2.3 Menge des phagozytierten Myelins *in vitro* nach Verwendung von Proteasom-Inhibitoren

Ähnliche Ergebnisse wie bei der Makrophagengröße lieferte die Analyse des von ihnen aufgenommenen Myelins. Die Menge des von den Makrophagen phagozytierten Myelins war nach Behandlung mit MG132 geringer als bei Applikation von Lactacystin. Dieser Effekt war bei der höheren Konzentration des MG132 ausgeprägter als bei der niedrigeren Konzentration (Abb. 18 A, B).

Dagegen hatte die Verwendung von Lactacystin kaum Auswirkungen auf die Myelinphagozytose. Nach der Behandlung mit Lactacystin war weder die Größe der Makrophagen ($p = 0,2006$ in Kulturen ohne Makrophagen; $p = 0,2808$ in Co-Kulturen; MWU-Test) noch die Menge des von ihnen phagozytierten Myelins ($p = 0,0546$ in Kulturen ohne Makrophagen; $p = 0,5501$ in Co-Kulturen; MWU-Test) signifikant geringer als in den Kontrollen.

Dies entsprach eher dem Effekt, wie er bei Verwendung von MG132 in einer Konzentration von 0,2 μM erzielt wurde. Für alle behandelten Kulturen gilt: je mehr phagozytiertes Myelin sich in den Makrophagen befand, desto höher war auch deren Zellgröße (Abb. Nr. 17, und 18).

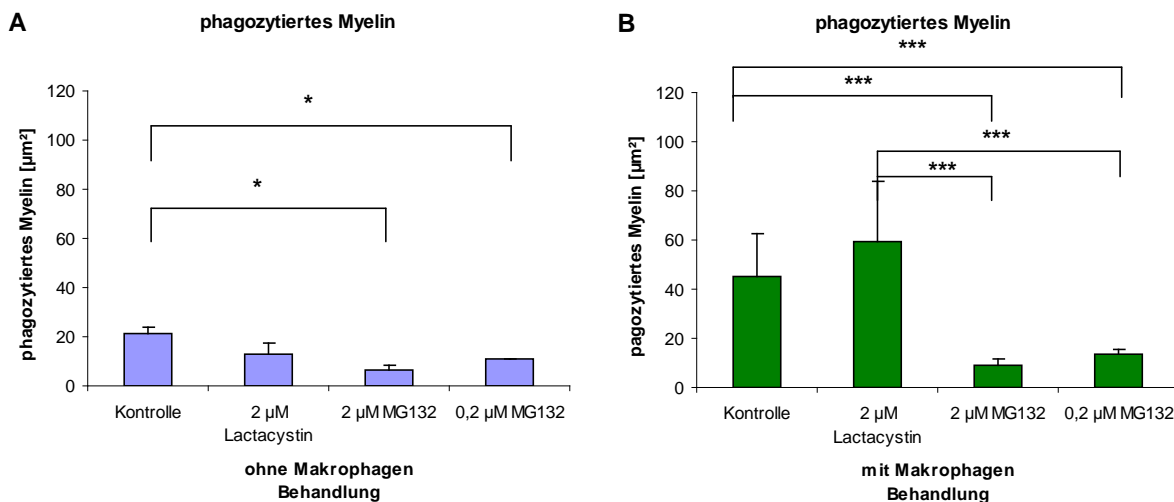


Abb. 18: Phagozytiertes Myelin bei Behandlung mit Inhibitoren. Ergebnisse des achten Versuchstages. In beiden Versuchsreihen zeigt sich signifikant weniger phagozytiertes Myelin bei Anwendung von MG132 in höherer Konzentration (2 μM) im Vergleich zu den Kontrollen. Dieser Effekt war bei den Co-Kulturen noch deutlicher, da hier ein signifikanter Unterschied von der hohen Konzentration MG132 im Vergleich zur Kontrolle und den anderen Inhibitoren gezeigt wurde. (Dunnett-Test);

A) Kulturen ohne Makrophagen, B) Co-Kulturen mit Makrophagen

* leicht signifikant, *** sehr signifikant

Tabelle 13 A, B im Anhang

Zusammenfassend hatte die Zugabe von Inhibitoren in den Versuchsansätzen mit oder ohne Makrophagen direkte Wirkung auf den Erhalt von Myelin und Axonen. Beide Inhibitoren sorgten beim Erhalt von Myelinscheiden und Axonen für eine höhere Anzahl, wobei sich die höhere Konzentration von MG132 am effektivsten zeigte.

Eine direkte Wirkung erzielten die Inhibitoren auch auf die zugegebenen Makrophagen. Die Anzahl der Makrophagen war nach der Behandlung geringer, jedoch waren sie auch kleiner und hatten weniger Myelin phagozytiert, wenn die Kulturen mit MG132 behandelt worden waren, dagegen wirkte sich die Zugabe von Lactacystin kaum auf die Größe der Makrophagen aus.

3.3 Wallersche Degeneration *in vivo* nach Anwendung von Proteasom-Inhibitoren

Nach den vielversprechenden Ergebnissen der *in-vitro*-Versuche hinsichtlich der neuroprotektiven, makrophagenhemmenden Wirkung insbesondere des Proteasom-Inhibitors MG132, untersuchten wir dessen Wirkung anschließend *in vivo*. Der Inhibitor Lactacystin wurde nicht *in vivo* angewendet, da die Daten *in vitro* nicht erwarten ließen, dass sich ein nennenswerter Effekt insbesondere hinsichtlich der Makrophagen zeigen würde.

Nach den operativ durchgeführten Durchtrennungen der *Nervi ischiadici* erschienen alle Tiere gesund und aktiv. Im Unterschied zu unbehandelten Tieren zeigten sie lediglich die zu erwartende Parese des operierten Hinterbeines. Die Entnahme der Nerven und deren Aufarbeitung erfolgten am Tag vier nach der Axotomie. Von dem getesteten Proteasom-Inhibitor MG132 wurden 20µg oder 100µg intraperitoneal (i.p.) appliziert. Zusätzlich erfolgte eine Testreihe bei der 50µg dieses Inhibitors mit Hilfe eines Gelatine-Schwamms ("Spongostan[®]", siehe Material und Methoden) appliziert wurde.

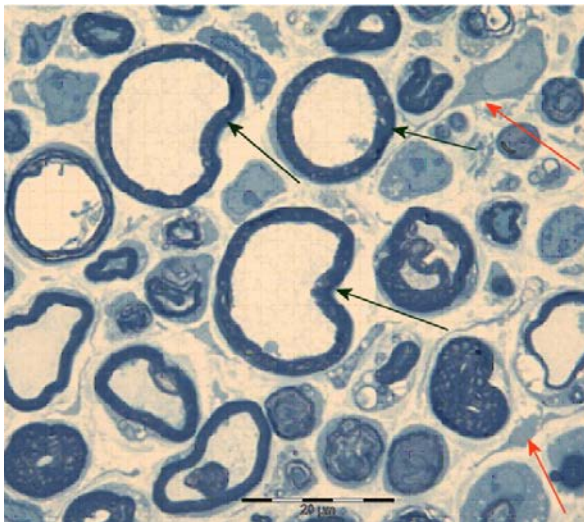


Abb. 19: Semidünnschnitt eines durchtrennten contralateralen Nervs ohne Behandlung. Man erkennt gut erhaltene Myelinscheiden (schwarze Pfeile). Diese erscheinen im Vergleich zu Abb. 20 jedoch „leer“. Sie enthalten keine Axone mehr. Rechts oben und unten im Bild findet sich jeweils ein Makrophage mit pseudopodienartigen Fortsätzen (rote Pfeile). Maßstab 20µm

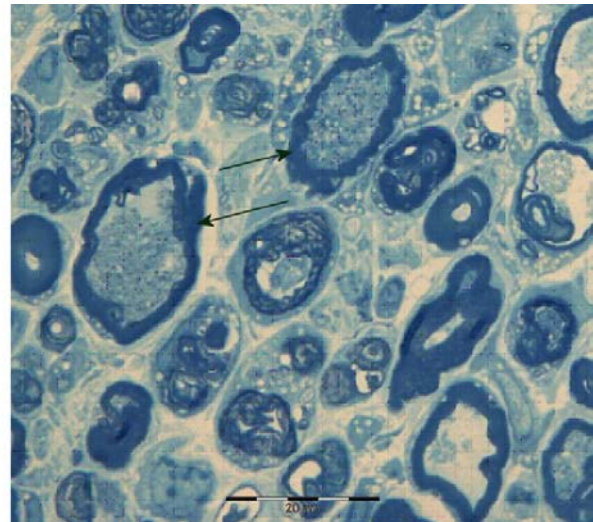


Abb. 20: Semidünnschnitt eines durchtrennten Nervs mit erhaltenen Axonen. Applikation von 50µg MG132 mittels Gelfoam. In der Mitte oben und links im Bild finden sich gut erhaltene Myelinscheiden (schwarze Pfeile). Diese enthalten noch sehr viele Axone. Maßstab 20µm

3.3.1 Myelin- und Axonparameter *in vivo* nach Applikation von Proteasom-Inhibitoren

Die Gabe von MG132 wirkte sich grundsätzlich auf die verschiedenen, gemessenen Parameter aus - allerdings in unterschiedlicher Ausprägung.

Hinsichtlich der Erhaltung des Myelins nach der Axotomie des Ischiasnerven hatte die niedrige Konzentration von MG132 (20µg) den stärksten Effekt. Im Vergleich zur Konzentration von 100µg und der Applikation via Gelatineschwamm war dieser Unterschied extrem signifikant (Abb. 21).

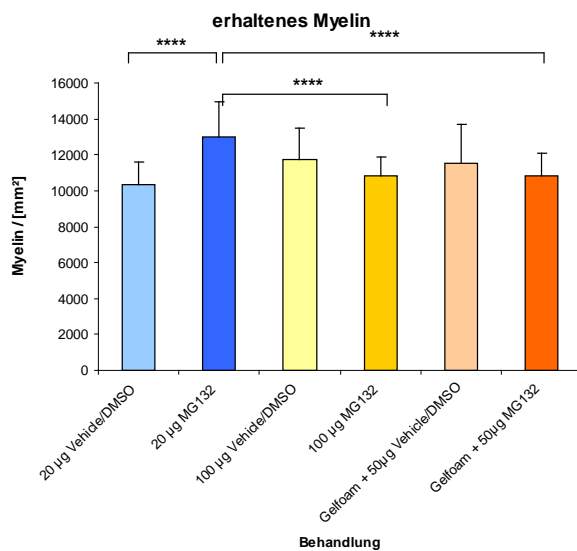


Abb. 21 Erhaltenes Myelin bei *in-vivo*-Versuchen und Behandlung mit MG132 in verschiedenen Konzentrationen. Die Verwendung von MG132 in niedriger Konzentration (20µg, dunkelblau) zeigte den größten Effekt hinsichtlich der Erhaltung des Myelins. (Mann-Whitney-U-Test);
**** extrem signifikant
Tabelle 14 im Anhang

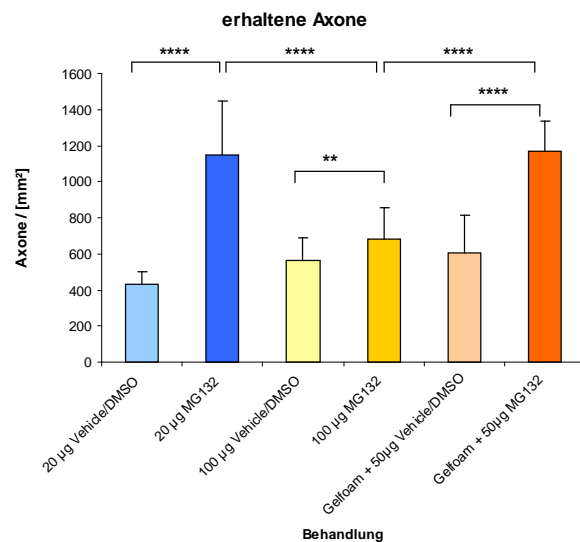


Abb. 22: Erhaltene Axone bei *in-vivo*-Versuchen und Behandlung mit MG132 in verschiedenen Konzentrationen. Die Gabe von 20 µg MG132 i.p. sowie mittels Gelfoam zeigten hier die größte Wirksamkeit. (Mann-Whitney-U-Test);

** signifikant, **** extrem signifikant
Tabelle 15 im Anhang

Bei der Verwendung von MG132 in niedriger Konzentration und mittels Gelatineschwamm fanden wir eine deutlich größere Anzahl erhaltener Axone (Abb. 22). Die Axonflächen auf der contralateralen Seite waren bei der Gruppe mit niedriger Inhibitorkonzentration am größten (Abb. 23.), während die Anzahl von Mitochondrien in dieser Gruppe am geringsten war (Abb. 24). Die geringere Anzahl von Mitochondrien und die Tatsache, dass die Axone durchschnittlich am größten waren, muss aber nicht zwangsläufig auf die Gabe des Inhibitors

zurückzuführen sein. Insbesondere die Gruppe der 20µg-Injektion zeigt in beiden Fällen – Kontrollen und behandelte Tiere – durchweg größere Axonflächen (Abb.23).

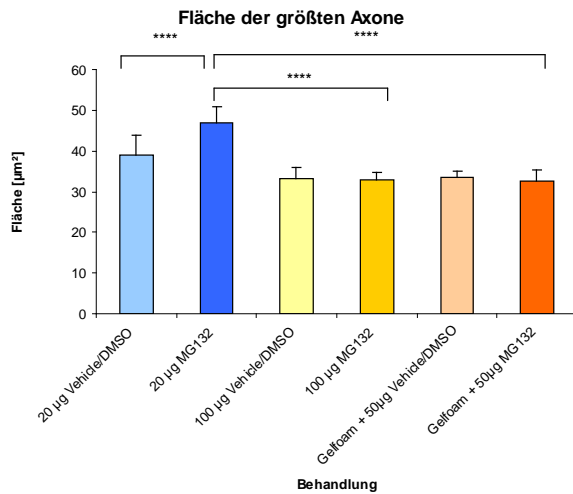


Abb. 23 Fläche der größten Axone in contralateralen Nerven nach Behandlung mit MG132. Hier zeigte sich wieder die signifikant stärkere Wirkung des MG132 in niedriger Konzentration im Vergleich zu den übrigen Anwendungen. (Mann-Whitney-U-Test);
 **** extrem signifikant
 Tabelle 16 im Anhang

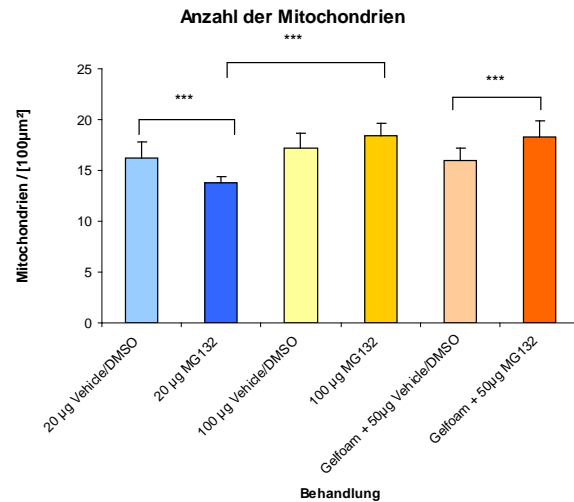


Abb. 24 Anzahl der Mitochondrien bei *in-vivo*-Versuchen und Behandlung mit MG132 in verschiedenen Konzentrationen. Die Anzahl der Mitochondrien war bei 20µg MG132 am geringsten. (Mann-Whitney-U-Test);
 *** sehr signifikant
 Tabelle 17 im Anhang

3.3.2 Makrophagenparameter *in vivo* nach Applikation von Proteasom-Inhibitoren

Die Wirkung der Proteasom-Inhibitoren auf Makrophagen wurde an Hand der Anzahl und Größe der Makrophagen, sowie der Menge des von ihnen aufgenommenen Myelins betrachtet. Hierbei ergaben sich folgende, bemerkenswerte Ergebnisse. Die Anzahl der Makrophagen war bei der niedrigeren Konzentration MG132 zwar am höchsten (Abb. 25), jedoch waren sowohl ihre Größe (Abb. 26) als auch die Menge des von ihnen phagozytierten Myelins (Abb. 27) eher gering.

Die Applikation von MG132 mittels Gelatineschwamm zeigte zwar eine relativ geringe Anzahl von invadierten Makrophagen (Abb. 25), jedoch waren die gefundenen Exemplare überdurchschnittlich groß (Abb. 26) und wiesen eine dementsprechend große Menge an inkorporiertem Myelin auf (Abb. 27).

Zusammenfassend ließen sich folgende Feststellungen zu unseren Experimenten machen:

Die Applikation des Proteasom-Inhibitors MG132 nach Axotomie zeigte die größte Auswirkung prinzipiell bei Betrachtung der erhaltenen Axone im distal degenerierenden Nervenstück. Hier führten die i.p.-Injektion und die Applikation mittels Gelatineschwamm *in vivo* zu einer signifikanten Erhöhung erhaltener Axone. Auch die *in-vitro*-Versuche zeigten uns eine deutliche Wirkung auf den Erhalt von Axonen (vgl. Abb. 15 in Kapitel 3.2.1, S 32). Alle Inhibitor-Anwendungen zeigten *in vitro* und *in vivo* eine deutlich höhere Anzahl erhaltener Axone als in den Kontrollen. Am wirksamsten war *in vitro* jedoch die höhere Konzentration von MG132 (2 μ M), während bei den *in-vivo*-Versuchen die niedrigeren Konzentrationen (20 μ g i.p. und 50 μ g via Gelatineschwamm) wirksamer waren als die Anwendung von 100 μ g MG132 intraperitoneal.

