

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

---

# **De- und Remyelinisierung in Dopaminrezeptor-defizienten Mäusen**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Katharina Schultz  
aus Göttingen

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

- I. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Stadelmann-Nessler
- II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Simons
- III. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Liebetanz

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2012

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	<i>Multiple Sklerose</i> .....	1
1.1.1	Epidemiologie .....	1
1.1.2	Ätiologie und Pathogenese .....	2
1.1.3	Pathophysiologie .....	3
1.1.4	Neuropathologie .....	5
1.1.5	Klinik .....	7
1.1.6	Diagnose .....	8
1.1.7	Therapie .....	10
1.2	<i>Remyelinisierung</i> .....	11
1.3	<i>Cuprizon-induzierte Entmarkung - ein Tiermodell der Multiplen Sklerose</i> ..	14
1.4	<i>Dopamin und Dopaminrezeptoren</i> .....	16
1.4.1	Struktur der Dopaminrezeptoren .....	18
1.4.2	Dopaminrezeptor-Expression auf Oligodendrozyten .....	21
1.5	<i>Dopaminagonisten</i> .....	23
1.6	<i>Ziel der Arbeit</i> .....	24
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>25</b>
2.1	<i>Material</i> .....	25
2.1.1	Tiere .....	25
2.1.2	Verfütterung von Cuprizon .....	25
2.1.3	Behandlung mit Pramipexol und PBS .....	26
2.1.4	Allgemein verwendete Puffersysteme, Lösungen und andere Substanzen .....	26
2.1.5	Histologische Färbungen .....	27
2.1.6	Antikörper und spezielle Chemikalien zur Immunhistochemie .....	28
2.2	<i>Methoden</i> .....	29
2.2.1	Versuchsdurchführung .....	29
2.2.2	Präparation der Mäuse .....	30

2.2.3	Histologische Präparate .....	30
2.2.3.1	Hämatoxylin-Eosin .....	30
2.2.3.2	Luxol-Fast-Blue/Perjodsäure-Schiff (LFB/PAS).....	32
2.2.4	Immunhistochemische Färbungen.....	33
2.2.4.1	Antikörper .....	34
2.2.4.2	Durchführung.....	34
2.2.5	Mikroskopie und Morphometrie .....	35
2.3	<i>Statistische Analysen</i> .....	37
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>38</b>
3.1	<i>Morphometrische Analyse der DRD2 -/- Mäuse nach 7-tägiger Verfütterung von Cuprizin</i> .....	39
3.1.1	Nachweis der Apoptosen gesamt, von Caspase-3-positiven apoptotischen Zellen und Nogo-A-positiven apoptotischen Oligodendrozyten .....	39
3.1.2	Quantifizierung der Mikrogliaaktivierung.....	41
3.1.3	Demyelinisierung .....	43
3.1.4	Nogo-A-positive, nicht apoptotische Oligodendrozyten .....	43
3.2	<i>Morphometrische Analyse der DRD3 -/- Mäuse nach 7-tägiger Verfütterung von Cuprizin mit und ohne Pramipexol-Behandlung</i> .....	45
3.2.1	Nachweis der Apoptosen gesamt.....	45
3.2.2	Nachweis von Caspase-3-positiven apoptotischen Zellen.....	46
3.2.3	Nachweis von Nogo-A-positiven apoptotischen Oligodendrozyten .....	47
3.2.4	Quantifizierung der Mikrogliaaktivierung.....	51
3.2.5	Demyelinisierung .....	53
3.2.6	Nogo-A-positive, nicht apoptotische Oligodendrozyten in mit Pramipexol behandelten und unbehandelten DRD3 -/- Mäusen .....	53
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>56</b>
4.1	<i>Oligodendroglia-Zelltod im Cuprizin-Modell der Entmarkung</i> .....	56
4.2	<i>Einfluss einer Dopaminrezeptor-Defizienz auf die oligodendrogliale Vulnerabilität im Cuprizin-Modell</i> .....	57

4.2.1	Die Bedeutung von endogenem (= in physiologischen Dosen vorhandenem) Dopamin bei Cuprizon-induzierten Apoptosevorgängen sowie dem Ausmaß der Mikrogliaaktivierung .....	58
4.2.2	Die Bedeutung exogener dopaminerger Stimulation in Form des Dopaminagonisten Pramipexol bei Cuprizon-induzierten Apoptosevorgängen sowie dem Ausmaß der Mikrogliaaktivierung .....	59
4.3	<i>Apoptosendetektion</i> .....	60
4.4	<i>Ausblick</i> .....	62
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>81</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.:	Abbildung
Abs:	<i>Antibodies</i> (Antikörper)
ADEM:	Akute disseminierte Enzephalomyelitis
Ag:	Antigen
AP:	Alkalische Phosphatase
AP-1:	<i>activator-protein 1</i> (Aktivierungsprotein 1)
APC:	Antigen-präsentierende Zelle
Aqua bidest.:	zweifach destilliertes Wasser
ATP:	Adenosintriphosphat
bcl-2:	<i>B cell lymphoma 2</i> (B-Zell-Lymphom-2-Protein)
BDNF:	<i>Brain derived neurotrophic factor</i> (aus Hirngewebe stammender neurotropher Faktor)
BHS:	Bluthirnschranke
bzw.:	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup> :	Calcium-Ion
ca.:	<i>circa</i> (etwa, ungefähr)
CaM:	Calmodulin
cAMP:	<i>3'-5'-cyclic adenosinmonophosphat</i> (zyklisches Adenosinmonophosphat)
CAMs:	zelluläre Adhäsionsmoleküle
C5b-9:	Membran-Angriffs-Komplex
CCRs:	Chemokine und Chemokinrezeptoren
CFA:	<i>complete freund's adjuvant</i> (komplettes Freund'sches Adjuvans)

COOH:	Carboxylgruppe
Cuprizon:	Bis-cyclohexanon-oxaldihydrazon
CXCRs:	Chemokine und Chemokinrezeptoren
DAB:	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DAG:	Diacylglycerin
D1-D4:	Dopaminrezeptor 1-4
Dest.:	<i>destillata</i> (destilliert)
d.h.:	das heißt
DRD2:	Dopaminrezeptor D2
DRD3:	Dopaminrezeptor D3
EAE:	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
et al.:	<i>et alii</i> (und andere)
FCS:	<i>fetal calf serum</i> (Fetales Kälberserum)
g:	gramm
GDP:	Guanosindiphosphat
ggf.:	gegebenenfalls
GPCR:	<i>G-protein-coupled receptor</i> (G-Protein-gekoppelter Rezeptor)
GTP:	Guanosintriphosphat
H <sup>+</sup> :	Wasserstoff
HCl:	Chlorwasserstoff
H.E.:	Hämatoxylin-Eosin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Wasserstoffperoxid
HRP:	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
Hrsg:	Herausgeber
HVL:	Hypophysenvorderlappen

ICAM 1:	<i>intercellular adhesion molecule 1</i> (interzelluläres Adhäsionsmolekül)
IFN $\gamma$ :	Interferon $\gamma$
IGF-1:	<i>Insulin-like growth-factor 1</i> (Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1)
IgG:	Immunglobulin G
IL:	Interleukin
IP3:	Inositoltriphosphat
IPS:	Idiopathisches Parkinson-Syndrom
K <sup>+</sup> :	Kalium-Ion
kg:	Kilogramm
KG:	Körpergewicht
LINGO-1 :	<i>leucine rich repeats and Ig domains containing 1</i> (Reichhaltige Leucin-Wiederholungen und Ig-Bereiche enthaltendes Protein 1)
LFB:	<i>Luxol fast blue</i>
LT:	Lymphotoxin
M:	Mol, molar
MAG:	Myelin-Assoziiertes Glykoprotein
MAPK:	Mitogen-Aktivierte Protein-Kinase
MBP:	Myelin-Basisches Protein
MF:	Makrophagen
mg:	Milligramm
MHC:	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min:	Minute
$\mu$ l:	Mikroliter
mm <sup>2</sup> :	Quadratmillimeter
MMPs:	Matrixmetalloproteinasen



MOG:	Myelin-Oligodendrozyten-Protein
mRNA:	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
MRT:	Magnetresonanztomographie
MRZ:	Masern, Röteln, Herpes zoster
MS:	Multiple Sklerose
MW:	Mittelwert
Na <sup>+</sup> :	Natrium
NaCl:	Natriumchlorid
NH <sub>2</sub> :	sekundäres Amin
NH <sub>3</sub> :	tertiäres Amin
NO:	Stickstoffmonoxid
Nogo:	<i>neurite outgrowth inhibitory protein</i> (Neuritenwachstum hemmendes Protein)
NRG-1:	Neuregulin 1
NT-3:	Neurotrophin-3
o.ä.:	oder ähnliches
o.g.:	oben genannt(e)
OH:	Hydroxylgruppe
OPC:	<i>Oligodendrocyte precursor cell</i> (Oligodendrozyten-Vorläuferzelle)
PAS:	<i>periodic acid Schiff reaction</i> (Perjodsäure-Schiff-Reaktion)
PBS:	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PDGF:	<i>platelet derived growth factor</i> (aus den Plättchen stammender Wachstumsfaktor)
PFA:	Paraformaldehyd
PIP:	Phosphatidyl-Inositoltriphosphat
PI3K:	Phosphatidylinositol-3-Kinase

PKA:	Proteinkinase A
PKC:	Proteinkinase C
PLC:	Phospholipase C
PLP:	Proteolipidprotein
PP-MS:	primary-progressive multiple sclerosis (primär chronisch-progrediente Multiple Sklerose)
PR-MS:	progressive-relapsing multiple sclerosis (progredient-schubförmig verlaufende Multiple Sklerose)
ROS:	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
RR-MS:	<i>relapsing-remitting multiple sclerosis</i> (schubförmig verlaufende Multiple Sklerose)
SD:	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SNP:	Einzelnukleotidpolymorphismus
SP-MS:	<i>secondary-progressive multiple sclerosis</i> (sekundär chronisch-progrediente Multiple Sklerose)
s.u.:	siehe unten
TCR:	T-Zell-Rezeptor
TGF:	<i>Transforming growth factor</i> (transformierender Wachstumsfaktor)
Th1-Lymphozyten:	T-Helfer-1-Lymphozyten
Th2-Lymphozyten:	T-Helfer-2-Lymphozyten
Treg:	regulatorische T-Zellen
u.a.:	unter anderem
UMG:	Universitätsmedizin Göttingen
VCAM1:	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i> (vaskuläres Zelladhäsionsmolekül)
vs.:	<i>versus</i> (gegen, kontra, verglichen mit)

wt:	Wildtyp
z.A.:	zum Ausschluss
z.B.:	zum Beispiel
ZNS:	Zentrales Nervensystem
-/- :	<i>knockout</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen bei jungen Menschen und wird als inflammatorische Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS) mit anschließender Neurodegeneration definiert (Ickenstein und Höhlig 2007).

1868 beschrieb der französische Neurologe Jean-Martin Charcot (1825-1893) erstmals die MS, als er bei seinen Patienten eine klinische Trias aus Nystagmus, Intentionstremor und Dysarthrie (Charcot-Trias) ausmachen konnte. Pathologisch zeigten sich bei diesen Patienten multiple, gliöse Herde im ZNS, welche zur Betitelung der Erkrankung führten, „Sclérose en plaques“.

Charakteristisch für die Erkrankung ist eine Destruktion der Myelinscheiden mit nur bedingter Remyelinisierung und im Verlauf der Erkrankung irreversiblen Axonschaden.

### 1.1.1 Epidemiologie

Für die MS ist eine Inzidenz von 4/100.000/Jahr in Deutschland bekannt. Frauen sind von der Erkrankung häufiger als Männer betroffen, das Verhältnis beträgt 1,8:1. Das Hauptmanifestationsalter findet sich zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, die Prävalenz in Deutschland wird mit 149/100.000 Patienten angegeben (Gleixner et al. 2007).

Auffällig sind auf der Nordhalbkugel ein geographisches Nord-Süd-Gefälle der Erkrankung sowie ein vermehrtes Auftreten in der weißen Bevölkerung gegenüber anderen Rassen, die auf dem gleichen Breitengrad leben. Epidemiologische Studien konnten außerdem zeigen, dass Einwanderer, die ihr Geburtsland vor dem 15.

Lebensjahr verließen, das Erkrankungsrisiko ihres neuen Heimatlandes trugen. Siedelten sie erst nach dem 15. Lebensjahr um, galt für sie das Erkrankungsrisiko ihres Geburtslandes (Poeck und Hacke 2006).

### 1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die genaue Ursache der MS ist nicht bekannt. Derzeit gibt es verschiedene Hypothesen, deren Kombination ursächlich für die Entstehung der MS zu sein scheint.

#### Umweltfaktoren

Das Epstein-Barr-Virus scheint nach Arbeiten von Ascherio und Munger, insbesondere nach Infektion im frühen Lebensalter, ein deutlicher Risikofaktor für die Entstehung einer MS zu sein (Ascherio und Munger 2010). Aber auch andere Virusinfektionen werden im Zusammenhang mit der Ätiopathogenese der MS diskutiert.

Im Tierversuch zeigte sich u.a. für das Coronavirus, dass es zu einer chronisch-rezidivierenden Form einer demyelinisierenden Enzephalomyelitis mit zellvermittelter Autoimmunreaktion führen kann (ter Meulen 1988). Auf die Frage, ob Herpes- und Retroviren ätiologisch für das Auftreten der MS verantwortlich sind oder die nachgewiesenen erhöhten Titer als Epiphänomen auftreten, konnte bislang keine definitive Antwort gefunden werden (Wiethölter 2006).

#### Genetische Disposition

Die MS tritt familiär gehäuft auf, doch spricht nichts für das Vorliegen eines Mendelschen Erbganges. Es zeigen sich unterschiedlicher Beginn, klinischer Verlauf und variable Penetranz der Erkrankung. Kollektivuntersuchungen zeigen, dass das Risiko für Geschwister von MS-Patienten, ebenfalls an der MS zu erkranken, bei 2,3-4% liegt, bei eineiigen Zwillingen sogar bei 20-40%. Dies weist auf das Vorhandensein prädisponierender polygenetischer Faktoren hin. Man geht von einer Kombination von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) aus, die in der Promotorregion verschiedener Immungene vorhanden sind und so beispielsweise

beim Antreffen eines spezifischen Antigens zu einer nicht-kontrollierten Immunzellproliferation und Autoimmunität führen (Ickenstein und Höhlig 2007).

### Autoimmune Genese

Angenommen wird eine T-Zell-vermittelte Autoimmunreaktion gegen Myelinantigene, die unter 1.1.3 Pathophysiologie noch genauer erläutert werden soll. Es wird ein Ungleichgewicht zwischen regulatorischen T-Zellen (Tregs) und T-Helferzellen postuliert, so dass autoaggressive T-Zellen wirksam werden können. Diese autoaggressiven T-Zellen finden sich auch bei Gesunden. Unklar ist noch, wie die Aktivierung und Expansion autoaggressiver T-Zellen vonstatten geht. Sind diese autoaggressiven T-Zellen aktiviert, wandern sie in Richtung ZNS und richten sich dort vermutlich gegen Autoantigene, die man in MS-Läsionen nachweisen konnte, z.B.:

- Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) (Lindert et al. 1999)
- Myelin-Basisches Protein (MBP) (Hohlfeld und Wekerle 2001)
- Proteolipidprotein (PLP) oder
- Myelin-Assoziiertes Glykoprotein (MAG).

Durch Reaktivierung der ZNS-Antigen-spezifischen T-Zellen nach Antigenpräsentation durch perivaskuläre und dendritische Zellen kommt es zur Ausschüttung von Zytokinen, zur Mikrogliaaktivierung und Rekrutierung weiterer Entzündungszellen aus dem Blut.

### 1.1.3 Pathophysiologie

Das derzeitige Wissen zur Immunzellphysiologie sowie die zellulären und molekularen Mechanismen der Entstehung einer MS-Läsion sind im folgenden Schema zusammengefasst (Kleinschnitz et al. 2007). Grundlegend für das pathophysiologische Verständnis der Entstehung der MS sind überwiegend die Erkenntnisse aus dem Tiermodell, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE).

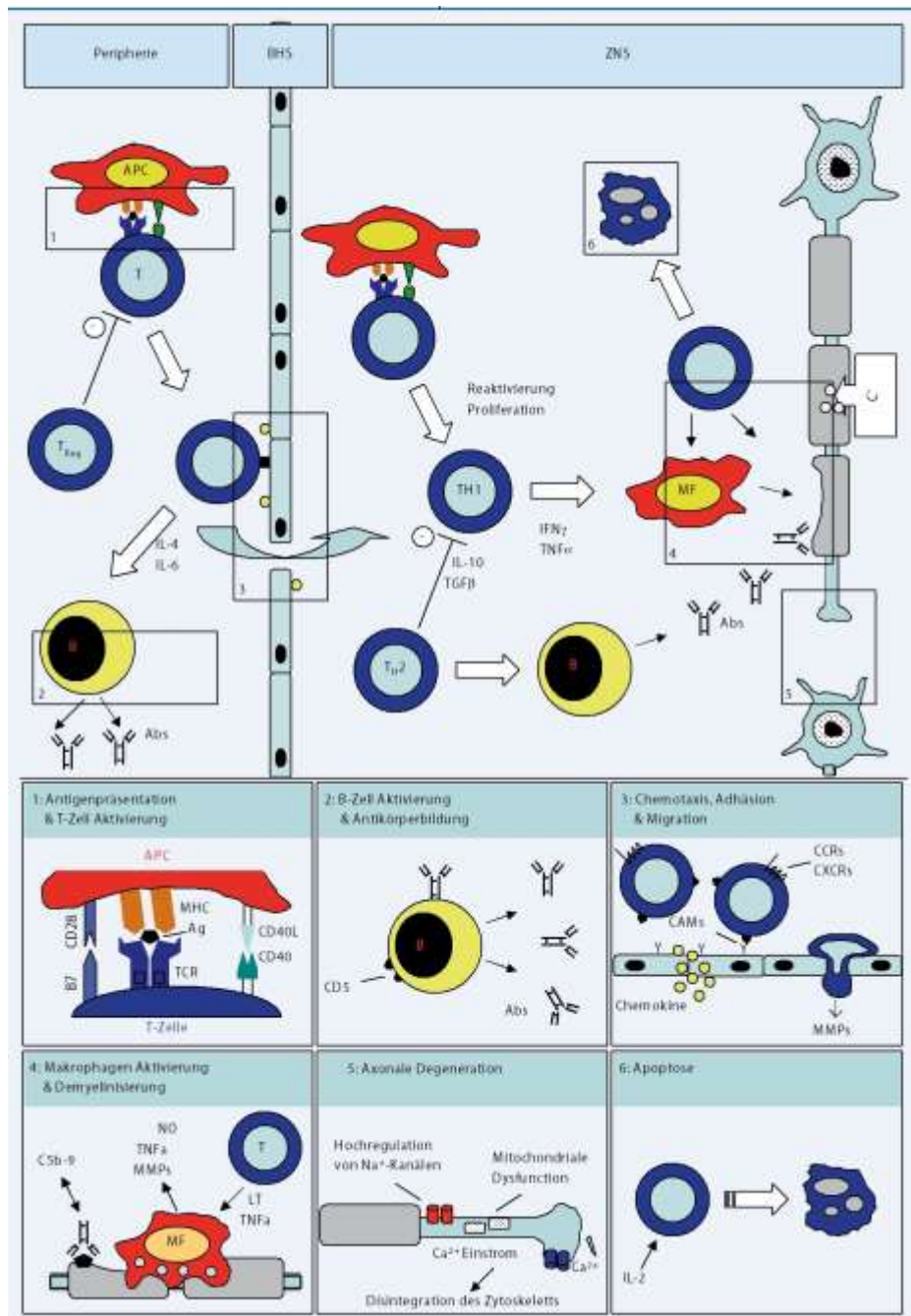


Abb. 1

Überblick über die an der Pathogenese der MS beteiligten Bestandteile des Immunsystems (entnommen aus Kleinschnitz et al. 2007, S. 884).

Aus noch nicht definitiv geklärter Ursache bilden sich im peripheren Blut autoreaktive T-Zellen, vermutlich basierend auf einer Kreuzreaktion zwischen exogenen Epitopen und identischen körpereigenen Strukturen, sogenanntes molekulares Mimikry. **(Schritt 1).**

Es erfolgt das Andocken der aktivierten autoreaktiven T-Zellen an Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke, welche komplementäre Adhäsionsmoleküle (ICAM1 und VCAM1) exprimieren (**Schritt 3**).

CD4+ Helferzellen sowie zytotoxische CD8+ Zellen werden lokal reaktiviert und stimulieren Mikroglia und Makrophagen, was zu einer Rekrutierung von Entzündungszellen aus dem peripheren Blut führt und eine gesteigerte Phagozytose und Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und freien Radikalen, wie z.B. TNF- $\alpha$ , Lymphotoxin (LT) und Stickstoffmonoxid (NO), bedingt, welche eine Schädigung von Myelin und Oligodendrozyten hervorrufen können.

Weiterhin sind die T-Zellen in der Lage, eine B-Zell-Aktivierung und Autoantikörperbildung gegen Myelinantigene, wie MBP oder MOG, anzustoßen (**Schritt 2**). Die Autoantikörper schädigen dann die Myelinscheide entweder durch Opsonisierung mit nachfolgender Phagozytose des Myelins oder durch Aktivierung des Komplementsystems mit nachfolgender Bildung eines Membran-Angriff-Komplexes (C5b-9), was zur Auflösung der Zielstruktur Myelin führt (**Schritt 4**).

**Schritt 5** verdeutlicht den axonalen Schaden, wobei nicht geklärt ist, ob die axonale Destruktion ausschließlich sekundär aufgrund der vorhergehenden Demyelinisierung oder zum Teil auch primär auftritt.

In **Schritt 6** wird die Regulation der Entzündungsreaktion durch Aktivierung von Th2-Lymphozyten, die die antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 produzieren, und von T-Suppressorzellen, die das antiinflammatorische Zytokin TGF- $\beta$  bilden, mit nachfolgender Apoptose der T-Zellen dargestellt.

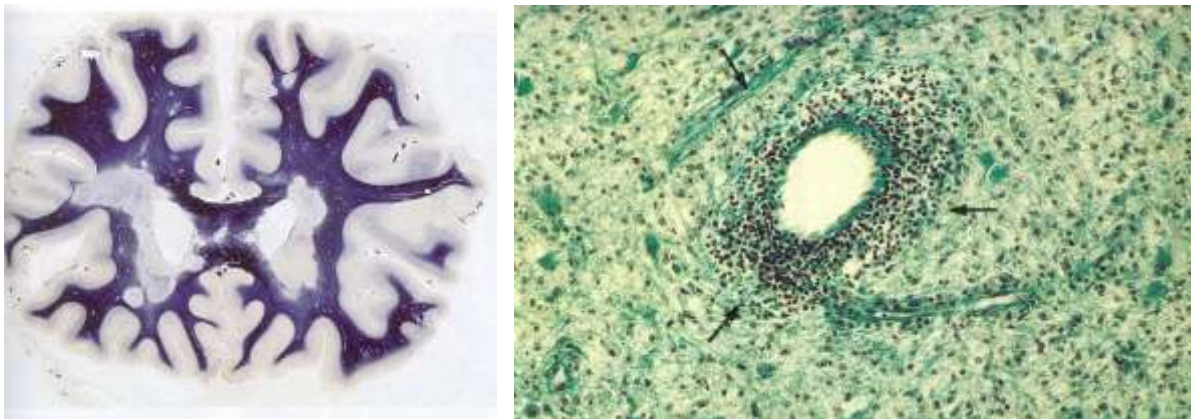
#### 1.1.4 Neuropathologie

Makroskopisch zeigen sich grau-weißliche, gut abgrenzbare Plaques, die den Untergang der Markscheiden repräsentieren und an allen Stellen des ZNS vorkommen können. An deren Ausläufern kann man sogenannte Dawson-Finger finden, dies sind fingerförmige Ausläufer der Läsionen, die sich entlang der Blutgefäße bis in die angrenzende weiße Substanz verfolgen lassen. Findet man in der Myelinfärbung dünne Myelinscheiden, die sich blasser anfärben, so sind dies remyelinisierte Areale, die oft am Rand von Läsionen gefunden werden. Vollständig



remyelinisierte Läsionen werden Shadow-Plaques genannt (Brück et al. 2003). Die fibrilläre Gliose ist Ausdruck einer Faserbildung durch Astrozyten an den Stellen, an denen die Myelinzerfallsprodukte bereits abgeräumt sind.

Lokalisiert sind die Entmarkungsherde vornehmlich in den Gebieten drainierender Venen. Prädilektionsstellen sind zum einen periventrikuläre Areale, zum anderen Orte mit großer mechanischer Belastung, wie z.B. der intrakanalikuläre Verlauf des N. opticus und das Zervikalmark (Deckert et al. 2004).



