

De- und Remyelinisierung im Mausmodell der Metachromatischen Leukodystrophie

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von

Klaudia Brysch

aus

Köln

Bonn, Juni 2017

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter	PD Dr. Matthias Eckhardt
2. Gutachter	Prof. Dr. Christoph Thiele

Tag der Promotion: 14.12.2018

Erscheinungsjahr: 2019

Inhaltsverzeichnis

<i>I.</i>	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	7
<i>II.</i>	<i>Tabellenverzeichnis</i>	9
<i>III.</i>	<i>Formelverzeichnis</i>	9
<i>IV.</i>	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	10
<i>V.</i>	<i>Verwendete Einheiten</i>	12
<i>VI.</i>	<i>Zusammenfassung</i>	13
1	Einleitung	14
1.1	Die Myelinisierung des Nervensystems	14
1.2	Metachromatische Leukodystrophie	18
1.3	Cuprizon-induzierte Demyelinisierung	23
1.4	Zielsetzung	25
2	Materialien	26
2.1	Geräte	26
2.2	Verbrauchsmaterialien	26
2.3	Verwendete Chemikalien	27
2.3.1	Chemikalien.....	27
2.3.2	Reagenziensätze.....	27
2.3.3	Standards.....	27
2.4	Verwendete Antikörper	27
2.4.1	Primärantikörper.....	27
2.4.2	Sekundärantikörper.....	28
2.5	Verwendete Mauslinien	28
2.5.2	ASA-Knockout-Maus.....	29
2.5.3	CST-transgene ASA-Knockout-Maus.....	29
2.6	Verwendete Primer	29
2.6.1	Für Genotypisierungs-PCR.....	29
2.6.2	Für qReal Time PCR.....	30
2.7	Puffer und Lösungen	30
2.7.2	Lösungen für Perfusion.....	32
2.7.3	Lösungen für Hämalaun-Gegenfärbung.....	32
2.7.4	Lösungen für Alzian-Blau-Färbung.....	33
2.7.5	Lösungen für Immunfluoreszenz.....	33

2.7.6	Lösungen für Lipide	33
2.7.7	Proteaseinhibitoren für Gewebehomogenate	33
3	Methoden	34
3.1	Versuchstiere	34
3.1.1	Haltung	34
3.1.2	Ohrmarken	34
3.2	Genotypisierung.....	34
3.2.1	Extraktion der genomischen DNA aus Gewebe	34
3.2.2	Polymerasekettenreaktion	35
3.2.3	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	36
3.3	Untersuchung der Genexpression.....	37
3.3.1	Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion von RNA	37
3.3.2	Aufreinigung von RNA	37
3.3.3	Denaturierende RNA-Agarose-Gelelektrophorese	38
3.3.4	cDNA-Synthese.....	38
3.3.5	Quantitative Real Time-Polymerase-Kettenreaktion.....	39
3.4	Cuprizon-Behandlung.....	40
3.4.1	Einfacher Zyklus.....	40
3.4.2	Zweifacher Zyklus	40
3.5	Histologische und immunhistologische Methoden	41
3.4.1	Perfusion und Fixierung	41
3.4.2	Gewebeschnitte	41
3.4.3	Färbung der Zellkerne mit Hämalaun	42
3.4.4	Alzian Blau Färbung von Sulfatid.....	42
3.4.5	Sudan Schwarz B Färbung von Myelin.....	44
3.4.6	Immunfluoreszenzfärbung	44
3.4.6.1	Reduktion von Aldimin-bedingter Autofluoreszenz.....	44
3.4.6.2	Immunfluoreszenzfärbung	45
3.4.6.3	Reduktion der Lipofuszin-bedingten Autofluoreszenz mit Sudan Schwarz B	46
3.4.7	Eindecken von Gewebeschnitten.....	46
3.6	Molekularbiologische Methoden: Lipide	47
3.6.1	Gewebehomogenisierung	47
3.6.2	Lipidextraktion	47
3.6.3	Alkalische Hydrolyse.....	47
3.6.4	Umkehrphasenchromatographie nach Williams und McCluer, 1980.....	48
3.6.4.1	Herstellung des RP-18-Sorptionsmittels	48