Alle anderen Parameter, insbesondere die Makrophagenparameter und die Menge des phagozytierten Myelins, stehen allerdings eher im Gegensatz zu den Gewebekultur-Daten, was in Kapitel 4.4 und 4.5 näher diskutiert wird. Die nahezu unveränderten Makrophagenzahlen bei gleichzeitig nur leicht erhöhter Zellgröße und inkorporierter Myelinmenge (mit Ausnahme der 20 μ g i.p.-Gruppe) deuten auf eine Verstärkung der Phagozytoseleistung dieser Zellen hin, aber nicht auf eine verminderte Migrationsfähigkeit. Die Unterschiede bei den beiden i.p.-Konzentrationen könnten darauf hindeuten, dass es für den Inhibitor MG132 ein Wirkoptimum gibt, das eher in einem geringeren Konzentrationsbereich liegt.

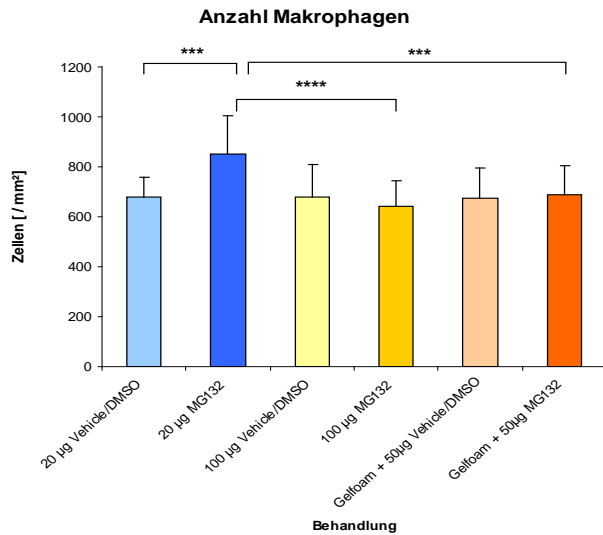


Abb. 25 Anzahl der Makrophagen bei *in-vivo*-Versuchen und Behandlung mit MG132 in verschiedenen Konzentrationen. Die Anzahl der Makrophagen war bei 20µg MG132 am höchsten. (Mann-Whitney-U-Test);
 *** sehr signifikant, **** extrem signifikant
 Tabelle 18 im Anhang

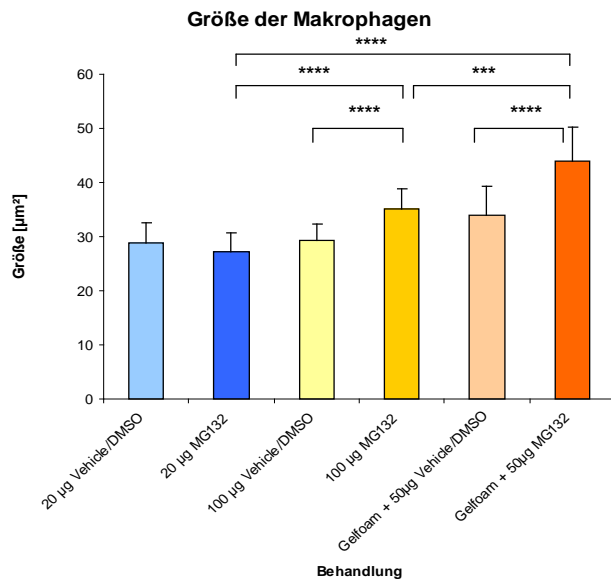


Abb. 26 Größe der Makrophagen bei *in-vivo*-Versuchen und Behandlung mit MG132 in verschiedenen Konzentrationen. Die kleinsten Makrophagen fanden sich bei Verwendung von MG132 in niedriger Konzentration. Die größten Makrophagen zeigten sich hingegen bei Applikation des Inhibitors mittels Gelfoam. (Mann-Whitney-U-Test);
 *** sehr signifikant, **** extrem signifikant
 Tabelle 19 im Anhang

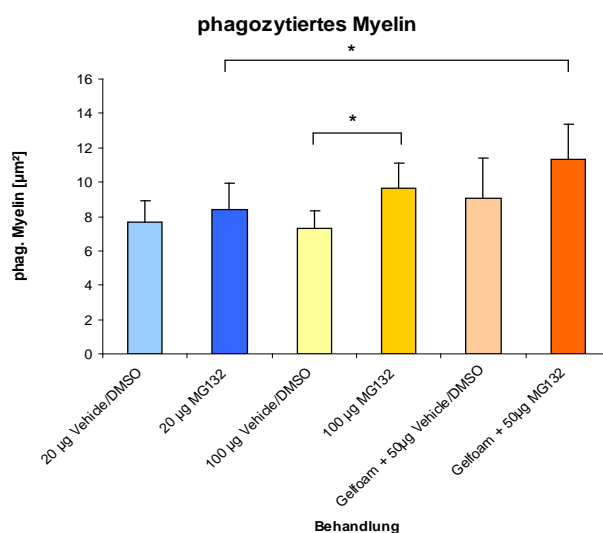


Abb. 27 Menge des phagozytierten Myelins in den Makrophagen bei *in-vivo*-Versuchen und Behandlung mit MG132 in verschiedenen Konzentrationen und Applikationen. Bei allen Applikationen zeigten sich erhöhte Myelinmengen nach Inhibitor-Gabe. (Mann-Whitney-U-Test);
 * leicht signifikant
 Tabelle 20 im Anhang

4 Diskussion

4.1 Validität des *in-vitro*-Modells

Das *in-vitro*-Modell der Wallerschen Degeneration aus Nervensegmenten und co-kultivierten Peritonealmakrophagen (siehe Kapitel 1.4) stellt nur ein angenähertes Modell der komplexen physiologischen Vorgänge dar. Es ermöglicht jedoch einen selektiven Blick auf das Zusammenspiel von Makrophagen, Schwann-Zellen, Myelinscheiden und Axonen. Letztere verbleiben nach Axotomie ohne Verbindung zum Zelleib des zugehörigen Motoneurons. Bleiben sie trotzdem im distalen Nervensegment intakt, so muss es hierfür benefizielle Bedingungen innerhalb der kurzen Axonstücke geben oder sie könnten unter dem Einfluss protektiver Faktoren der sie noch umhüllenden Schwann-Zellen erhalten bleiben.

Das *in-vitro*-Modell kann als eine Art Zwischenstufe zwischen Zellkulturen und der *in-vivo*-Situation betrachtet werden. Die Anwendung dieses Modells hat sich über Jahre bewährt und zeigt - analog zu den Vorgängen *in vivo* - eine zunehmende Degeneration von Myelinscheiden und den darin enthaltenen Axonen. Auch *in vitro* zeigt sich eine über den zeitlichen Verlauf zunehmende Invasion von nicht-residenten Makrophagen (Hann-Bonnekoh et al. 1989). Das Modell liefert insgesamt aussagekräftige Ergebnisse, deren Übertragbarkeit zur Fragestellung dieser Arbeit geführt haben.

4.2 Zeitverlauf der Wallerschen Degeneration

Die Abläufe der Wallerschen Degeneration in peripheren Nerven können grob in vier Phasen unterteilt werden (Brück 1997; Siebert et al. 2001a). In der ersten Phase werden periphere Makrophagen durch Zytokine aktiviert. Dieser Vorgang findet nur *in vivo* statt. In Phase zwei erfolgt die Migration der Makrophagen in den peripheren Nerven, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. In unseren Co-Kultur-Versuchen kam es, wie in Kapitel 3.1.2, S. 27 beschrieben, ab dem zweiten Versuchstag zu einer massiven Invasion von Peritonealmakrophagen in die Nervenstücke (Abb. 9). Diese Invasion scheint also auch *in vitro* einen Zeitraum von ca. 2 Tagen in Anspruch zu nehmen. Dies entspricht dem Zeitraum der Makrophagen-Invasion *in vivo* (Perry et al. 1987; Bendszus und Stoll 2003).

Dieser Phase folgt die Erkennung von opsonierten Zell-Bestandteilen, was durch eine Hochregulation von Makrophagen-Antigenen, wie z.B. dem Mac-1 und Fc-Rezeptor

charakterisiert ist (Brück et al. 1995; Brück 1997; Stoll und Muller 1999; Siebert et al. 2001a). Schließlich folgt die Phagozytose der Zell-Trümmer in der vierten Phase. Unsere Versuche zeigten einen fortschreitenden Abbau von Axonen und Myelinscheiden. Diese bildeten auch *in vitro* die typischen Myelinovoide, welche bereits durch mehrere Forschungsgruppen beschrieben wurden (Lunn et al. 1989; van der Laan et al. 1996; Brück 1997; Stoll und Muller 1999; Hirata und Kawabuchi 2002; Zhai et al. 2003; Gitik et al. 2011). Konkret zeigten unsere Versuche, dass in weniger als 10% der nach acht Versuchstagen erhaltenen Myelinscheiden noch Axone vorhanden waren.

Durch die Ergebnisse der Zeitreihe verfügen wir über eine Vergleichsmöglichkeit, um unsere Ergebnisse der Inhibitorversuche, vor allem bezüglich der Makrophagenzahlen und Axondegeneration, einordnen zu können. Interessant ist, dass die Anzahl der Makrophagen bis zum vierten Tag ansteigt und dann bis zum achten Versuchstag wieder langsam abfällt. Hierzu lieferten van Rossum et al. (2008) andere Ergebnisse. Sie beobachteten die Entwicklung der Makrophageninvasion in dem gleichen *in-vitro*-Modell über den Zeitraum von 10 Tagen. Dabei fanden sie einen konstanten Anstieg der eingewanderten Peritoneal-Makrophagenzahlen über den gesamten Zeitraum (van Rossum et al. 2008). Allerdings basieren ihre Daten auf dem immunhistochemischen Nachweis von Markern für Oberflächenproteine von Makrophagen (F4/80, CD11b, CD204 und CD16/CD32), während unsere Befunde aus der mikroskopischen Auswertung von Semi-Dünnschnitten stammen.

Zusammenfassend kann durch unsere Experimente für den zeitlichen Ablauf der Wallerschen Degeneration *in vitro* bestätigt werden, dass nicht-residente Makrophagen in den peripheren Nerv einwandern und die Haupteffektorzellen der Myelinphagozytose sind.

Eine Hemmung dieser Makrophagen führt zu einer geringer ausgeprägten Degeneration von peripheren Nerven nach Axotomie, was die Ergebnisse mehrerer Forschungsarbeiten bestätigt (Beuche und Friede 1986; Brück und Friede 1990a, b; Reichert et al. 2001; Siebert et al. 2001a; Hirata und Kawabuchi 2002). Wie diese Hemmung auch durch Proteasom-Inhibitoren realisiert werden kann wird im Folgenden diskutiert.

4.3 Der protektive Einfluss der Proteasom-Inhibitoren auf Axone während der Wallerschen Degeneration *in vitro* und *in vivo*

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, wirkt die Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren neuroprotektiv auf Axone *in vitro* und *in vivo*.

Unsere Ergebnisse bestätigen die Versuche von Zhai et al. aus dem Jahre 2003. Sie konnten an Hand von *in-vitro*-Versuchen an sympathischen Grenzstrangganglien der Ratte zeigen, dass die Anwendung von MG132 (20µM) und Lactacystin (20µM) die Axondegeneration signifikant verzögern konnte. Unbehandelte Kulturen zeigten schon 8 Stunden nach Axotomie frühe Anzeichen für Axondegeneration (fokale Schwellung und Wulstbildung), während dies bei den behandelten Kulturen erst nach 16 Stunden beobachtet wurde. Sie bemerkten jedoch auch, dass die protektiven Effekte nur auftraten, wenn die Inhibitoren den Kulturen schon vor der Axotomie zugefügt wurden (Zhai et al. 2003). Daraus folgerten sie eine Beteiligung des UPS schon in den ersten Stufen der Wallerschen Degeneration. Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass das UPS eine Rolle bei der Desintegration des axonalen Zytoskeletts spielt. Dies wurde an Hand des verzögerten Abbaus von Mikrotubuli in Gegenwart von MG132 gezeigt.

Auch die Ergebnisse von Lee HK et al (2009) wurden durch unsere Experimente bestätigt. Sie behandelten axotomierte Ischias-Nerven der Maus *in vivo* mit MG132 (100µM). Die anschließenden immunzytochemischen Färbungen gegen Neurofilamente zeigten eine signifikante Verzögerung der Axondegeneration (Lee HK et al. 2009).

Zusammenfassend entsprechen die Ergebnisse von Zhai et al. (2003) und Lee HK et al. (2009) unserer Beobachtung, dass die Anwendung von MG132 einen protektiven Effekt auf die Axone während der Wallerschen Degeneration *in vitro* und *in vivo* hat.

Unser Co-Kultur-Modell enthält neben den untersuchten Axonen und Makrophagen den gesamten Zellverband mitsamt der Schwann-Zellen. Als Modell bildet es so eine Art Zwischenstufe zwischen den reinen Ganglienzell-Kulturen von Zhai et al. (2003) und den *in-vivo*-Versuchen von Lee HK et al. (2009). Die komplexe Realität mit zahlreichen Interaktionen zwischen einzelnen Zellpopulationen wird in unserem Modell wahrscheinlich näher abgebildet als in den reinen Kulturen ohne Glia-Zellen.

***In vivo* zeigt sich eine konzentrationsabhängige Wirkung von MG132 auf Axone**

Ein Aspekt unserer *in-vivo*-Experimente muss jedoch Beachtung finden: Im contralateralen Nerv der Mäuse, die mit der geringeren Konzentration von MG132 behandelt wurden, waren die Axonflächen am größten. Es ist allgemein bekannt, dass großkalibrige Axone und Myelinscheiden Stress jeglicher Genese besser kompensieren können als diejenigen mit kleinerem Kaliber. Wir müssen also davon ausgehen, dass die Behandlungsgruppe mit der geringeren Konzentration MG132, entsprechend den Daten aus dem contralateralen Nerv, schon per se mit stress-resistenteren, größeren Axonen ausgestattet war. Einen weiteren Hinweis hierfür liefert unser Befund, dass in dieser Gruppe weniger Mitochondrien gefunden wurden. Ein gehäuftes Auftreten von Mitochondrien wäre ein Indikator für erhöhten oxidativen Stress. Dieser wäre also in der Gruppe mit der niedrigeren Konzentration MG132 am geringsten ausgeprägt. Diese Betrachtung wäre daher eine mögliche Erklärung für den sehr ausgeprägten Axonerhalt *in vivo* bei Verwendung der geringeren Konzentration MG132 (20µg) gegenüber einer Konzentration von 100µg. Es gibt Hinweise darauf, dass intakte Mitochondrien insbesondere für postmitotische Nerven- und Muskelzellen essentiell sind und dass eine Schädigung dieser Organellen die Pathologie vieler Erkrankungen im PNS und ZNS mitbestimmt (Bertoni-Freddari et al. 2004; Stichel et al. 2007). Auch beim Morbus Parkinson spielen pathologische Veränderungen an Mitochondrien eine entscheidende Rolle (Van Laar et al. 2008).

Die geringe Anzahl an Mitochondrien könnte allerdings auch Zeichen eines verlangsamten axonalen Transportes dieser Zellorganellen sein. Dieser Transport wird durch das Mikrotubuli-System geleistet, wobei die Mikrotubuli durch bestimmte Proteine, sog. „MAP“ (Mikrotubuli-assoziiertes Protein) stabilisiert werden (Pathak et al. 2010). Proteine die mit der Integrität des Mikrotubulus-Systems assoziiert sind, könnten ein Ziel für den UPS-gesteuerten Abbau sein und müssten in Folge der Anwendung von Proteasom-Inhibitoren eine gewisse Protektion erfahren. Wie bereits erwähnt, konnten Zhai et al (2003) zeigen, dass die axonalen Mikrotubuli in Gegenwart von MG132 verzögert abgebaut wurden. Diese durch uns nicht untersuchte Beobachtung macht die Theorie einer geringeren Anzahl von Mitochondrien auf Grund einer eingeschränkten Transportleistung des Mikrotubulus-Systems eher unwahrscheinlich.

Die geringe Anzahl an Mitochondrien könnte jedoch auch ein Hinweis auf ein Wirkoptimum von MG132 in einem niedrigeren Konzentrationsbereich *in vivo* sein. Eine solche konzentrationsabhängige Wirkung von MG132 und anderen Proteasom-Inhibitoren

(Lactacystin, ALLN und Epoxomicin) auf hippocampale Zellen (HT22) *in vitro* konnte von Maher (2008) gezeigt werden. Hier wurde ein neuroprotektiver Effekt von niedrigen Dosen beobachtet, der durch die Reduktion von toxischen, mitochondrialen Sauerstoffradikalen (ROS "*reactive oxygen species*") und eine Aktivierung von NF- κ B erklärt werden kann (Maher 2008). Daher wurde aus diesen Ergebnissen geschlossen, dass Proteasom-Inhibitoren in geringer Dosierung einen moderaten oxidativen Stress auslösen und dadurch konsekutiv neuroprotektive Abläufe aktivieren (Maher 2008). Ähnliches könnte für die *in-vivo*-Situation gelten und wäre eine mögliche Erklärung für den von uns beobachteten, ausgeprägten Myelin- und Axonerhalt bei der niedrigeren Konzentration MG132. Ähnliche konzentrationsabhängige Effekte von Proteasom-Inhibitoren konnten auch andere Arbeitsgruppen zeigen (Hamano et al. 2009).