**Abb. 2**

Multiple Sklerose; links: Multiple periventrikuläre Entmarkungsherde nach Markscheidenfärbung, Frontalschnitt; rechts: Entmarkung, Astroglie und perivenöses Lymphozyteninfiltrat (*Pfeile*) (Goldner-Färbung, Vergr. 1:150) (entnommen aus Riede et al. 2004, S 1088).

Histopathologisch lassen sich die Läsionen in ein aktives und in ein chronisches Stadium unterteilen. In den aktiven Läsionen findet man eine deutliche Störung der Blut-Hirn-Schranke, gekennzeichnet durch Ödem und Eindringen von Serumkomponenten, z.B. Albumin und IgG, in das Gewebe. Perivaskuläre und parenchymatöse T-Zell-Infiltrate sind vorhanden. Es zeigen sich zahlreiche axonale Sphäroide als Zeichen einer axonalen Transportstörung bzw. einer akuten axonalen Schädigung. Hingegen dominieren in inaktiven Läsionen ein ausgeprägter Oligodendrozytenverlust sowie eine auffallende Gliose. Entzündungszellen lassen sich kaum ausmachen, die Axondichte ist oft deutlich reduziert.

Nach Lucchinetti et al. lassen sich im früh-aktiven Läsionsstadium vier histopathologische Subtypen charakterisieren (Lucchinetti et al. 2000):

- Typ I:       • T-Zell- und Makrophageninfiltration in scharf begrenztem Entzündungsareal
- deutliche Demyelinisierung
- Oligodendrozytenerhalt
- Typ II:       • T-Zell - und Makrophageninfiltration
- Antikörper- und Komplementablagerung in den demyelinisierten Arealen
- Demyelinisierung
- Typ III:      • Oligodendrozytendystrophie/Oligodendrozytenapoptose, Verlust von MAG-Protein
- oft unscharf begrenzte Demyelinisierung
- Typ IV:      • primärer Oligodendrozytentod in der periläsionalen weißen Substanz

### 1.1.5 Klinik

#### **Verlaufsformen**

Es lassen sich unterschiedliche Verlaufsformen der MS beschreiben (Lublin und Reingold 1996).

#### Schubförmiger Verlauf

Bei ca. 80% der Patienten verläuft die Erkrankung anfangs schubförmig. Auf Phasen neurologischer Ausfallerscheinungen folgen Intervalle der zumeist kompletten Remission der Symptomatik (schubförmige MS [*relapsing-remitting, RR-MS*]). Betroffen sind vor allem junge Erwachsene, Frauen doppelt so häufig wie Männer. Initialsymptome sind oft Sehstörungen, eine zunehmende Schwäche der Beine sowie Sensibilitätsstörungen.

Dieser Verlauf geht bei 50% der Patienten innerhalb von 10 Jahren in einen sekundär chronisch-progredienten (*secondary-progressive, SP-MS*) Verlauf mit oder ohne zusätzliche Schübe über.

### Primär chronisch-progredienter Verlauf (*primary-progressive, PP-MS*)

Diese Verlaufsform findet sich bei ca. 10-15% der Patienten, manifestiert sich klinisch zumeist durch eine zunehmende spastische Paraparese und verläuft ohne Schübe und Remissionen. Sie tritt vornehmlich nach dem 40. Lebensjahr auf. Frauen und Männer sind zu gleichen Teilen betroffen.

### Progredient-schubförmiger Verlauf (*progressive-relapsing, PR-MS*)

Bei diesem Verlauf besteht von Beginn an ein progredienter Verlauf, bei dem es zusätzlich zu Schüben mit partieller Remission kommt.

## **Symptome**

Die MS äußert sich durch eine vielseitige Klinik, da jede Region des ZNS von der Erkrankung betroffen sein kann. Initial besonders häufig sind Sehstörungen im Rahmen einer Optikusneuritis, Sensibilitätsstörungen mit Kribbelparästhesien und Ameisenlaufen sowie motorische Störungen, die sich als vorzeitige Ermüdung der Beine oder als Gangstörung präsentieren. Häufig sind erloschene Bauchhautreflexe. Im Verlauf kommt es, je nach Befallsmuster, zu Blasen- und Sexualfunktionsstörungen bei Rückenmarksherden oder Koordinationsstörungen bei Befall des Kleinhirns, die oft als Charcot-Trias auftreten: Nystagmus, Intentionstremor, Dysarthrie. Die Dysarthrie äußert sich in Form einer skandierenden Sprache, d.h. Silben und Wörter werden ungleichmäßig laut und schnell ausgesprochen. Neben diesen fokalen Defiziten kann es auch zu weniger greifbaren Symptomen wie Depression (50% aller MS-Patienten), Fatigue (75-90%) und kognitiven Störungen (65%) kommen (Sommer 2007).

### 1.1.6 Diagnose

#### **Diagnosekriterien**

Nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie stützt sich die Diagnose auf die Anamnese, respektive neurologische Ereignisse mit Schubcharakter, die Objektivierung klinisch-neurologischer Ausfälle, die eine

zentralnervöse Störung anzeigen, sowie das Auftreten zeitlich differenter, zumindest zweimalig unterschiedlicher Schub-Symptome, so dass multilokuläre Läsionen anzunehmen sind.

Ein Schub definiert sich durch klinisch-neurologische Ausfälle, die

- mindestens 24 Stunden anhalten
- mit einem Zeitintervall von > 30 Tagen zum Beginn vorausgegangener Schübe auftreten (z.A. einer akuten disseminierten Enzephalomyelitis, ADEM) und
- nicht durch Änderungen der Körpertemperatur (Uhthoff-Phänomen) oder im Rahmen von Infektionen erklärbar sind (Leitlinien der „Deutschen Gesellschaft für Neurologie“ 2008).

Der Liquorbefund, welcher IgG-Produktion im ZNS, oligoklonale Banden und/oder geringe lymphozytäre Pleozytose und eine leichte Eiweißvermehrung aufweist, unterstützt die klinisch-symptomatologische Annahme.

Seit dem Jahr 2001 existieren die McDonald-Diagnosekriterien (McDonald et al. 2001), die die Einteilung nach Poser et al. (1983) durch Miteinbeziehung der radiologischen Befunde ablösen und sich in ständiger Überarbeitung und Revision durch verschiedene Arbeitsgruppen befinden (Wiendl et al. 2006; Zettl et al. 2004), um eine frühere, bessere und zuverlässigere Diagnose der MS zu ermöglichen.

## **Diagnostik**

Als diagnostische Maßnahmen bei MS-Verdacht werden eine Bildgebung mittels MRT zum Nachweis disseminierter Läsionen in Gehirn und Rückenmark, neurophysiologische Untersuchungen, wie evozierte Potenziale, zum Nachweis einer Leitungslatenz, wie sie bei Demyelinisierung anzutreffen ist, sowie eine Untersuchung des Liquors durchgeführt.

Die Ergebnisse der Liquoruntersuchung sind durchaus charakteristisch und in 90% aller MS-Fälle auch pathologisch verändert, dennoch gibt es keine MS-pathognomonischen Befunde, da sie ebenso bei anderen entzündlichen Krankheiten des ZNS oder der Hirnhäute vorkommen können. Bestimmte Parameter-Konstellationen im Liquor treten dennoch charakteristischerweise auf: Man findet bei

klarem Liquor und normaler Zellzahl eine leichte Lymphozytose, ebenso finden sich Plasmazellen im Liquor. Das Gesamteiweiß kann leicht erhöht sein, häufig findet man aber ein normales Gesamteiweiß mit einer relativen Vermehrung der IgG-Fraktion als Hinweis auf eine autochthone IgG-Synthese, die durch Errechnung des Eiweißquotienten zum Ausdruck kommt ( $[\text{IgG im Liquor/IgG im Serum}]:[\text{Albumin im Liquor/Albumin im Serum}] >0,7$ ). Eine vermehrte IgG-Produktion im Liquor lässt sich auch durch Elektrophorese in Form von oligoklonalen Banden nachweisen. Das parallel untersuchte Serum zeigt keine oligoklonalen Banden.

Bei 50-60% der Patienten findet man Myelinabbauprodukte, wie das basische Myelinprotein (MBP), bei etwa 80% sind Antikörper gegen Masern, Röteln und Herpes zoster (MRZ) nachzuweisen. Die MRZ-Reaktion ist vermutlich durch eine unspezifische Mitreaktion von B-Zellklonen im ZNS bei Autoimmunprozessen zu erklären (Wiethölter 2006).

### 1.1.7 Therapie

Für die medikamentöse Therapie der MS stehen verschiedene Therapeutika zur Verfügung, die nach Stadium und Verlaufsform der MS einzusetzen sind. Allen gemein ist als Ziel die Reduktion der Schubfrequenz, die Verzögerung der Progression sowie die Verbesserung des Behinderungsgrades (Diener und Putzki 2008).

#### Schubtherapie

Als Schubtherapeutikum der ersten Wahl gelten hochdosierte Glukokortikosteroide. Bei Nichtansprechen kommen Mitoxantron, ein synthetisches Anthrazyklinderivat mit immunsuppressiver und zytostatischer Wirkung, sowie Cyclophosphamid, ein Alkylans mit ebenfalls immunsuppressiver und zytostatischer Wirkung, zum Einsatz. Auch möglich ist bei schwersten, nicht Kortikosteroid-responsiven Schüben der Einsatz der Plasmapherese.

### Immunmodulatorische Basistherapie

Eine immunmodulatorische Therapie ist nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (Diener und Putzki 2008) indiziert, sofern es in den letzten zwei Jahren zu zwei relevanten Schüben oder dem Auftreten eines schweren Schubs mit schlechter Remissionstendenz gekommen ist.

Die immunmodulatorische Therapie kann mittels der  $\beta$ -Interferone 1b und 1a als Pharmazeutika der ersten Wahl, mittels des synthetischen Polypeptids Glatirameracetat oder, bei Unverträglichkeit von Interferonen, des Purinanalogs Azathioprin erfolgen.

Bei Patienten mit hoher Schubrate ist der monoklonale Antikörper Natalizumab zugelassen. Natalizumab bindet Adhäsionsmoleküle auf der Immunzelloberfläche und verhindert somit das Andocken von Lymphozyten an die Endothelzellen.

Bei primär chronisch-progredientem Verlauf findet die Immunmodulation keine Anwendung. Hier greift die Kombinationstherapie aus Mitoxantron/Cyclophosphamid und einem Steroid.

## **1.2 Remyelinisierung**

Die unmittelbare Remission der MS-Symptome wird neben einem Rückgang der Entzündung durch die vermehrte Ausbildung von Natriumkanälen an demyelinisierten Axonen und dadurch verbesserte Leitfähigkeit erklärt. Zu den mittel- und langfristigen Reparaturmechanismen zählt die Bildung neuer Markscheiden um die entmarkten Axone, die sogenannte Remyelinisierung. Neu gebildete Oligodendrozyten beginnen unmittelbar nach der Entmarkung mit der Produktion von neuem Myelin (Stadelmann und Brück 2008). Dieses ist jedoch dünner als das ursprüngliche Myelin und führt nicht zu einer vollständigen Erholung der Leitfähigkeit (Wiethölter 2006). Remyelinisierte Axone lassen sich gut mittels Elektronenmikroskopie, zum Teil auch in speziellen Färbungen der Lichtmikroskopie, anhand der Myelinscheidendicke von unbeschädigten, regelrecht myelinisierten Axonen unterscheiden (Lindner et al. 2008; Stadelmann und Brück 2008). Remyelinisierung kann zu einer vollständigen Reparatur einer Läsion führen, meist

ist der Prozess aber unvollständig und bleibt auf den Randsaum der Läsion beschränkt (Wiethölter 2006). Findet keine oder eine unzureichende Remyelinisierung statt, proliferieren Astrozyten im Entmarkungsareal, um den Defekt narbig zu verschließen. Man geht davon aus, dass sich eine frühe Remyelinisierung günstig auf das Überleben von Axonen auswirkt.

Oligodendrozyten sind in der Lage, demyelinisierte Axone mit neuen Markscheiden zu umgeben. Entmarkungsherde mit einer großen Dichte an Oligodendrozyten weisen eine hohe Remyelinisierungstendenz auf (Brück et al. 2003). Remyelinisierende Oligodendrozyten stammen von pluripotenten Stammzellen ab, die sich ausreichend in frühen MS-Läsionen finden, in späten jedoch nur noch teilweise vorhanden sind (Lassmann 1983; Lucchinetti et al. 1999; Kuhlmann et al. 2008). Doch nicht jede Zelle ist in der Lage, ein reifer Oligodendrozyt zu werden oder als Oligodendrozyt tatsächlich die Produktion von Myelinscheiden zu übernehmen. Für eine erfolgreiche Remyelinisierung sind außer potenten Oligodendrozyten auch noch weitere Faktoren, wie z.B. das Ausmaß der glialen Narbenbildung, das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren, z.B. des *Platelet derived growth factor* (PDGF) (Zhao et al. 2005; Kumar et al. 2007), und der Zustand der Axone wichtig. Das exakte Funktionieren jedes einzelnen Mechanismus ist essenziell für eine erfolgreiche Myelinisierung (Fernandez et al. 2000).

Aktuelle Studien zeigen, dass aktivierte T-Zellen und andere Entzündungszellen, die bei der MS in Aktion treten, in den Läsionen neuroprotektive Faktoren, wie z.B. BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) oder NT-3 (Neurotrophin-3) produzieren, die das Überleben von Neuronen und Axonen sowie die Proliferation von Oligodendrozyten fördern (Zhang et al. 2006).

Um das Verständnis bezüglich der Faktoren, die die Remyelinisierung positiv oder negativ beeinflussen, zu verbessern, bedarf es einer besseren Kenntnis der Regulation von Proliferation und Differenzierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen (OPC, *oligodendrocyte precursor cells*).

Oligodendrozyten entstehen aus Oligodendrozytenvorläuferzellen, die sich an verschiedenen Stellen des neuronalen Gewebes befinden (Cai et al. 2005; Rowitch 2004).

Die Myelinisierungsfähigkeit der Oligodendrozyten wird durch verschiedene Faktoren bestimmt, z. B. durch die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, hierbei insbesondere durch das Glykoprotein Laminin mit seinen Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Es konnte gezeigt werden, dass Oligodendrozyten, denen die  $\alpha$ -Untereinheit fehlt, eine Dysmyelinisierung des ZNS bedingen (Burne et al. 1996; Buttery et al. 1999; Chun et al. 2003).

Über die molekularen Vorgänge der Bildung von Myelinscheiden durch ausdifferenzierte Oligodendrozyten ist sowohl beim normalen Myelinisierungsprozess als auch bei der Remyelinisierung relativ wenig bekannt (Prineas et al. 1993). Es stellte sich heraus, dass der Prozess der Myelinisierung anders reguliert ist als der Prozess der Oligodendrozytendifferenzierung (Camara und French-Constant 2007). So inhibiert z.B. der Wachstumsfaktor PDGF die Myelinbildung, ist aber für die Oligodendrozytenproliferation überaus bedeutsam (Butt et al. 1997).

Die Myelindicke wird über den Wachstumsfaktor Neuregulin-1 (NRG-1) reguliert. NRG 1 wird von den Axonen exprimiert und interagiert mit dem Tyrosinkinase-Rezeptor ErbB. NRG-1-downregulierte bzw. -Knockout-Mäuse zeigen eine Hypomyelinisierung, transgene hingegen eine Überexpression des Proteins und somit dickere Myelinscheiden (Michailov et al. 2004). Eine verminderte Expression des NRG 1 findet sich auch in aktiven MS-Läsionen (Viehöver et al. 2001).

Im entzündlichen Tiermodell der MS, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), konnten in der jüngeren Vergangenheit zwei die Myelinisierung hemmende Proteine ausgemacht werden. Erstens das Glucosamin Hyaluron, das in MS-Herden akkumuliert und die Ausreifung von OPC und die Remyelinisierung verhindert (Back et al. 2005), und zweitens LINGO-1, ein ZNS-spezifisches Transmembranprotein. LINGO-1 bedingt eine Inhibierung axonaler Regeneration und greift auch negativ in die Regulation der Oligodendrozytendifferenzierung ein. LINGO-1-Knockouts zeigten eine frühzeitigere Myelinisierung des ZNS (Mi et al. 2005).

Ein weiterer Angriffspunkt der remyelinisierenden Therapie sind die Integrine, besonders  $\beta$ 1-Integrin und Vitronectin. Für Vitronectin konnte eine Verbindung zu aktiven entzündlichen MS-Herden gefunden werden. Vitronectin schützt Zellen vor einer Komplement-vermittelten Phagozytose, die an der Demyelinisierung beteiligt ist (Sobel et al. 1995).



Paradoxerweise wird zur Remyelinisierung offensichtlich auch ein bestimmtes Signal der vorherrschenden Entzündungszellen benötigt. Ausgeprägte Remyelinisierung zeigte sich vor allem in Geweben aktiver entzündlicher Läsionen (Raine und Wu 1993). Im Tiermodell konnte man nachweisen, dass Tiere, denen proinflammatorische Stoffe fehlen, eine verminderte Remyelinisierungstendenz aufweisen (Arnett et al. 2001; Kotter et al. 2001; Mason et al. 2001; Foote und Blakemore 2005). Dies könnte erklären, warum chronische MS-Läsionen mit nur geringgradiger Entzündung eine schlechte Remyelinisierungseffizienz zeigen.

### **1.3 Cuprizon-induzierte Entmarkung - ein Tiermodell der Multiplen Sklerose**

Es existieren verschiedene Tiermodelle der MS, die verschiedene Aspekte der humanen Erkrankung modellieren. In den Versuchen dieser Arbeit wurde das Cuprizon-Modell verwendet. Es handelt sich um ein neurotoxisches Modell, das für die Untersuchung von De- und Remyelinisierungsvorgängen verwendet wird (Veto et al. 2010). Cuprizon (Bis-cyclohexanon-oxaldihydrazon) ist ein Kupferchelator, der bei den Versuchstieren den Zelltod der Oligodendrozyten und eine darauffolgende Demyelinisierung vor allem im Bereich des Corpus callosum und des oberen Kleinhirnstiels bewirkt (Hiremath et al. 1998; Morell et al. 1998). Die Folgen der Kupfer-Defizienz sind nur an Oligodendrozyten zu finden, andere Zellen des ZNS sind nicht betroffen (Blakemore 1973a; Fujita et al. 1990). Im Gegensatz zum entzündlichen Modell der MS, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), bleibt bei der Cuprizon-induzierten Entmarkung die Blut-Hirn-Schranke intakt, ebenso findet sich kein wesentlicher Influx von T-Zellen, so dass sowohl die Rolle der Mikroglia als auch die Remyelinisierung unabhängig von adaptiven immunologischen Prozessen untersucht werden können (Bornstein und Raine 1970). Nach Umstellung des Cuprizon-Futters auf Normalfutter kann innerhalb weniger Wochen eine nahezu vollständige Remyelinisierung beobachtet werden (Matsushima und Morell 2001).

Der Mechanismus der Cuprizon-induzierten Demyelinisierung ist nicht bis ins Detail verstanden, wird aber zum einen zurückgeführt auf eine Inhibition und Strukturänderung der Mitochondrien in Oligodendrozyten (Suzuki und Kikkawa 1969;

Suzuki 1969). So konnte in der Leber gezeigt werden, dass sich durch die Kupfer-Defizienz Megamitochondrien bilden. In der Wand der Mitochondrien befindet sich der *apoptosis-inducing factor* (AIF), der beispielsweise durch steigende Calciumspiegel, oxidative Prozesse oder eine generell geschädigte Mitochondrienstruktur wie z.B. eine Strukturänderung durch die genannte Bildung von Megamitochondrien freigesetzt wird. Demnach ist durch Cuprizin eine direkte oder indirekt mediierte Mitochondrienschädigung denkbar (Hesse et al. 2010). Analog könnte dieses auch für das Gehirn gelten, denn auch hier fand sich eine reduzierte Aktivität der kupferabhängigen Cytochrom C-Oxidase und anderer mitochondrialer Enzyme, wie der Monoaminoxidase (Venturini 1973). Diese Störung im Energiemetabolismus der Oligodendrozyten scheint ursächlich zu sein für die Demyelinisierung bzw. für die Apoptose myelinisierender Oligodendrozyten und den nachfolgenden Myelinzerfall (Morell et al. 1998). Warum ausgerechnet Oligodendrozyten so suszeptibel für ein Kupferdefizit sind, konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden (Matsushima und Morell 2001).

Zum anderen konnte in frühen, aber nicht mehr späteren, Stadien der Cuprizin-Diät vermehrt exprimierte aktivierte Caspase 3 der apoptotischen Oligodendrozyten als Ausdruck eines programmierten Zelltodmechanismus nachgewiesen werden (Hesse et al. 2010). Dies zeigt, dass der Oligodendrozytentod im Falle einer Cuprizin-vermittelten Toxizität zunächst über die Caspase 3 abhängig und dann unabhängig von dieser Protease abläuft. Die genauen Mechanismen oder auch die Frage, warum Cuprizin letztendlich die Apoptose über Caspase 3 induziert, sind ungeklärt.

Diverse Autoren, unter anderem Skripuletz et al. (2008), konnten zeigen, dass bei Mäusen des Stammes C57BL/6, die 6 Wochen lang eine 0,2%ige Cuprizin-Diät erhielten, eine komplette Demyelinisierung des Corpus callosum vorlag. Nach weiteren 6 Wochen ohne den Kupferchelator im Futter zeigten die Mäuse eine komplette Remyelinisierung der Balkenregion. Auch bei Mäusen, die für einen Zeitraum von 12 Wochen eine 0,2%ige Cuprizin-Diät erhielten, zeigte sich nach Absetzen des Kupferchelators eine Remyelinisierung, die jedoch zeitverzögert auftrat (Lindner 2007). Die Tatsache der spontanen Remyelinisierung macht die Cuprizin-induzierte Entmarkung zu einem exzellenten Modell, um Vorgänge der De- und Remyelinisierung zu untersuchen (Torkildsen et al. 2008).

In einer von Matsushima und Morell im Jahr 2001 durchgeführten ausführlichen Charakterisierung des Cuprizon-Modells konnte gezeigt werden, dass die Remyelinisierung einem festgelegten Programm folgt. So sah man bei 8 Wochen alten C57BL/6 Mäusen, die mit 0,2% Cuprizon gefüttert wurden, nach 5 Wochen Diät eine komplette Depletion der Oligodendrozyten, nach 6 Wochen allerdings trotz anhaltender Cuprizon-Diät bereits eine deutliche Remyelinisierung und neue Oligodendrozyten (Blakemore 1973b; Mason et al. 2000). Je länger der Fütterungszeitraum war, umso länger dauerten die Vorgänge der Remyelinisierung, bis zu einem Fütterungszeitraum von 12 Wochen konnten aber immer Remyelinisierungsvorgänge belegt werden. Ging der Fütterungszeitraum über die 12. Woche hinaus, zeigten sich bei den Mäusen systemische Komplikationen, die letal in spätestens der 16. Woche endeten (Matsushima und Morell 2001). Die Remyelinisierung erfolgt vermutlich durch Proliferation und Differenzierung lokaler Oligodendrozytenvorläuferzellen. Die Remyelinisierung und das Vorhandensein von Oligodendrozyten trotz persistierender Zufuhr von Cuprizon wird dadurch begründet, dass in den Prozess involvierte Mikroglia *insulin-like growth-factor-1* (IGF-1) produzieren und dieser neu gebildete Oligodendrozyten vor der Apoptose schützt (Matsushima und Morell 2001).

Parallel zur Demyelinisierung konnte ein vermehrtes Auftreten von Mikro- und Astroglia an den Läsionsorten gefunden werden. Die zunächst angenommene Hypothese, dass Cuprizon eine Mikroglia-Mitose induziert, hat sich nicht bestätigt (Blakemore 1972 und 1973a). Es bleibt die Möglichkeit der Rekrutierung aus anderen Hirn-Regionen und/oder die lokale Proliferation schon vorhandener Gliazellen. Mikro- und Astroglia greifen unterstützend in die Proliferation und Differenzierung der Oligodendrozytenvorläuferzellen ein (Matsushima und Morell 2001).

## **1.4 Dopamin und Dopaminrezeptoren**

Dopamin, ein biogenes Amin, entsteht durch Decarboxylierung der Aminosäure L-DOPA und fungiert u.a. als Transmittersubstanz des Nervensystems. Es wirkt mit bei einer Vielzahl neurologischer Funktionen, wie beispielsweise kognitiven Leistungen,

Bewegungsaktivität und -steuerung, Essensaufnahme oder endokriner Regulation (Jaber et al. 1996).