Eine weitere Hypothese zur Klärung der unterschiedlich ausgeprägten Axonprotektion *in vivo* könnten Prozesse sein, die im lebenden Organismus möglicherweise viel früher und effektiver zur Axondegeneration beitragen. Ein Beispiel für einen solch frühen Prozess könnte die von Kerschensteiner et al. im Jahr 2005 erstmals beschriebene *acute axonal degeneration* (AAD) (Kerschensteiner et al. 2005) sein. Hier wurde eine *in-vivo*-Studie an GFP-transgenen Mäusen durchgeführt. In den Axonen dieser Mäuse wird auf Grund des Thy1-gekoppelten GFP-Promotors ein grün-fluoreszierendes Protein (GFP = *green fluorescent protein*) ausschließlich in Nervenzellen exprimiert. Dadurch können einzelne Axone im chirurgisch freigelegten Hinterstrang des Rückenmarks mit einem speziellen Epifluoreszenz-Mikroskop über mehrere Tage beobachtet werden. In einem darauf basierenden Modell gelang es der Gruppe um Misgeld et al. (2007), den axonalen Transport von Mitochondrien *in vivo* und in explantierten Nerven selektiv darzustellen (Misgeld et al. 2007). Nach Durchtrennung von Axonen traten bereits nach 20 Minuten am proximalen und distalen Stumpf axonale Schwellungen auf. Daraufhin folgten innerhalb von ca. 5 Minuten die Fragmentierung und Beseitigung von Axonen auf einer Strecke von bis zu 150 μ m proximal und distal der Läsion (Kerschensteiner et al. 2005; Misgeld et al. 2007). Der schnelle Beginn dieses Prozesses könnte nach Kerschensteiner et al. (2005) und Saxena und Caroni (2007) ein Hinweis darauf sein, dass extrazellulär vorhandene Substrate wie z.B. Kalzium durch die Läsion in das Zytosol gelangen und so den Prozess initiieren (Kerschensteiner et al. 2005; Saxena und Caroni 2007). Ausgehend von dieser Beobachtung könnte man annehmen, dass die Kaliber-stärkeren Axone in unserer mit 20 μ g MG132 behandelten Gruppe *in vivo* die AAD besser kompensieren als die im Durchschnitt deutlich kleineren Axone bei der höheren Inhibitorkonzentration.

Bei den Versuchen *in vivo* könnte ein weiterer Prozess zum Tragen kommen. Wie in Kapitel 1.2 erwähnt, resultiert aus einer UPS-Blockade eine Hochregulation der lysosomalen Makroautophagie, denn das Lysosom scheint bis zu einem gewissen Maße in der Lage zu sein, ubiquitinierte Substrate aufzunehmen und abzubauen (Webb et al. 2003; Ding et al. 2007; Hoyer-Hansen und Jaattela 2007; Pandey et al. 2007; Rubinsztein 2007). Dies könnte ein Hinweis auf die Abhängigkeit der intrazellulären Proteinhomöostase von einem Zusammenwirken von UPS und Lysosom sein (Korolchuk et al. 2010; Wong und Cuervo 2010). Für unsere *in-vivo*-Experimente könnte eine erhöhte lysosomale Aktivität bei der geringeren Konzentration MG132 eine Erklärung für die offenbar stärker ausgeprägte Neuroprotektion als Folge eines gewissen Kompensationsmechanismus sein. Durch Anwendung der höheren Konzentration könnte es hingegen zu einem derart raschen Anstieg von UPS-Substraten kommen, dass die intrazelluläre Proteinhomöostase irreversibel aus dem Gleichgewicht gerät und pro-apoptotische Faktoren überwiegen (siehe Kapitel 4.5). Die Aktivität des Lysosoms wurde durch unsere Experimente allerdings nicht erfasst und müsste daher gesondert untersucht werden.

Man könnte außerdem annehmen, dass eine intakte Blut-Nerven-Schranke (BNS) *in vivo* die Permeation des Proteasom-Inhibitors MG132 in den distalen Nervenstumpf verändert. *In vivo* ist die BNS nur am Ort der Axotomie geschädigt. Proximal und distal davon übten wir keinen direkten Einfluss auf die BNS aus. *In vitro* hingegen wurde das Perineurium, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, von den Nerven entfernt. Dadurch ergibt sich theoretisch eine größere Oberfläche der Nerven, die dem Inhibitor "ungeschützt" ausgesetzt ist. In wie weit die BNS den Durchtritt von MG132 überhaupt beeinflusst, müsste gesondert geklärt werden. Neue Untersuchungsmethoden zur Permeabilität der Blut-Nerven-Schranke *in vivo* stehen seit kurzem zur Verfügung. Wessig et al. (2011) beschreiben erstmals die Möglichkeit axotomierte periphere Nerven nach Behandlung mit dem Kontrastmittel "Gadofluorine M" *in vivo* darzustellen. Das Kontrastmittel akkumuliert in peripheren Nerven mit verletzter BNS und macht so deren Darstellung im T1-gewichteten Magnetresonanztomographen (MRT) möglich (Wessig et al. 2007; Wessig 2011).

Bei der Anwendung von MG132 mittels Gelatineschwamm *in vivo* konnten wir ebenfalls einen deutlich protektiven Effekt auf die Axone beobachten. Ein Teil dieses Effektes könnte durch eine mechanische Komponente bedingt sein. Der Gelatineschwamm könnte die

axotomierte Stelle interponieren und direkt am distalen Stumpf eine lokal begrenzte, aber dafür recht hohe Wirkstoffmenge des Inhibitors bereitstellen. Nach Herstellerangaben enthält der Schwamm keinerlei Zusatzsubstanzen wie Heparin oder Serumkomponenten. Dies macht den Einfluss von anderen Inhaltsstoffen sehr unwahrscheinlich. Möglich wäre auch eine Art mechanische Barriere durch den *in vivo* langsam zerfallenden Schwamm, der die Makrophageninvasion behindert. Dies würde unsere Beobachtung erklären, dass in diesen Nerven relativ geringe Makrophagenzahlen gefunden wurden. Letztendlich zeigt die Anwendung mittels Gelatineschwamm deutliche Effekte auf Axone und Makrophagen und könnte eine interessante Alternative zur systemischen Applikation sein.

4.4 Der protektive Einfluss der Proteasom-Inhibitoren auf Myelin und Schwann-Zellen während der Wallerschen Degeneration

MG132 limitiert den Myelinabbau in peripheren Nerven *in vitro*

Hinsichtlich des Myelins ist die neuroprotektive Wirkung des MG132 in unseren Gewebekulturen besonders deutlich. Auch in dieser Hinsicht konnten wir die Ergebnisse von Lee HK et al. (2009) bestätigen. Als morphologisches Korrelat für degenerierende Myelinscheiden betrachteten sie die in Kapitel 1.1.1 erwähnten Myelinovoide, welche degradierte Myelinscheiden und Axone enthalten. Die Anwendung von MG132 (2 μ M) oder Lactacystin (50 μ M) in einer *ex-vivo*-Kultur resultierte in einer signifikanten Verringerung der Bildung dieser Ovoide (Lee HK et al. 2009). Folglich wird also das UPS zur Bildung von Myelin-Ovoiden benötigt.

Sie schlussfolgerten aus ihren Ergebnissen, dass das UPS sowohl beim Myelinabbau als auch bei der Axondegeneration eine wichtige Rolle spielt (Lee HK et al. 2009). Beide Aussagen können wir durch unsere Ergebnisse bestätigen.

Außerdem konnten sie beobachten, dass die *in-vitro*-Anwendung von MG132 (0,5 μ M) und Lactacystin (20 μ M) in Kulturen von Schwann-Zellen ein drastisches Wachstum der Zellfortsätze von Schwann-Zellen und einen Stillstand des Zellzyklus bewirkten. Die Bildung langer Zellfortsätze wird bei diesen Zellen als Hinweis auf einen Myelin-bildenden, also differenzierten Phänotyp angesehen. UPS-Inhibitoren verringern also die Dedifferenzierung von Schwann-Zellen während der Wallerschen Degeneration (Lee HK et al. 2009). Diese Beobachtung muss nach Meinung der Autoren jedoch als ein zweiseitiges Schwert betrachtet werden. Die Neuroprotektion durch Proteasom-Inhibition könnte Nebeneffekte auslösen, die für Nervenregeneration eher ungünstige Bedingungen schaffen (Lee HK et al. 2009). So könnte der dedifferenzierte Phänotyp von Schwann-Zellen eine Voraussetzung zur Regeneration von Nerven sein, denn man betrachtet ihn als den myelinisierenden Phänotyp und darüber hinaus ist nur er zur Proliferation fähig (Vargas und Barres 2007). Eine toxische Wirkung des Proteasom-Inhibitors auf die Schwann-Zell-Population könnte nach Meinung von Lee HK et al. (2009) von Zeitpunkt und Dauer seiner Applikation abhängig sein. Offensichtlich wirkte insbesondere die von uns angewendete höhere Konzentration von MG132 (2 μ M) *in vitro* protektiv auf Myelin und Axone. Es müsste gesondert nachgewiesen werden, ob diese Konzentration die Fähigkeit der Schwann-Zellen sich zu dedifferenzieren und im Verlauf einer Regeneration einen myelinisierenden Phänotyp auszubilden verändert.

***In vivo* zeigt sich eine konzentrationsabhängige Wirkung von MG132 auf das Myelin**

Unsere *in-vivo*-Ergebnisse zeigen konzentrationsabhängige Effekte der Proteasom-Inhibition auf das Myelin. Die Anwendung der geringeren Konzentration i.p. zeigte einen ausgeprägten Erhalt des Myelins. Bei der höheren Konzentration i.p. und der Anwendung mittels Gelatineschwamm beobachteten wir tendenziell weniger erhaltenes Myelin als in den Kontrollen und leicht erhöhte Mengen an phagozytiertem Myelin. Man könnte dementsprechend eine allgemein toxische Wirkung der hohen Konzentration MG132 *in vivo* postulieren, da weniger erhaltenes Myelin und weniger Makrophagen gefunden wurden. Coleman et al. vermuteten bereits 2004, dass gerade Neuriten für die toxischen Effekte der Proteasom-Inhibitoren besonders empfindlich sein könnten, da ihrer Beobachtung nach Neuriten spontan von distal nach proximal degenerieren, wenn Lactacystin in höheren Konzentrationen angewandt wurde als bei den Versuchen von Zhai et al. (2003) (Zhai et al. 2003; Coleman und Ribchester 2004). Diese Beobachtung könnte analog zu Lactacystin auch für MG132 zutreffen, obwohl beide zu unterschiedlichen Inhibitor-Klassen gehören.

Coleman und Ribchester (2004) schließen aus den teilweise widersprüchlichen Beobachtungen, dass die bisher untersuchten Proteasom-Inhibitoren "ungenauere Werkzeuge" sind, da sie auch eine ganze Reihe anderer physiologischer Reaktionen unspezifisch beeinflussen. MG132 beispielsweise aktiviert die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNKs), während es neben dem Proteasom auch noch Cathepsine, Calpaine und NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) hemmt. Diese unspezifische Wirkung auf andere physiologische Vorgänge und eine wahrscheinliche Konzentrationsabhängigkeit könnten Erklärungen für die toxische Wirkung von Proteasom-Inhibitoren sein.

Bei der Betrachtung apoptotischer Vorgänge wird die Anhäufung von ubiquitinierten Proteinen nach Proteasom-Inhibition als ein möglicher Trigger für die Apoptoseinduktion gesehen. So zeigten diverse Zellen nach Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren eine Konglomeratbildung mit hohem Molekulargewicht und eine verminderte Verfügbarkeit von freien Ubiquitin-Monomeren (Wojcik 1997; Johnston et al. 1998). Die perinukleär gefundenen Ubiquitin-Aggregate wurden „Aggresome“ genannt (Johnston et al. 1998). Von den bisher getesteten Zellen zeigten alle diese Anhäufung von Ubiquitin-Konglomeraten nach Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren, jedoch führte dies nicht in allen Zellen zur Apoptose. Neuronale Zellen zeigen ebenfalls eine Anhäufung von Ubiquitin-Konglomeraten (Rideout et al. 2001; Ardley et al. 2003). Dies konnte bei verschiedenen neurodegenerativen

Erkrankungen gezeigt werden, wie z.B. Morbus Alzheimer und M. Parkinson, die charakterisiert sind durch eine intrazelluläre Anhäufung von ubiquitinierten Proteinen (Rideout et al. 2001; Wojcik 2002; Ardley et al. 2003; Ardley et al. 2004; Rideout et al. 2004; Mizuno et al. 2008).

Für die Anwendung von Proteasom-Inhibitoren in Kulturen von ZNS-Zellen wurden vergleichbare Beobachtungen beschrieben (Goldbaum und Richter-Landsberg 2004). Sie stellten eine Caspase 3-abhängige Apoptose-Aktivierung in Kulturen von Oligodendrozyten aus Rattenhirnen nach Proteasom-Inhibition durch MG132 und Lactacystin fest. Außerdem führte die Inhibition zur Anhäufung von Tau-Protein-haltigen Aggregaten und Hitzeschockproteinen. Dabei helfen Hitzeschockproteine die Sekundärstruktur von Zellproteinen aufrecht zu erhalten und führen fehlgefaltete Proteine dem UPS zur Degradation zu. So schützen sie die Zelle vor Denaturierung (Sherman und Goldberg 2001). Die intrazytoplasmatisch gefundenen Aggregate enthielten sowohl Tau-Protein, als auch Ubiquitin. Diese Ergebnisse führten sie zu der Vermutung, dass eine länger anhaltende Störung des UPS zu einer Erschöpfung der zellulären Schutzmechanismen und damit schließlich zum Zelltod führen kann (Goldbaum und Richter-Landsberg 2004; Goldbaum et al. 2006).

4.5 Der Einfluss der Proteasom-Inhibitoren auf Makrophagen während der Wallerschen Degeneration

Die Aktivität von Makrophagen lässt sich an Hand ihrer Migrations- und Phagozytoseleistung abschätzen. Deshalb soll im Folgenden der Effekt von Proteasomen-Inhibitoren auf die Migration und Myelinphagozytose von Makrophagen im peripheren Nerv diskutiert werden.

MG132 limitiert die Makrophagen-Invasion in periphere Nervenstücke *in vitro*

Auf die Makrophagen-Invasion wirkt das MG132 in Kultur sehr effektiv, während sich Lactacystin kaum auswirkt. So konnten wir nach Anwendung von MG132 *in vitro* eine signifikant geringere Migration in die Nervenstücke beobachten. Offenbar behindert die Anwendung der Proteasom-Inhibitoren *in vitro* die effektive Migration von Makrophagen in die Nervenstücke.

MG132 bewirkt *in vivo* keine Hemmung der Makrophageninvasion

In vivo ist der Einfluss auf die Makrophagen-Invasion nicht so deutlich wie *in vitro*. Die Gruppe mit der niedrigen Konzentration von intraperitoneal appliziertem MG132 enthielt sogar recht viele Makrophagen. Hier scheint also eine erleichterte Migration Folge der Inhibitorbehandlung zu sein. MG132 in höherer Konzentration und mit Gelatine-Schwamm zeigten *in vivo* keine relevante Beeinflussung der Migration.

Die Rekrutierung von Makrophagen aus dem peripheren Blut ist von Zytokinen abhängig. Schwann-Zellen und Makrophagen sezernieren unter anderem *leukemia inhibitory factor* (LIF), *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) (Tofaris et al. 2002) und *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) (Siebert et al. 2000). Diese Zytokine leiten invadierende Makrophagen zum Ort der axonalen Schädigung.

Möglicherweise vollzieht sich die Migration von nicht-residenten Makrophagen in den Co-Kulturen leichter als dies *in vivo* abläuft. Dieser Umstand wäre zumindest eine Erklärung für die sehr hohe Anzahl an *in vitro* invadierten Makrophagen in den Versuchen zur Zeitreihe und den Kontroll-Nervenstücken bei den Inhibitor-Versuchen.

Nach einer experimentellen Durchtrennung des Ischiasnerven können Makrophagen den axotomierten Nerv an der Durchtrennungsstelle invadieren. Jenseits davon muss *in vivo* die Blut-Nerven-Schranke (BNS) überquert werden. Die BNS besteht aus nicht-fenestrierten Endothelzellen und sog. *tight-junctions*. Sie limitiert unter physiologischen Bedingungen den Austausch von im Blut zirkulierenden Stoffen und Zellen mit dem Nervengewebe und erhält so die neuronale Homöostase unabhängig von systemischen Änderungen aufrecht (Weerasuriya und Mizisin 2011). Eine maximal erhöhte Permeabilität dieser Schranke wird unter physiologischen Bedingungen *in vivo* erst nach vier bis sieben Tagen beobachtet (Gray et al. 2007). Eine relevante Makrophagen-Invasion findet in unseren Experimenten also nur an der Axotomiestelle statt. Dabei spielt die Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) eine wichtige Rolle, denn Siebert et al. (2001b) konnten zeigen, dass eine unspezifische Hemmung der MMPs durch einen synthetischen Inhibitor die Makrophageninvasion signifikant verminderte (Siebert et al. 2001b). *In vitro* scheint außerdem ein toxischer Effekt des MG132 auf Makrophagen sehr wahrscheinlich, wenn man ihre Morphologie (eher kleine Zellen ohne pseudopodienartige Fortsätze; siehe Abb. 13) betrachtet. Diese Morphologie könnte mit einer verminderten Migrationsfähigkeit einhergehen.

MG132 hemmt die Myelinphagozytose durch periphere Makrophagen *in vitro*

MG132 zeigte *in vitro* einen deutlichen Effekt auf die Größe der Makrophagen und auf die Menge des von ihnen phagozytierten Myelins. Die Makrophagen stellten sich wesentlich kleiner dar und enthielten weniger phagozytiertes Myelin als in den Kontrollen. Diese Befunde sprechen für eine eingeschränkte Phagozytoseleistung durch Hemmung des UPS.

In lichtmikroskopischen Bildern der *in-vitro*-Co-Kulturen konnten wir am achten Versuchstag erkennen, dass die außerhalb der Nervenstücke liegenden Makrophagen in der MG132-Gruppe inaktiv und ohne pseudopodienartige Fortsätze erschienen bzw. bereits abgestorben waren. Offenbar wirkten die Proteasom-Inhibitoren in den gewählten Konzentrationen teilweise schon toxisch auf die Makrophagen. Dies könnte auf eine Störung des kontrollierten intrazellulären Stoffwechsels zurückzuführen sein, denn durch die Inhibition des UPS häufen sich intrazellulär ubiquitinierte Proteine an, die je nach Situation pro-apoptotisch (Franco et al. 2001; Fujihara et al. 2002) oder anti-apoptotisch wirken (Drexler 1998; Grimm und Osborne 1999; Orłowski RZ 1999; Lee MH et al. 2001; Jesenberger und Jentsch 2002; Suh et al. 2005; Tsuji et al. 2005).

Pro-apoptotisch wirkt beispielsweise der Einfluss der Inhibitoren auf NFκB, dessen Aktivierung durch Proteasom-Inhibition gestört wird. NFκB wird durch die Wirkung von MG132 nachweislich inaktiviert (Franco et al. 2001; Fujihara et al. 2002). In der Folge steht es der Zelle nicht mehr als wichtiger Transkriptionsfaktor zur Verfügung, was letztendlich zu Apoptose führen kann.

Eine weitere Rolle spielt das Tumorsuppressorgen p53, der sog. "Wächter des Genoms". Normalerweise wird dieses ständig ubiquitiniert und folglich durch das Proteasom degradiert (Fang et al. 2000). Sollte die Zelle jedoch Stress (Hitze, Oxidation, etc.) ausgesetzt werden, so entfällt die Degradierung des p53. Steigende p53-Spiegel induzieren Apoptose. Ein Anstieg des p53 und damit Apoptose kann auch durch Proteasom-Inhibition induziert werden (MacLaren et al. 2001).

Es werden jedoch auch anti-apoptotische Effekte einer Proteasom-Inhibition postuliert.

Lee MH et al. beobachteten 2001 dosisabhängige Effekte von Lactacystin auf neuronale Zell-Linien eines humanen Neuroblastoms (SK-N-MC). Niedrige Inhibitor-Dosen (1 μM) bewirkten zwar oxidative Proteinschäden und erhöhten die Anzahl an ubiquitinierten Proteinen, aber induzierten nicht die Apoptose. Bei höheren Dosen (25 μM) zeigten sich

apoptotische Zellen und die Autoren fanden außerdem höhere Spiegel von Stickstoffmonoxid (NO) (Lee MH et al. 2001).

Diese Beobachtung zeigte, dass Proteasom-Inhibitoren je nach Situation und Konzentration pro- oder anti-apoptotisch wirken konnten. Dies ergibt sich wahrscheinlich aus der großen Anzahl verschiedener Zielproteine des UPS. Hierunter fallen Transkriptionsfaktoren (z.B. das oben erwähnte NFκB), Regulatorproteine des Zellzyklus (z.B. p27, p53, p62), Caspasen und viele andere Proteine, die letztendlich in einem empfindlichen Gleichgewicht innerhalb der Zelle organisiert sind. Dieses Gleichgewicht scheint auf eine regelrechte Funktion der proteolytischen Systeme UPS und Lysosom absolut angewiesen zu sein.

Gleiches gilt vermutlich auch für die Makrophagen in unseren Experimenten. *In vitro* wurde ganz deutlich, dass sowohl die Makrophageninvasion als auch deren Myelinphagozytose durch MG132 stark eingeschränkt wurde. Die schwächeren Auswirkungen auf die Makrophagen *in vivo* könnten durch kompensatorisch aktivierte lysosomale Autophagie erklärt werden.

Janen et al. (2010) konnten zeigen, dass Astrozyten nach Behandlung mit MG132 eine erhöhte Autophagie-Funktion aufwiesen. Die Stimulation der Autophagie war zeit- und konzentrationsabhängig und blieb auch nach der Behandlung für einen gewissen Zeitraum erhöht. Offenbar trug die erhöhte Autophagie zur Beseitigung von Aggresomen bei, welche durch die Proteasom-Inhibition entstanden waren. Die Aggresome wurden weniger effektiv beseitigt und die Anzahl vitaler Astrozyten war geringer, nachdem ein Inhibitor der Makroautophagie (3-Methyladenin, 3-MA) appliziert wurde (Janen et al. 2010). Die Autoren schlossen aus ihren Ergebnissen, dass die Fähigkeit zur Steigerung der Autophagie einen Kompensationsmechanismus der Astrozyten darstellt, um die Widerstandsfähigkeit gegen proteosomalen Stress zu erhöhen.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Ding et al. (2007). An Hand von *in-vitro*-Experimenten an Colon-Carcinom-Zellen zeigten sie ebenfalls die Verknüpfung von lysosomaler Autophagie und dem UPS (Ding et al. 2007). Nach Behandlung der Carcinom-Zellen mit MG132 beobachteten sie die Bildung von autophagischen Vakuolen, was auf eine kompensatorisch erhöhte Autophagie nach Proteasom-Inhibition schliessen lässt. Außerdem beobachteten sie eine erhöhte Apoptose-Rate nach Autophagie-Inhibition durch 3-MA.

Die Erhöhung der Autophagie-Rate und weitere Kompensationsmechanismen scheinen in einem ansonsten gesunden Organismus effektiver abzulaufen als *in vitro* und könnten eine Erklärung für die *in vivo* geringere Hemmung der Makrophagen durch Proteasom-Inhibitoren sein.

MG132 wirkt neuroprotektiv *in vitro* und *in vivo*

Zusammenfassend lässt sich herausstellen, dass die Anwendung von Proteasom-Inhibitoren *in vitro* sowohl die Invasion von hämatogenen Makrophagen als auch deren Phagozytoseleistung effektiv einschränkt. Reziprok ergibt sich eine höhere Menge von erhaltenem Myelin und Axonen, was auch schon in früheren Studien ohne Inhibitoren gezeigt wurde (Friede und Brück 1993; Brück 1997). *In vivo* zeigt sich ein deutlicher Effekt auf den Erhalt von Axonen, was auch durch die Arbeitsgruppe um Lee HK et al. gezeigt wurde (Lee HK et al. 2009).

Die Wirkung von MG132 *in vivo* ist konzentrationsabhängig

Der Effekt von MG132 zeigt sich *in vivo* am deutlichsten für den Erhalt von Axonen. Die Auswirkungen auf Myelin und Makrophagen sind *in vivo* eher gering ausgeprägt und sie sind offenbar konzentrationsabhängig. *In vitro* scheint die höhere Konzentration von MG132 einen stärkeren neuroprotektiven Effekt zu haben. Eine konzentrationsabhängige Wirkung *in vitro* wurde von Lee MH et al. (2001) ebenfalls beschrieben, jedoch für die Inhibitoren Lactacystin und Epoxomicin.

Durch die artifizielle *in-vitro*-Situation in den Co-Kulturen könnten Abläufe wie die AAD und die Interaktion zwischen Lysosom und UPS und vermutlich noch zahllose andere, fein abgestimmte Reaktionen gestört werden oder ganz fehlen. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen unseren *in-vitro*- und *in-vivo*-Daten hinsichtlich des Erhalts von Myelin, aber auch der Auswirkung von Proteasom-Inhibitoren auf die Makrophagen *in vivo* sein.

Zukünftige Untersuchungen müssen die konzentrationsabhängigen Wirkungen detaillierter beschreiben um ein mögliches Wirkoptimum dieser potenten Substanzen in den verschiedenen Situationen zu ermitteln.

4.6 Proteasom-Inhibitoren in der klinischen Medizin

Die kritische Rolle des UPS in diversen zellulären Prozessen (Zellzyklus, Apoptose, DNA-Reparatur, usw.) ist schon seit längerem bekannt und wird somit als ein vielversprechendes Ziel pharmakologischer Beeinflussung angesehen.

In Experimenten an Zelllinien als Modelle maligner Erkrankungen (z.B. Leukämie, Burkitt-Lymphom) *in vitro* zeigte sich der allgemeine Trend, dass Zellen mit einer hohen Proliferationsrate besonders empfindlich auf die Inhibierung des UPS reagieren (Imajoh-Ohmi et al. 1995; Shinohara et al. 1996; Drexler 1997; Orlowski RZ et al. 1998; Teicher et al. 1999).

Neoplastische Erkrankungen sind also ein interessantes Ziel für den Einsatz von Proteasom-Inhibitoren. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit weisen vor allem auf eine mögliche Abschwächung der Axondegeneration hin, was einen Einsatz von Proteasom-Inhibitoren bei neurodegenerativen Erkrankungen und Verletzungen denkbar macht. Der folgende Abschnitt soll einen kurzen Überblick über mögliche klinische Anwendungen geben.

Bortezomib (Velcade ®) – ein Proteasom-Inhibitor in der Therapie von multiplem Myelom (MM) und Non-Hodgkin-Lymphom (NHL)

Das Bor-haltige Bortezomib bindet mit hoher Affinität an das katalytische Zentrum des 26S-Proteasoms, woraus eine Hemmung des UPS resultiert. Diese Hemmung führt zu Zellzyklus-Arrest und Apoptose der Zelle, was wiederum zu einer Hemmung von Angiogenese und Tumorwachstum führt (Ling et al. 2002).

Das Medikament ist seit 2003 eine Therapieoption bei Patienten mit progressivem multiplem Myelom, bei denen die herkömmlichen Regime inklusive Knochenmarktransplantation ausgeschöpft sind.

Nawrocki et al. konnten 2008 zeigen, dass zwischen der Translationsrate in multiplen Myelom-Zellen und einer Proteasom-Inhibition durch den Proteasom-Inhibitor Bortezomib eine direkte Korrelation herrscht (Nawrocki et al. 2008). Neben erstaunlichen Therapieerfolgen beim multiplen Myelom, bei dem man teilweise sogar vollständige Remissionen erreichte, wurden Fälle beobachtet, bei denen eine Resistenz gegenüber Bortezomib vorzuliegen scheint. Die Ursachen dieser Resistenzen sind bisher noch nicht hinreichend verstanden, könnten möglicherweise jedoch in dem UPS nachgeschalteten Reaktionen oder dem UPS selbst liegen (Piperdi et al. 2011).

Bortezomib (*Velcade*[®], Fa. Janssen Cilag) wird neben dem multiplen Myelom auch in der Therapie des Non-Hodgkin-Lymphoms (NHL) angewendet und die Indikation für weitere neoplastische Erkrankungen (z.B. Kolon-, Lungen- und Prostatakarzinom) wird momentan geprüft.

Eine der wichtigsten, weil therapiebegrenzenden, Nebenwirkungen von Bortezomib ist die periphere Neuropathie. Der Entstehungsmechanismus dieser Bortezomib-induzierten peripheren Neuropathie (BIPN) ist noch nicht vollständig verstanden (Filosto et al. 2007; Cavaletti und Jakubowiak 2010). Es wurde jedoch gezeigt, dass Bortezomib-Behandlung im Maus-Modell das endoplasmatische Retikulum von Schwann-Zellen schädigen kann, was wiederum zu pathologischer Myelinisierung von Axonen und erhöhter Expression von bestimmten Makrophagen-anlockenden Chemokinen (CCL-3 "*Chemokine (C-C motif) ligand 3*" oder "*Macrophage inflammatory protein-1 α* " (MIP-1 α)) führt (Shin et al. 2010). Watanabe et al. konnten an Hand von *in-vitro*-Studien zeigen, dass Bortezomib offensichtlich die Bildung von Aggresomen in einer Schwannom-Zelllinie der Ratte induziert (Watanabe et al. 2010). Diese Aggresome stellen eine Anhäufung von fehlgefalteten Proteinen dar und werden für die Entwicklung der BIPN mit verantwortlich gemacht. Mit den Ergebnissen konnten Watanabe et al. (2010) außerdem zeigen, dass bestimmte Medikamente (z.B. Clonazepam) den lysosomalen Abbau der fehlgefalteten Proteine über eine Induktion von Hitzeschockproteinen und lysosomale Membranproteine ermöglichen. Diese Beobachtung zeigt deutlich den Zusammenhang zwischen UPS und lysosomaler Proteolyse und könnte in Zukunft eine Therapie der BIPN möglich machen.

Axondegeneration bei neurologischen Erkrankungen als mögliches Ziel von Proteasom-Inhibitoren

Weitere Implikationen der Wallerschen Degeneration und somit mögliche therapeutische Beeinflussung des UPS sind bei peripheren Nervenverletzungen zu erwarten. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist das Modell einer "scharfen", traumatischen Nervenverletzung. Wie unsere Ergebnisse zeigen, konnte durch Hemmung des UPS die Axondegeneration wirksam abgeschwächt werden. Denkbar wäre also in Zukunft der Einsatz von Proteasom-Inhibitoren bei Schnittverletzungen von peripheren Nerven bis hin zum supportiven Einsatz bei der chirurgischen Therapie von Gliedmaßenamputationen. Auch der Einsatz bei Nervenschädigungen durch akute oder chronische Einwirkung von unphysiologisch hohem Druck auf das Nervengewebe (Quetschverletzungen, Karpaltunnelsyndrom, etc.) könnte in Zukunft denkbar sein (Park et al. 2009; Dubovy 2011).

Vielversprechende Ergebnisse auf die positive Beeinflussung des pathologischen Schmerzsyndroms liegen bereits vor. Ossipov et al. (2007) führten intrathekale Injektionen von Proteasom-Inhibitoren (MG132, Epoxomicin und Lactacystin) an Ratten durch. Ihre Ergebnisse zeigten sowohl Prävention von neuropathischen Schmerzen als auch deren Rückgang bei bereits bestehenden Schmerzsyndromen (Ossipov et al. 2007).

Die Multiple Sklerose (MS) zeigt ebenfalls axonale Schädigungen. MRT-Untersuchungen und immunzytochemische Färbungen des *amyloid precursor protein* (APP), welches auch zur Untersuchung von Axonschäden bei Schädel-Hirn-Trauma (SHT) genutzt wird, belegten diese Tatsache (Sherriff et al. 1994; Narayanan et al. 1997).

Untersuchungen an menschlichen post mortem-Präparaten zeigten Nervenfaserverluste von bis zu 45% in Corpus callosum und Nervus opticus (Evangelou et al. 2000, 2001), was die Bedeutung des Axonverlustes als anatomisches Korrelat von fortschreitender klinischer Pathologie unterstreicht (Bjartmar et al. 2001; Bjartmar und Trapp 2001).

Der Axonverlust betrifft nicht nur die demyelinisierenden Plaques, sondern auch die morphologisch normal erscheinende weiße Substanz (*normal-appearing white matter* (NAWM)) (Dziedzic et al. 2010).

Ein *in-vivo*-Modell der multiplen Sklerose in Mäusen, die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), konnte zeigen, dass fokale Schwellung und Fragmentierung auch Axone betraf, die noch von intakten Myelinscheiden umgeben waren (Nikic et al. 2011). Dies war insofern ein Meilenstein, als dass man bisher davon ausging, dass eine Demyelinisierung Voraussetzung für den Axonverlust sei. Man nannte diese Form der axonalen Schädigung *focal axonal degeneration* (FAD). Sie wurde durch Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen, genauer *reactive oxygen species* (ROS) und *reactive nitrogen species* (RNS) von Makrophagen vermittelt. ROS und RNS lösten mitochondriale Schädigungen aus. Die Neutralisierung von ROS und RNS konnte eine bereits beginnende Axondegeneration aufhalten (Nikic et al. 2011). Ob diese Verbindungen auch Ziele einer UPS-abhängigen Degradation sein könnten bleibt bisher jedoch offen.

Im Jahre 2004 erregten McNaught et al. die Fachwelt mit ihrer Entdeckung eines Proteasom-Inhibitor-induzierten Modells der Parkinson Erkrankung (*Parkinson Disease*, PD) (McNaught et al. 2004). Grundlage zur Entwicklung ihres Modells war die Entdeckung, dass das UPS entscheidenden Anteil an der Ätiopathologie der PD hatte (Hattori und Mizuno 2004; Moore et al. 2005; McNaught und Olanow 2006a). In ihren *in-vivo*-Experimenten an Ratten

applizierten sie die Proteasom-Inhibitoren PSI oder Epoxomicin subkutan. Mit einer Latenz von 1 bis 2 Wochen entwickelten die Ratten typische Symptome der PD. Dies waren Rigor, Tremor und Bradykinesie, welche sich nach Gabe des Dopamin-Agonisten Apomorphin und L-Dopa besserten. Positronen-Emissions-Tomographie (PET)-Aufnahmen zeigten eine signifikante Verminderung der Aufnahme von einem bestimmten Markerprotein (*2-β-Carbomethoxy-3-β-(4-fluorophenyl)tropane*) (β -CFT, WIN 35,428)) der nigrostriatalen Funktion. Post mortem-Analysen zeigten Neuronenverluste in der Substantia nigra pars compacta (SNc) und anderen typischen Lokalisationen. Außerdem konnten sie intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen finden, welche Ubiquitin und α -Synuclein enthielten und somit den typischen, pathognomonischen Lewy-Körperchen entsprachen. Sie folgerten aus all diesen Beobachtungen, dass das Proteasom-Inhibitor-Modell der PD die Verhaltensänderungen und pathomorphologischen Korrelate der PD gut nachbilden konnte (McNaught et al. 2004).