Molekularbiologisch können fünf Subtypen von Dopamin-Rezeptoren unterschieden werden, die alle zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören. Pharmakologisch-funktionell existiert eine Einteilung in zwei Untergruppen: D1-Rezeptoren, die nachfolgend G-Protein-vermittelt die Adenylatzyklase aktivieren und somit den cAMP-Spiegel erhöhen, und D2-Rezeptoren, die ebenfalls G-Protein-vermittelt den cAMP-Spiegel senken.

Die molekularbiologisch gefundenen Subtypen lassen sich funktionell eingliedern. So zählen die molekularbiologischen Rezeptortypen D1 und D5 zum pharmakologischen Subtyp D1 (D1-like), die molekularbiologischen Rezeptortypen D2, D3 und D4 zum pharmakologischen Subtyp D2 (D2-like) (Missale et al. 1998).

Die Lokalisation der Rezeptoren gestaltet sich wie folgt (Landwehrmeyer et al. 1993):

D1 – Striatum, Globus pallidus, Substantia nigra

D2 – Striatum, Nucleus accumbens, Globus pallidus externus, Area postrema,  
Hypophysenvorderlappen

D3 – Cerebellum, Ncl. accumbens, Striatum

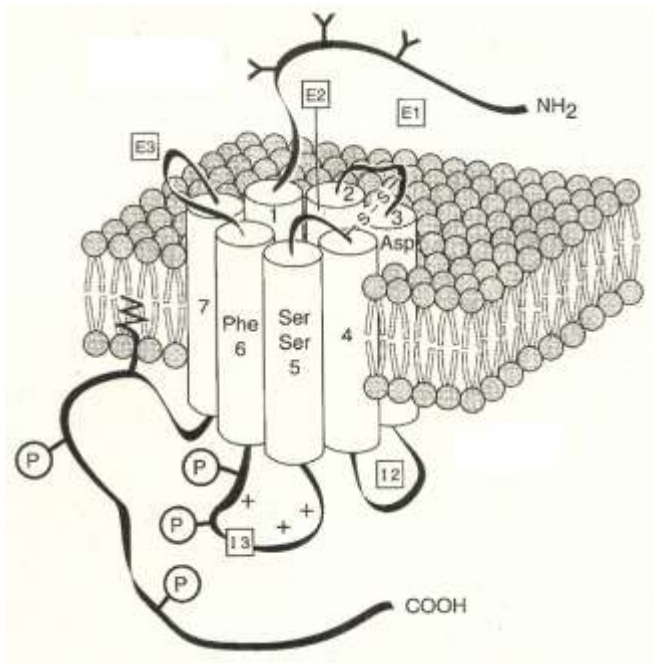
D4 – limbisches System

D5 – Hippokampus, Hypothalamus.

D1-like Rezeptoren finden sich prä- und postsynaptisch, meist auf GABAergen Neuronen, die Substanz P coexprimieren. D2-Rezeptoren findet man auf GABAergen Neuronen, die Enkephalin und Neurotensin exprimieren, und D3-Rezeptoren sind auf Substanz P- und Neurotensin-exprimierenden GABAergen Neuronen anzutreffen (Jaber et al. 1996).

### 1.4.1 Struktur der Dopaminrezeptoren

Alle bekannten Subtypen der Dopaminrezeptoren gehören zu den G-Proteingekoppelten Rezeptoren (GPCR), die sich aufgrund ihrer Struktur der Familie der heptahelikalen Transmembranproteine zuordnen lassen (Sokoloff et al. 1990).



**Abb. 3**

Struktur eines Dopamin-Rezeptors (entnommen aus Missale et al. 1998, S. 192)

In die Lipiddoppelschicht sind Transmembranproteine eingelagert, die mit einem Gerüst aus Aminosäuren die gesamte Membran sieben Mal durchspannen und als Rezeptoren für Signalstoffe agieren. Die meisten von ihnen sind glykosyliert und bilden die Glykokalix, die charakteristisch für jede Zelle ist. Der N-Terminus befindet sich extra-, der C-Terminus intrazellulär.

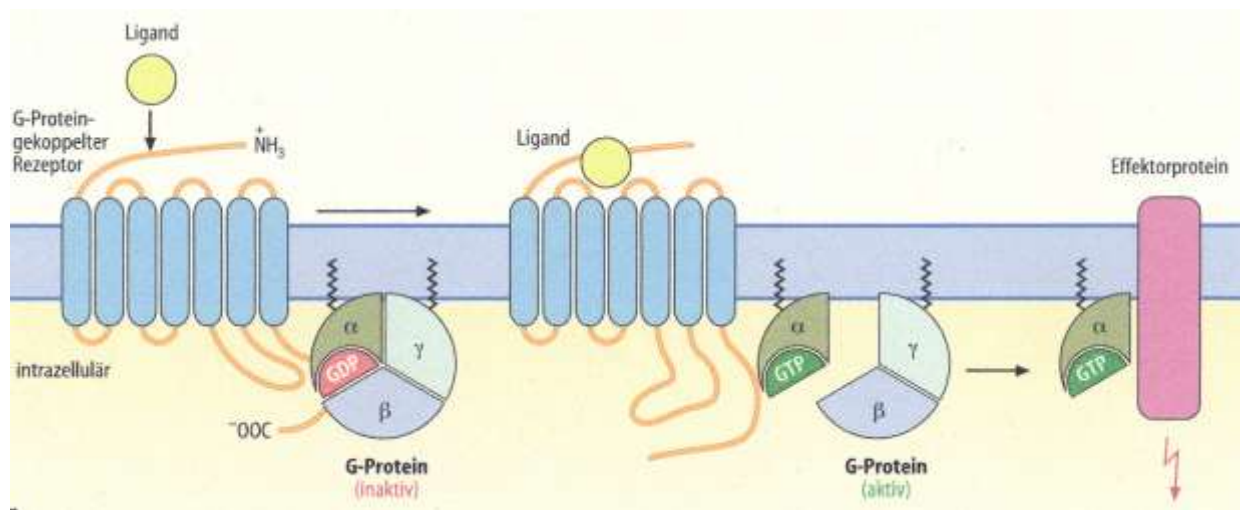
Rezeptoranalysen zeigten eine Übereinstimmung der Transmembrandomänen bei den D1- und D2-Rezeptoren zu 80%, den D2- und D3- Rezeptoren zu 75% und den D3- und D4-Rezeptoren zu 53%.

Bei allen Subtypen findet sich am NH<sub>2</sub>-terminalen Ende die gleiche Anzahl von Aminosäuren, jedoch eine verschiedene Anzahl von möglichen Glykosylierungsstellen. So gibt es an den D1-like Rezeptoren derer fünf, an den D2-Rezeptoren vier, an D3 drei und an D4 noch eine mögliche Glykosylierungsstelle.

Das intrazelluläre C-terminale Ende der Proteine variiert innerhalb der Rezeptorsubtypen in ihrer Länge, die Kette in D1-like Rezeptoren ist um ein Siebenfaches länger als in den D2-like Rezeptoren. In der C-terminalen-Kette befindet sich ein Cysteinrest, der bei D1-like Rezeptoren am Beginn der Kette lokalisiert ist, bei D2-like Rezeptoren jedoch am Ende.

Wie alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren enthalten die Dopaminrezeptoren extrazelluläre Schleifen, die mittels Disulfidbrücken verbunden sind und vornehmlich die Stabilität des Rezeptors gewährleisten sollen.

In einer intrazellulären Schleife, die an der Signaltransduktion beteiligt ist, finden sich zusätzliche Cysteinreste. In D1-like Rezeptoren ist diese Schleife klein, in D2-like Rezeptoren groß. Diese Formation entspricht den nachgeschalteten G-Proteinen: Große Schleife - inhibitorisches G-Protein ( $G_i$ ), kleine Schleife - exzitatorisches G-Protein ( $G_a$ ) (Missale et al. 1998).



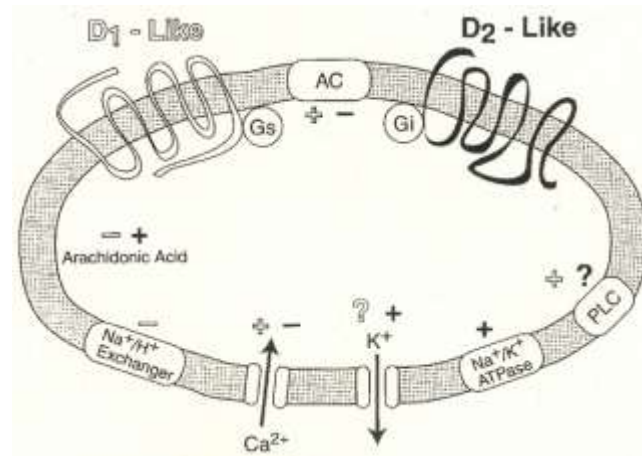
**Abb. 4**

Membranständige Rezeptoren. Aktivierungsmechanismus von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit intrinsischer Kinaseaktivität (entommen aus Löffler et al. 2007, S. 768).

### Signaltransduktion

Der durch Ligandenbindung aktivierte Rezeptor führt an dem aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit bestehenden G-Protein zum Austausch von GDP gegen GTP an der  $\alpha$ -Untereinheit. Die Untereinheiten dissoziieren. Die GTP-beladene  $\alpha$ -Untereinheit kann entweder die membranständige Adenylatcyclase aktivieren bzw. inhibieren oder sie

aktiviert die Phospholipase C. Als 2<sup>nd</sup> messenger entstehen dabei entweder cAMP oder Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG).



**Abb. 5**

Signaltransduktion an Dopaminrezeptoren. AC=Adenylatcyclase, PLC=Phospholipase C (entnommen aus Missale et al. 1998, S. 198).

An den verschiedenen Dopaminrezeptoren werden unterschiedliche Reaktionen hervorgerufen. So ist ein häufiger Signaltransduktionsweg der D1-like Rezeptoren, die an exzitatorische G-Proteine gekoppelt sind und eine hohe Aktivität der Adenylatcyclase bedeuten, die cAMP-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), die L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle phosphoryliert und einen nach intrazellulär gerichteten Ca<sup>2+</sup>-Strom bewirkt. Im Weiteren wird durch die PKA der Glykogen- und Lipidkatabolismus moduliert. Seltener zielt die Signaltransduktion auf Aktivierung der Phospholipase C (PLC) ab, die dann das membranständige Phosphatidyl-inositol-triphosphat (PIP) zu Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) spaltet. IP3 öffnet Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, es kommt zum Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Zelle. Die kombinierte Wirkung aus DAG und Ca<sup>2+</sup> aktiviert die Proteinkinase C (PKC). Die PKC steuert u.a. die Zellproliferation.

Ebenso wird Ca<sup>2+</sup>-gesteuert Calmodulin (CaM) bereitgestellt, welches wiederum CaM-abhängige Kinasen aktiviert, die an einer Vielzahl zellulärer Funktionen beteiligt sind (Heinrich et al. 2007). Zudem löst die Signaltransduktion an D1-like Rezeptoren eine Inhibition des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauschers aus, welcher verantwortlich für den pH-Wert in der Zelle sowie das Zellvolumen ist.

D2-like Rezeptoren sind im Unterschied dazu an inhibitorische G-Proteine, die im Verlauf die Adenylatcyclase inhibieren und so einen erniedrigten cAMP-Spiegel

bedingen, gekoppelt. Demnach kommt es auch zu einer verminderten Aktivität der PKA und somit zu einem verminderten Glykogen- und Lipid-Metabolismus. Des Weiteren bewirken die D2-like Rezeptoren die Öffnung von nach extrazellulär gerichteten  $K^+$ -Kanälen, die eine Hyperpolarisation der Zelle nach sich ziehen und dieser durch G-Protein-vermittelte Schließung von  $Ca^{2+}$ -Kanälen entgegenwirken. Bei den D2-like Rezeptoren besteht keine Signalkaskade mit PIP, es kommt aber zu einer Aktivierung der  $Na^+/K^+$ -Pumpe und zu einer Erhöhung der Arachidonsäure-Ausschüttung (Missale et al. 1998). Arachidonsäure ist als Vorstufe der entzündungs- und schmerzverstärkenden Eicosanoide anzusehen.

In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass am Ende einer Dopaminrezeptor-Aktivierung oft die Expression von Fos, einem Produkt des Gens *c-fos*, steht (Robertson et al. 1992; Robertson und Jian 1995). Fos kann als Marker der neuronalen Aktivität betrachtet werden. Fos bewirkt über Dimerisierung eine vermehrte Expression von *activator protein-1* (AP-1). AP-1 aktiviert die Transkription einer Vielzahl von Genen, die gegen den Zellschaden/ -tod ankämpfen (Cho et al. 2007).

#### 1.4.2 Dopaminrezeptor-Expression auf Oligodendrozyten

Die Myelinscheidenbildung erfolgt durch reife Oligodendrozyten, nachdem die OPCs zuerst proliferiert und sich dann zu reifen Oligodendrozyten ausdifferenziert haben. Bongarzone et al. konnten 1998 zeigen, dass immature Oligodendrozyten v.a. im Bereich des Corpus callosum D3-Rezeptoren exprimieren. Die höchste Konzentration von D3-Rezeptoren auf Oligodendrozyten sah man unmittelbar vor der Phase der Myelinscheidenbildung. Je reifer die Zellen wurden, umso weniger D3 wurde exprimiert.

Weiter konnten die Autoren zeigen, dass eine Behandlung von primären Oligodendroglia-Kulturen mit Quinpirol, einem D2-/D3-Agonist, einen Anstieg der Oligodendrozytenvorläuferzellen um etwa 50% bedingt sowie eine Dedifferenzierung und Minderung der Anzahl ausgereifter Oligodendrozyten induziert (Bongarzone et al. 1998). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass Dopamin oder ein anderes über den D3-Rezeptor wirkendes Molekül die Anzahl von



Oligodendrozytenvorläuferzellen und womöglich die Myelinisierung neuronaler Strukturen beeinflusst.

Rosin et al. (2005) entdeckten sowohl D2- als auch D3-mRNA in Oligodendrozyten. Mengenmäßig dominierte in ihren Untersuchungen das Vorliegen der D2-mRNA. Sie untersuchten weiterhin die Rolle von Dopaminrezeptor-Agonisten bei der Protektion neuronaler Zellen, die oxidativem Stress mit nachfolgendem Zelltod ausgesetzt waren (Rosin et al. 2005). Dass Oligodendrozyten auf oxidativen Stress, der entweder durch Glutamat-Toxizität oder durch Mangel an Sauerstoff und Glukose bedingt ist, mit dem Zelltod reagieren, konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden (Murphy et al. 1990; Oka et al. 1993; Ratan et al. 1994; Rosin et al. 2004). Schon Sawada et al. konnten in den 90er Jahren eine Schutzfunktion von D2-Rezeptor-Stimulation in Oligodendrozyten bei Glutamat-induzierter oxidativer Stresstoxizität ausmachen (Sawada et al. 1998 und 1996). Die Neuroprotektion der Dopaminrezeptor-Agonisten verläuft somit entweder rezeptorvermittelt, wie z.B. bei Quinpirol, oder zumindest partiell rezeptorunabhängig, wie z.B. bei Bromocriptin, das auch als direktes Antioxidans wirken kann (Noh et al. 1999; Sawada et al. 1998; Sethy et al. 1997; Takashima et al. 1999). Die Studien von Rosin et al. (2005) zeigten eine verminderte Zelltodrate bei Oligodendrozyten unter oxidativem Stress, wenn diese parallel mit einem D2- und/oder D3-Agonisten behandelt wurden. Eine wiederum zeitgleiche Behandlung mit den entsprechenden Antagonisten limitierte die Agonistenwirkung (Costanza et al. 2001; Millan et al. 2000; Pillai et al. 1998). Für Dihydroxid, einen selektiven D1-Rezeptor-Agonisten konnte keine zytoprotektive Wirkung festgestellt werden (Mottola et al. 1992; Rosin et al. 2005). Zellen, die unter hypoxisch ausgelöstem oxidativen Stress standen, exprimierten bereits nach einer Hypoxie von 2 Stunden vermehrt D2- und D3-Rezeptoren, im Sinne einer zellulären Selbstverteidigung, der durch Hypoxie ausgelöste Zelltod fand nach 18 Stunden statt (Rosin et al. 2005).

Die neuroprotektive Wirkung der Agonisten wird durch eine Stimulation der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK) und Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) erklärt sowie durch eine durch die D2-Stimulation ausgelöste Hochregulation der Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*). Der genaue protektive Mechanismus ist jedoch unklar.

D2-Agonisten schützen Zellen ebenfalls vor einem überschießenden Calcium-Einfluss, welches als ein Mediator in der Kaskade der glutamatergen Toxizität mitwirkt (Kihara et al. 2002).

## 1.5 Dopaminagonisten

In verschiedenen Bereichen der Medizin werden Dopaminagonisten therapeutisch verwendet. Wichtigstes Anwendungsgebiet ist die Therapie des idiopathischen Parkinson-Syndroms (IPS). Die meisten heute verwandten Dopaminagonisten sind synthetisch hergestellte Derivate des Ergotamins.

Dopaminagonisten fungieren als Prolaktininhibitoren und werden so bei einer Vielzahl von Erkrankungen erfolgversprechend eingesetzt, wie z.B. bei Prolaktinomen, als Abstillhilfe in der Geburtshilfe (Orrego et al. 2000), in der Behandlung des Restless legs Syndroms (Stiasny et al. 2000; Weimerskirch und Ernst 2001), aber auch zur Therapie autoimmunologisch bedingter Erkrankungen, wie z.B. des systemischen Lupus erythematoses (SLE) (Alvarez-Nemegyei et al. 1998) und der rheumatoiden Arthritis (RA) (McMurray 2001). Grundlegend für die Anwendung sind die Annahme, dass Prolaktin immunmodulierende Eigenschaften besitzt, und die Beobachtung, dass bei den genannten Erkrankungen erhöhte Serumspiegel von Prolaktin gefunden wurden.

Im weit verbreiteten Tiermodell der MS, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), konnten in der Vergangenheit ebenfalls Zusammenhänge zwischen erhöhtem Prolaktinspiegel und Krankheitsverlauf der EAE hergestellt werden. Hier führte die Behandlung mit dem Dopaminagonisten Bromocriptin zu einer deutlichen Verbesserung des Krankheitsverlaufes (Riskind et al. 1991; Dijkstra et al. 1994).

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Dopaminagonist ist Pramipexol. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten in der Vergangenheit für Pramipexol eine deutlich höhere Affinität für den Dopamin-D3-Rezeptor im Vergleich zum D2-Rezeptor feststellen (Mierau et al. 1995; Perachon et al. 1999; Piercey et al. 1996).

## 1.6 Ziel der Arbeit

Die Cuprizon-Diät induziert bei Mäusen nach mehrwöchiger Verfütterung eine Entmarkung im Bereich des Corpus callosum sowie des oberen Kleinhirnstiels. Bereits nach einwöchiger Gabe sind zahlreiche apoptotische Oligodendrozyten in den vulnerablen Hirnregionen festzustellen. Dabei spielen vermutlich oxidative Schädigungsmechanismen eine Rolle.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verfütterung von Cuprizon an Mäusepopulationen durchgeführt, bei denen der Dopamin-D2- oder -D3-Rezeptor ausgeknockt war. Zusätzlich wurden Wildtyp- (wt) und D3-Knockout-Mäuse mit dem Dopaminagonisten Pramipexol behandelt.

Unsere Hypothese war, dass Dopaminrezeptor-defiziente Mäuse im Vergleich zu wt-Mäusen eine erhöhte Vulnerabilität der Oligodendrozyten gegenüber der Cuprizon-induzierten Toxizität zeigen. Weiterhin sollte untersucht werden, inwieweit die Therapie mit Pramipexol, einem Dopamin-D3-Rezeptor-Agonisten, rezeptorunabhängig oder rezeptorabhängig zu einem Schutz der Oligodendrozyten führt.

Mit Hilfe verschiedener histologischer und immunhistochemischer Methoden wurde in frühen Stadien der Cuprizon-induzierten Toxizität die Dichte der apoptotischen Oligodendrozyten sowie der aktivierten Mikrogliazellen, die Rückschlüsse auf das Ausmaß der Gewebeschädigung zulassen, bestimmt

Ziel der Arbeit war es zum einen, zu untersuchen, ob das Ausmaß des Oligodendrozytenzelltodes durch die Rezeptordefizienz beeinflusst wird, und zum anderen, ob die Behandlung mit dem Dopaminagonisten Pramipexol einen protektiven Effekt auf das Ausmaß der Oligodendrozytenapoptose hat.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### 2.1.1 Tiere

Als Experimentaltiere wurden 20 6-8 Wochen alte, männliche D2- bzw. D3-Rezeptor-Knockout-Mäuse sowie 21, ebenfalls 6-8 Wochen alte, männliche Wildtyp-Mäuse des Stammes C57Bl/6 Mäuse verwendet und von der Firma Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA bzw. von Charles River, Sulzfeld, Deutschland bezogen.

Die Tierhaltung und Durchführung der Experimente erfolgte entsprechend den Richtlinien der tierexperimentellen Abteilung der Universitätsmedizin Göttingen (UMG). Das gesamte tierexperimentelle Versuchsvorhaben war von der Bezirksregierung Braunschweig bewilligt, Genehmigungsnummer G23-04.

Die Mäuse gewöhnten sich nach dem Eintreffen im Tierstall für 5 Tage an die Licht- und Temperaturverhältnisse und erhielten Pressfutter sowie Wasser ad libitum.

#### 2.1.2 Verfütterung von Cuprizone

Cuprizone (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) wurde in einer Konzentration von 0,25% dem Pressfutter beigemischt und an die Versuchstiere verfüttert.

### 2.1.3 Behandlung mit Pramipexol und PBS

Einmal täglich erfolgte die intraperitoneale Injektion von 200µl Pramipexol bzw. PBS in einer Konzentration von 0,5mg/ml, was 0,1 mg pro Maus und einer Dosis von 5mg/kg KG entspricht.

### 2.1.4 Allgemein verwendete Puffersysteme, Lösungen und andere Substanzen

Bezeichnung	Hersteller	Bearbeitung
Citrat-Puffer, 10mM	Merck (1)	2,1014g Citronensäure-Monohydrat in 1l Aqua bidest., pH 6
Cuprizon	Sigma Aldrich (5)	0,25% im Pressfutter
Ethanol absolut	Merck (1)	100%; 50%, 70%, 90%, 95% in Aqua bidest.
Essigsäure 100%	Merck (1)	10% in Aqua bidest.
FCS (Fetales Kälberserum)	Biochrom (2)	-
Iso-Xylol	Merck (1)	Ethanol und Xylol zu gleichen Teilen
Mayers Hämalaunlösung	Merck (1)	-
Paraffin, Paraplast plus	Tyco (3)	-
PBS DULBECO Instamed 9,55g/l w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Biochrom (2)	30 min. bei 120°C autoklaviert
Paraformaldehyd (PFA)	Merck (1)	4% in Aqua bidest.
Pramipexol	Boehringer Ingelheim (4)	5mg/kg KG in PBS
Wasserstoffperoxid 30% (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck (1)	-
HCl-Alkohol		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1750ml Iso-Alkohol</li> <li>• 750ml H<sub>2</sub>O</li> <li>• 25ml HCl (20%)</li> </ul>

Xylol	Merck (1)	-
-------	-----------	---

**Tab. 1** Verwendete Puffersysteme, Lösungen und andere Substanzen

Hersteller:

- 1) Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- 2) Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- 3) Tyco Healthcare GmbH, Neustadt a.d. Donau, Deutschland
- 4) Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim, Deutschland
- 5) Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

### 2.1.5 Histologische Färbungen

Histologische Färbung	Bearbeitung
<b><u>Hämatoxylin-Eosin-Färbung</u></b>	
Mayers Hämalaunlösung (Merck ) (1)	
Eosin Stammlösung 1%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2g Eosin-G Certistain® (Merck) (1)</li> <li>• 40ml Aqua bidest.</li> <li>• 160ml Ethanol 95%</li> </ul>
1 Tropfen Essigsäure 100%	

<b><u>LFB/PAS</u></b>	
<b>LFB</b>	
Luxol fast blue (LFB) Lösung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1g Luxol fast blue (BDH Laboratory supplies) (2)</li> <li>• 1000ml Ethanol 95%</li> <li>• 5ml Essigsäure 10%</li> </ul>
Lithiumcarbonat (Merck) (1)	0,05% in Aqua bidest.
Aqua bidest.	