Problematisch war in der Folge, dass zahlreiche Arbeitsgruppen diese Ergebnisse nur teilweise oder gar nicht replizieren konnten (Bove et al. 2006; Kordower et al. 2006; Manning-Bog et al. 2006; Schapira et al. 2006; Zeng et al. 2006).

In einer Stellungnahme benannten McNaught et al. (2006b) mögliche Gründe dafür. So könnten ihrer Meinung nach verschiedene Variationen der Proteasom-Inhibitoren (Löslichkeit, Hersteller, Konzentration), Umwelteinflüsse auf die Versuchstiere (Nahrung, Stress, Temperatur, mikrobiologische Faktoren) und schließlich Unterschiede in der Dosis und Bioverfügbarkeit der Inhibitoren eine Rolle gespielt haben (McNaught und Olanow 2006b).

Beal und Lang (2006) schlossen daraus, dass das Modell ohne weitere Untersuchung der Unstimmigkeiten vorerst nicht akzeptiert werden konnte (Beal und Lang 2006).

Im Jahre 2010 konnte jedoch durch McNaught et al. belegt werden, dass die Verteilung der Proteasom-Aktivatoren PA700/PA28 (siehe Kapitel 1.3.1, S. 8) in der SNc reduziert ist, dafür aber in nicht betroffenen Hirnregionen erhöht. Diese unterschiedliche Verteilung und Aktivität der Proteasom-Aktivatoren könnte ihrer Meinung nach zur Pathogenese der PD beitragen (McNaught et al. 2010).

Ebenfalls im Jahre 2010 entwickelten Xie et al. ein alternatives PD-Mausmodell um die Auswirkungen einer UPS-Hemmung zu untersuchen. Sie führten eine Mikroinjektion von Lactacystin, MG132 oder PSI in das mediale Vorderhirn von Tieren des Stammes C57BL/6 durch. Anschließend untersuchten sie das Verhalten der Tiere und das Ausmaß der Degeneration von dopaminergen Neuronen in der SNc. Die anhaltende Inhibition des UPS

fürhte zur Aktivierung der Caspase 3, einer Anhäufung unlöslicher Ubiquitin-Konjugate und α -Synuclein-haltigen Einschlusskörperchen. Außerdem zeigten die Tiere die typischen motorischen Einschränkungen mit Rigor, Tremor und Hypokinesie (Xie et al. 2010).

Dieses Modell könnte eine Alternative zu dem oben beschriebenen Modell von McNaught et al. (2004) darstellen und der Erforschung von Medikamenten zur Behandlung des Morbus Parkinson dienen.

Eine weitere Form der axonalen Degeneration zeigt einen Zusammenhang mit dem UPS. Dies ist die sogenannte *gracile axonal dystrophy* (*gad*). Sie stellt im Prinzip ein einfaches Mausmodell einer zentralen neurodegenerativen Erkrankung dar, welche durch die Deletion eines Genabschnittes für ein de-ubiquitinierendes Enzym (Uch-L1 (*ubiquitin C-terminal hydrolase L-1*)) charakterisiert ist (Saigoh et al. 1999). Homozygote Tiere zeigen eine Degeneration des *Fasciculus gracilis*, der afferente Informationen der Hinterbeine zur Propriozeption über den Hinterstrang des Rückenmarks in die Medulla oblongata leitet. Aus der Degeneration dieser Bahn resultiert eine sensorische Ataxie (Yamazaki et al. 1988). In Kombination mit Defekten einer weiteren Ubiquitin-Hydrolase (Uch-L3 (*ubiquitin C-terminal hydrolase L-3*)) zeigen die Mäuse zusätzlich eine deutliche Dysphagie mit signifikantem Gewichtsverlust und frühem Tod (Kurihara et al. 2001), die auf einer axonalen Degeneration des *Nucleus tractus solitarius* und der *Area postrema* beruht. Die beiden beschriebenen Ubiquitin-Hydrolasen lösen Verbindungen zwischen Ubiquitin und Substraten, um freies, monomeres Ubiquitin zur Verfügung zu stellen (Wilkinson 1997; Larsen et al. 1998). Sie gehören somit zur Gruppe der de-Ubiquitinierenden Enzyme.

Es existiert ein Polymorphismus des Uch-L1 Gens (S18Y), dessen Genprodukt eine erhöhte Hydrolase-Aktivität (Setsuie und Wada 2007) und geringere Ligase-Aktivität (Liu Y et al. 2002) besitzt. Einige Autoren konnten eine geringere Inzidenz an Morbus Parkinson in Zusammenhang mit Auftreten dieses Polymorphismus bringen (Maraganore et al. 2004; Carmine Belin et al. 2007). Hierfür zeigt das Tiermodell der *gad*-Mäuse, das die axonale Integrität von einem funktionierenden UPS abhängig ist (Kurihara et al. 2001).

Zusammenfassend bleibt die hohe Wahrscheinlichkeit, dass das UPS einen wichtigen Anteil an der Pathogenese des Morbus Parkinson und anderen neurodegenerativen Erkrankungen, sowohl des ZNS als auch des PNS hat (Lehman 2009; Coleman MP und Freeman 2011).

Durch unsere Ergebnisse konnten neuroprotektive Effekte durch die Anwendung von Proteasom-Inhibitoren gezeigt werden. Zukünftige Projekte müssen der genauen Evaluation

einer Dosisabhängigkeit dieser Effekte gewidmet werden und könnten die Anwendung von Proteasom-Inhibitoren bei weiteren Krankheitsbildern möglich machen.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht die Auswirkungen von Proteasom-Inhibitoren auf die Wallersche Degeneration (WD) im peripheren Nervensystem am Beispiel von Ischiasnerv-Durchtrennungen *in vivo* und anhand von Nerv-Makrophagen Co-Kulturen *in vitro*.

Die Wallersche Degeneration beschreibt die Vorgänge im Nervensystem nach Kontinuitätsunterbrechung durch chemisch-toxische, metabolische oder mechanische Ursachen. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) leistet neben dem Lysosom den größten Teil der Proteolyse und ist damit einer der Haupteffektoren von sämtlichen koordiniert ablaufenden Vorgängen zur Protein-Degradation. Durch eine Hemmung dieses Systems erhofft man sich, Einfluss auf die Degeneration peripherer Nerven nehmen zu können.

Zur Darstellung der Ereignisse der WD *in vitro* wird zunächst eine Zeitreihe aus Gewebekulturen ohne Inhibitor-Zusatz über einen Zeitraum von 8 Tagen angefertigt. Verglichen werden Kulturen mit und ohne Zugabe von Peritonealmakrophagen.

Als Proteasom-Inhibitoren für die eigentlichen Versuche dienen MG132 und Lactacystin, wobei letzteres nur bei *in-vitro*-Co-Kulturen aus Nervenstücken und Peritonealmakrophagen zur Anwendung kommt. *In vivo* erfolgt die Applikation unterschiedlicher Konzentrationen MG132 intraperitoneal oder mit Hilfe eines Gelatineschwammes.

Die Ergebnisse der Zeitreihe *in vitro* zeigen eine voranschreitende Degeneration der distalen Nervenstücke mit fortschreitender Abnahme der Myelin- und Axonzahlen bei gleichzeitiger Zunahme der Phagozytose durch Makrophagen. Die *in-vitro*-Anwendung von MG132 zeigt insbesondere bei einer höher gewählten Konzentration neuroprotektive und Makrophagen-hemmende Effekte. Lactacystin zeigt insgesamt eher geringere Auswirkungen sowohl auf Makrophagen wie auch auf Myelin und Axone, weshalb auf seinen Einsatz *in vivo* verzichtet wurde. *In vivo* sind die Ergebnisse für den Erhalt von Axonen durch MG132 ebenfalls ganz deutlich, während die untersuchten Makrophagenparameter vom Proteasominhibitor weitgehend unbeeinflusst bleiben. Die systemische Anwendung zeigte dabei eine Konzentrationsabhängigkeit, die auf ein Wirkoptimum in einem bestimmten Bereich schließen lässt, während die lokale Applikation mittels Gelatineschwamm eine starke Wirkung auf den Axonerhalt zeigte.

Die Ergebnisse bestätigen zum einen die zentrale Rolle von Makrophagen bei der Degeneration peripherer Nerven. Zum anderen zeigen sie Unterschiede für die Degenerationsvorgänge auf, wenn Proteasom-Inhibitoren *in vivo* oder *in vitro* eingesetzt werden. Für weitere zukünftige Anwendungen von Inhibitoren zeigen die Befunde in dieser Arbeit, dass eine sorgfältige Überprüfung der Applikationsform erforderlich ist, um die Erfolgssaussichten bei malignen Erkrankungen zu erhöhen. Hier wären genauere Untersuchungen zur Evaluation der Dosis-Wirkungs-Beziehung insbesondere *in vivo* nötig. Für einen therapeutischen Ansatz bei degenerativen Erkrankungen oder auch zur Regeneration nach traumatischen Ereignissen versprechen diese Substanzen zukünftig durchaus noch weiteres Anwendungs-Potenzial.

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

AAD	<i>acute axonal degeneration</i> (schnelle, axonale Degeneration)
BIPN	<i>bortezomib induced peripheral neuropathy</i>
BNS	Blut-Nerven-Schranke
Cl ₂ MDP	Dichlormethylen-Diphosphonat
DUB	<i>deubiquitinating enzymes</i> (De-Ubiquitinierende Enzyme)
Fc-Rezeptor	Membranrezeptor für verschiedene Immunglobulinisotypen
gad	<i>gracile axonal dystrophy</i>
Mac-1	<i>membrane attack complex</i> (Makrophagenantigen 1)
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i> (Monozyten-chemotaktisches Chemokin)
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
mRNA	<i>messenger Ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NFκB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i> (Nervenwachstumsfaktor)
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PD	<i>Parkinson's Disease</i> (Parkinson Krankheit, Morbus Parkinson)
PNS	peripheres Nervensystem
RNS	<i>reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>

SNc	Substantia nigra pars compacta
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-α</i> (Tumornekrosefaktor)
Uch-L1	<i>ubiquitin C-terminal hydrolase L-1</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
WD	Wallersche Degeneration
ZNS	Zentrales Nervensystem

6.2 Tabellen

Die folgenden Tabellen bilden die Datengrundlagen für die Abbildungen 7 - 27 und enthalten neben den Mittelwerten und Standardabweichungen auch die Bewertungen der jeweils angegebenen statistischen Tests.

Tabelle 4 zu Abbildung 7

Zeitreihe - Mittelwerte für erhaltenes Myelin; Einheit: [mm²]

Kulturtag	ohne Makrophagen ±sd	Testrichtung	Kruskal-Wallis-Test	Signifikanz	Zeichen
2	9965,2 ± 1430,96	2d vs 4d	p<0,001	sehr signifikant	***
4	6613,44 ± 1208,04	4d vs 6d	p>0,05	nicht signifikant	n.s.
6	6379,2 ± 453,73	6d vs 8d	p<0,01	signifikant	**
8	4853,96 ± 184,07	2d vs 8d	p<0,001	sehr signifikant	***

Kulturtag	mit Makrophagen ±sd	Testrichtung	Kruskal-Wallis-Test	Signifikanz	Zeichen
2	6892,84 ± 188,25	2d vs 4d	p>0,05	nicht signifikant	n.s.
4	6102,98 ± 126,38	4d vs 6d	p<0,01	signifikant	**
6	4323,29 ± 433,85	6d vs 8d	p>0,05	nicht signifikant	n.s.
8	3157,08 ± 499,73	2d vs 8d	p<0,001	sehr signifikant	***

Kulturtag	MWU-Test p-Wert ohne vs. mit Makrophagen	Signifikanz	Zeichen
2	< 0,0001	extrem signifikant	****
4	0,6078	nicht signifikant	n.s.
6	< 0,0001	extrem signifikant	****
8	< 0,0001	extrem signifikant	****

Tabelle 5 zu Abbildung 8

Zeitreihe - Mittelwerte für erhaltene Axone; Einheit: [mm²]

Kulturtag	ohne Makrophagen ±sd	Testrichtung	Kruskal- Wallis-Test	Signifikanz	Zeichen
2	1963,57 ± 147,26	2d vs 4d	p<0,01	signifikant	**
4	1275,53 ± 319,6	4d vs 6d	p>0,05	nicht signifikant	n.s.
6	1067,27 ± 81,77	6d vs 8d	p<0,001	sehr signifikant	***
8	383,17 ± 118,6	2d vs 8d	p<0,001	sehr signifikant	***

Kulturtag	mit Makrophagen ±sd	Testrichtung	Kruskal- Wallis-Test	Signifikanz	Zeichen
2	1184,07 ± 13,41	2d vs 4d	p<0,01 2*	signifikant	**
4	753,97 ± 80,07	4d vs 6d	p<0,01 2*	signifikant	**
6	405,98 ± 17,03	6d vs 8d	p>0,05 n.s.	nicht signifikant	n.s.
8	251,06 ± 57,24	2d vs 8d	p<0,001 3*	sehr signifikant	***

Kulturtag	MWU-Test p- Wert ohne vs. mit Makrophagen	Signifikanz	Zeichen
2	< 0,0001	extrem signifikant	****
4	0,0013	sehr signifikant	***
6	< 0,0001	extrem signifikant	****
8	0,0259	signifikant	**

Tabelle 6 zu Abbildung 9

Zeitreihe - Mittelwerte für die **Anzahl Makrophagen**; Einheit: [Zellen/ mm²]

Kulturtag	ohne Makrophagen ±sd	Testrichtung	Kruskal-Wallis-Test	Signifikanz	Zeichen
2	155,66 ± 28,88	2d vs 4d	p<0,001	sehr signifikant	***
4	303,8 ± 98,64	4d vs 6d	p<0,001	sehr signifikant	***
6	180,53 ± 13,57	6d vs 8d	p<0,01	signifikant	**
8	111,55 ± 58,25	2d vs 8d	p> 0,05	nicht signifikant	n.s.

Kulturtag	mit Makrophagen ±sd	Testrichtung	Kruskal-Wallis-Test	Signifikanz	Zeichen
2	242,63 ± 7,13	2d vs 4d	p<0,001	sehr signifikant	***
4	355,25 ± 30,3	4d vs 6d	p> 0,05	nicht signifikant	n.s.
6	296,70 ± 42,2	6d vs 8d	p> 0,05	nicht signifikant	n.s.
8	218,54 ± 117,96	2d vs 8d	p> 0,05	nicht signifikant	n.s.

Kulturtag	MWU-Test p-Wert ohne vs. mit Makrophagen	Signifikanz	Zeichen
2	0,6847	nicht signifikant	n.s.
4	0,1624	nicht signifikant	n.s.
6	0,0002	extrem signifikant	****
8	0,0037	sehr signifikant	***

Tabelle 7 zu Abbildung 10

Zeitreihe - Mittelwerte für die **Größe der Makrophagen**; Einheit: [μm^2]

Kulturtag	ohne Makrophagen $\pm\text{sd}$	Testrichtung	Kruskal-Wallis-Test	Signifikanz	Zeichen
2	24,05 \pm 16,84	2d vs 4d	p<0,001	sehr signifikant	***
4	30,26 \pm 17,82	4d vs 6d	p>0,05	nicht signifikant	n.s.
6	32,5 \pm 26,81	6d vs 8d	p<0,05	nicht sehr signifikant	*
8	48,16 \pm 39,3	2d vs 8d	p<0,001	sehr signifikant	***

Kulturtag	mit Makrophagen $\pm\text{sd}$	Testrichtung	Kruskal-Wallis-Test	Signifikanz	Zeichen
2	66,8 \pm 13,24	2d vs 4d	p>0,05	nicht signifikant	n.s.
4	79,9 \pm 16,67	4d vs 6d	p<0,001	sehr signifikant	***
6	4178,89 \pm 50,5	6d vs 8d	p>0,05	nicht signifikant	n.s.
8	168,19 \pm 63,51	2d vs 8d	p<0,001	sehr signifikant	***

Kulturtag	MWU-Test p-Wert ohne vs. mit Makrophagen	Signifikanz	Zeichen
2	< 0,0001	extrem signifikant	****
4	0,0016	extrem signifikant	****
6	< 0,0001	extrem signifikant	****
8	< 0,0001	extrem signifikant	****

Tabelle 8 zu Abbildung 11

Zeitreihe - Mittelwerte für phagozytiertes Myelin; Einheit: [μm^2]

Kulturtag	ohne Makrophagen $\pm\text{sd}$	Testrichtung	Kruskal-Wallis-Test	Signifikanz	Zeichen
2	7,29 \pm 7,24	2d vs 4d	p>0,05	nicht signifikant	n.s.
4	8,06 \pm 14,33	4d vs 6d	p>0,05	nicht signifikant	n.s.
6	10,19 \pm 9,6	6d vs 8d	p>0,05	nicht signifikant	n.s.
8	18,83 \pm 23,06	2d vs 8d	p<0,01	signifikant	**

Kulturtag	mit Makrophagen $\pm\text{sd}$	Testrichtung	Kruskal-Wallis-Test	Signifikanz	Zeichen
2	19,59 \pm 6,38	2d vs 4d	p>0,05 n.s.	nicht signifikant	n.s.
4	21,42 \pm 2,03	4d vs 6d	p<0,05 1*	nicht sehr signifikant	*
6	35,05 \pm 17,92	6d vs 8d	p>0,05 n.s.	nicht signifikant	n.s.
8	44,84 \pm 17,82	2d vs 8d	p<0,05 1*	nicht sehr signifikant	*

Kulturtag	MWU-Test p-Wert ohne vs. mit Makrophagen	Signifikanz	Zeichen
2	0,0009	extrem signifikant	****
4	< 0,0001	extrem signifikant	****
6	< 0,0001	extrem signifikant	****
8	0,0017	sehr signifikant	***

Tabelle 9 A zu Abbildung 14 A

Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren

Mittelwerte und Statistik für erhaltenes Myelin – Kulturen ohne Makrophagen;

Einheit: Myelinscheiden pro [mm²]

Behandlung	Mittelwert ±sd
Kontrolle	4853,96 ± 184,07
2 µM Lactacystin	6555,61 ± 482,27
2 µM MG132	10693,32 ± 737,43
0,2 µM MG132	6454,63 ± 584,77

Statistik	Dunnett-Test p-Wert	Signifikanz	Zeichen
Kontrolle vs. 2µM Lactacystin	p<0,001	sehr signifikant	***
Kontrolle vs. 2µM MG132	p<0,001	sehr signifikant	***
Kontrolle vs. 0,2µM MG132	p<0,01	signifikant	**

Tabelle 9 B zu Abbildung 14 B

Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren

Mittelwerte und Statistik für erhaltenes Myelin – Kulturen mit Makrophagen;

Einheit: Myelinscheiden pro [mm²]

Behandlung	Mittelwert ±sd
Kontrolle	3157,08 ± 499,73
2 µM Lactacystin	4830,82 ± 459,87
2 µM MG132	9718,32 ± 526,53
0,2 µM MG132	5833,43 ± 582,3

Statistik	Dunnett-Test p-Wert	Signifikanz	Zeichen
Kontrolle vs. 2µM Lactacystin	p<0,05	sehr signifikant	*
Kontrolle vs. 2µM MG132	p<0,001	sehr signifikant	***
Kontrolle vs. 0,2µM MG132	p<0,001	signifikant	***

Tabelle 10 A zu Abbildung 15 A

Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren

Mittelwerte und Statistik für erhaltene Axone – Kulturen ohne Makrophagen;

Einheit: Axone in Myelinscheiden pro [mm²]

Behandlung	Mittelwert ±sd
Kontrolle	383,17 ± 118,6
2 µM Lactacystin	990,23 ± 64,71
2 µM MG132	2228,77 ± 147,86
0,2 µM MG132	716,77 ± 16,96

Statistik	Dunnett-Test p-Wert	Signifikanz	Zeichen
Kontrolle vs. 2µM Lactacystin	p<0,001	sehr signifikant	***
Kontrolle vs. 2µM MG132	p<0,001	sehr signifikant	***
Kontrolle vs. 0,2µM MG132	p<0,05	nicht sehr signifikant	*

Tabelle 10 B zu Abbildung 15 B

Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren

Mittelwerte und Statistik für erhaltene Axone – Kulturen mit Makrophagen;

Einheit: Axone in Myelinscheiden pro [mm²]

Behandlung	Mittelwert ±sd
Kontrolle	251,06 ± 57,24
2 µM Lactacystin	840,28 ± 54,17
2 µM MG132	2179,78 ± 486,14
0,2 µM MG132	766,59 ± 170,68

Statistik	Dunnett-Test p-Wert	Signifikanz	Zeichen
Kontrolle vs. 2µM Lactacystin	p<0,001	sehr signifikant	***
Kontrolle vs. 2µM MG132	p<0,001	sehr signifikant	***
Kontrolle vs. 0,2µM MG132	p<0,05	nicht sehr signifikant	*

Tabelle 11 A zu Abbildung 16 A

Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren

Anzahl Makrophagen – Kulturen ohne Makrophagen;

Einheit: [Zellen/ mm²]

Behandlung	Mittelwert \pm sd
Kontrolle	111,55 \pm 48,25
2 μ M Lactacystin	70,44 \pm 18,32
2 μ M MG132	41,54 \pm 14,59
0,2 μ M MG132	79,13 \pm 4,58

Statistik	Dunnett-Test p-Wert	Signifikanz	Zeichen
Kontrolle vs. 2 μ M Lactacystin	p>0,05	nicht signifikant	n.s.
Kontrolle vs. 2 μ M MG132	p>0,05	nicht signifikant	n.s.
Kontrolle vs. 0,2 μ M MG132	p>0,05	nicht signifikant	n.s.

Tabelle 11 B zu Abbildung 16 B

Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren

Anzahl Makrophagen – Kulturen mit Makrophagen;

Einheit: [Zellen/ mm²]

Behandlung	Mittelwert \pm sd
Kontrolle	218,54 \pm 117,96
2 μ M Lactacystin	191,73 \pm 52,35
2 μ M MG132	82,5 \pm 18,78
0,2 μ M MG132	141,49 \pm 44,99

Statistik	Dunnett-Test p-Wert	Signifikanz	Zeichen
Kontrolle vs. 2 μ M Lactacystin	p>0,05	nicht signifikant	n.s.
Kontrolle vs. 2 μ M MG132	p<0,001	sehr signifikant	***
Kontrolle vs. 0,2 μ M MG132	p>0,05	nicht signifikant	n.s.

Tabelle 12 A zu Abbildung 17 A

Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren

Größe der Makrophagen – Kulturen ohne Makrophagen;Einheit: [μm^2]

Behandlung	Mittelwert \pm sd
Kontrolle	47,81 \pm 3,15
2 μM Lactacystin	38,42 \pm 12,33
2 μM MG132	18,09 \pm 3,17
0,2 μM MG132	39,79 \pm 3,45

Statistik	Dunnett-Test p-Wert	Signifikanz	Zeichen
Kontrolle vs. 2 μM Lactacystin	p>0,05	nicht signifikant	n.s.
Kontrolle vs. 2 μM MG132	p<0,001	sehr signifikant	***
Kontrolle vs. 0,2 μM MG132	p<0,01	signifikant	**

Tabelle 12 B zu Abbildung 17 B

Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren

Größe der Makrophagen – Kulturen mit Makrophagen;Einheit: [μm^2]

Behandlung	Mittelwert \pm sd
Kontrolle	168,19 \pm 63,51
2 μM Lactacystin	172,39 \pm 41,83
2 μM MG132	33,42 \pm 10,86
0,2 μM MG132	88,09 \pm 25,8

Statistik	Dunnett-Test p-Wert	Signifikanz	Zeichen
Kontrolle vs. 2 μM Lactacystin	p>0,05	nicht signifikant	n.s.
Kontrolle vs. 2 μM MG132	p<0,001	sehr signifikant	***
Kontrolle vs. 0,2 μM MG132	p<0,001	sehr signifikant	***

Tabelle 13 A zu Abbildung 18 A

Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren

Phagozytiertes Myelin – Kulturen ohne Makrophagen; Einheit: [μm^2]

Behandlung	Mittelwert \pm sd
Kontrolle	21,42 \pm 2,18
2 μM Lactacystin	12,89 \pm 4,77
2 μM MG132	6,4 \pm 2,05
0,2 μM MG132	10,83 \pm 0,1

Statistik	Dunnett-Test p-Wert	Signifikanz	Zeichen
Kontrolle vs. 2 μM Lactacystin	p>0,05	nicht signifikant	n.s.
Kontrolle vs. 2 μM MG132	p<0,05	nicht sehr signifikant	*
Kontrolle vs. 0,2 μM MG132	p<0,05	nicht sehr signifikant	*

Tabelle 13 B zu Abbildung 18 B

Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren

Phagozytiertes Myelin – Kulturen mit Makrophagen; Einheit: [μm^2]

Behandlung	Mittelwert \pm sd
Kontrolle	44,84 \pm 17,82
2 μM Lactacystin	59,34 \pm 24,27
2 μM MG132	9,09 \pm 2,7
0,2 μM MG132	13,53 \pm 2,1

Statistik	Dunnett-Test p-Wert	Signifikanz	Zeichen
Kontrolle vs. 2 μM Lactacystin	p>0,05	nicht signifikant	n.s.
Kontrolle vs. 2 μM MG132	p<0,001	sehr signifikant	***
Kontrolle vs. 0,2 μM MG132	p<0,001	sehr signifikant	***

Tabelle 14 zu Abbildung 21Ischiasaxotomien – *in-vivo*-Experimenteerhaltenes Myelin; Einheit: Myelinscheiden pro [mm²]

Behandlung	Mittelwert \pm sd
20 μ g Vehikel / DMSO	10320,22 \pm 1272,45
20 μ g MG132	12995,20 \pm 1974,78
100 μ g Vehikel / DMSO	11772,44 \pm 1683,13
100 μ g MG132	10815,54 \pm 1040,04
Gelfoam + 50 μ g Vehikel / DMSO	11545,7 \pm 2159,30
Gelfoam + 50 μ g MG132	10830,18 \pm 1257,20

Statistik	MWU-Test p-Wert	Signifikanz	Zeichen
Veh 20 vs MG132 20	p < 0,0001	extrem signifikant	****
Veh 100 vs MG132 100	p = 0,08555	nicht sehr signifikant	*
Veh Gelf vs MG132 Gelf	p = 0,2884	nicht signifikant	n.s.
MG132 20 vs MG132 100	p < 0,0001	extrem signifikant	****
MG132 100 vs MG132 Gelf	p = 0,8523	nicht signifikant	n.s.
MG132 20 vs MG132 Gelf	p < 0,0001	extrem signifikant	****
Veh 20 vs Veh 100	p = 0,0012	Sehr signifikant	***
Veh 100 vs Veh Gelf	p = 0,4650	nicht signifikant	n.s.
Veh 20 vs Veh Gelf	p = 0,024	signifikant	**

Tabelle 15 zu Abbildung 22Ischiasaxotomien – *in-vivo*-Experimenteerhaltene Axone; Einheit: Axone in Myelinscheiden pro [mm²]

Behandlung	Mittelwert \pm sd
20 μ g Vehikel / DMSO	434,6 \pm 67,89
20 μ g MG132	1144,60 \pm 301,15
100 μ g Vehikel / DMSO	560,20 \pm 126,98
100 μ g MG132	680,34 \pm 176,36
Gelfoam + 50 μ g Vehikel / DMSO	604,80 \pm 206,05
Gelfoam + 50 μ g MG132	1170,35 \pm 166,90

Statistik	MWU-Test p-Wert	Signifikanz	Zeichen
Veh 20 vs MG132 20	p < 0,0001	extrem signifikant	****
Veh 100 vs MG132 100	p = 0,0163	signifikant	**
Veh Gelf vs MG132 Gelf	p < 0,0001	extrem signifikant	****
MG132 20 vs MG132 100	p < 0,0001	extrem signifikant	****
MG132 100 vs MG132 Gelf	p < 0,0001	extrem signifikant	****
MG132 20 vs MG132 Gelf	p = 0,4461	nicht signifikant	n.s.
Veh 20 vs Veh 100	p = 0,0447	signifikant	**
Veh 100 vs Veh Gelf	p = 0,3257	nicht signifikant	n.s.
Veh 20 vs Veh Gelf	p = 0,0007	extrem signifikant	****

Tabelle 16 zu Abbildung 23Ischiasaxotomien – *in-vivo*-ExperimenteFläche der größten Axone; Einheit: [μm^2]

Behandlung	Mittelwert \pm sd
20 μg Vehikel / DMSO	38,99 \pm 4,97
20 μg MG132	46,79 \pm 3,93
100 μg Vehikel / DMSO	33,06 \pm 2,74
100 μg MG132	33,02 \pm 1,57
Gelfoam + 50 μg Vehikel / DMSO	33,50 \pm 1,54
Gelfoam + 50 μg MG132	32,51 \pm 2,90

Statistik	MWU-Test p-Wert	Signifikanz	Zeichen
Veh 20 vs MG132 20	$p < 0,0001$	extrem signifikant	*****
Veh 100 vs MG132 100	$p = 0,8371$	nicht signifikant	n.s.
Veh Gelf vs MG132 Gelf	$p < 0,0095$	sehr signifikant	***
MG132 20 vs MG132 100	$p < 0,0001$	extrem signifikant	*****
MG132 100 vs MG132 Gelf	$p = 0,2082$	nicht signifikant	n.s.
MG132 20 vs MG132 Gelf	$p < 0,0001$	extrem signifikant	*****
Veh 20 vs Veh 100	$p < 0,0001$	extrem signifikant	*****
Veh 100 vs Veh Gelf	$p = 0,1372$	nicht signifikant	n.s.
Veh 20 vs Veh Gelf	$p < 0,0001$	extrem signifikant	*****

Tabelle 17 zu Abbildung 24

Ischiasaxotomien – *in-vivo*-Experimente

Anzahl der Mitochondrien; Einheit: Anzahl Mitochondrien pro [100 μm^2]

Behandlung	Mittelwert \pmsd
20 μg Vehikel / DMSO	16,28 \pm 1,52
20 μg MG132	13,76 \pm 0,68
100 μg Vehikel / DMSO	17,18 \pm 1,47
100 μg MG132	18,43 \pm 1,25
Gelfoam + 50 μg Vehikel / DMSO	15,94 \pm 1,25
Gelfoam + 50 μg MG132	18,29 \pm 1,64

Statistik	MWU-Test p-Wert	Signifikanz	Zeichen
Veh 20 vs MG132 20	p = 0,0079	sehr signifikant	***
Veh 100 vs MG132 100	p = 0,2222	nicht signifikant	n.s.
Veh Gelf vs MG132 Gelf	p = 0,0079	sehr signifikant	***
MG132 20 vs MG132 100	p = 0,0079	sehr signifikant	***
MG132 100 vs MG132 Gelf	p > 0,9999	nicht signifikant	n.s.
MG132 20 vs MG132 Gelf	p = 0,0079	sehr signifikant	***
Veh 20 vs Veh 100	p = 0,2222	nicht signifikant	n.s.
Veh 100 vs Veh Gelf	p = 0,2222	nicht signifikant	n.s.
Veh 20 vs Veh Gelf	p = 0,6905	nicht signifikant	n.s.

Tabelle 18 zu Abbildung 25

Ischiasaxotomien – *in-vivo*-Experimente

Anzahl Makrophagen; Einheit: [Zellen / mm²]

Behandlung	Mittelwert ±sd
20 µg Vehikel / DMSO	679,00 ± 80,84
20 µg MG132	852,92 ± 151,12
100 µg Vehikel / DMSO	680,34 ± 129,99
100 µg MG132	639,92 ± 102,21
Gelfoam + 50 µg Vehikel / DMSO	674,94 ± 120,04
Gelfoam + 50 µg MG132	688,46 ± 115,89

Statistik	MWU-Test p-Wert	Signifikanz	Zeichen
Veh 20 vs MG132 20	p = 0,034	sehr signifikant	***
Veh 100 vs MG132 100	p = 0,5622	nicht signifikant	n.s.
Veh Gelf vs MG132 Gelf	p = 0,537	nicht signifikant	n.s.
MG132 20 vs MG132 100	p = 0,0003	extrem signifikant	*****
MG132 100 vs MG132 Gelf	p = 0,1797	nicht signifikant	n.s.
MG132 20 vs MG132 Gelf	p = 0,0042	sehr signifikant	***
Veh 20 vs Veh 100	p = 0,9148	nicht signifikant	n.s.
Veh 100 vs Veh Gelf	p = 0,9477	nicht signifikant	n.s.
Veh 20 vs Veh Gelf	P = 0,8604	nicht signifikant	n.s.

Tabelle 19 zu Abbildung 26Ischiasaxotomien – *in-vivo*-ExperimenteGröße der Makrophagen; Einheit: [μm^2]

Behandlung	Mittelwert \pm sd
20 μg Vehikel / DMSO	28,94 \pm 3,61
20 μg MG132	27,12 \pm 3,54
100 μg Vehikel / DMSO	29,28 \pm 3,09
100 μg MG132	35,18 \pm 3,61
Gelfoam + 50 μg Vehikel / DMSO	34,03 \pm 5,35
Gelfoam + 50 μg MG132	43,94 \pm 6,34

Statistik	MWU-Test p-Wert	Signifikanz	Zeichen
Veh 20 vs MG132 20	p = 0,5748	nicht signifikant	n.s.
Veh 100 vs MG132 100	p = 0,0008	extrem signifikant	*****
Veh Gelf vs MG132 Gelf	p < 0,0001	extrem signifikant	*****
MG132 20 vs MG132 100	p < 0,0001	extrem signifikant	*****
MG132 100 vs MG132 Gelf	p < 0,0001	extrem signifikant	*****
MG132 20 vs MG132 Gelf	p < 0,0001	extrem signifikant	*****
Veh 20 vs Veh 100	p = 0,6815	nicht signifikant	n.s.
Veh 100 vs Veh Gelf	p = 0,2913	nicht signifikant	n.s.
Veh 20 vs Veh Gelf	p = 0,1615	nicht signifikant	n.s.

Tabelle 20 zu Abbildung 27

Ischiasaxotomien – *in-vivo*-Experimente

phagozytiertes Myelin; Einheit: [μm^2]

Behandlung	Mittelwert \pm sd
20 μg Vehikel / DMSO	7,66 \pm 1,25
20 μg MG132	8,42 \pm 1,55
100 μg Vehikel / DMSO	7,30 \pm 1,02
100 μg MG132	9,64 \pm 1,44
Gelfoam + 50 μg Vehikel / DMSO	9,09 \pm 2,34
Gelfoam + 50 μg MG132	11,33 \pm 2,01

Statistik	MWU-Test p-Wert	Signifikanz	Zeichen
Veh 20 vs MG132 20	p = 0,5476	nicht signifikant	n.s.
Veh 100 vs MG132 100	p = 0,0566	nicht sehr signifikant	*
Veh Gelf vs MG132 Gelf	p = 0,1508	nicht signifikant	n.s.
MG132 20 vs MG132 100	p = 0,2222	nicht signifikant	n.s.
MG132 100 vs MG132 Gelf	p = 0,1508	nicht signifikant	n.s.
MG132 20 vs MG132 Gelf	p = 0,0556	nicht sehr signifikant	*
Veh 20 vs Veh 100	p = 0,6905	nicht signifikant	n.s.
Veh 100 vs Veh Gelf	p = 0,3095	nicht signifikant	n.s.
Veh 20 vs Veh Gelf	p = 0,6905	nicht signifikant	n.s.