<b>PAS</b>	
Periodsäure (Merck) <sup>(1)</sup>	1% in Aqua bidest.
Schiff'sches Reagenz (Merck) <sup>(1)</sup>	
Mayers Hämalaunlösung (Merck) <sup>(1)</sup>	

**Tab. 2 Histologische Routinefärbungen**

Hersteller:

- 1) Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- 2) BDH Laboratory Supplies, VWR, International Ltd., Poole, UK

### 2.1.6 Antikörper und spezielle Chemikalien zur Immunhistochemie

#### Antikörper

<b>Antigen</b>	<b>Herkunftsspezies</b>	<b>Klon</b>	<b>Kat.-Nr.</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung in 10% FCS/PBS</b>
Mac-3	Ratte	M3/84	553322	BD Biosciences <sup>(1)</sup>	1:200
aktivierte Caspase 3	Kaninchen	-	-	IDUN Pharmaceuticals <sup>(2)</sup>	1:5000
Nogo A	Maus	11C7	-	M. Schwab <sup>(3)</sup>	1:20000

**Tab. 3 Primärantikörper**

Hersteller:

- 1) Biosciences Clontech, Heidelberg, Deutschland
- 2) IDUN Pharmaceuticals Inc., San Diego, California, USA
- 3) M. Schwab, ETH Zürich, Schweiz

Sekundärsysteme

Bezeichnung	Konjugiert mit	Kat.-Nr.	Hersteller	Verdünnung
Schaf-anti-Maus-IgG	Biotin	RPN 1001	Amersham (2)	1:200 in 10% FCS/PBS
Ziege-anti-Ratte-IgG	Biotin	RPN 1005	Amersham (2)	1:200 in 10% FCS/PBS
Esel-anti-Kaninchen-Ig	Biotin	RPN 1004	Amersham (2)	1:200 in 10% FCS/PBS
DAB	-	D-5637	Sigma-Aldrich (1)	25mg/50ml PBS
Extr Avidin®	Peroxidase	E 2886	Sigma-Aldrich (1)	1:1000 in 10% FCS/PBS

**Tab. 4 Sekundärsysteme**

Hersteller:

- 1) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- 2) Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland

**2.2 Methoden****2.2.1 Versuchsdurchführung**

Die verschiedenen Mäusestämme erhielten für 7 Tage 0,25% Cuprizone (Bis-cyclohexanon-oxaldihydrazon), d.h. 2,5g/kg Trockenfutter, ihrem normalen Pressfutter beigemischt und bekamen ggf. die intraperitoneale Injektion von Pramipexol bzw. PBS in der o.g. Dosierung verabreicht.

Bei Versuchsende wurden die Mäuse mit 300µl 14%iger Chloralhydratlösung (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) anästhesiert. Sobald die Tiere keinerlei Schmerzreflexe mehr zeigten, wurde das Gewebe transkardial durch Perfusion mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert und danach Gehirn und Rückenmark entnommen.



Die Präparation der Mäuse (2.2.2) sowie die Herstellung der histologischen und der immunhistochemischen Präparate (2.2.3, 2.2.4), erfolgte durch technische Mitarbeiter der neuropathologischen Abteilung der Universitätsmedizin Göttingen.

## 2.2.2 Präparation der Mäuse

Bei der transkardialen Perfusion wurde den Mäusen zuerst mit PBS das Blut aus dem Körper gespült und anschließend das Gewebe mit 4%iger PFA-Lösung fixiert. Es folgte die Isolierung des Gehirns mittels Präparation aus der knöchernen Hülle, so dass es in Scheiben zu je 3mm Dicke geschnitten werden konnte. Diese Scheiben wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in Paraffin gebettet. Anschließend wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica, Wetzlar, Deutschland) Schnitte von 2-4µm Dicke hergestellt und auf Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) gebracht.

Die Gewebeschnitte wurden 3x3 min. mit Xylol und 1x3 min. mit Isoxylol entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe rehydriert (jeweils 3 min. in Ethanol 100% → 100% → 90% → 70% → 50% → Aqua bidest.).

Nach Abschluss der jeweiligen Färbemethode wurde das Gewebe zur Konservierung in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert (jeweils 3 min. Aqua bidest. → 50% → 70% → 90% → 100% → 100% Ethanol → Xylol).

## 2.2.3 Histologische Präparate

### 2.2.3.1 Hämatoxylin-Eosin

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.) zählt zu den Routinefärbungen in der Histologie, die durch möglichst kontrastreiche Farbstoffe eine Übersicht über Kern- und Plasmafärbung liefern sollen.

Die H.E.-Färbung besteht aus den Anteilen der Hämatoxylin/Hämalaun-Färbung und der Eosin-Färbung.

Bei dem ersten Anteil wird das Hämatoxylin, dessen wirksamer Farbstoff das Oxidationsprodukt Hämatin ist, zur besseren farblichen Darstellung an ein Alaunsalz gekoppelt. Die Kombination aus Hämatin und Alaunsalz lässt gut färbende, stark positiv geladene Hämatinlacke entstehen. So kann der Farbstoff an die Gewebekomponenten binden. Durch Zugabe von Essigsäure wird der pH-Wert der Lösung bestimmt. Chloralhydrat, Glycerol oder Ethylenglycol dienen als Stabilisator der Lösung, um eine Überoxidation und eine Bakterienbesiedlung zu vermeiden. Die Hämalaun-Färbung ist eine Kernfärbung, die hauptsächlich Zellkerne blau oder violett anfärbt. Ebenfalls in diesem Farbton angefärbt werden saurer Schleim sowie grampositive Bakterien.

Eosin, chemisch Tetrabrom-Fluorescein, ist ein saurer Farbstoff, der in Wasser und Alkohol löslich ist. Die Zugabe von 1 Tropfen Eisessig lässt den pH-Wert zwischen 4-6 einpendeln und verhindert die Alkalisierung der Lösung nach dem Wässern. Bei der Bindung handelt es sich um eine Ionenbindung, bei der der anionische Farbstoff an das kationische Plasmaprotein bindet. Eosin ist eine Plasmafärbung und färbt Zytoplasma, Bindegewebe und Kollagenfasern kräftig rot (Lang 2006).

Die Hämalaunlösung hat einen pH-Wert von 3-4 und färbt bräunlich-rot. Es folgt die Waschung mit Leitungswasser, pH~7, und einem Spritzer 1%iger Lithiumcarbonatlösung, um die gewünschte Alkalisierung und somit Blaufärbung zu erlangen.

Mit Eosin wird im Anschluss im Überschuss gefärbt und der Überschuss durch Wasser oder eine aufsteigende Alkoholreihe differenziert.

#### Durchführung:

Die entparaffinierten und rehydrierten Gewebeschnitte wurden in die Hämalaun-Lösung nach Mayer überführt und dort für 8 Minuten belassen. Danach erfolgte das Eintauchen in HCl-Alkohol zur Differenzierung und im Anschluss die Auslösung der Blaufärbung unter Leitungswasser. Abschließend wurden die Präparate für 5 Minuten in die auf 0,1% verdünnte Eosin-Färbung gehalten und erhielten so ihre Rotfärbung.

### 2.2.3.2 Luxol-Fast-Blue/Perjodsäure-Schiff (LFB/PAS)

Die LFB/PAS-Färbung wird in der Neuropathologie genutzt, um phospholipidhaltiges Myelin mittels Luxol-fast-blue in blau-grünlichem sowie Zellkerne, Nisslsubstanz und entmarkte Bereiche durch Inkubation im Schiff'schen Reagenz in pink-violetter Farbton darzustellen.

LFB ist alkohollöslich und stark affin gegenüber Phospholipiden, deren Anfärbung über Ionenbindung erfolgt. Die Strukturen werden zunächst überfärbt und im Anschluss in Lithiumcarbonat-Lösung wieder so lange ausgewaschen, bis graue und weiße Substanz zu erkennen sind.

Die PAS-Färbung wird in der Histochemie zur Darstellung von bestimmten Kohlenhydraten genutzt, deren Hydroxylgruppen (-OH) durch die Reaktion mit Perjodsäure Ameisensäure abspalten und zu Aldehydgruppen oxidieren, welche wiederum mit dem Schiff'schen Reagenz reagieren und eine rot-violette Färbung hervorrufen. Im Anschluss an die Färbung wird mit Metabisulfit gespült, um den an andere Gewebebausteine falsch angelagerten Farbstoff herauszuspülen. Zur Verstärkung der Farbgebung kommt es meist noch zu einer Gegenfärbung mit Hämalaun.

Das Schiff'sche Reagenz besteht aus mit schwefelhaltiger Säure behandeltem Fuchsin. Die Säure entfärbt das Fuchsin und es entsteht eine farblose fuchsin-schwefelhaltige Säure, Leukofuchsin. Leukofuchsin reagiert mit den Aldehyden, unter Wiederherstellung der Farbe, rot-violett (Lang 2006).

#### Durchführung:

Die Entparaffinierung und Rehydrierung in absteigender Alkohol-Reihe erfolgte bei dieser Färbung zunächst nur bis zur 90%igen Ethanol-Lösung. Die Schnitte verbrachten in der 90%igen Ethanol-Lösung 24h im Wärmeschrank bei 60°C. Anschließend wurde die absteigende Alkohol-Reihe abgeschlossen. Es folgte 1 Minute in einer Lithiumcarbonatlösung 0,05% und anschließend 1 Minute in 70%igem Ethanol zur Differenzierung der Schnitte. Nach Einbringung in Aqua bidest. wurden die Präparate 5 Minuten in Perjodsäure 1% und folgend 5 Minuten in Leitungswasser getaucht. Im Anschluss dreimalige Spülung der Schnitte mit Aqua

bidest. und Gabe in das Schiff'sche Reagenz für 15 Minuten. Im Anschluss erneutes Eintauchen in Leitungswasser für die Dauer von 10 Minuten. Abschließend erfolgte eine 2-minütige Differenzierung in der Hämalaun-Lösung sowie mit HCl-Alkohol und weiteren 10 Minuten Spülung unter Leitungswasser. Abschließend Entwässerung des Gewebes in aufsteigender Alkoholreihe.

#### 2.2.4 Immunhistochemische Färbungen

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbungen basiert auf einer Farbstoffentwicklung am Ort der Antigen-Antikörper-Reaktion. Bei Antreffen des Antikörpers, der aus dem Serum von Versuchstieren gewonnen wird, auf ein spezifisches Epitop des Antigens, kommt es zu einer starken Bindung, die durch eine Farbstoffentwicklung nachgewiesen wird.

Damit der Antikörper nicht zu sehr durch den pH-Wert beeinflusst wird, werden Puffersysteme in die Reaktionslösung gegeben, in unseren Versuchen war dies der PBS-Puffer (*phosphate buffered saline*), eine 0,9%ige NaCl-Lösung in 0,03M Phosphatpuffer.

An die Antikörper werden bestimmte andere Stoffe gebunden, mit denen dann die Sichtbarkeit der Reaktion erzeugt wird. Zu diesen Stoffen zählen Enzyme, Farbstoffe, Fluorochrome, Biotin o.ä..

Die am häufigsten verwendeten Marker sind Enzyme, zumeist die Kombination aus Meerrettichperoxidase (*HRP, horseradish peroxidase*) und dem Chromogen DAB (Diaminobenzidintetrahydrochlorid), was als Farbergebnis einen Brauntön liefert. Das Chromogen wird durch Wasserstoffperoxid und mittels der katalytischen Wirkung von Peroxidase farbig umgesetzt. Alternativ zur HRP wird auch die aus Kälberdarm gewonnene Alkalische Phosphatase (AP) verwendet. Dies v.a. bei blutreichem Gewebe, um die Mitreaktion durch die endogene Peroxidase zu vermindern oder gar zu umgehen. Hier erfolgt die Umsetzung zu Farbe mithilfe verschiedener Chromogene durch Hydrolyse.

Häufig wird dem primären Antikörper noch ein zweiter hinzugesetzt, der Sekundärantikörper, der an den Primärantikörper bindet und die Färbung sensitiver macht.

Abschließend erfolgt die Gegenfärbung in einer zum Chromogen kontrastreichen Farbe zur Darstellung der Kernmorphologie.

#### 2.2.4.1 Antikörper

##### **Mac-3**

Mac-3 ist ein monoklonaler Antikörper, der das Mac-3-Antigen erkennt. Dieses Antigen findet sich auf Makrophagen und ist ein Glykoprotein, das von Makrophagen synthetisiert wird. Somit dient Mac-3 als Marker für das Ausmaß der Makrophagen- bzw. Mikrogliaaktivierung.

##### **Nogo-A**

Nogo-A ist ein Protein, das sich hauptsächlich in oligodendroglialen Zellkörpern findet und das Wachstum von Neuriten inhibiert. Nogo-A wird hier zur Detektion von Oligodendrozyten sowie apoptotischen Oligodendrozyten eingesetzt (Kuhlmann et al. 2007).

##### **Caspase 3**

Mit diesem Antikörper (CM-1) lässt sich aktivierte Caspase 3 nachweisen, deren Gegenwart als weitestgehend spezifisch für apoptotische Zellen angesehen wird.

#### 2.2.4.2 Durchführung

##### **Bindung des primären Antikörpers**

Zunächst erfolgte die Entparaffinierung und Rehydrierung in absteigender Alkohol-Reihe, dann die Einstellung der Gewebeschnitte in kochendem Citratpuffer über 15 min., um maskierte Antigene freizulegen („epitope retrieval“). Als nächster Schritt folgte die Äquilibrierung im PBS-Puffer. Um die endogene Peroxidase zu blockieren,

wurden die Präparate 10 min. lang in einem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Ansatz (45ml PBS und 5ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) behandelt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte für jeden Schnitt die Behandlung mit 120µl einer 10%igen FCS/PBS Lösung über 10 Minuten. Dann wurden 120µl der jeweils gegen ihr spezifisches Antigen gerichteten primären Antikörper in entsprechender Verdünnung zu den Gewebeschnitten gegeben und die Schnitte über Nacht bei 4°C inkubiert.

### **Bindung des sekundären Antikörpers**

Die Bindung des primären Antikörpers wurde durch Zugabe von biotinylierten sekundären Antikörpern sichtbar gemacht: Der primäre Antikörper Mac-3 bekam den sekundären Antikörper Ziege-anti-Ratte-IgG angelegt; Nogo-A erhielt Schaf-anti-Maus-IgG und CM-1 Esel-anti-Kaninchen-IgG

Die Bindung an den sekundären Antikörper erfolgte über 1h bei Raumtemperatur. Im Anschluss Spülung der Präparate mit PBS und Zugabe von Extr Avidin<sup>®</sup>, einem Glykoprotein, welches Biotin hochaffin bindet und sich an die Biotinmoleküle der sekundären Antikörper anlagert. Erneute Spülung mit PBS und Zugabe der DAB-Entwicklungslösung. Extr Avidin<sup>®</sup> ist mit einer Peroxidase gekoppelt, die nach Hinzufügen von 16µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behilflich ist, DAB umzusetzen, so dass ein Farbniederschlag resultiert.

Abschließend wurden die Präparate in Hämalaun-Lösung gefärbt, entwässert und eingedeckelt.

### **2.2.5 Mikroskopie und Morphometrie**

Zur histologischen Auswertung verwendeten wir ein Lichtmikroskop der Firma Olympus (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Germany), Modell BX 51, das mit folgenden Objektiven ausgestattet war:

- Objektiv 2x/0,05 (20-fache Vergrößerung)
- Objektiv 10x/0,25 (100-fache Vergrößerung)
- Objektiv 20x/0,40 (200-fache Vergrößerung)

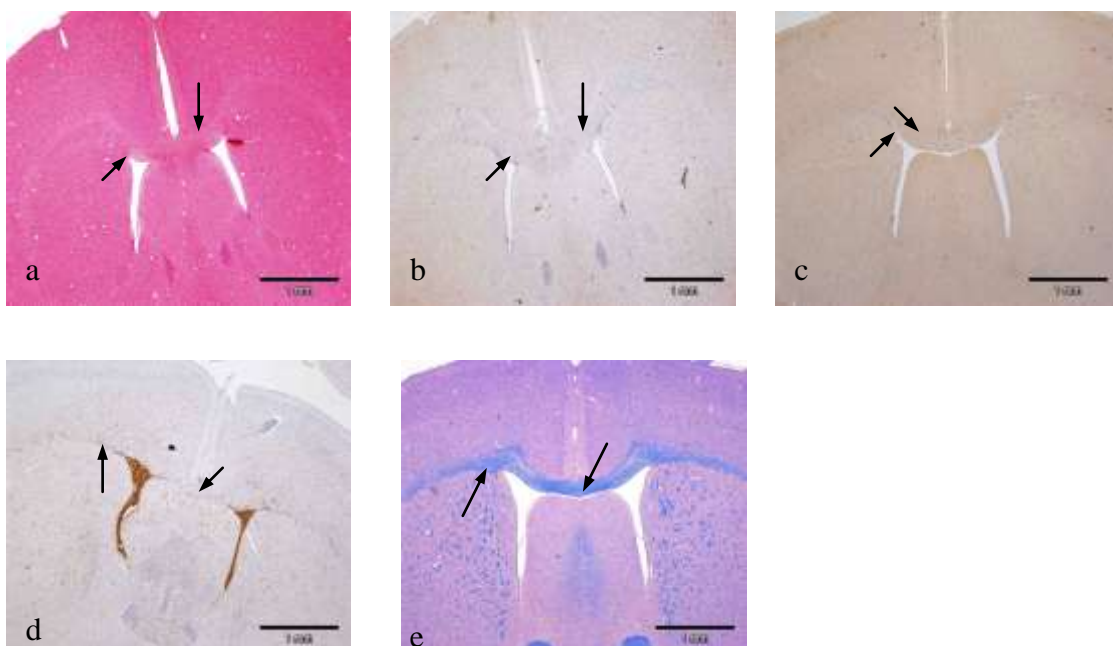
- Objektiv 40x/0,65 (400-fache Vergrößerung)
- Objektiv 100x/1,25 (1000-fache Vergrößerung).

Die benutzten Okulare mit 10-facher Vergrößerung kamen ebenfalls von der Firma Olympus.

Die morphometrische Auswertung der Schnitte erfolgte in den Färbungen H.E., Nogo-A, CM-1 und Mac-3 in 200- und 400-facher Vergrößerung und in der LFB/PAS-Färbung in der 100-fachen Vergrößerung. Ausgezählt wurde der zwischen den Ausläufern der beiden Seitenventrikel gelegene mediane Anteil des Corpus callosum. Aufgrund der Faserstruktur und der fehlenden Nervenzellen ließ es sich sehr gut von den abgrenzenden Strukturen unterscheiden.

Eine Fotodokumentation der histologischen Schnitte erfolgte mittels eines BX52 Hellfeldmikroskops der Firma Olympus sowie der dazugehörigen Bildanalysesoftware cell<sup>^</sup>F.

Die Identifikation der Apoptosen erfolgte anhand ihrer charakteristischen Morphologie: stark eosinophiles Zytoplasma, kondensiertes und fragmentiertes Chromatin (Karyopyknose bis hin zur Karyorrhexis), zeltförmige Gebilde, sogenannte Pannendreieck-Zellen, ohne Kontakt zu Nachbarzellen.



**Abb. 6**

Überblick über die ausgezählte Region mit Markierung des Corpus callosum (Pfeile) in den verwendeten Färbungen. a) H.E., b) CM-1, c) Nogo-A, d) Mac-3, e) LFB/PAS; Originalvergrößerung: 200-fach.

## 2.3 Statistische Analysen

Sämtliche Daten wurden mit dem Programm Microsoft Excel 2000 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) auf einem Personalcomputer erfasst und mit GraphPad PRISM® 5.00 (GraphPad Software, San Diego, USA) statistisch ausgewertet.

Zur Überprüfung der Signifikanz der Unterschiede der durch die Zellzählungen gewonnenen Daten zwischen den Gruppen ermittelten wir zunächst jeweils den Mittelwert sowie die Standardabweichung und überprüften mittels Kolmogorov-Smirnov-Test, ob die Daten einer Gauß'schen Normalverteilung unterliegen. Für den Vergleich zweier experimenteller Gruppen unterzogen wir die normalverteilten Daten dem ungepaarten t-Test ggf. mit Welch-Korrektur, bzw. bei nicht-normalverteilten Daten dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test. Als statistisch signifikant wurden p-Werte von  $p \leq 0,05$  angesehen.

Für den Vergleich mehrerer experimenteller Gruppen, wie es im zweiten Teil unserer Versuchsreihe, der Auswertung der Tiere des D3-Versuchs, der Fall war, unterzogen wir die normalverteilten Daten der Varianzanalyse nach ANOVA (*analysis of variance*) mit anschließender Überprüfung durch den Tukey's Post Test. Nicht-normalverteilte Daten kamen nicht vor. Auch hier galt ein p-Wert von  $p \leq 0,05$  als statistisch signifikant.



### 3 Ergebnisse

Bei den ausgewerteten histologischen und immunhistochemischen Präparaten handelt es sich um Frontalschnitte des Gehirns in Höhe der Balkenregion von Mäusen, bei denen über einen Zeitraum von sieben Tagen Cuprizon verfüttert wurde. Die Verfütterung des Kupferchelators Cuprizon führt nach dieser kurzen Fütterungszeit vor allem im Bereich des Corpus callosum zur Apoptose von Oligodendrozyten und zur Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten (Matsushima und Morell 2001).

Es wurden sowohl Wildtyp (wt)- als auch Dopaminrezeptor-Knockout-Tiere (DRD2 -/- bzw. DRD3 -/-) untersucht. Einem Teil der Tiere mit DRD3-Defizienz wurde außerdem der Dopaminagonist Pramipexol injiziert.

Mittels verschiedener histologischer und immunhistochemischer Färbungen wurde die Anzahl der Oligodendrozytenapoptosen/mm<sup>2</sup> nach Cuprizon-Verfütterung in DRD2 -/- oder DRD3 -/- Mäusen bzw. Wildtyp-Mäusen untersucht.

Es erfolgte einerseits die Standardfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (H.E.), die es erlaubt, die kondensierten und fragmentierten Zellkerne sowie das kondensierte Zytoplasma apoptotischer Zellen sehr sensitiv und spezifisch zu detektieren. Andererseits erlaubt die Nogo-A-Färbung, den Anteil der Oligodendrozyten an den apoptotischen Zellen zu detektieren. Die Immunreaktion mit dem CM-1-Antikörper, die den Nachweis apoptotischer Zellen bekräftigt, markiert die aktivierte Caspase 3 des programmierten Zelltodes. Weiterhin wurden die Präparate noch mit dem Antikörper Mac-3 markiert, der Rückschlüsse auf eine Aktivierung der Mikroglia und somit indirekt auf das Ausmaß des Zelltodes ziehen lässt.

Eine Auswertung der Schnittpräparate mit LFB/PAS schloss sich abschließend an, um etwaige Areale der Entmarkung zu detektieren.

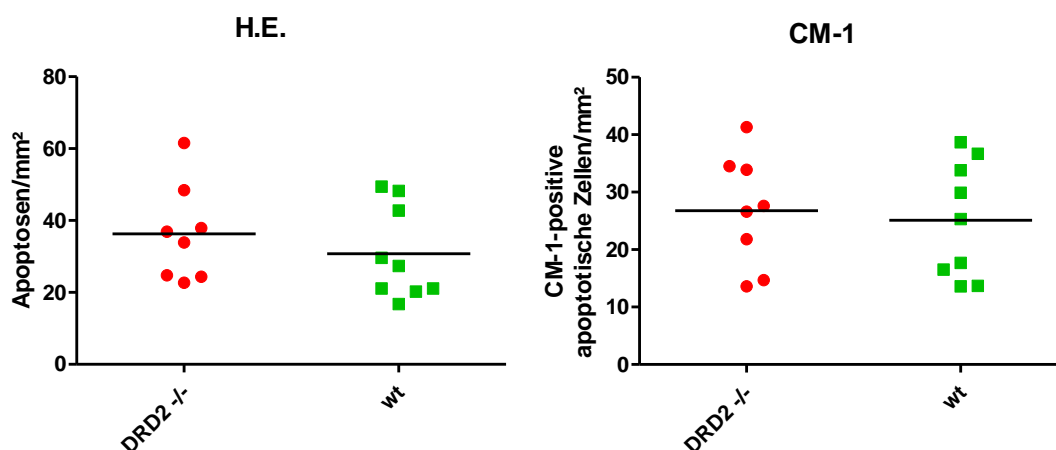
### 3.1 Morphometrische Analyse der DRD2 $-/-$ Mäuse nach 7-tägiger Verfütterung von Cuprizon

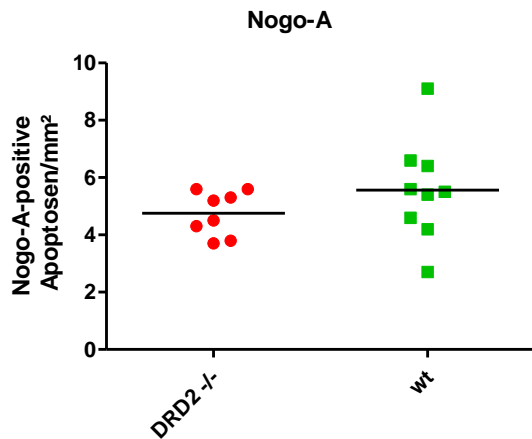
#### 3.1.1 Nachweis der Apoptosen gesamt, von Caspase-3-positiven apoptotischen Zellen und Nogo-A-positiven apoptotischen Oligodendrozyten

In der H.E.- Färbung zeigte sich beim Vergleich der beiden Versuchsgruppen DRD2  $-/-$  vs. wt kein signifikanter Unterschied der Anzahl der Apoptosen/mm<sup>2</sup> (DRD2  $-/-$ : 36,3  $\pm$  13,9 (MW  $\pm$  SD); wt: 30,7  $\pm$  12,8 (MW  $\pm$  SD);  $p = 0,3919$ ; ungepaarter t-Test) (Abb. 3-1).