7 Literaturverzeichnis

Almond JB, Snowden RT, Hunter A, Dinsdale D, Cain K und Cohen GM (2001) Proteasome inhibitor-induced apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia cells involves cytochrome c release and caspase activation, accompanied by formation of an approximately 700 kDa Apaf-1 containing apoptosome complex. *Leukemia* 15, 1388-1397.

Ardley HC, Scott GB, Rose SA, Tan NG, Markham AF und Robinson PA (2003) Inhibition of proteasomal activity causes inclusion formation in neuronal and non-neuronal cells overexpressing Parkin. *Mol Biol Cell* 14, 4541-4556.

Ardley HC, Scott GB, Rose SA, Tan NG und Robinson PA (2004) UCH-L1 aggresome formation in response to proteasome impairment indicates a role in inclusion formation in Parkinson's disease. *J Neurochem* 90, 379-391.

Azzarelli B, Woodburn R, Olivelle S, Kimbro S, Siakotos A, Taylor M, Lee C-H, Yen M und Paulsrud J (1993) The A-1 antigen: a novel marker in experimental peripheral nerve injury. *J Comp Neurol* 337, 353-365.

Beal F und Lang A (2006) The proteasomal inhibition model of Parkinson's disease: "Boon or bust"? *Ann Neurol* 60, 158-161.

Bedford L, Paine S, Rezvani N, Mee M, Lowe J und Mayer RJ (2009) The UPS and autophagy in chronic neurodegenerative disease: six of one and half a dozen of the other--or not? *Autophagy* 5, 224-227.

Bendszus M und Stoll G (2003) Caught in the act: in vivo mapping of macrophage infiltration in nerve injury by magnetic resonance imaging. *J Neurosci* 23, 10892-10896.

Bertoni-Freddari C, Fattoretti P, Giorgetti B, Solazzi M, Baliani M und Meier-Ruge W (2004) Role of mitochondrial deterioration in physiological and pathological brain aging. *Gerontology* 50, 187-192.

Beuche W und Friede RL (1984) The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. *J Neurocytol* 13, 767-796.

Beuche W und Friede RL (1986) Myelin phagocytosis in Wallerian degeneration of peripheral nerves depends on silica-sensitive, bg/bg-negative and Fc- positive monocytes. *Brain Res* 378, 97-106.

Bjartmar C und Trapp BD (2001) Axonal and neuronal degeneration in multiple sclerosis: mechanisms and functional consequences. *Curr Opin Neurol* 14, 271-278.

Bjartmar C, Kidd G und Ransohoff RM (2001) A real-time insight into disease progression and the role of axonal injury in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 58, 37-39.

Bochtler M, Ditzel L, Groll M, Hartmann C und Huber R (1999) The proteasome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28, 295-317.

Bove J, Zhou C, Jackson-Lewis V, Taylor J, Chu Y, Rideout HJ, Wu DC, Kordower JH, Petrucelli L und Przedborski S (2006) Proteasome inhibition and Parkinson's disease modeling. *Ann Neurol* 60, 260-264.

Brück W (1997) The role of macrophages in Wallerian degeneration. *Brain Pathol* 7, 741-752.

Brück W und Friede RL (1990a) L-Fucosidase treatment blocks myelin phagocytosis by macrophages in vitro. *J Neuroimmunol* 27, 217-227.

Brück W und Friede RL (1990b) Anti-macrophage CR3 antibody blocks myelin phagocytosis by macrophages in vitro. *Acta Neuropathol* 80, 415-418.

Brück W und Friede RL (1991) The role of complement in myelin phagocytosis during PNS Wallerian degeneration. *J Neurol Sci* 103, 182-187.

Brück W, Brück Y, Maruschak B und Friede RL (1995) Mechanisms of macrophage recruitment in Wallerian degeneration. *Acta Neuropathol* 89, 363-367.

Carmine Belin A, Westerlund M, Bergman O, Nissbrandt H, Lind C, Sydow O und Galter D (2007) S18Y in ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) associated with decreased risk of Parkinson's disease in Sweden. *Parkinsonism Relat Disord* 13, 295-298.

Cavaletti G und Jakubowiak AJ (2010) Peripheral neuropathy during bortezomib treatment of multiple myeloma: a review of recent studies. *Leuk Lymphoma* 51, 1178-1187.

Ciechanover A (2005) Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 79-87.

Ciechanover A, Breitschopf K, Hatoum OA und Bengal E (1999) Degradation of MyoD by the ubiquitin pathway: regulation by specific DNA-binding and identification of a novel site for ubiquitination. *Mol Biol Rep* 26, 59-64.

Clemence A, Mirsky R und Jessen KR (1989) Non-myelin-forming Schwann cells proliferate rapidly during Wallerian degeneration in the rat sciatic nerve. *J Neurocytol* 18, 185-192.

Coleman DL (1986) Regulation of macrophage phagocytosis. *Eur J Clin Microbiol* 5, 1-5.

Coleman MP und Ribchester RR: Programmed Axon Death, Synaptic Dysfunction and the Ubiquitin Proteasome System; in: *Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders*; hrsg. v. Morrissy RE, 3. Auflage, Nummer 3; Bentham Science Publishers, Oak Park 2004, 227-238.

Coleman MP und Freeman MR (2011) Wallerian degeneration, wld(s), and nmnat. *Annu Rev Neurosci* 33, 245-267.

Crang AJ und Blakemore WF (1986) Observations on Wallerian degeneration in explant cultures of cat sciatic nerve. *J Neurocytol* 15, 471-482.

D'Andrea A und Pellman D (1998) Deubiquitinating enzymes: a new class of biological regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33, 337-352.

De Duve C und Wattiaux R (1966) Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* 28, 435-492.

DeMartino GN, Proske RJ, Moomaw CR, Strong AA, Song X, Hisamatsu H, Tanaka K und Slaughter CA (1996) Identification, purification, and characterization of a PA700-dependent activator of the proteasome. *J Biol Chem* 271, 3112-3118.

Ding WX, Ni HM, Gao W, Yoshimori T, Stolz DB, Ron D und Yin XM (2007) Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol* 171, 513-524.

Drexler HC (1997) Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 855-860.

Drexler HC (1998) Programmed cell death and the proteasome. *Apoptosis* 3, 1-7.

Dubovy P (2011) Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and neuropathic pain induction. *Ann Anat* 193, 267-275.

Dziedzic T, Metz I, Dallenga T, Konig FB, Muller S, Stadelmann C und Bruck W (2010) Wallerian degeneration: a major component of early axonal pathology in multiple sclerosis. *Brain Pathol* 20, 976-985.

Evangelou N, Konz D, Esiri MM, Smith S, Palace J und Matthews PM (2000) Regional axonal loss in the corpus callosum correlates with cerebral white matter lesion volume and distribution in multiple sclerosis. *Brain* 123 (Pt 9), 1845-1849.

Evangelou N, Konz D, Esiri MM, Smith S, Palace J und Matthews PM (2001) Size-selective neuronal changes in the anterior optic pathways suggest a differential susceptibility to injury in multiple sclerosis. *Brain* 124, 1813-1820.

Fang S, Jensen JP, Ludwig RL, Vousden KH und Weissman AM (2000) Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem* 275, 8945-8951.

Fenteany G, Standaert RF, Lane WS, Choi S, Corey EJ und Schreiber SL (1995) Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 268, 726-731.

Fernandez-Valle C, Bunge RP und Bunge BM (1995) Schwann cells degrade myelin and proliferate in the absence of macrophages: evidence from in vitro studies of Wallerian degeneration. *J Neurocytol* 24, 667-679.

Filosto M, Rossi G, Pelizzari AM, Buzio S, Tentorio M, Broglio L, Mancuso M, Rinaldi M, Scarpelli M und Padovani A (2007) A high-dose bortezomib neuropathy with sensory ataxia and myelin involvement. *J Neurol Sci* 263, 40-43.

Franco AV, Zhang XD, Van Berkel E, Sanders JE, Zhang XY, Thomas WD, Nguyen T und Hersey P (2001) The role of NF-kappa B in TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis of melanoma cells. *J Immunol* 166, 5337-5345.

Friede RL und Brück W (1993) Macrophage functional properties during myelin degradation. *Adv Neurol* 59, 327-336.

Fuertes G, Villarroya A und Knecht E (2003a) Role of proteasomes in the degradation of short-lived proteins in human fibroblasts under various growth conditions. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 651-664.

Fuertes G, Martin De Llano JJ, Villarroya A, Rivett AJ und Knecht E (2003b) Changes in the proteolytic activities of proteasomes and lysosomes in human fibroblasts produced by serum withdrawal, amino-acid deprivation and confluent conditions. *Biochem J* 375, 75-86.

Fujihara S, Ward C, Dransfield I, Hay RT, Uings IJ, Hayes B, Farrow SN, Haslett C und Rossi AG (2002) Inhibition of nuclear factor-kappaB activation un-masks the ability of TNF-alpha to induce human eosinophil apoptosis. *Eur J Immunol* 32, 457-466.

Geetha T und Wooten MW (2008) TrkA receptor endolysosomal degradation is both ubiquitin and proteasome dependent. *Traffic* 9, 1146-1156.

Gitik M, Liraz-Zaltsman S, Oldenborg PA, Reichert F und Rotshenker S (2011) Myelin down-regulates myelin phagocytosis by microglia and macrophages through interactions between CD47 on myelin and SIRPalpha (signal regulatory protein-alpha) on phagocytes. *J Neuroinflammation* 8, 24.

Goldbaum O und Richter-Landsberg C (2004) Proteolytic stress causes heat shock protein induction, tau ubiquitination, and the recruitment of ubiquitin to tau-positive aggregates in oligodendrocytes in culture. *J Neurosci* 24, 5748-5757.

Goldbaum O, Vollmer G und Richter-Landsberg C (2006) Proteasome inhibition by MG-132 induces apoptotic cell death and mitochondrial dysfunction in cultured rat brain oligodendrocytes but not in astrocytes. *Glia* 53, 891-901.

Gordon S, Perry VH, Rabinowitz S, Chung L-P und Rosen H (1988) Plasma membrane receptors of the mononuclear phagocyte system. *J Cell Sci Suppl* 9, 1-26.

Gray M, Palispis W, Popovich PG, van Rooijen N und Gupta R (2007) Macrophage depletion alters the blood-nerve barrier without affecting Schwann cell function after neural injury. *J Neurosci Res* 85, 766-777.

Griffin JW und Hoffman PN: Degeneration and regeneration in the peripheral nervous system; in: *Peripheral Neuropathy*; hrsg. v. Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW, Low PA, Podulso JF, 3. Auflage, Band 1; W.B. Saunders Company, Philadelphia 1993, 361-376

Grimm LM und Osborne BA (1999) Apoptosis and the proteasome. *Results Probl Cell Differ* 23, 209-228.

Groll M, Ditzel L, Lowe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD und Huber R (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386, 463-471.

Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D, Grimes B, Howard DS, Rizzieri DA, Luger SM und Jordan CT (2001) Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* 98, 2301-2307.

Hamano T, Gendron TF, Ko LW und Yen SH (2009) Concentration-dependent effects of proteasomal inhibition on tau processing in a cellular model of tauopathy. *Int J Clin Exp Pathol* 2, 561-573.

Hann-Bonnekoh PG, Scheidt P und Friede RL (1989) Myelin phagocytosis by peritoneal macrophages in organ cultures of mouse peripheral nerve. A new model for studying myelin phagocytosis in vitro. *J Neuropathol Exp Neurol* 48, 140-153.

Hattori N und Mizuno Y (2004) Pathogenetic mechanisms of parkin in Parkinson's disease. *Lancet* 364, 722-724.

Hendil KB (1988) The 19 S multicatalytic "prosome" proteinase is a constitutive enzyme in HeLa cells. *Biochem Int* 17, 471-477.

Hershko A und Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-479.

Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J und Anderson KC (2001) The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 61, 3071-3076.

Hirata K und Kawabuchi M (2002) Myelin phagocytosis by macrophages and nonmacrophages during Wallerian degeneration. *Microsc Res Tech* 57, 541-547.

Hoyer-Hansen M und Jaattela M (2007) Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ* 14, 1576-1582.

Imajoh-Ohmi S, Kawaguchi T, Sugiyama S, Tanaka K, Omura S und Kikuchi H (1995) Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, induces apoptosis in human monoblast U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 217, 1070-1077.

Jagannath S, Barlogie B, Berenson J, Siegel D, Irwin D, Richardson PG, Niesvizky R, Alexanian R, Limentani SA, Alsina M, Adams J, Kauffman M, Esseltine DL, Schenkein DP und Anderson KC (2004) A phase 2 study of two doses of bortezomib in relapsed or refractory myeloma. *Br J Haematol* 127, 165-172.

Janen SB, Chaachouay H und Richter-Landsberg C (2010) Autophagy is activated by proteasomal inhibition and involved in aggresome clearance in cultured astrocytes. *Glia* 58, 1766-1774.

Jesenberger V und Jentsch S (2002) Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 112-121.

Jessen KR und Mirsky R (2008) Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease. *Glia* 56, 1552-1565.

Jessen KR und Mirsky R (2010) Control of Schwann cell myelination. *F1000 Biol Rep* 2.

Johnston JA, Ward CL und Kopito RR (1998) Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* 143, 1883-1898.

Kerschensteiner M, Schwab ME, Lichtman JW und Misgeld T (2005) In vivo imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord. *Nat Med* 11, 572-577.

Komiyama A, Novicki DL und Suzuki K (1991) Adhesion and proliferation are enhanced in vitro in Schwann cells from nerve undergoing Wallerian degeneration. *J Neurosci Res* 29, 308-318.

Kordower JH, Kanaan NM, Chu Y, Suresh Babu R, Stansell J, 3rd, Terpstra BT, Sortwell CE, Steece-Collier K und Collier TJ (2006) Failure of proteasome inhibitor administration to provide a model of Parkinson's disease in rats and monkeys. *Ann Neurol* 60, 264-268.

Korolchuk VI, Menzies FM und Rubinsztein DC (2009a) A novel link between autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Autophagy* 5, 862-863.

Korolchuk VI, Mansilla A, Menzies FM und Rubinsztein DC (2009b) Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. *Mol Cell* 33, 517-527.

Korolchuk VI, Menzies FM und Rubinsztein DC (2010) Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Lett* 584, 1393-1398.

Kurihara LJ, Kikuchi T, Wada K und Tilghman SM (2001) Loss of Uch-L1 and Uch-L3 leads to neurodegeneration, posterior paralysis and dysphagia. *Hum Mol Genet* 10, 1963-1970.

Larsen CN, Krantz BA und Wilkinson KD (1998) Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: ubiquitin C-terminal hydrolases. *Biochemistry* 37, 3358-3368.

Lee DH und Goldberg AL (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists, in *trends in Cell Biology*, pp 397-403.

Lee HK, Shin YK, Jung J, Seo S-Y, Baek S-Y und Park HT (2009) Proteasome inhibition suppresses Schwann cell dedifferentiation in vitro and in vivo. *Glia* 10.

Lee MH, Hyun DH, Jenner P und Halliwell B (2001) Effect of proteasome inhibition on cellular oxidative damage, antioxidant defences and nitric oxide production. *J Neurochem* 78, 32-41.

Lehman NL (2009) The ubiquitin proteasome system in neuropathology. *Acta Neuropathol* 118, 329-347.

- Lemke G und Chao M (1988) Axons regulate Schwann cell expression of the major myelin and NGF receptor genes. *Development* 102, 499-504.
- Ling YH, Liebes L, Ng B, Buckley M, Elliott PJ, Adams J, Jiang JD, Muggia FM und Perez-Soler R (2002) PS-341, a novel proteasome inhibitor, induces Bcl-2 phosphorylation and cleavage in association with G2-M phase arrest and apoptosis. *Mol Cancer Ther* 1, 841-849.
- Liu HM, Yang LH und Yang YJ (1995) Schwann cell properties: 3. C-fos expression, bFGF production, phagocytosis and proliferation during Wallerian degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 54, 487-496.
- Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z und Lansbury PT, Jr. (2002) The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 111, 209-218.
- Lowe J, Stock D, Jap B, Zwickl P, Baumeister W und Huber R (1995) Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 268, 533-539.
- Lunn ER, Perry VH, Brown MC, Rosen H und Gordon S (1989) Absence of Wallerian degeneration does not hinder regeneration in peripheral nerve. *Eur J Neurosci* 1, 27-33.
- MacLaren AP, Chapman RS, Wyllie AH und Watson CJ (2001) p53-dependent apoptosis induced by proteasome inhibition in mammary epithelial cells. *Cell Death Differ* 8, 210-218.
- Maggi V und Hart K (1973) Lysosomes and lysosomal enzymes in hearts of hamsters (BIO 14.6 and BBL x7) with congenital cardiomyopathy. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* 3, 489-495.
- Maher P (2008) Proteasome inhibitors prevent oxidative stress-induced nerve cell death by a novel mechanism. *Biochem Pharmacol* 75, 1994-2006.
- Manning-Bog AB, Reaney SH, Chou VP, Johnston LC, McCormack AL, Johnston J, Langston JW und Di Monte DA (2006) Lack of nigrostriatal pathology in a rat model of proteasome inhibition. *Ann Neurol* 60, 256-260.
- Maraganore DM, Lesnick TG, Elbaz A, Chartier-Harlin MC, Gasser T, Kruger R, Hattori N, Mellick GD, Quattrone A, Satoh J, Toda T, Wang J, Ioannidis JP, de Andrade M und Rocca WA (2004) UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. *Ann Neurol* 55, 512-521.
- McNaught KS und Olanow CW (2006a) Protein aggregation in the pathogenesis of familial and sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 27, 530-545.

McNaught KS und Olanow CW (2006b) Proteasome inhibitor-induced model of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 60, 243-247.

McNaught KS, Perl DP, Brownell AL und Olanow CW (2004) Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 56, 149-162.

McNaught KS, Jnobaptiste R, Jackson T und Jengelley TA (2010) The pattern of neuronal loss and survival may reflect differential expression of proteasome activators in Parkinson's disease. *Synapse* 64, 241-250.

Misgeld T, Kerschensteiner M, Bareyre FM, Burgess RW und Lichtman JW (2007) Imaging axonal transport of mitochondria in vivo. *Nat Methods* 4, 559-561.

Mizuno Y, Hattori N, Kubo S, Sato S, Nishioka K, Hatano T, Tomiyama H, Funayama M, Machida Y und Mochizuki H (2008) Progress in the pathogenesis and genetics of Parkinson's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363, 2215-2227.

Moore DJ, West AB, Dawson VL und Dawson TM (2005) Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 28, 57-87.

Myung J, Kim KB und Crews CM (2001) The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med Res Rev* 21, 245-273.

Narayanan S, Fu L, Pioro E, De Stefano N, Collins DL, Francis GS, Antel JP, Matthews PM und Arnold DL (1997) Imaging of axonal damage in multiple sclerosis: spatial distribution of magnetic resonance imaging lesions. *Ann Neurol* 41, 385-391.

Nathan CF (1987) Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 79, 319-326.

Nawrocki ST, Carew JS, Maclean KH, Courage JF, Huang P, Houghton JA, Cleveland JL, Giles FJ und McConkey DJ (2008) Myc regulates aggresome formation, the induction of Noxa, and apoptosis in response to the combination of bortezomib and SAHA. *Blood* 112, 2917-2926.

Neves DD, Rehen SK und Linden R (2001) Differentiation-dependent sensitivity to cell death induced in the developing retina by inhibitors of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Eur J Neurosci* 13, 1938-1944.

Nikic I, Merkler D, Sorbara C, Brinkoetter M, Kreutzfeldt M, Bareyre FM, Bruck W, Bishop D, Misgeld T und Kerschensteiner M (2011) A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nat Med* 17, 495-499.

Orlowski M und Wilk S (2000) Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch Biochem Biophys* 383, 1-16.

Orlowski RZ (1999) The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis. *Cell Death Differ* 6, 303-313.

Orlowski RZ, Eswara JR, Lafond-Walker A, Grever MR, Orlowski M und Dang CV (1998) Tumor growth inhibition induced in a murine model of human Burkitt's lymphoma by a proteasome inhibitor. *Cancer Res* 58, 4342-4348.

Ossipov MH, Bazov I, Gardell LR, Kowal J, Yakovleva T, Usynin I, Ekstrom TJ, Porreca F und Bakalkin G (2007) Control of chronic pain by the ubiquitin proteasome system in the spinal cord. *J Neurosci* 27, 8226-8237.

Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y, McCray BA, Ritson GP, Nedelsky NB, Schwartz SL, DiProspero NA, Knight MA, Schuldiner O, Padmanabhan R, Hild M, Berry DL, Garza D, Hubbert CC, Yao TP, Baehrecke EH und Taylor JP (2007) HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature* 447, 859-863.

Park JW, Kim KM, Oh KJ, Rhyu IJ und Jang HS (2009) Proteasome inhibition promotes functional recovery after peripheral nerve reperfusion injury. *J Trauma* 66, 743-748.

Pathak D, Sepp KJ und Hollenbeck PJ (2010) Evidence that myosin activity opposes microtubule-based axonal transport of mitochondria. *J Neurosci* 30, 8984-8992.

Perry VH, Brown MC und Gordon S (1987) The macrophage response to central and peripheral nerve injury. A possible role for macrophages in regeneration. *J Exp Med* 165, 1218-1223.

Piperdi B, Ling YH, Liebes L, Muggia F und Perez-Soler R (2011) Bortezomib: understanding the mechanism of action. *Mol Cancer Ther* 10, 2029-2030.

Prinz M und Mildner A (2011) Microglia in the CNS: immigrants from another world. *Glia* 59, 177-187.

Qiao L und Zhang J (2009) Inhibition of lysosomal functions reduces proteasomal activity. *Neurosci Lett* 456, 15-19.

Reichert F, Saada A und Rotshenker S (1994) Peripheral nerve injury induces Schwann cells to express two macrophage phenotypes: phagocytosis and the galactose-specific lectin MAC-2. *J Neurosci* 14, 3231-3245.

Reichert F, Slobodov U, Makranz C und Rotshenker S (2001) Modulation (inhibition and augmentation) of complement receptor-3-mediated myelin phagocytosis. *Neurobiol Dis* 8, 504-512.

Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D, Rajkumar SV, Srkalovic G, Alsina M, Alexanian R, Siegel D, Orłowski RZ, Kuter D, Limentani SA, Lee S, Hideshima T, Esseltine DL, Kauffman M, Adams J, Schenkein DP und Anderson KC (2003) A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med* 348, 2609-2617.

Richardson PG, Briemberg H, Jagannath S, Wen PY, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Siegel DS, Irwin D, Schuster M, Srkalovic G, Alexanian R, Rajkumar SV, Limentani S, Alsina M, Orłowski RZ, Najarian K, Esseltine D, Anderson KC und Amato AA (2006) Frequency, characteristics, and reversibility of peripheral neuropathy during treatment of advanced multiple myeloma with bortezomib. *J Clin Oncol* 24, 3113-3120.

Rideout HJ, Larsen KE, Sulzer D und Stefanis L (2001) Proteasomal inhibition leads to formation of ubiquitin/alpha-synuclein-immunoreactive inclusions in PC12 cells. *J Neurochem* 78, 899-908.

Rideout HJ, Lang-Rollin I und Stefanis L (2004) Involvement of macroautophagy in the dissolution of neuronal inclusions. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2551-2562.

Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D und Goldberg AL (1994) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761-771.

Rubinsztein DC (2007) Autophagy induction rescues toxicity mediated by proteasome inhibition. *Neuron* 54, 854-856.

Saigoh K, Wang YL, Suh JG, Yamanishi T, Sakai Y, Kiyosawa H, Harada T, Ichihara N, Wakana S, Kikuchi T und Wada K (1999) Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice. *Nat Genet* 23, 47-51.

Saxena S und Caroni P (2007) Mechanisms of axon degeneration: from development to disease. *Prog Neurobiol* 83, 174-191.

Schapira AH, Cleeter MW, Muddle JR, Workman JM, Cooper JM und King RH (2006) Proteasomal inhibition causes loss of nigral tyrosine hydroxylase neurons. *Ann Neurol* 60, 253-255.

Scheidt P und Friede RL (1987) Myelin phagocytosis in Wallerian degeneration. Properties of millipore diffusion chambers and immunohistochemical identification of cell populations. *Acta Neuropathol* 75, 77-84.

Scheidt P, Waehnelndt TV, Beuche W und Friede RL (1986) Changes of myelin proteins during Wallerian degeneration in situ and in millipore diffusion chambers preventing active phagocytosis. *Brain Res* 379, 380-384.

Schubert T und Friede RL (1981) The role of endoneural fibroblasts in myelin degradation. *J Neuropathol Exp Neurol* 40, 134-154.

Setsuie R und Wada K (2007) The functions of UCH-L1 and its relation to neurodegenerative diseases. *Neurochem Int* 51, 105-111.

Sharon N (1984) Carbohydrates as recognition determinants in phagocytosis and in lectin-mediated killing of target cells. *Biol Cell* 51, 239-246.

Sherman MY und Goldberg AL (2001) Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* 29, 15-32.

Sherriff FE, Bridges LR und Sivaloganathan S (1994) Early detection of axonal injury after human head trauma using immunocytochemistry for beta-amyloid precursor protein. *Acta Neuropathol* 87, 55-62.

Shin YK, Jang SY, Lee HK, Jung J, Suh DJ, Seo SY und Park HT (2010) Pathological adaptive responses of Schwann cells to endoplasmic reticulum stress in bortezomib-induced peripheral neuropathy. *Glia* 58, 1961-1976.

Shinohara K, Tomioka M, Nakano H, Tone S, Ito H und Kawashima S (1996) Apoptosis induction resulting from proteasome inhibition. *Biochem J* 317 (Pt 2), 385-388.

Siebert H, Sachse A, Kuziel WA, Maeda N und Brück W (2000) The chemokine receptor CCR2 is involved in macrophage recruitment to the injured peripheral nervous system. *J Neuroimmunol* 110, 177-185.

Siebert H, Engelke S, Maruschak B und Bruck W (2001a) Concentration-dependent effects of the esterase inhibitor BNPP on macrophage migration and myelin phagocytosis. *Brain Res* 916, 159-164.

Siebert H, Dippel N, Mader M, Weber F und Bruck W (2001b) Matrix metalloproteinase expression and inhibition after sciatic nerve axotomy. *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 85-93.

Silbernagl S, Despopoulos A: Taschenatlas der Physiologie. 6. Auflage; G. Thieme Verlag, Stuttgart 2003

Stichel CC, Zhu XR, Bader V, Linnartz B, Schmidt S und Lubbert H (2007) Mono- and double-mutant mouse models of Parkinson's disease display severe mitochondrial damage. *Hum Mol Genet* 16, 2377-2393.

Stoll G und Muller HW (1999) Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol* 9, 313-325.

Stoll G, Trapp BD und Griffin JW (1989a) Macrophage function during Wallerian degeneration of rat optic nerve: clearance of degenerating myelin and Ia expression. *J Neurosci* 9, 2327-2335.

Stoll G, Griffin JW, Li CY und Trapp BD (1989b) Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol* 18, 671-683.

Suh J, Lee YA und Gwag BJ (2005) Induction and attenuation of neuronal apoptosis by proteasome inhibitors in murine cortical cell cultures. *J Neurochem* 95, 684-694.

Teicher BA, Ara G, Herbst R, Palombella VJ und Adams J (1999) The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 5, 2638-2645.

Thomson CE, Mitchell LS, Griffiths IR und Morrison S (1991) Retarded Wallerian degeneration following peripheral nerve transection in C57BL/6/Ola mice is associated with delayed down-regulation of the P0 gene. *Brain Res* 538, 157-160.

Tofaris GK, Patterson PH, Jessen KR und Mirsky R (2002) Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. *J Neurosci* 22, 6696-6703.

Tomita K, Kubo T, Matsuda K, Fujiwara T, Yano K, Winograd JM, Tohyama M und Hosokawa K (2007) The neurotrophin receptor p75NTR in Schwann cells is implicated in remyelination and motor recovery after peripheral nerve injury. *Glia* 55, 1199-1208.

Tsuji S, Kikuchi S, Shinpo K, Tashiro J, Kishimoto R, Yabe I, Yamagishi S, Takeuchi M und Sasaki H (2005) Proteasome inhibition induces selective motor neuron death in organotypic slice cultures. *J Neurosci Res* 82, 443-451.

van der Laan LJ, Ruuls SR, Weber KS, Lodder IJ, Dopp EA und Dijkstra CD (1996) Macrophage phagocytosis of myelin in vitro determined by flow cytometry: phagocytosis is mediated by CR3 and induces production of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide. *J Neuroimmunol* 70, 145-152.

Van Laar VS, Dukes AA, Cascio M und Hastings TG (2008) Proteomic analysis of rat brain mitochondria following exposure to dopamine quinone: implications for Parkinson disease. *Neurobiol Dis* 29, 477-489.

van Rooijen N (1989) The liposome-mediated macrophage 'suicide' technique. *J Immunol Methods* 124, 1-6.

van Rooijen N und Sanders A (1994) Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods* 174, 83-93.

van Rossum D, Hilbert S, Strassenburg S, Hanisch UK und Bruck W (2008) Myelin-phagocytosing macrophages in isolated sciatic and optic nerves reveal a unique reactive phenotype. *Glia* 56, 271-283.

Vargas ME und Barres BA (2007) Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? *Annu Rev Neurosci* 30, 153-179.

Waller A (1850) Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. *Phil Trans R Soc Lond (Biol)* 140, 423-429.

Watanabe T, Nagase K, Chosa M und Tobinai K (2010) Schwann cell autophagy induced by SAHA, 17-AAG, or clonazepam can reduce bortezomib-induced peripheral neuropathy. *Br J Cancer* 103, 1580-1587.

Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN und Rubinsztein DC (2003) Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem* 278, 25009-25013.

Weerasuriya A und Mizisin AP (2011) The blood-nerve barrier: structure and functional significance. *Methods Mol Biol* 686, 149-173.

Wessig C (2011) Detection of blood-nerve barrier permeability by magnetic resonance imaging. *Methods Mol Biol* 686, 267-271.

Wessig C, Bendszus M und Stoll G (2007) In vivo visualization of focal demyelination in peripheral nerves by gadofluorine M-enhanced magnetic resonance imaging. *Exp Neurol* 204, 14-19.

Wilk S und Orlowski M (1983) Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex. *J Neurochem* 40, 842-849.

Wilkinson KD (1997) Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J* 11, 1245-1256.

Wojcik C (1997) An inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the proteasome (PSI) induces similar morphological changes in various cell lines. *Folia Histochem Cytobiol* 35, 211-214.

Wojcik C (2002) Regulation of apoptosis by the ubiquitin and proteasome pathway. *J Cell Mol Med* 6, 25-48.

Wong E und Cuervo AM (2010) Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a006734.

Xie W, Li X, Li C, Zhu W, Jankovic J und Le W (2010) Proteasome inhibition modeling nigral neuron degeneration in Parkinson's disease. *J Neurochem* 115, 188-199.

Yamazaki K, Wakasugi N, Tomita T, Kikuchi T, Mukoyama M und Ando K (1988) Gracile axonal dystrophy (GAD), a new neurological mutant in the mouse. *Proc Soc Exp Biol Med* 187, 209-215.

Yue Z (2007) Regulation of neuronal autophagy in axon: implication of autophagy in axonal function and dysfunction/degeneration. *Autophagy* 3, 139-141.

Zeng BY, Bukhatwa S, Hikima A, Rose S und Jenner P (2006) Reproducible nigral cell loss after systemic proteasomal inhibitor administration to rats. *Ann Neurol* 60, 248-252.

Zhai Q, Wang J, Kim A, Liu Q, Watts R, Hoopfer E, Mitchison T, Luo L und He Z (2003) Involvement of the ubiquitin-proteasome system in the early stages of wallerian degeneration. *Neuron* 39, 217-225.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. Brück danke ich für die Möglichkeit, in seiner Abteilung meine Arbeit durchführen zu dürfen. Außerdem möchte ich mich für seine hervorragende Betreuung bedanken. Prof. Brück und seine Mitarbeiter waren jederzeit für mich erreichbar und erhielten meine Motivation mit praktischen Tipps und tatkräftiger Unterstützung aufrecht.

Mein besonderer Dank ist an Frau Dr. H. Siebert gerichtet, die mir freundlicherweise das Thema überlassen hat. Dr. Siebert war jederzeit und überall für mich ansprechbar und hatte immer ein offenes Ohr für alle Probleme, die bei der Arbeit im Labor und am Text entstanden. Ohne ihr freundliches und motivierendes Wesen und ihr enormes Engagement wäre die Arbeit nie möglich gewesen.

Frau Brigitte Maruschak und Frau Margit Kollhoff sei ebenfalls vielmals für die technische Unterstützung gedankt. Vielen Dank auch an alle anderen Mitarbeiter der Neuropathologie für die unzähligen, unkomplizierten Hilfestellungen.

Meiner Familie und meiner Frau möchte ich für die Durchsicht des Manuskripts danken. Ohne ihre unbedingte Hilfe wäre diese Arbeit nie möglich gewesen.

Lebenslauf

Am 10. Januar 1980 wurde ich als zweites Kind des Ehepaares Ute und Theodor Denninger in Bremen geboren.

Die Allgemeine Hochschulreife erlangte ich im Jahre 1999 am St.-Viti-Gymnasium in meiner Heimatstadt Zeven.

Im Anschluss an die Schulzeit folgte mein zwölfmonatiger Wehrersatzdienst im Martin-Luther-Krankenhaus in Zeven.

Zum Sommersemester 2003 begann ich das Studium der Humanmedizin in Göttingen. Im März 2005 legte ich die Ärztliche Vorprüfung ab. Im Laufe des Studiums famulierte ich in den Bereichen Unfallchirurgie, Anästhesie, Chirurgie und Allgemeinmedizin.

Das Praktische Jahr absolvierte ich in Trinidad & Tobago im Bereich Chirurgie und am Universitätsklinikum Göttingen in den Bereichen Anästhesie und Innere Medizin.

Am 20. Juni 2009 legte ich die Ärztliche Prüfung in Göttingen ab.

Vom 05. Oktober 2009 bis zum 31. August 2010 war ich als Assistenzarzt in der chirurgischen Abteilung im Krankenhaus Wegscheid unter der Leitung von Dr. M. Werner tätig.

Seit dem 01. September 2010 bin ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Regensburg unter Prof. Dr. med. Bernhard M. Graf, MSc. tätig.