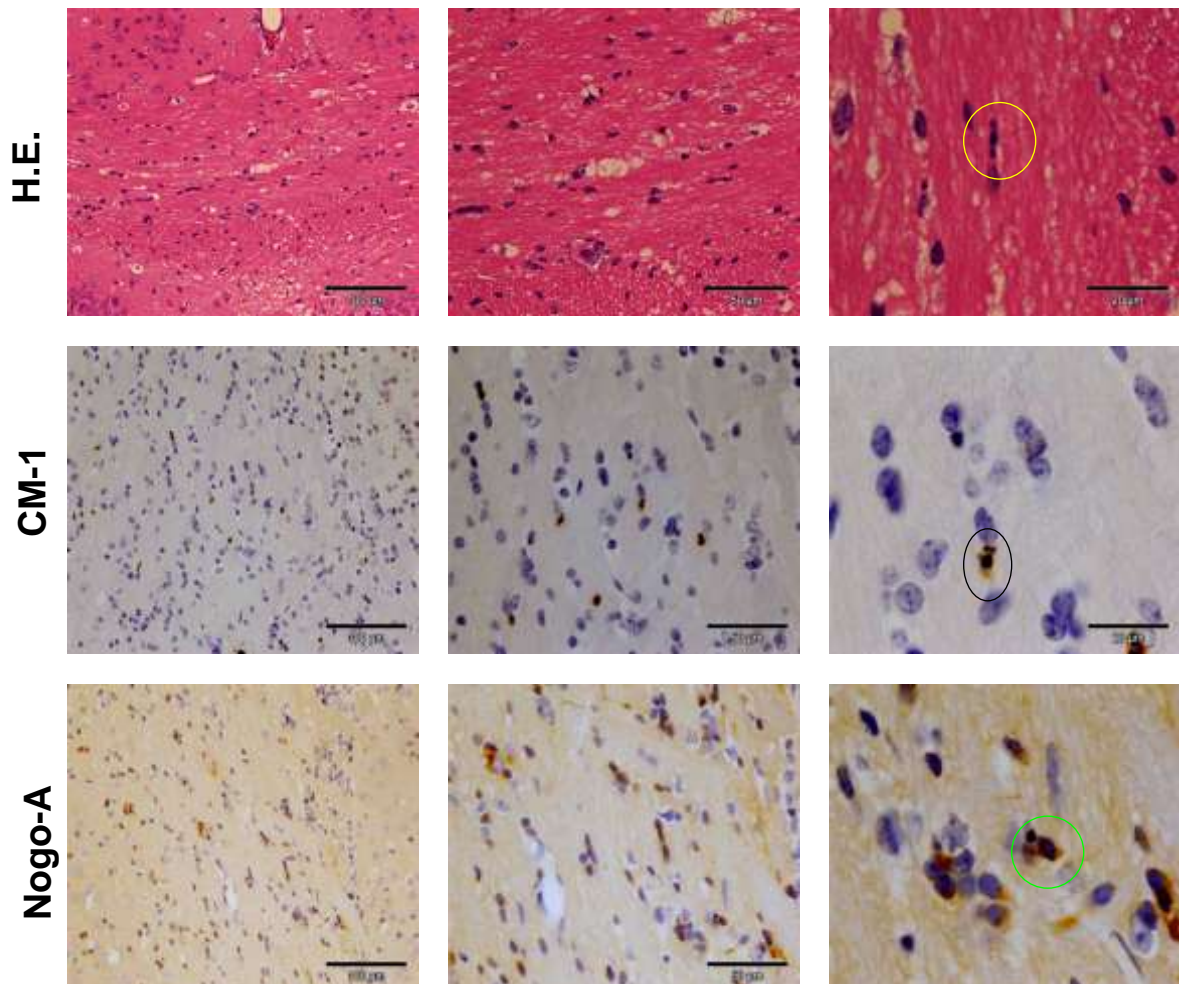
In der Oligodendrozyten-spezifischen Färbemethode mit Nogo-A konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Nogo-A-positiven Apoptosen/mm<sup>2</sup> festgestellt werden (DRD2  $-/-$ : 4,8  $\pm$  0,8 (MW  $\pm$  SD); wt: 5,6  $\pm$  1,8 (MW  $\pm$  SD);  $p = 0,2372$ ; ungepaarter t-Test mit Welch's correction) (Abb. 3-1). Es ist jedoch zu sehen, dass sich nur ein Teil der Gesamtapoptosen mit Antikörpern gegen Nogo-A anfärben lässt.

Weniger Apoptosen im Vergleich zur H.E.-Färbung zeigen sich auch in den CM-1-gefärbten Präparaten. Zwischen den untersuchten experimentellen Gruppen konnte aber auch hier keine Signifikanz festgestellt werden (CM-1-positive apoptotische Zellen/mm<sup>2</sup>; DRD2  $-/-$ : 26,75  $\pm$  9,8 (MW  $\pm$  SD); wt: 25,1  $\pm$  10,0 (MW  $\pm$  SD);  $p = 0,7368$ ; ungepaarter t-Test) (Abb. 3-1).



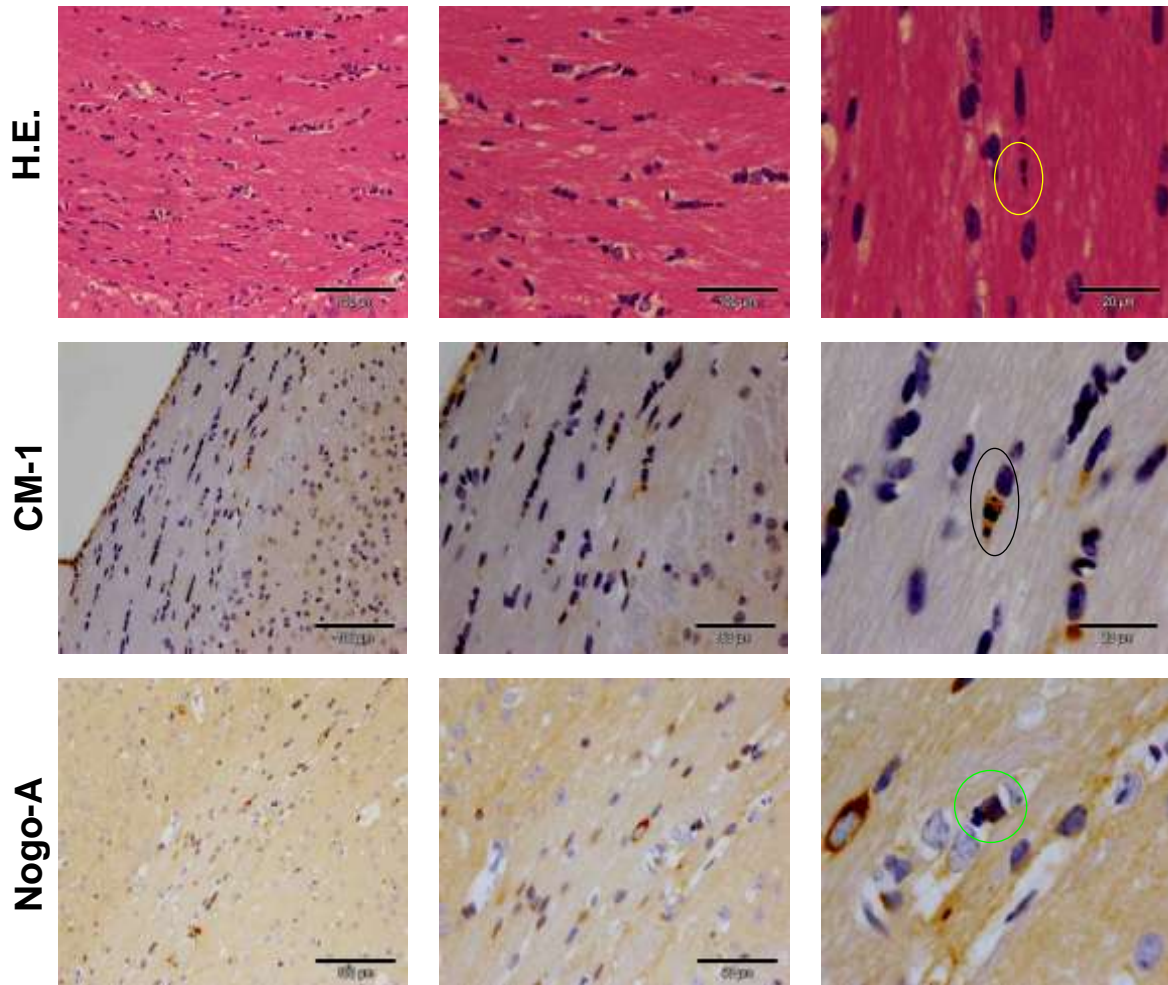
**Abb. 7**

Anzahl der Apoptosen/mm<sup>2</sup> in H.E. (links), der CM-1-positiven apoptotischen Zellen/mm<sup>2</sup> in CM-1 (rechts) und der Nogo-A-positiven Apoptosen/mm<sup>2</sup> in Nogo-A (unten); Vergleich zwischen DRD2<sup>-/-</sup>-Mäusen und wt-Mäusen mit Angabe des Mittelwertes. Ein signifikanter Unterschied der Anzahl der Apoptosen/mm<sup>2</sup> im Vergleich der DRD2<sup>-/-</sup> mit den wt-Tieren konnte in keiner der Untersuchungen gefunden werden.



**Abb. 8**

Morphologie und Verteilung der Apoptosen bei den DRD2 <sup>-/-</sup> Tieren in den Färbungen H.E. (gelbe Ellipse), CM-1 (schwarze Ellipse) und Nogo-A (grüner Kreis). Originalvergrößerungen: 200-fach (links), 400-fach (Mitte), 1000-fach (rechts).

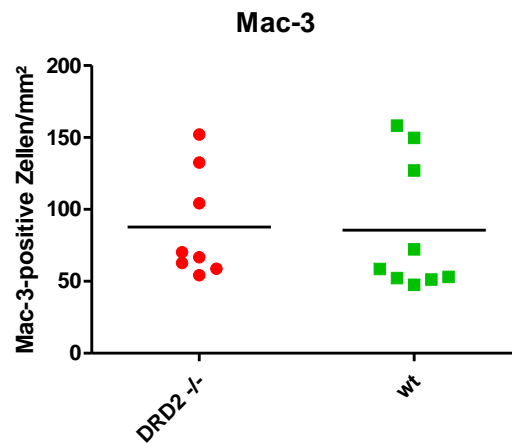
**Abb. 9**

Morphologie und Verteilung der Apoptosen bei den wt-Tieren in den Färbungen H.E. (gelbe Ellipse), CM-1 (schwarze Ellipse und schwarzer Kreis) und Nogo-A (grüner Kreis). Originalvergrößerungen 200-fach (links), 400-fach (Mitte), 1000-fach (rechts).

### 3.1.2 Quantifizierung der Mikrogliaaktivierung

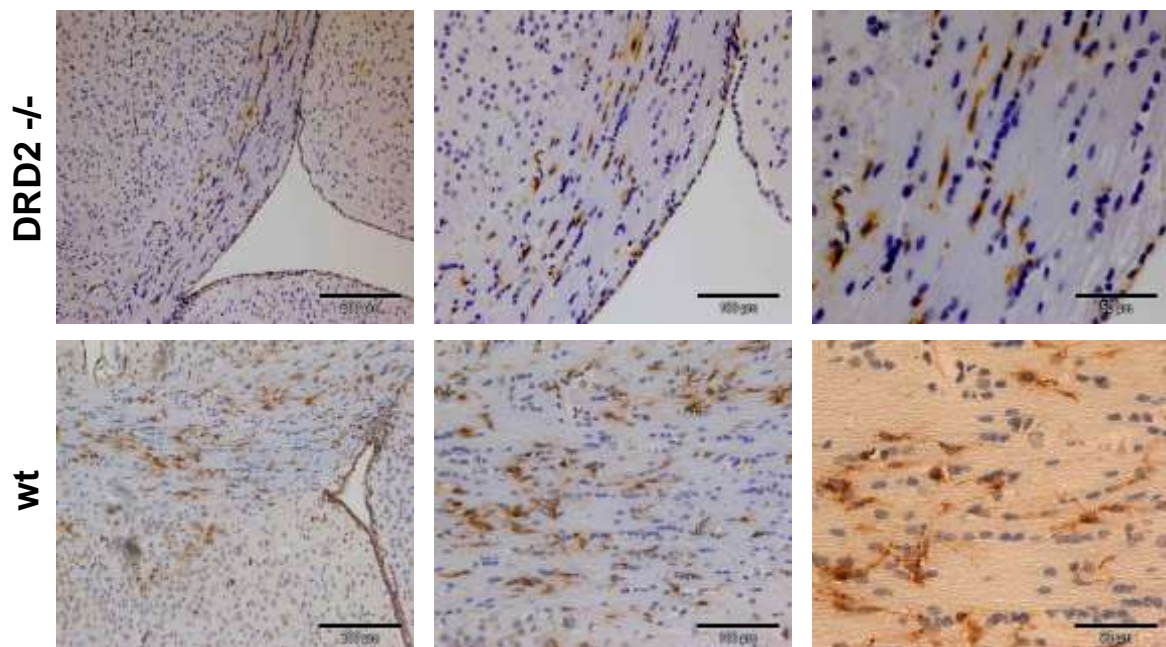
In den mit dem Antikörper Mac-3 markierten Schnitten ließen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Mac-3-positiven Zellen/mm<sup>2</sup> in den

untersuchten Versuchsgruppen feststellen (DRD2  $-/-$ : 87,7  $\pm$  37,3 (MW  $\pm$  SD); wt : 85,6  $\pm$  45,9 (MW  $\pm$  SD);  $p = 0,4234$ ; Mann-Whitney-Test) (Abb. 10).



**Abb. 10**

Mac-3-positive Zellen/mm<sup>2</sup> im Vergleich der DRD2  $-/-$  und der wt-Versuchsgruppen mit Angabe des Mittelwertes. Ein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl der Mac-3-positiven Zellen/mm<sup>2</sup> fand sich nicht. Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper Mac-3.

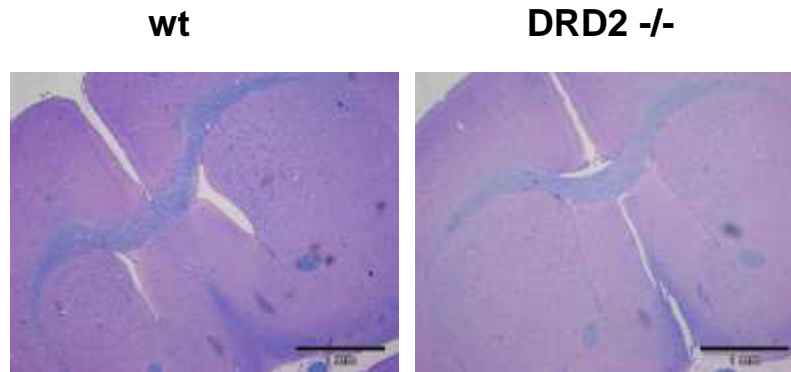


**Abb. 11**

Morphologie und Verteilung aktivierter Mikrogliazellen in der immunhistochemischen Färbung mit Mac-3 bei DRD2  $-/-$  Tieren (oben) und wt-Tieren (unten). Die aktivierten Mikroglia stellen sich als goldbraun gefärbte Zellen mit Ausläufern dar. Originalvergrößerungen 100-fach (links), 200-fach (Mitte), 400-fach (rechts).

### 3.1.3 Demyelinisierung

Bei keiner der untersuchten Versuchsgruppen konnten in der LFB/PAS-Färbung entmarkte Areale gefunden werden.



**Abb. 12**

Übersicht über die LFB/PAS-Färbung und etwaige Entmarkungsareale in den Tieren der wt- (links) und der DRD2  $-/-$  Versuchsgruppe (rechts). In der LFB/PAS-Färbung zeigt sich eine deutliche Anfärbbarkeit des Balkens als Zeichen des Myelinscheidenerhalts nach 7-tägiger Cuprizinverfütterung in wt- und DRD2  $-/-$  Mäusen. Originalvergrößerung: 20-fach.

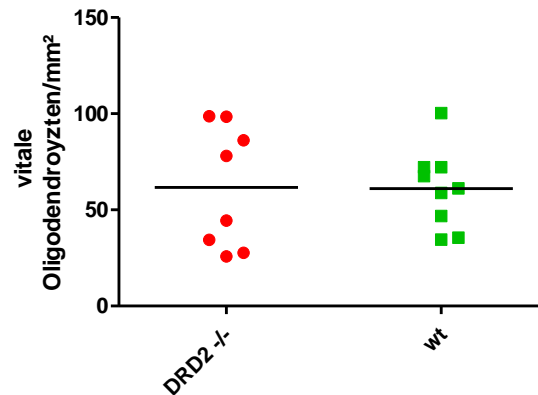
### 3.1.4 Nogo-A-positive, nicht apoptotische Oligodendrozyten

In den bisher beschriebenen Untersuchungen standen die Quantifizierung der Gesamtanzahl von Apoptosen, von apoptotischen Oligodendrozyten sowie der dadurch ausgelösten Mikrogliaaktivierung im Corpus callosum von Versuchstieren nach 7-tägiger Cuprizin-Verfütterung im Vordergrund.

Nicht betrachtet wurde bis dato der Anteil der vitalen Oligodendrozyten, was nachfolgend graphisch illustriert werden soll.

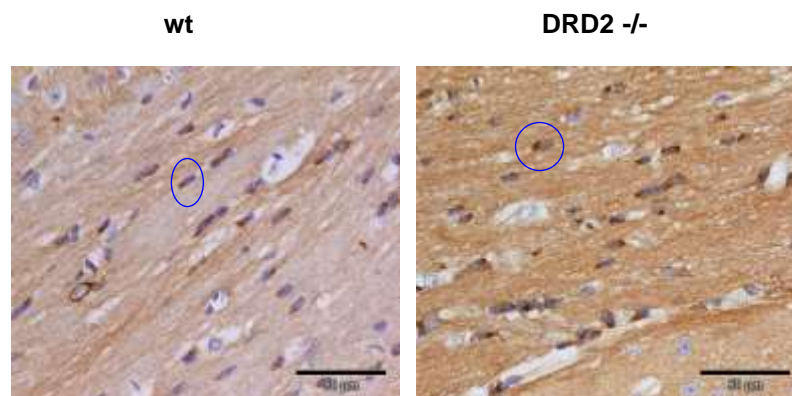
Der Nachweis reifer Oligodendrozyten erfolgte mittels des immunhistochemischen Nachweises von Nogo-A.

In Bezug auf die Anzahl der nicht apoptotischen, Nogo-A-positiven Oligodendrozyten/mm<sup>2</sup> fand sich im Balken im Vergleich der DRD2 <sup>-/-</sup> Tiere zu den wt-Tieren kein signifikanter Unterschied.



**Abb. 13**

Vergleich der Anzahl der vitalen Nogo-A-positiven Oligodendrozyten mit Angabe des Mittelwertes in den Versuchsgruppen DRD2 <sup>-/-</sup> vs. wt, Nogo-A-Immunhistochemie, kein Nachweis eines signifikanten Unterschiedes. Vitale Oligodendrozyten/mm<sup>2</sup>; DRD2 <sup>-/-</sup> = 61,7 +/- 31,8 (MW +/- SD); wt = 61,0 +/- 20,6 (MW +/- SD); p = 0,9572, ungepaarter t-Test.



**Abb. 14**

Morphologie und Verteilung vitaler Nogo-A-positiver Oligodendrozyten (Beispiel: blaue Ellipse und blauer Kreis) in der Nogo-A-Färbung in den zu untersuchenden Versuchsgruppen wt und DRD2 <sup>-/-</sup>. Originalvergrößerung 400-fach.

## 3.2 Morphometrische Analyse der DRD3 -/- Mäuse nach 7-tägiger Verfütterung von Cuprizin mit und ohne Pramipexol-Behandlung

Im Vergleich der DRD3 -/- Mäuse zu den wt-Mäusen wurde ebenfalls die Anzahl der Apoptosen/mm<sup>2</sup> der Balkenregion in den verschiedenen histopathologischen und immunhistochemischen Färbungen nach 7-tägiger Cuprizin-Fütterung ermittelt.

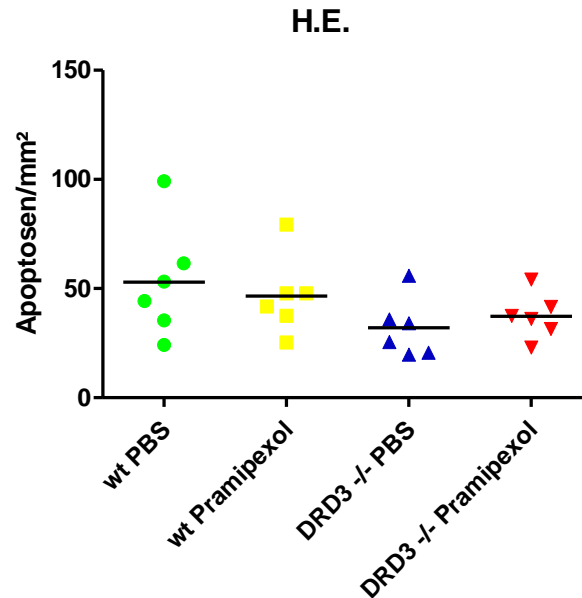
Zudem wurde ein Teil der Tiere mit dem D3-spezifischen Dopaminagonisten Pramipexol, die Kontrollgruppe mit einer Phosphatpuffer-Salzlösung (PBS) behandelt.

### 3.2.1 Nachweis der Apoptosen gesamt

Die Anzahl der apoptotischen Zellen in der H.E.-Färbung in den unterschiedlichen Versuchsgruppen ergab im Einzelnen (vgl. Abb. 15):

- 1) wt-Tiere nach intraperitonealer PBS-Injektion (wt PBS): 52,3 +/- 26,2 Apoptosen/mm<sup>2</sup> (MW +/- SD)
- 2) wt-Tiere mit Pramipexol-Behandlung (wt Pramipexol): 46,4 +/- 18,1 Apoptosen/mm<sup>2</sup>: (MW +/- SD)
- 3) DRD3 -/- Tiere nach intraperitonealer PBS-Injektion (DRD3 -/- PBS): 32,0 +/- 13,5 Apoptosen/mm<sup>2</sup> (MW +/- SD)
- 4) DRD3 -/- Tiere nach Pramipexol-Behandlung (DRD3 -/- Pramipexol): 37,4 +/- 10,4 Apoptosen/mm<sup>2</sup> (MW +/- SD)



**Abb. 15**

Apoptosen/mm<sup>2</sup> mit Angabe des Mittelwertes in den verschiedenen Versuchsgruppen. Färbungen mit Hämatoxylin-Eosin. Ein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl der Apoptosen/mm<sup>2</sup> ließ sich bei einem p-Wert von  $p=0,23$  nach ANOVA nicht feststellen.

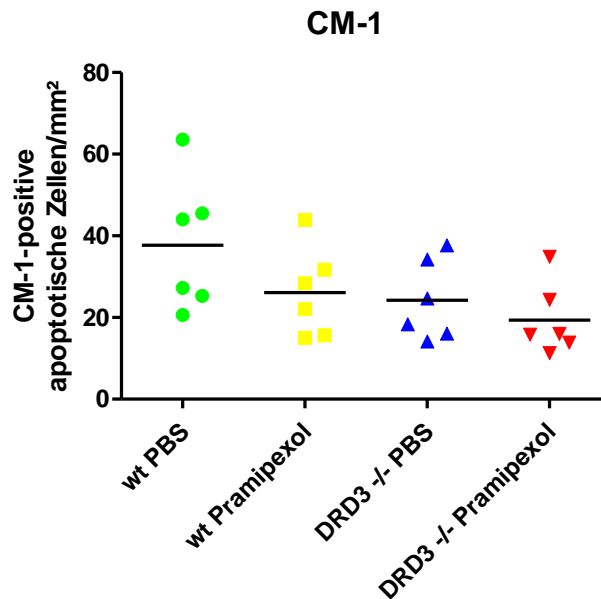
Für den p-Wert ergab sich nach Durchführung des ANOVA-Testes ein Wert von  $p=0,23$ . Somit ergeben sich in der H.E.-Färbung keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl der Apoptosen/mm<sup>2</sup> in den einzelnen Versuchsgruppen.

### 3.2.2 Nachweis von Caspase-3-positiven apoptotischen Zellen

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit CM-1 ergab im Einzelnen (vgl. Abb. 16):

- 1) wt-Tiere nach intraperitonealer PBS-Injektion (wt PBS): 37,7 +/- 16,3 CM-1-positive apoptotische Zellen/mm<sup>2</sup> (MW +/- SD)
- 2) wt-Tiere mit Pramipexol-Behandlung (wt Pramipexol): 26,1 +/- 11,0 CM-1-positive apoptotische Zellen/mm<sup>2</sup> (MW +/- SD)
- 3) DRD3 -/- Tiere nach intraperitonealer PBS-Injektion (DRD3 -/- PBS): 24,2 +/- 9,8 CM-1-positive apoptotische Zellen/mm<sup>2</sup> (MW +/- SD)

4) DRD3  $-/-$  Tiere nach Pramipexol-Behandlung (DRD3  $-/-$  Pramipexol): 19,4  $\pm$  8,8 CM-1-positive apoptotische Zellen/mm<sup>2</sup> (MW  $\pm$  SD)



**Abb. 16**

CM-1-positive apoptotische Zellen/mm<sup>2</sup> mit Angabe des Mittelwertes in den verschiedenen Versuchsgruppen, immunhistochemische Färbung mit CM-1. Ein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl der CM-1-positiven apoptotischen Zellen ließ sich bei einem p-Wert von  $p=0,5325$  nach ANOVA nicht feststellen.

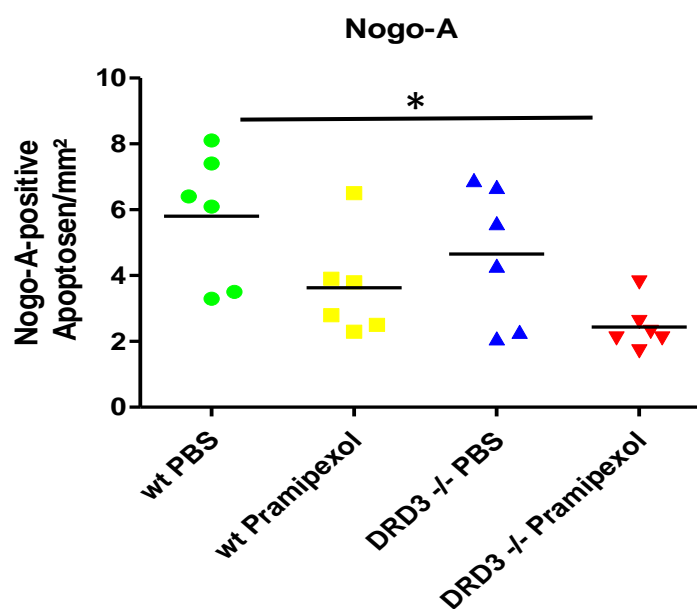
Für den p-Wert (ANOVA) ergab sich Wert von  $p=0,5325$ . Somit ergeben sich in der immunhistochemischen Färbung mit CM-1 keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl der CM-1-positiven apoptotischen Zellen/mm<sup>2</sup> in den einzelnen Versuchsgruppen.

### 3.2.3 Nachweis von Nogo-A-positiven apoptotischen Oligodendrozyten

Die statistische Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit Nogo-A ergab im Einzelnen (vgl. Abb. 17):

1) wt-Tiere nach intraperitonealer PBS-Injektion (wt PBS): 5,8  $\pm$  2,0 Nogo-A-positive Apoptosen/mm<sup>2</sup> (MW  $\pm$  SD)

- 2) wt-Tiere mit Pramipexol-Behandlung (wt Pramipexol): 3,6 +/- 1,6 Nogo-A-positive Apoptosen/mm<sup>2</sup> (MW +/- SD)
- 3) DRD3 -/- Tiere nach intraperitonealer PBS-Injektion (DRD3 -/- PBS): 4,7 +/- 2,1 Nogo-A-positive Apoptosen/mm<sup>2</sup> (MW +/- SD)
- 4) DRD3 -/- Tiere nach Pramipexol-Behandlung (DRD3 -/- Pramipexol): 2,4 +/- 0,7 Nogo-A-positive Apoptosen/mm<sup>2</sup> (MW +/- SD)



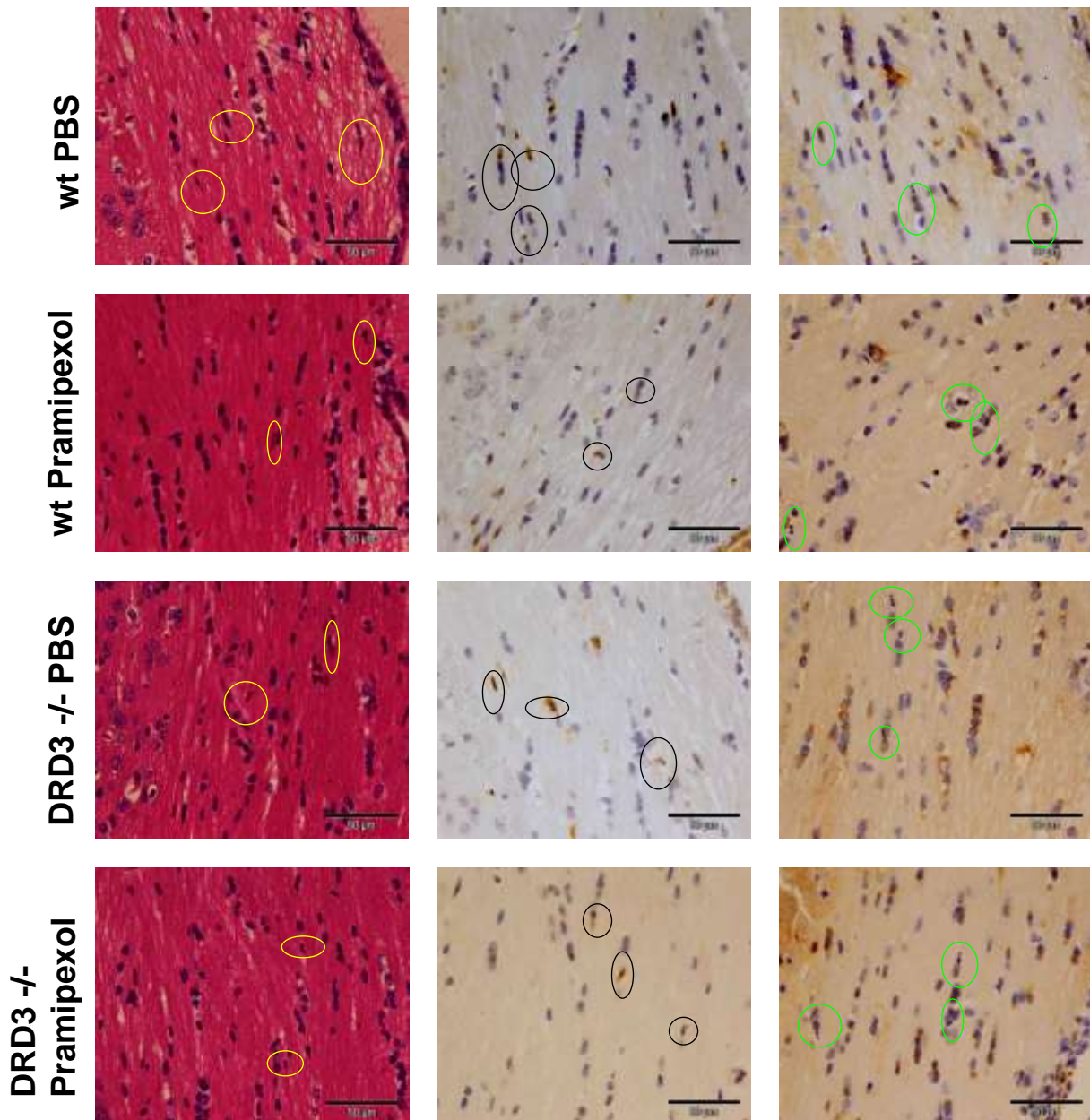
**Abb. 17**

Nogo-A-positive Apoptosen/mm<sup>2</sup> mit Angabe des Mittelwertes in den verschiedenen Versuchsgruppen. Immunhistochemische Färbung mit Nogo-A. Ein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl der Nogo-A-positiven Apoptosen/mm<sup>2</sup> ließ sich bei einem p-Wert von  $p=0,1824$  nach ANOVA nicht feststellen. Allerdings zeigt der Post Test nach Tukey eine signifikant niedrigere Anzahl an apoptotischen Oligodendrozyten in DRD3 -/- Tieren, die mit Pramipexol behandelt wurden im Vergleich zu PBS injizierten Wildtyp-Tieren ( $p < 0,05$ ).

Für den p-Wert ergab sich nach Durchführung des ANOVA-Testes ein Gesamtwert von  $p=0,1824$ . Somit ergeben sich in der immunhistochemischen Färbung mit Nogo-A keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl der Nogo-A-positiven Apoptosen/mm<sup>2</sup> den einzelnen Versuchsgruppen.

Die Post-Test-Analyse mittels Tukey zeigt einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen den Gruppen wt PBS und DRD3 -/- Pramipexol, entsprechend mehr Nogo-A-positiven apoptotischen Zellen in der wt PBS-Gruppe.

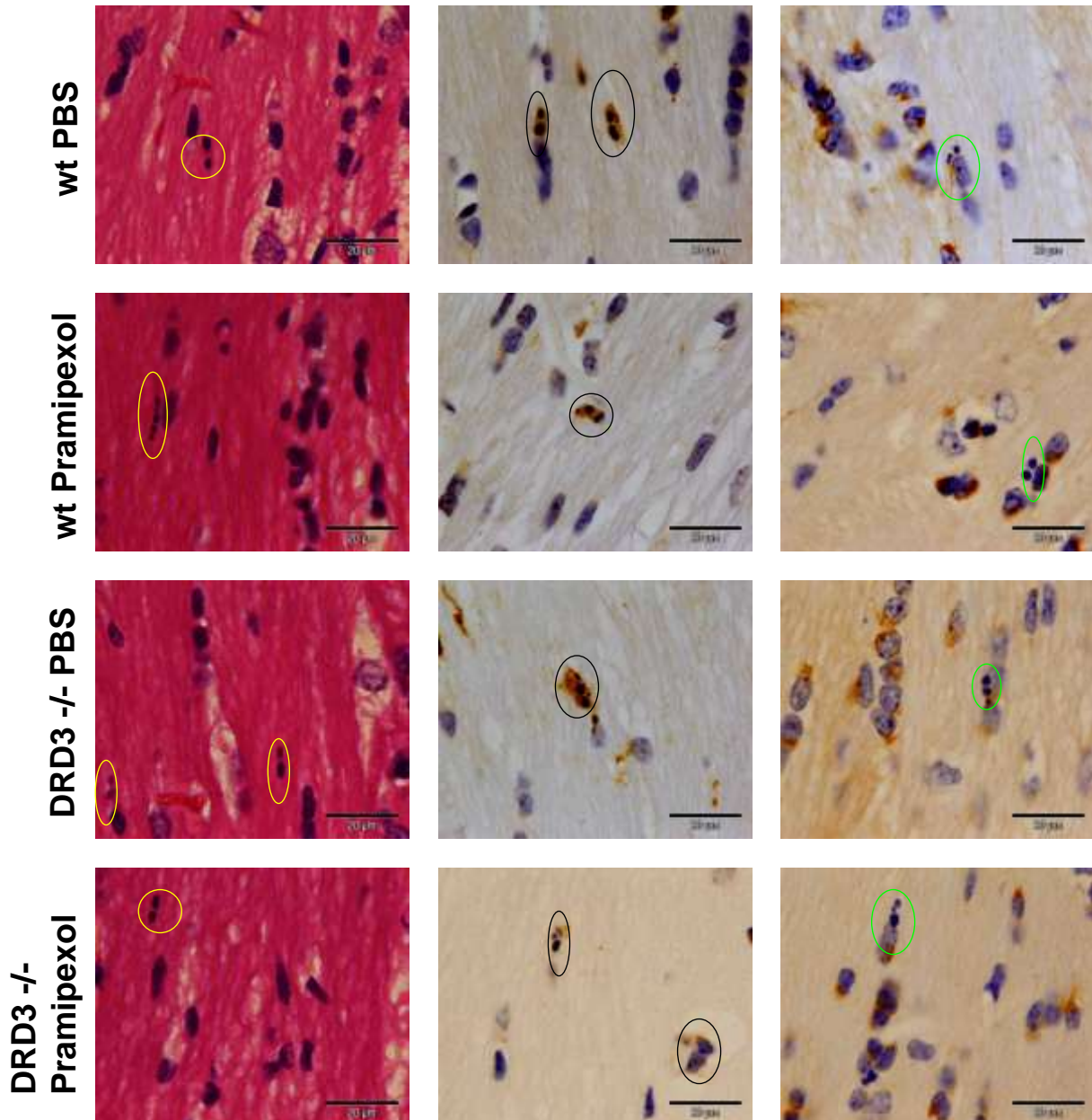
Zu beobachten ist wie auch schon in den Versuchen der DRD2-Gruppe eine stete Abnahme der Gesamtanzahl der Apoptosen in den einzelnen Färbungen, H.E. > CM-1 > Nogo-A (Abb. 18).



**Abb. 18**

Überblick über die Verteilung der Apoptosen im Vergleich der verschiedenen Versuchsgruppen, wt nach intraperitonealer PBS-Injektion (1. Reihe), wt mit Pramipexol, (2. Reihe), DRD3 -/- nach intraperitonealer PBS-Injektion (4. Reihe), DRD3 -/- mit Pramipexol (4. Reihe). Auffällig ist eine höhere

Anzahl von Nogo-A-positiven Apoptosen in der wt PBS-Gruppe im Vergleich zur DRD3  $-/-$  Pramipexol-Gruppe. Morphologische Beispiele für Apoptosen in H.E. (gelbe Kreise und Ellipsen), CM-1 (schwarze Kreise und Ellipsen), Nogo-A (grüne Kreise und Ellipsen). Originalvergrößerung 400-fach. Färbungen: H.E. (links) CM-1 (Mitte), Nogo-A (rechts).



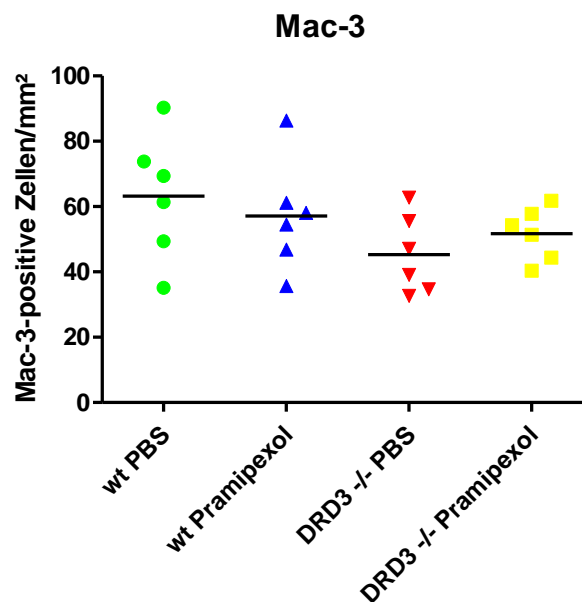
**Abb. 19**

Morphologie der Apoptosen im Vergleich unter den bekannten Versuchsgruppen, wt nach intraperitonealer PBS-Injektion (1. Reihe), wt mit Pramipexol (2. Reihe), DRD3  $-/-$  nach intraperitonealer PBS-Injektion (3. Reihe), DRD3  $-/-$  mit Pramipexol (4. Reihe). Morphologische Beispiel für Apoptosen in H.E. (gelbe Kreise und Ellipsen), CM-1 (schwarze Kreise und Ellipsen), Nogo-A (grüne Kreise und Ellipsen). Originalvergrößerung 1000-fach. Färbungen: H.E. (links) CM-1 (Mitte), Nogo-A (rechts).

### 3.2.4 Quantifizierung der Mikrogliaaktivierung

Die Quantifizierung der immunhistochemischen Markierung mit dem Antikörper Mac-3 ergab im Einzelnen (vgl. Abb. 20):

- 1) wt-Tiere nach intraperitonealer PBS-Injektion (wt PBS): 63,2 +/- 19,3 Mac-3-positive Zellen/mm<sup>2</sup> (MW +/- SD)
- 2) wt-Tiere mit Pramipexol-Behandlung (wt Pramipexol): 57,1 +/- 17,0 Mac-3-positive Zellen/mm<sup>2</sup> (MW +/- SD)
- 3) DRD3 -/- Tiere nach intraperitonealer PBS-Injektion (DRD3 -/- PBS): 45,3 +/- 12,0 Mac-3-positive Zellen/mm<sup>2</sup> (MW +/- SD)
- 4) DRD3 -/- Tiere nach Pramipexol-Behandlung (DRD3 -/- Pramipexol): 51,7 +/- 8,1 Mac-3-positive Zellen/mm<sup>2</sup> (MW +/- SD)

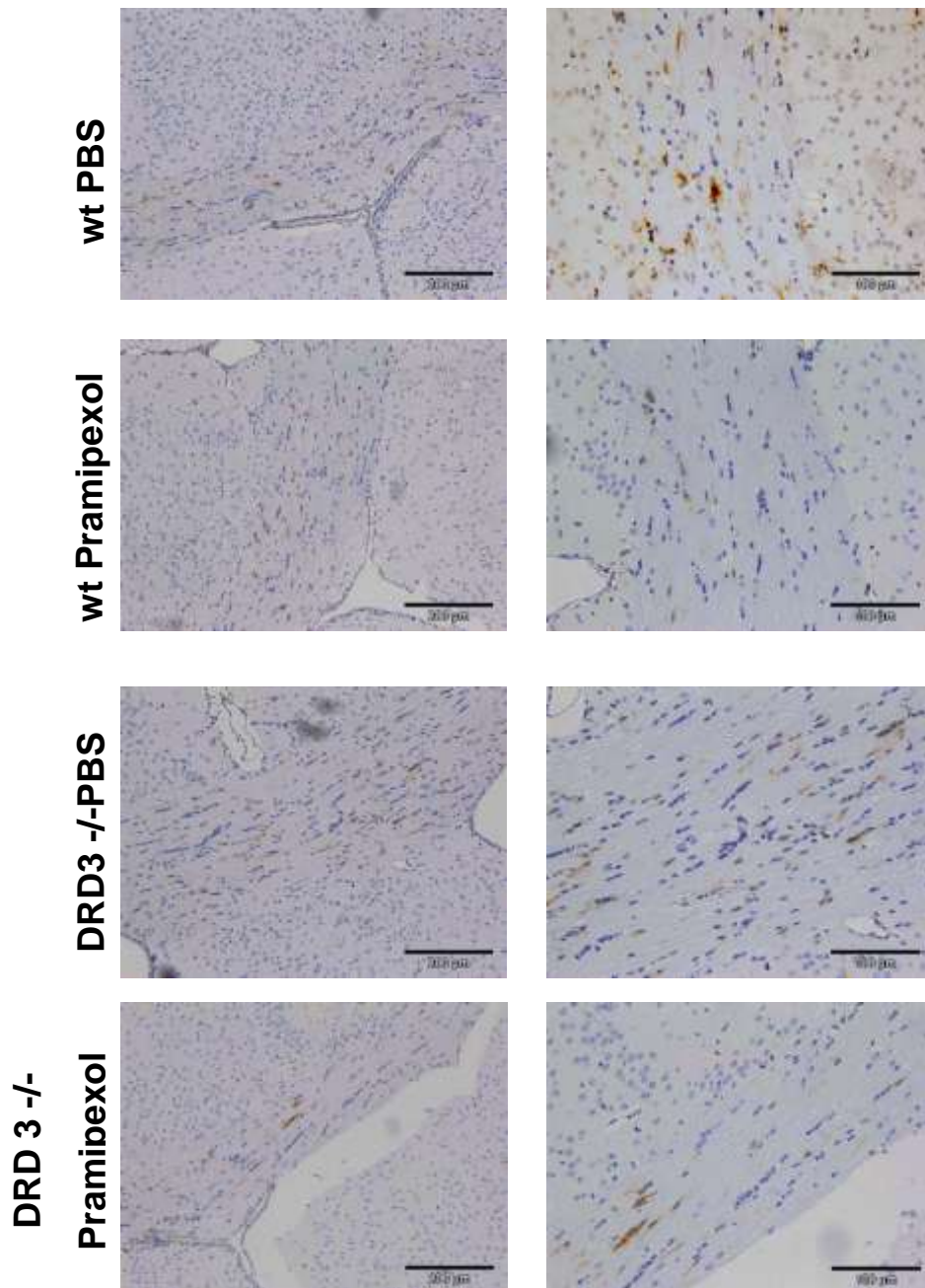


**Abb. 20**

Mac-3-positive Zellen/mm<sup>2</sup> in den untersuchten Versuchsgruppen mit Angabe des Mittelwertes; Es fand sich bei einem p-Wert von  $p=0,2991$  (ANOVA) kein signifikanter Unterschied in den genannten Versuchsgruppen bezüglich der Anzahl Mac-3-positiver Zellen/mm<sup>2</sup>. Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper Mac-3.

Für die untersuchten Tiere mit und ohne Pramipexolbehandlung in den bekannten Versuchsgruppen ließ sich in den mit dem Antikörper Mac-3 markierten Schnitten

kein signifikanter Unterschied bezüglich der Mac-3-positiven Zellen/mm<sup>2</sup> feststellen. Der berechnete p-Wert (ANOVA) belief sich auf  $p=0,2991$ .

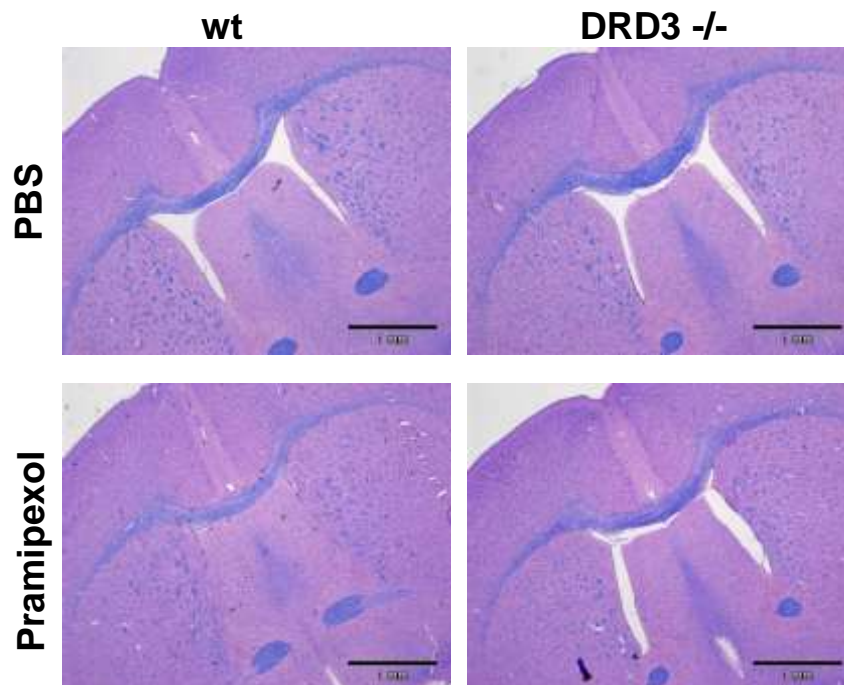


**Abb. 21**

Morphologie und Verteilung aktivierter Mikrogliazellen in der Mac-3-Immunhistochemie in den bekannten Versuchsgruppen. Die aktivierte Mikroglia stellt sich als goldbraun gefärbte Zellen mit Ausläufern dar. Originalvergrößerungen 100fach (links) und 200fach (rechts).

### 3.2.5 Demyelinisierung

Bei keiner der untersuchten Versuchsgruppen konnten in der LFB/PAS-Färbung entmarkte Areale gefunden werden.



**Abb. 22**

Übersicht über die LFB/PAS-Färbung und etwaige Entmarkungsareale in den Tieren der wt (links) und der DRD3  $-/-$  Versuchsgruppe (rechts). Oben: PBS-Injektion, unten: Pramipexol-Injektion. Auch hier zeigt eine deutliche Anfärbbarkeit des Balkens den Myelinscheidenerhalt nach 7-tägiger Cuprizon-Diät in allen Versuchsgruppen. Originalvergrößerung: 20-fach.

### 3.2.6 Nogo-A-positive, nicht apoptotische Oligodendrozyten in mit Pramipexol behandelten und unbehandelten DRD3 $-/-$ Mäusen

Wie schon in den Untersuchungen der Tiere der DRD2-Versuchsgruppe stand bis zu diesem Zeitpunkt die Quantifizierung der Gesamtanzahl von Apoptosen, von apoptotischen Oligodendrozyten sowie der dadurch ausgelösten Mikrogliaaktivierung im Corpus callosum von Versuchstieren nach 7-tägiger Cuprizon-Verfütterung im Vordergrund.



Nicht betrachtet wurde bis dato der Anteil der vitalen Oligodendrozyten, was nachfolgend graphisch illustriert werden soll.

Der Nachweis reifer Oligodendrozyten erfolgte auch hier mittels des immunhistochemischen Nachweises von Nogo-A.

Abb. 23 zeigt die Graphen der untersuchten Gruppen, die statistische Auswertung im Einzelnen ergab folgendes:

- 1) wt PBS: 94,7 +/- 35,6 vitale Oligodendrozyten/mm<sup>2</sup> (MW +/- SD)
- 2) wt Pramipexol: 79,5 +/- 19,4 vitale Oligodendrozyten/mm<sup>2</sup> (MW +/- SD)
- 3) DRD3 -/- PBS: 80,6 +/- 22,1 vitale Oligodendrozyten/mm<sup>2</sup> (MW +/- SD)
- 4) DRD3 -/- Pramipexol: 61,7 +/- 17,0 vitale Oligodendrozyten/mm<sup>2</sup>  
(MW +/- SD)

Nach Durchführung des ANOVA -Testes ergab sich ein p-Wert von p=0,3644.

Es zeigt sich also, dass auch die Tiere der DRD3-Versuchsreihe, sowohl unbehandelt als auch mit Pramipexol behandelt, hinsichtlich ihrer Anzahl an vitalen Oligodendrozyten im Corpus callosum nach 7-tägiger Cuprizon-Verfütterung keinen signifikanten Unterschied aufweisen.

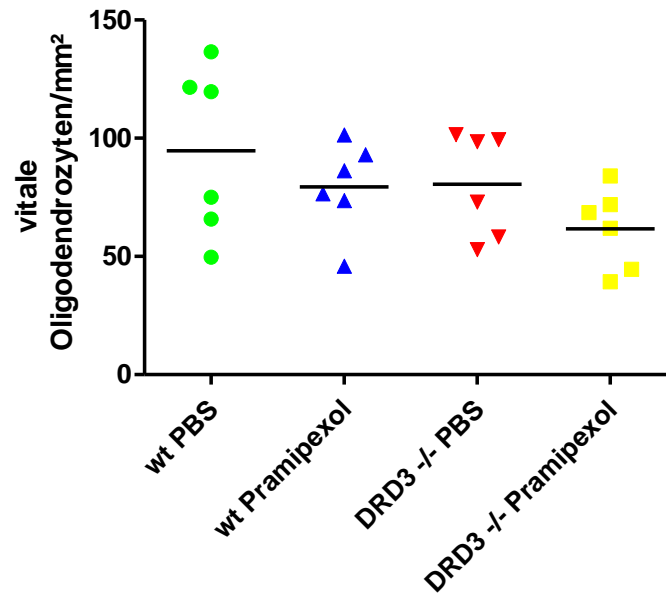


Abb. 23

Vitale, nicht apoptotische, Nogo-A-positive Oligodendrozyten der unbehandelten und behandelten DRD3-Tiere mit Angabe des Mittelwerts. Im Vergleich der einzelnen Versuchsreihen untereinander fand sich im Hinblick auf die Anzahl vitaler Oligodendrozyten/mm<sup>2</sup> kein signifikanter Unterschied.

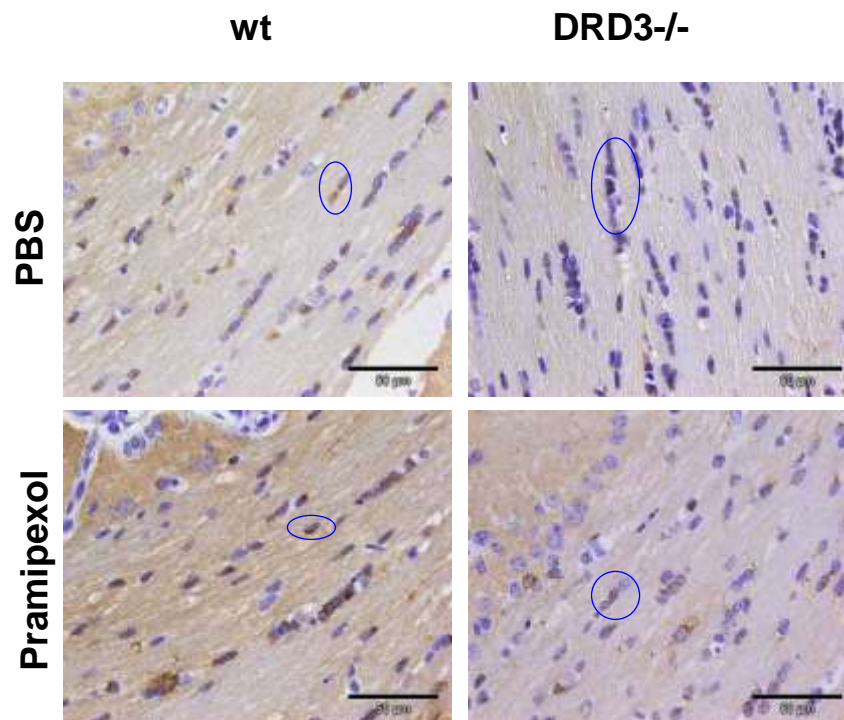


Abb. 24

Morphologie und Verteilung vitaler Oligodendrozyten (Beispiel: blaue Ellipsen und blauer Kreis) der Versuchsgruppen in wt und DRD3 -/- Mäusen mit und ohne Injektion von Pramipexol in der Nogo-A-Färbung. Es findet sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl vitaler Oligodendrozyten/mm<sup>2</sup> der Vergleichsgruppen. Originalvergrößerung 400-fach.

## 4 Diskussion

### 4.1 Oligodendroglia-Zelltod im Cuprizon-Modell der Entmarkung

Ein Modell, um die Mechanismen der Demyelinisierung zu untersuchen, ist das Cuprizon-Modell, ein neurotoxisches Modell der Multiplen Sklerose. Die Fütterung von Mäusen mit dem Kupferchelator Cuprizon (Bis-cyclohexanon-oxaldihydrazon) bewirkt eine lokalisierte Demyelinisierung vor allem im Bereich der oberen Kleinhirnstiele sowie des Corpus callosum. Nach Absetzen des Kupferchelators kann innerhalb weniger Wochen eine nahezu vollständige Remyelinisierung beobachtet werden (Matsushima und Morell 2001). Die Demyelinisierungsvorgänge im Cuprizon-Modell sind wohl auf eine durch den Kupferchelator verursachte Änderung im Energiestoffwechsel der Oligodendrozyten zurückzuführen, die zum Zelltod der Oligodendrozyten und zum Myelinverlust führt (Morell et al. 1998).

Gegenüber entzündlichen Tiermodellen der MS, wie z.B. der Experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), hat das Cuprizon-Modell den Vorteil, dass die Blut-Hirn-Schranke intakt bleibt und somit auch die Rolle der Mikroglia, deren vermehrtes Auftreten an den Läsionsorten gefunden werden konnte (Blakemore 1972) und deren Präsenz unterstützend in die Proliferation und Differenzierung von zur Remyelinisierung benötigten Oligodendrozytenvorläuferzellen eingreift (Matsushima und Morell 2001), unabhängig von adaptiven immunologischen Geschehnissen untersucht werden kann.

Verschiedene Arbeitsgruppen, die mit dem Cuprizon-Modell arbeiten, konnten eine Entmarkung in den bekannten Arealen nach 3-4 Wochen Cuprizon-Diät ausmachen. In unseren Experimenten konnten wir diese Erkenntnis der relativ späten Entmarkung anhand der Auswertung der LFB/PAS-Präparate bestätigen, da sich in diesen nach unserer Cuprizon-Versuchsdauer von sieben Tagen keinerlei Demyelinisierung in der Balkenregion feststellen ließ.

Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss einer Dopaminrezeptor-D2- oder -D3-Defizienz sowie einer Behandlung mit dem Dopaminrezeptor-Agonisten Pramipexol auf den oligodendroglialen Zelltod in vivo zu untersuchen. Der

oligodendrogliale Zelltod beginnt in etwa eine Woche nach Beginn der Cuprizon-Verfütterung. Daher haben wir in der vorliegenden Arbeit Mäuse, die sieben Tage unter Cuprizon-Futter standen, untersucht.

## **4.2 Einfluss einer Dopaminrezeptor-Defizienz auf die oligodendrogliale Vulnerabilität im Cuprizon-Modell**

Der exakte Mechanismus der Cuprizon-Wirkung auf selektive Oligodendrozytenpopulationen im Mausgehirn ist noch unbekannt. Der Befund einer gestörten mitochondrialen Respiration weist auf eine mögliche Beteiligung oxidativer Schädigungsmechanismen hin (Morell et al. 1998; Hesse et al. 2010).

Unklar ist bisher, inwieweit eine endogene Dopamin-Defizienz die oligodendrogliale Vulnerabilität im Cuprizon-Modell erhöht bzw. eine Therapie mit Dopaminagonisten Oligodendrozyten in diesem Modell vor dem Zelltod schützen kann.

Die zentralen Fragen dieser Arbeit sind daher:

1. Weisen Dopaminrezeptor-defiziente Mäuse eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber Cuprizon auf?
2. Inwieweit schützt eine Therapie mit einem Dopaminagonisten die Oligodendrozyten?
3. Falls ja, erfolgt dieser Schutz rezeptorabhängig oder unabhängig?

In Studien von Rosin et al. (2005) konnte eine verminderte Zelltodrate der Oligodendrozyten *in vitro* nach Glutamatapplikation bzw. Glukose- und Sauerstoffdeprivation bei Behandlung mit einem Dopaminagonisten gezeigt werden. Betrachtet man noch einmal die Wirkung der Dopaminagonisten, so bleibt festzuhalten, dass die beobachtete Neuroprotektion sowohl rezeptorvermittelt, wie z.B. beim D2-Agonisten Quinpirol, als auch partiell rezeptorunabhängig, wie z.B. beim D2-Agonisten Bromocriptin, der auch direkt antioxidativ wirkt, induziert sein kann. Die Neuroprotektion erklärt sich mitunter durch eine Stimulation der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK) und der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K),

durch eine vermehrte Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 sowie durch einen Schutz vor überschießender Calcium-vermittelter glutamaterger Toxizität (Kihara et al. 2002). Die genauen Mechanismen sind jedoch nicht bekannt. Für den in dieser Arbeit verwendeten D3-Agonisten Pramipexol werden sowohl rezeptorabhängige als auch rezeptorunabhängige Wirkmechanismen postuliert (Sethy et al. 1997).

#### 4.2.1 Die Bedeutung von endogenem (= in physiologischen Dosen vorhandenem) Dopamin bei Cuprizon-induzierten Apoptosevorgängen sowie dem Ausmaß der Mikrogliaaktivierung

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten auf immaturren Oligodendrozyten (OPC) die Expression von Dopamin-D2(DRD2)- und Dopamin-D3(DRD3)-Rezeptoren nachweisen. Die höchste Dichte der Rezeptoren zeigte sich auf den immaturren Oligodendrozyten, während auf den reifen, myelinisierenden Oligodendrozyten kaum noch Rezeptoren zu detektieren waren (Bongarzone et al. 1998). Eben diese Autoren postulieren demnach einen Zusammenhang zwischen dem Dopaminsystem und dem Prozess der Myelinscheidenbildung.

Unklar ist bisher, in welcher Art und Weise und in welchem Ausmaß über die Dopaminrezeptoren wesentliche Differenzierungs- und/oder sogar Überlebenssignale an Oligodendrozyten übermittelt werden.

Wir wollten daher in einem Modell der MS untersuchen, inwieweit die Expression von DRD2- und DRD3-Rezeptoren Einfluss auf den oligodendrogialen Zelltod hat.

Untersucht wurde in dieser Studie die Bedeutung der Dopaminrezeptoren hinsichtlich der Cuprizon-vermittelten Oligodendrozytenapoptose in der Balkenregion - erhöht ein Fehlen von D2 oder D3 die Vulnerabilität von Oligodendrozyten gegenüber Cuprizon-mediierter Toxizität?

In unseren Untersuchungen konnten wir keinen signifikanten Unterschied des Apoptoseausmaßes zwischen den Tieren der Dopaminrezeptor-knockout-Populationen, DRD2  $-/-$  und DRD3  $-/-$ , und den Tieren der wt-Populationen ausmachen. Auch für das Ausmaß der Mikrogliaaktivierung, die als indirekter Marker

für das Ausmaß des Zelltodes gilt, ließ sich keinerlei Signifikanz im Vergleich der Populationen feststellen. Ebenso zeigte sich kein Unterschied in der Dichte vitaler, reifer Nogo-A-positiver apoptotischer Oligodendrozyten zwischen DRD2  $-/-$ , DRD3  $-/-$  und wt-Mäusen.

Demnach kommt dem Dopaminrezeptorsystem nach unseren Daten keine Rolle bei der Protektion von Oligodendrozyten vor Cuprizon-mediiertes Schädigung zu. Außerdem konnten unsere Versuche einen Effekt der Dopaminrezeptor-Defizienz auf die Mikrogliaaktivierung ausschließen.

#### 4.2.2 Die Bedeutung exogener dopaminerger Stimulation in Form des Dopaminagonisten Pramipexol bei Cuprizon-induzierten Apoptosevorgängen sowie dem Ausmaß der Mikrogliaaktivierung

Die Arbeitsgruppe Bongarzone et al. 1998 zeigt, dass die Behandlung von primären Rattenoligodendrogliazellen mit einem D2/D3-Dopaminagonisten, Quinpirol, zu einem deutlichen Anstieg der Oligodendrozytenvorläuferzellen und nachfolgend zu einer ausgeprägten Remyelinisierung in den entsprechenden Tiermodellen führte.

Eine weitere Arbeitsgruppe postulierte einen neuroprotektiven Effekt von Dopamin D2- oder D3-Agonisten in Form einer verminderten Zelltodrate bei Oligodendrozyten, die oxidativem Stress *in vitro* ausgesetzt waren (Rosin et al. 2005). Nach Ansicht der Autoren lässt sich die neuroprotektive Wirkung insbesondere der D2-Agonisten durch eine Stimulation der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK) sowie der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und nachfolgender Hochregulation der Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 erklären. Der genaue protektive Mechanismus ist allerdings unklar (Kihara et al. 2002). Weiterhin ergaben die Untersuchungen der o.g. Arbeitsgruppe, dass D2-Agonisten die Zellen vor einem überschießenden Calcium-Einstrom, welcher als ein Mediator in der Kaskade der glutamatergen Toxizität mit anschließendem programmierten Zelltod mitwirkt, schützen (Kihara et al. 2002).

In dieser Studie liegt das Augenmerk nicht auf einem D2-spezifischen Dopaminagonisten, sondern auf Pramipexol, dem eine deutliche Affinität für den D3-Rezeptor nachgewiesen werden konnte (Mierau et al. 1995).

Es stellt sich demnach die Frage, ob Pramipexol einen protektiven Effekt auf das Ausmaß der Apoptose bzw. der Mikrogliaaktivierung im Cuprizon-Modell besitzt.

Signifikante Unterschiede hinsichtlich der Anzahl der Apoptosen/mm<sup>2</sup> mit und ohne Pramipexol-Therapie im Vergleich der Wildtyp- und der Knock-out-Mäuse konnten wir in unseren Versuchen nicht systematisch finden. Einzig in der Nogo-A-Färbung ergab sich nach Anwendung des Tukey Post Tests ein signifikanter Unterschied von  $p < 0,05$  bzgl. der Apoptosenanzahl zwischen den Gruppen wt PBS und DRD3 -/- Pramipexol. Es zeigten sich mehr apoptotische Nogo-A-positive Zellen in der Wildtyp-PBS-Gruppe. Dieses Resultat könnte auf eine protektive Wirkung des Dopaminagonisten Pramipexol hinweisen. Überblickt man die Statistik des Gesamtversuches, so sieht es so aus, als ob die Pramipexol-Therapie insgesamt die Oligodendrozytenapoptosen etwas reduzieren könne, signifikant ist dieser Effekt jedoch nicht. Insgesamt spricht der Befund einer höheren Apoptoserate in den Wildtyp-Tieren im Gegensatz zu Pramipexol-behandelten DRD3 -/- Tieren eher für einen rezeptorunabhängigen Effekt der Pramipexol-Wirkung. Um diesen Befund zu erhärten, sind jedoch weitere Versuche mit größeren Tierzahlen nötig.

### 4.3 Apoptosendetektion

Zur Detektion der apoptotischen Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Methoden angewandt. Einerseits wurden Apoptosen in der Standardfärbung H.E., zum anderen über die immunhistochemische Färbung mit CM-1 zum Nachweis aktivierter Caspase 3 identifiziert.

Die Färbung mit Nogo-A gemeinsam mit dem Nachweis eines chromatindichten, fragmentierten Zellkerns identifiziert die betroffenen Zellen als Oligodendrozyten.

Die Identifikation der Apoptosen in H.E. erfolgte anhand ihrer charakteristischen Morphologie, zu der unter anderem das Auftreten stark eosinophilen Zytoplasmas sowie Karyopyknose bzw. Karyorrhesis gehören.

Als indirekter Marker für das Ausmaß der Gewebeschädigung kam die Markierung von aktivierten Mikrogliazellen mit dem Antikörper Mac-3 zum Einsatz.

Hinsichtlich der Apoptosendetektion im Vergleich der histopathologischen Färbungen untereinander fällt auf, dass die Färbungen eine unterschiedliche Sensitivität bzgl. der Detektion apoptotischer Zellen bieten. Dabei machte es keinen Unterschied, ob es sich um Knock-out- oder Wildtyp-Tiere handelte.

Mittels des CM-1-Antikörpers zum Nachweis aktivierter Caspase 3 lassen sich noch ca. 60% der im H.E. gefundenen Apoptosen bestätigen.

In der Literatur wird hierzu diskutiert, dass möglicherweise ein Teil des Oligodendrozytenzelltodes im Modell der Cuprizin-induzierten Entmarkung über Nicht-Caspase-3-abhängige Apoptose verläuft (Coprzy et al. 2005). Allerdings wird auch in anderen Modellen regelhaft eine höhere Sensitivität der H.E.-basierten Methode der Apoptosedetektion beobachtet (Stadelmann und Lassmann 2000). Auch wird vermutlich mit dem Nachweis der aktivierten Caspase 3 nur ein bestimmtes, relativ frühes Stadium des apoptotischen Prozesses abgebildet (Hesse et al. 2010; Kitazumi und Tsukahara 2011). Die genauen Mechanismen des Zelltodes der Cuprizin-induzierten Zytotoxizität sind noch nicht vollständig geklärt und gegenwärtig Inhalt der Forschung (Abraham und Shaham 2004).

Die Nogo-A-Färbung in ihrer Funktion als Nachweis für apoptotische Oligodendrozyten findet noch ca. 15% der in der H.E.-Färbung beobachteten Apoptosen. Dies könnte einerseits bedeuten, dass nur ein Teil der apoptotischen Zellen tatsächlich Oligodendrozyten sind, so könnten beispielsweise auch Astrozyten, Mikrogliazellen oder Oligodendrozytenvorläuferzellen absterben. Diese Hypothese steht allerdings im Widerspruch mit der bekannten Literatur, die zeigt, dass die von Cuprizin überwiegend geschädigte Zellpopulation größtenteils reife Oligodendrozyten sind (Hesse et al. 2010; Veto et al. 2010). Auch wurden hier in der Mac-3-Immunhistochemie keine apoptotischen Mikrogliazellen gefunden. Die andere, weit wahrscheinlichere Erklärung für den geringen Prozentsatz der Nogo-A-positiven apoptotischen Zellen ist, dass während des Ablaufs der Apoptose zunehmend die zelltypspezifischen Marker, in diesem Fall Nogo-A, aufgrund des Abbaus zellulärer Proteine verloren gehen.



## 4.4 Ausblick

Die Auswirkung des Dopaminsystems auf Oligodendrozytenvorläuferzellen (OPCs) und Remyelinisierung ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Ein Ansatz beispielsweise ist die Untersuchung von OPCs z.B. vor dem Hintergrund der in dieser Arbeit untersuchten Fragestellungen:

1. In welchem Ausmaß sind auch OPCs von Wildtyp- und Dopaminrezeptor-defizienten Mäusen von der Cuprizin-Toxizität betroffen? Beeinflusst die Cuprizin-Toxizität oder die Dopaminrezeptor-Defizienz die Proliferation von OPCs?
2. Steigt unter Gabe eines Dopaminagonisten die Proliferation der OPCs?

## 5 Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine entzündlich-entmarkende Erkrankung des Zentralnervensystems mit Destruktion der Myelinscheiden, axonaler Schädigung und nur bedingter Remyelinisierung. In nicht remyelinisierten MS-Läsionen findet sich häufig ein deutlicher Verlust an Oligodendrozyten. Der Untergang der Oligodendrozyten findet ganz überwiegend zu Beginn der Läsionsbildung statt.

In dieser Arbeit wurde der Effekt der Dopaminrezeptoren D2 (DRD2) und D3 (DRD3) sowie des Dopaminagonisten Pramipexol auf das oligodendrogliale Überleben im Modell der Cuprizin-induzierten toxischen Entmarkung getestet. Arbeiten in der Literatur hatten eine Expression von DRD2 und DRD3 auf Oligodendrozytenvorläuferzellen und einen Effekt auf das Ausmaß der Oligodendrozytendichte gezeigt.

Unsere Hypothese war, dass Dopaminrezeptor-defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtyp (wt)-Mäusen eine erhöhte Vulnerabilität der Oligodendrozyten zeigen. Weiterhin sollte untersucht werden, inwieweit die Therapie mit Pramipexol, einem Dopamin-D3-Rezeptor-Agonisten, rezeptorunabhängig oder rezeptorabhängig zu einem Schutz der Oligodendrozyten führt.

Mit Hilfe verschiedener histologischer und immunhistochemischer Methoden wurde die Dichte der apoptotischen Oligodendrozyten sowie der aktivierten Mikrogliazellen, die Rückschlüsse auf das Ausmaß der Gewebeschädigung zulassen, bestimmt.

Wir konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Dichte apoptotischer Oligodendrozyten oder aktivierter Mikrogliazellen zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen feststellen. In einem einzigen Versuch zeigten sich mehr apoptotische Oligodendrozyten in den Tieren der Wildtyp-PBS (*phosphate buffered saline*)-Gruppe im Vergleich zu den Pramipexol-behandelten DRD3-Knockout-Mäusen, was möglicherweise Rückschlüsse auf rezeptorunabhängige Effekte von Pramipexol erlaubt. Diese Ergebnisse müssen aber in weitergehenden Forschungen im Detail reproduziert und verifiziert werden.

Somit bleibt festzuhalten, dass das endogene Dopaminrezeptorsystem nach unseren Ergebnissen keine entscheidende Rolle bei der Protektion von Oligodendrozyten bei Cuprizon-induziertem Schaden spielt. Auch ein präventiv-protektiver Effekt von Pramipexol kann nach unserer Datenlage nicht sicher bestätigt werden.

## 6 Literatur

Abraham MC, Shaham S (2004): Death without caspases, caspases without death. *Trends Cell Biol* 14 (4), 184-193

Alvarez-Nemegyei J, Cobarrubias-Cobos A, Escalante-Triay F, Sosa-Munoz J, Miranda JM, Jara LJ (1998): Bromocriptine in systemic lupus erythematosus: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Lupus* 7 (6), 414-419

Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP (2001): TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 4 (11), 1116-1122

Ascherio A, Munger KL (2010): Epstein-barr virus infection and multiple sclerosis: a review. *J Neuroimmune Pharmacol* 5 (3), 271-7

Back SA, Tuohy TM, Chen H, Wallingford N, Craig A, Struve J, Luo NL, Banine F, Liu Y, Chang A, Trapp BD, Bebo BF Jr, Rao MS, Sherman LS (2005): Hyaluronan accumulates in demyelinated lesions and inhibits oligodendrocyte progenitor maturation. *Nat Med* 11 (9), 966-972

Blakemore WF (1972): Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice. *J Neurocytol* 1 (4), 413-236

Blakemore WF (1973a): Demyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse induced by cuprizone. *J Neurol Sci* 20 (1), 63-72

Blakemore WF (1973b): Remyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse following demyelination induced by feeding cuprizone. *J Neurol Sci* 20 (1), 73-83

Blakemore WF, Irvine KA (2008): Endogenous or exogenous oligodendrocytes for remyelination. *J Neurol Sci* 265 (1-2), 43-46

Blakemore WF, Keirstead HS (1999): The origin of remyelinating cells in the central nervous system. *J Neuroimmunol* 98 (1), 69-76

Bongarzone ER, Howard SG, Schonmann V, Campagnoni AT (1998): Identification of the Dopamine D3 Receptor in Oligodendrocyte Precursors: Potential Role in Regulating Differentiation and Myelin Formation. *J Neurosci* 18 (14), 5344-5353

Bornstein MB, Raine C (1970): Experimental allergic encephalomyelitis. Antiserum inhibition of myelination in vitro. *Lab Invest* 23 (5), 536-539

Brück W, Stadelmann C (2005): The spectrum of multiple sclerosis: new lessons from pathology. *Curr Opin Neurol* 18 (3), 221-224

Brück W, Kuhlmann T, Stadelmann C (2003): Remyelination in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 206 (2), 181-185

Burne JF, Staple JK, Raff MC (1996): Glial cells are increased proportionally in transgenic optic nerves with increased numbers of axons. *J Neurosci* 16 (6), 2064-2073

Butt AM, Hornby MF, Kirvell S, Berry M (1997): Platelet-derived growth factor delays oligodendrocyte differentiation and axonal myelination in vivo in the anterior medullary velum of the developing rat. *J Neurosci Res* 48 (6), 588-596

Buttery PC, French-Constant C (1999): Laminin-2/integrin interactions enhance myelin membrane formation by oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci* 14 (3), 199-212

Cai J, Qi Y, Hu X, Tan M, Liu Z, Zhang J, Li Q, Sander M, Qiu M (2005): Generation of oligodendrocyte precursor cells from mouse dorsal spinal cord independent of Nkx6 regulation and Shh signaling. *Neuron* 45 (1), 41-53

Camara J, French-Constant C (2007): Lessons from oligodendrocyte biology on promoting repair in multiple sclerosis. *J Neurol* 254 (Suppl 1), 15-22

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

Cho DI, Quan W, Oak MH, Choi HJ, Lee KY, Kim KM (2007): Functional interaction between dopamine receptor subtypes for the regulation of c-fos expression. *Biochem Biophys Res Commun* 357 (4), 1113-1118

Chun SJ, Rasband MN, Sidman RL, Habib AA, Vartanian T (2003): Integrin-linked kinase is required for laminin-2-induced oligodendrocyte cell spreading and CNS myelination. *J Cell Biol* 163 (2), 397-408

Copray JC, Küst BM, Mantingh-Otter I, Boddeke HWGM (2005): p75<sup>NTR</sup> independent oligodendrocyte death in cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *Neuropathol Appl Neurobiol* 31 (6), 600-609

Costanza RM, Barber DJ, Terry P (2001): Antagonism of the discriminative stimulus effects of cocaine at two training doses by dopamine D2-like receptor antagonists. *Psychopharmacology* 158 (2), 146-153

Deckert M, Reifenberger G, Riede UN, Schlote W, Thal DR, Wiestler OD: Nervensystem, in: Allgemeine und spezielle Pathologie, hrsg v. Riede UN, Werner M, Schaefer HE; 5. Auflage, *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart 2004, 1088-1089

De Keyser J (1993): Subtypes and localization of dopamine receptors in human brain. *Neurochem Int* 22 (2), 83-93

Deutsche Gesellschaft für Neurologie, (2008): Diagnostik und Therapie der Multiplen Sklerose, Leitlinien der DGN 2008; <http://www.dgn.org/neurologische-leitlinien-online/inhalte-a-z/437-leitlinien-der-dgn-diagnostik-und-therapie-der-multiplen-sklerose.html>

Diener HC, Putzki N: Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie; 4. Auflage, *Georg Thieme Verlag KG*, Stuttgart 2008, 363-474

Dijkstra CD, van der Voort ER, De Groot CJ, Huitinga I, Uitdehaag BM, Polman CH, Berkenbosch F (1994): Therapeutic effect of the D2-dopamine agonist bromocriptine on acute and relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *Psychoneuroendocrinol* 19 (2), 135-142

Fernandez PA, Tang DG, Cheng L, Prochiantz A, Mudge AW, Raff MC (2000): Evidence that axon-derived neuregulin promotes oligodendrocyte survival in the developing rat optic nerve. *Neuron* 28 (1), 81-90

Foote AK, Blakemore WF (2005): Inflammation stimulates remyelination in areas of chronic demyelination. *Brain* 128 (3), 528-539

Franklin RJ (2002): Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nat Rev Neurosci* 3 (9), 705-714

Fujita N, Ishiguro H, Sato S, Kurihara T, Kuwano R, Sakimura K, Takahashi Y, Miyatake T (1990): Induction of myelin-associated glycoprotein mRNA in experimental remyelination. *Brain Res* 513 (1), 152-155

Gallo V, Zhou JM, McBain J, Wright P, Knutson PL, Armstrong RC (1996): Oligodendrocyte progenitor cell proliferation and lineage progression are regulated by glutamate receptor-mediated K<sup>+</sup> channel block. *J Neurosci* 16 (8), 2659-2670

Gleixner C, Müller M, Wirth SB: Neurologie und Psychiatrie für Studium und Praxis; 5. Auflage, *Medizinische Verlags- und Informationsdienste*, Breisach 2007, 69-74

Gold R, Rieckmann P (2007): Fortschritte im Verständnis von Pathogenese und Immuntherapie der Multiplen Sklerose. *Nervenarzt* 78 (Suppl 1), 15-24

Heinrich PC, Haan S, Herrmanns HM, Löffler G, Müller-Newen G, Schaper F: Kommunikation zwischen Zellen: Extrazelluläre Signalmoleküle, Rezeptoren und Signaltransduktion, in: Biochemie und Pathobiochemie, hrsg. von Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC; 8. Auflage, *Springer-Verlag*, Berlin 2007, 767-774

Hesse A, Wagner M, Held L, Brück W, Salinas-Riester G, Hao Z, Waisman A, Kuhlmann T (2010): In toxic demyelination oligodendroglial cell death occurs early and is FAS independent. *Neurobiol Dis* 37 (2), 362-369

Hiremath MM, Saito Y, Knapp GW, Ting JP-Y, Suzuki K, Matsushima GK (1998): Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol* 92 (1-2), 38-49

Hohlfeld R, Wekerle H (2001): Immunological update on multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 14 (3), 299-304



Ickenstein G, Höhlig K: Pathogenetische Zusammenhänge und Therapieoptionen der Multiplen Sklerose, in: Multiple Sklerose: Krankheitsbewältigung - Therapiemotivation - Lebensqualität, hrsg v. Twork S, Kugler J, *Springer-Verlag*, Berlin 2007, 1-27

Jaber M, Robinson SW, Missale C, Caron MG (1996): Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* 35 (11), 1503-1519

Kihara T, Shimohama S, Sawada H, Honda K, Nakamizo T, Kanki R, Yamashita H, Akaike A (2002): Protective effect of dopamine D2 agonists in cortical neurons via the phosphatidylinositol 3 kinase cascade. *J Neurosci Res* 70 (3), 274-282

Kitazumi I, Tsukahara M (2011): Regulation of DNA fragmentation: the role of caspases and phosphorylation. *FEBS J* 278 (3), 427-441

Kleinschnitz C, Meuth SG, Kieseier BC, Wiendl H (2007): Update on pathophysiologic and immunotherapeutic approaches for the treatment of multiple sclerosis. *Nervenarzt* 78 (8), 883-911

Kotter MR, Setzu A, Sim FJ, Van Rooijen N, Franklin RJ (2001): Macrophage depletion impairs oligodendrocyte remyelination following lysolecithin-induced demyelination. *Glia* 35 (3), 204-212

Kuhlmann T, Lucchinetti C, Zettl UK, Bitsch A, Lassmann H, Brück W (1999): Bcl-2-expressing oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. *Glia* 28 (1), 34-39

Kuhlmann T, Remington L, Maruschak B, Owens T, Brück W (2007): Nogo-A is a reliable oligodendroglial marker in adult human and mouse CNS and in demyelinated lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 66 (3), 238-246

Kuhlmann T, Miron V, Cuo Q, Wegner C, Antel J and Brück W (2008): Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain* 131 (7), 1749-1758

---

Kumar S, Biancotti JC, Yamaguchi M, de Vellis J (2007): Combination of growth factors enhances remyelination in a cuprizone-induced demyelination mouse model. *Neurochem Res* 32 (4-5), 783-797

Lahoste GJ, Yu J, Marshall JF (1993): Striatal fos expression is indicative of dopamine D1/D2 synergism and receptor super-sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (16), 7451-7455

Landwehrmeyer B, Mengod G, Palacios JM (1993): Differential visualization of dopamine D2 and D3 receptor sites in rat brain. A comparative study using in situ hybridization histochemistry and ligand binding autoradiography. *Eur J Neurosci* 5 (2), 145-153

Lang G: Histotechnik. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik; 1. Auflage, *Springer-Verlag*, Berlin 2006, 183-194 und 265-283

Lassmann H (1983): Comparative neuropathology of chronic experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Schriftenr Neurol* 25, 1-135

Lindert RB, Haase CG, Brehm U, Linington C, Werkele H, Hohlfeld R (1999): Multiple sclerosis: B- and T-cell responses to the extracellular domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Brain* 122 (Pt.11), 2089-2100

Lindner M: Characterization of toxin induced de- and remyelination in the central nervous system and role of the chemokine receptor CXCR2. *Med.vet.diss. Tierärztliche Hochschule Hannover* 2007, 17-26 und 52-93

Lindner M, Heine S, Haastert K, Garde N, Fokuhl J, Linsmeier F, Grothe C, Baumgärtner W, Stangel M (2008): Sequential myelin protein expression during remyelination reveals fast and efficient repair after central nervous system demyelination. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34 (1), 105-114

---

Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (Hrsg.): Biochemie und Pathobiochemie, 8. Auflage, *Springer -Verlag*, Berlin 2007, 767-774

Lublin FD, Reingold SC (1996): Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology* 46 (4), 907-911

Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (1999): A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study of 113 cases. *Brain* 122 (Pt.12), 2279-2295

Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000): Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47 (6), 707-717

Ludwin SK (1978): Central nervous system demyelination and remyelination in the mouse. An ultrastructural study of cuprizone toxicity. *Lab Invest* 39 (6), 597-612

Mason JL, Jones J, Taniike M, Morell P, Suzuki K, Matsushima GK (2000): Mature oligodendrocytes apoptosis precedes IGF-1 production and oligodendrocyte progenitor accumulation and differentiation during demyelination/ remyelination, *J Neurosci Res* 61 (3), 251-262

Mason JL, Langaman C, Morell P, Suzuki K, Matsushima GK (2001): Episodic demyelination and subsequent remyelination within the murine central nervous system: changes in axonal calibre. *Neuropathol Appl Neurobiol* 27(1), 50-58

Matsushima GK, Morell P (2001):The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol* 11 (1), 107-116

McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W,

Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS (2001): Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50(1), 121-127

McMurray RW (2001): Bromocriptine in rheumatic and autoimmune diseases. *Semin Arthritis Rheum* 31 (1), 21-32

Mi S, Miller RH, Lee X, Scott ML, Shulag-Morskaya S, Shao Z, Chang J, Thill G, Lecesque M, Zhang M, Hession C, Sah D, Trapp B, He Z, Jung V, McCoy JM, Pepinsky RB (2005): LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat Neurosci* 8 (6), 745-751

Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Birchmeier C, Role L, Lai C, Schwab MH, Nave KA (2004): Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* 304 (5671), 700-703

Mierau J, Schneider FJ, Ensinger HA, Chio CL, Lajiness ME, Huff RM (1995): Pramipexole binding and activation of cloned and expressed dopamine D2, D3 and D4 receptors. *Eur J Pharmacol* 290 (1), 29-36

Millan MJ, Dekeyne A, Rivet JM, Dubuffet T, Lavielle G, Brocco M (2000): I. S33084, a novel, potent, selective and competitive antagonist at dopamine D3-receptors. II. Functional and behavioral profile compared with GR218,231 and L741,626. *J Pharmacol Exp Ther* 293 (3), 1063-1073

Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998): Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiol Rev* 78 (1), 189 - 225

Morell P, Barrett CV, Mason JL, Toews AD, Hostettler JD, Knapp GW, Matsushima GK (1998): Gene expression in the brain during cuprizone-induced demyelination and remyelination. *Mol Cell Neurosci* 12 (4-5), 220-227

Mottola DM, Brewster WK, Cook LL, Nichols DE, Mailman RB (1992): Dihydroxydopamine, a novel full efficacy D1 dopamine receptor agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 262 (1), 383-393

Murphy TH, Schnaar RL, Coyle JT (1990): Immature cortical neurons are uniquely sensitive to glutamate toxicity by inhibition of cystine uptake. *FASEB J* 4 (6), 1624-1633

Noh JS, Kim EY, Kang JS, Kim HR, Oh YJ, Gwag BJ (1999): Neurotoxic and neuroprotective actions of catecholamines in cortical neurons. *Exp Neurol* 159 (1), 217-224

Ogawa N (1995): Molecular and chemical neuropharmacology of dopamine receptor subtypes. *Acta Med Okayama* 49 (1), 1-11

Oka A, Belliveau MJ, Rosenberg PA, Volpe JJ (1993): Vulnerability of oligodendroglia to glutamate: pharmacology, mechanisms, and prevention. *J Neurosci* 13 (4), 1441-1453

Orrego JJ, Chandler WF, Barkan AL (2000): Pergolide as primary therapy for macroprolactinomas. *Pituitary* 3 (4), 251-256

Pasquini LA, Calatayud CA, Bertone Una AL, Millet V, Pasquini JM, Soto EF (2007): The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia. *Neurochem Res* 32 (2), 279-292

Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Brück W, Lucchinetti C, Lassmann H (2006): Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain* 129 (Pt. 12), 3165-3172

Perachon S, Schwartz JC, Sokoloff P (1999): Functional potencies of new antiparkinsonian drugs at recombinant human dopamine D1, D2 and D3 receptors. *Eur J Pharmacol* 366 (2-3), 293-300

Piercey MF, Hoffmann WE, Smith MW, Hyslop DK (1996): Inhibition of dopamine neuron firing by pramipexole, a dopamine D3 receptor-preferring agonist: comparison to other dopamine receptor agonists. *Eur J Pharmacol* 312 (1), 35-44

Pillai G, Brown NA, McAllister G, Milligan G, Seabrook GR (1998): Human D2 and D4 dopamine receptors couple through beta gamma G-protein subunits to inwardly rectifying K1 channels (GIRK1) in a Xenopus oocyte expression system: selective antagonism by L-741,626 and L-745,870 respectively. *Neuropharmacology* 37 (8), 983-987

Poeck W, Hacke K: Neurologie ,12. Auflage, *Springer-Verlag*, Berlin 2006, 490-505

Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, Johnson KP, Sibley WA, Silberberg DH, Tourtellotte WW, (1983): New diagnostics criteria for multiple sclerosis : guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 13 (3), 227-231

Prineas JW, Barnard RO, Kwon EE, Sharer LR, Cho ES (1993): Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Ann Neurol* 33 (2), 137-151

Raine CS, Wu E (1993): Multiple sclerosis: remyelination in acute lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 52 (2), 199-204

Ratan RR, Murphy TH, Baraban JM (1994): Macromolecular synthesis inhibitors prevent oxidative stress-induced apoptosis in embryonic cortical neurons by shunting cysteine from protein synthesis to glutathione. *J Neurosci* 14 (7), 4385-4392

Riede UN, Schäfer HE, Werner M: Allgemeine und spezielle Pathologie. 5. Auflage, *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart 2004,1088-1089

Riskind PN, Massacesi L, Doolittle TH, Hauser SL (1991): The role of prolactin in autoimmune demyelination: suppression of experimental allergic encephalomyelitis by bromocriptine. *Ann Neurol* 29 (5), 542-547

Robertson GS, Jian M (1995): D1 and D2 dopamine receptors differentially increase Fos-like immunoreactivity in accumbal projections to the ventral pallidum and midbrain. *Neuroscience* 64 (4), 1019-1034

Robertson GS, Vincent SR, Fibiger HC (1992): D1 and D2 dopamine receptors differentially regulate *c-fos* expression in striatonigral and striatopallidal neurons. *Neuroscience* 49 (2), 285-296

Rosin C, Bates TE, Skaper SD (2004): Excitatory amino acid induced oligodendrocyte cell death in vitro: receptor-dependent and -independent mechanisms. *J Neurochem* 90 (5), 1173-1185

Rosin C, Colombo S, Calver AA, Bates TE, Skaper SD (2005): Dopamine D2 and D3 Receptor agonists limit oligodendrocyte injury caused by glutamate oxidative stress and oxygen/glucose deprivation. *Glia* 52 (4), 336-343

Rowitch DH (2004): Glial specification in the vertebrate neural tube. *Nat Rev Neurosci* 5 (5), 409-419

Sawada H, Shimohama S, Tamura Y, Kawamura T, Akaike A, Kimura J (1996): Methylphenylpyridium ion (MPP<sup>+</sup>) enhances glutamate-induced cytotoxicity against dopaminergic neurons in cultured rat mesencephalon. *J Neurosci Res* 43 (1), 55-62

Sawada H, Ibi M, Kihara T, Urushitani M, Akaike A, Kimura J, Shimohama S (1998): Dopamine D2-type agonists protect mesencephalic neurons from glutamate neurotoxicity: mechanisms of neuroprotective treatment against oxidative stress. *Ann Neurol* 44 (1), 110-119

Sethy VH, Wu H, Oosveen J.A, Hall ED (1997): Neuroprotective effects of dopamine agonists pramipexole and bromocriptine in 3-acetylpyridine-treated rats. *Brain Res* 754 (1-2), 181-186

Skripuletz T, Lindner M, Kotsiari A, Garde N, Fokuhl J, Linsmeier F, Trebst C, Stangel M (2008): Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent. *Am J Pathol* 172 (4), 1053-1061

Sobel RA, Chen M, Maeda A, Hinojoza JR (1995): Vitronectin and integrin vitronectin receptor localization in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 54 (2), 202-213

Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC (1990): Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* 347 (6289), 146-151

Sommer N: MS - eine neuroendokrine Erkrankung, in: Gehirn und Geschlecht hrsg. v. Lautenbacher S, Güntürkün O, Hausmann M; 1. Auflage, *Springer-Verlag*, Berlin 2007, 249 - 267

Stadelmann C, Lassmann H (2000): Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res* 301 (1), 19-31

Stadelmann C , Brück W (2008): Interplay between mechanisms of damage and repair in multiple sclerosis. *J Neurol* 255 (Suppl 1), 12-18

Stiasny K, Wetter TC, Trenkwalder C, Oertel WH (2000): Restless legs syndrome and its treatment by dopamine agonists. *Parkinsonism Relat Disord* 7 (1), 21-25

Suzuki K (1969): Giant hepatic mitochondria: production in mice fed with cuprizone. *Science* 163 (862), 81-82



Suzuki K, Kikkawa Y (1969): Status spongiosus of CNS and hepatic changes induced by cuprizone (biscyclohexanone oxalyldihydrazone). *Am J Pathol* 54 (2), 307-325

Takashima H, Tsujihata M, Kishikawa M, Freed WJ (1999): Bromocriptine protects dopaminergic neurons from levodopa-induced toxicity by stimulating D2 receptors. *Exp Neurol* 159 (1), 98-104

ter Meulen, V (1988): Autoimmune reactions against myelin basic protein induced by corona and measles viruses. *Ann N Y Acad Sci* 540, 202-209

Torkildsen O, Brunborg LA, Myhr KM, Bo L (2008): The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurol Scand Suppl* 188, 72-76

Venturini G (1973): Enzymic activities and sodium, potassium and copper concentrations in mouse brain and liver after cuprizone treatment in vivo. *J Neurochem* 21 (5), 1147-1151

Veto S, Acs P, Bauer J, Lassmann H, Berente Z, Setalo G Jr, Borgyła G, Sumegi B, Komoly S, Gallyas F Jr, Illes Z (2010): Inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase: a potential therapy against oligodendrocyte death. *Brain* 133 (3), 822-834

Viehover A, Miller RH, Park SK, Fischbach G, Vartanian T (2001): Neuregulin: an oligodendrocyte growth factor absent in active multiple sclerosis lesions. *Dev Neurosci* 23 (4-5), 377-386

Weimerskirch PR, Ernst ME (2001): Newer dopamine agonists in the treatment of restless legs syndrome. *Ann Pharmacother* 35 (5), 627-630

---

Wiendl H, Lehmann HC, Hohlfeld R, Hartung HP, Kieseier BC (2004): Multiple Sklerose: potenzielle Therapieansätze und Update laufender Studien. *Nervenarzt* 75 (6), 536-552

Wiendl H, Kieseier BC, Gold R, Hohlfeld R, Bendtsen M, Hartung HP (2006): Multiple Sklerose - Revision der neuen McDonald-Diagnosekriterien. *Nervenarzt* 77 (10), 1235-1245

Wiethölter H: Multiple Sklerose; in: *Klinische Neurologie*; hrsg. v. Berlit P; 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin 2006, 1105-1137

Zettl UK, Eilhard M, Hartung HP (2004): Diagnostische Kriterien der Multiplen Sklerose - aktuelle Aspekte. *psychoneuro* 30 (7), 370-374

Zhang YW, Denham J, Thies RS (2006): Oligodendrocyte progenitor cells derived from human embryonic stem cells express neurotrophic factors. *Stem Cells Dev* 15 (6), 1473-1490

Zhao C, Fancy SP, Kotter MR, Li WW, Franklin RJ (2005): Mechanisms of CNS remyelination - the key to therapeutic advances. *J Neurol Sci* 233 (1-2), 87-91

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	4
Abb. 2	6
Abb. 3	18
Abb. 4	19
Abb. 5	20
Abb. 6	37
Abb. 7	40
Abb. 8	41
Abb. 9	41
Abb. 10	42
Abb. 11	42
Abb. 12	43
Abb. 13	44
Abb. 14	44
Abb. 15	46
Abb. 16	47
Abb. 17	48
Abb. 18	49
Abb. 19	50
Abb. 20	51
Abb. 21	52
Abb. 22	53
Abb. 23	55
Abb. 24	55

## 8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	.....	27
Tab. 2	.....	28
Tab. 3	.....	28
Tab. 4	.....	29

## Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen, die mir die Erstellung dieser Arbeit ermöglichten und stets unterstützend zur Seite standen, herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. W. Brück danke ich dafür, dass ich diese wissenschaftliche Arbeit in seiner Abteilung durchführen konnte.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Christine Stadelmann-Nessler für den Vorschlag des Dissertationsthemas, das entgegengebrachte Vertrauen bei der Durchführung der Arbeit, die kontinuierliche tatkräftige Unterstützung über die gesamte Zeit und die vielen investierten Stunden. Danke auch für die äußerst wertvollen Hilfestellungen bei der Erstellung der vorliegenden Dissertation, die Geduld und die stets freundliche Zusammenarbeit in äußerst angenehmer Atmosphäre.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter der Abteilung für die Beratung und die Mitarbeit bei meiner wissenschaftlichen Tätigkeit und die stets vorhandenen unermüdlichen Hilfestellungen bei aufkommenden Fragen.

## Lebenslauf

Am 11.März 1982 wurde ich, Katharina Schultz, als Tochter von Frau Karin Schultz, geb. Meyer, und Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Schultz in Göttingen geboren.

Von 1988 bis 1992 besuchte ich die Grundschule Elliehausen in Göttingen-Elliehausen und anschließend von 1992 bis 1994 die Orientierungsstufe Lutherschule in Göttingen. Von 1994 bis zum Erhalt der Allgemeinen Hochschulreife im Juni 2001 war ich Schülerin des Max-Planck-Gymnasiums Göttingen.

Im April 2002 nahm ich an der Georg-August-Universität zu Göttingen das Studium der Humanmedizin auf.

Im April 2004 legte ich die Ärztliche Vorprüfung ab.

Mein Praktisches Jahr absolvierte ich von Februar 2007 bis Januar 2008 am Klinikum Bremen-Mitte sowie im Spital Uster, Kanton Zürich, Schweiz.

Nach erfolgreich bestandener Ärztlicher Prüfung im November 2008 wurde mir am 8. Dezember 2008 die Approbation als Ärztin erteilt.

Meine Promotion bei Frau Prof. Dr. med. Stadelmann am Institut für Neuropathologie der Universität Göttingen begann ich im Januar 2008.

Seit dem 18.05.2009 arbeite ich als Assistenzärztin bei Herrn Dr. med. Niemann in der Abteilung für Unfall- und orthopädische Chirurgie des Evangelischen Krankenhauses in Oldenburg.