3.6.4.2 Umkehrphasenchromatographie	48
3.6.5 Dünnschichtchromatografie	49
3.6.6 Massenspektrometrische Analyse des Lipidextrakte	49
3.7 Molekularbiologische Methoden: Proteine.....	53
3.7.1 Lyse.....	53
3.7.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung	53
3.7.3 Natriumdodecyl-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	53
3.7.4 “Western Blot”	54
3.7.5 Quantifizierung von Zytokinen mit dem Bio-Plex® Immunoassay System von BioRad	55
3.8 Quantifizierung von NG2-positiven Zellen in Gehirn mittels Immunfluoreszenzfärbung	56
3.8.1 Gemischte Primärkultur	56
3.8.2 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen.....	56
4 Ergebnisse.....	58
4.1 Genetischer Hintergrund der Versuchstiere und statistische Auswertung des Tierexperiments	59
4.2 CPZ-induzierte Reduktion des Körpergewichts in ASA-defizienten Mäusen...60	
4.3 Sudan Schwarz B-Färbung von Myelin.....62	
4.4 IF-Färbung der Myelinproteine.....67	
4.5 Quantifizierung der Myelinproteine	71
4.5.1 Basisches Myelinprotein	71
4.5.1.1 Konventionelles MLD-Mausmodell	72
4.5.1.2 CST-transgenes MLD-Mausmodell	75
4.5.2 Proteolipid-Protein	78
4.5.2.1 Konventionelles MLD-Mausmodell	78
4.5.2.2 CST-transgenes MLD-Mausmodell	82
4.5.3 2',3'-Zyklische Nukleotid-3'-phosphodiesterase	85
4.5.3.1 Konventionelles MLD-Mausmodell	85
4.5.3.2 CST-transgenes MLD-Mausmodell	88
4.5.4 Oligodendrozyten-spezifischer Transkriptionsfaktor 2.....	90
4.5.4.1 Konventionelles MLD-Mausmodell	90
4.5.4.2 CST-transgenes MLD-Mausmodell	93
4.6 Histologische Untersuchung des Corpus callosum	95
4.6.1 Cuprizon-induzierte Zellmigration: Oligodendrozytenvorläuferzellen	95
4.6.2 Cuprizon-induzierte Zellmigration: Mikrogliazellen	100
4.7 Lipidanalytik	105

4.7.1	Altersabhängige Veränderungen	107
4.7.1.1	Densitometrische Analyse	107
4.7.1.2	Massenspektrometrische Analyse.....	109
4.7.1.2.1	Überprüfung des linearen Zusammenhangs von Signalintensität und Stoffkonzentration im Massenspektrum	109
4.7.1.2.2	Identifizierung von N-Tetracosenoylsulfatid und N-Octadecanoylsulfatid im Massenspektrum von Lipidextrakt aus Gehirn	110
4.7.1.2.3	Einfluss von Alter und Genotyp auf das Verhältnis von C18:0- zu C24:1-Sulfatid im Gehirn der Maus	113
4.7.2	Cuprizon-induzierte Veränderungen der Lipidzusammensetzung des Gehirns	116
4.7.2.1	Densitometrische Analyse	116
4.7.2.1.1	Konventionelles MLD-Mausmodell	116
4.7.2.1.2	CST-transgenes MLD-Mausmodell.....	121
4.7.2.2	Massenspektrometrische Analyse.....	124
4.7.2.2.1	Konventionelles MLD-Mausmodell	125
4.7.2.2.2	CST-transgenes MLD-Mausmodell.....	128
4.8	Immunologische Antwort auf Cuprizon-induzierte Demyelinisierung.....	130
4.8.1	Astrogliose	130
4.8.1.1	GFAP-Immunfluoreszenzfärbung	131
4.8.1.1.1	Konventionelles MLD-Mausmodell	131
4.8.1.1.2	CST-transgenes MLD-Mausmodell.....	134
4.8.1.2	Quantifizierung von GFAP in „Western Blot“-Verfahren.....	135
4.8.1.2.1	Konventionelles MLD-Mausmodell	136
4.8.1.2.2	CST-transgenes MLD-Mausmodell.....	139
4.8.2	Mikrogliose	141
4.8.3	Zytokine.....	145
4.8.3.1	CPZ-Behandlung	146
4.8.3.1.1	<i>Konventionelles MLD-Mausmodell</i>	<i>146</i>
4.8.3.1.2	<i>CST-transgenes MLD-Mausmodell.....</i>	<i>149</i>
4.8.3.2	Einfluss des CST-Transgens auf die Immunantwort.....	150
5	Diskussion.....	154
5.1	Genetischer Hintergrund der Gründertiere	154
5.1.1	CST-Transgen.....	155
5.2	CPZ stört durch Komplexierung von Kupfer den Energiehaushalt des myelinisierenden Oligodendrozyten.....	156
5.3	Aufgrund der verzögerten Myelinogenese ist die CPZ-induzierte Demyelinisierung im Gehirn der ASA(-/-)-Maus stärker ausgeprägt, als in der ASA(+/-)-Maus.	157

5.4	Die Reifung der prä-Oligodendrozyten ist in der ASA(-/-)-Maus gehemmt und verhindert die effiziente Remyelinisierung im CPZ-Modell.....	158
5.5	Die Veränderung der Lipid-Rafts in der ASA(-/-)-Maus führt zur Verlangsamung des Myelinogenese.....	161
5.6	Die Remyelinisierungseffizienz ist im zweiten Behandlungszyklus reduziert.	165
5.7	Die CPZ-induzierte Sulfatid-Speicherung in ASA-defizienten Mäusen führt nicht zu Neuroinflammation.....	166
5.7.1	Die Art der Immunantwort entscheidet über den Phänotyp im MLD-Mausmodell.....	167
5.7.2	Methode Multiplex-ELISA: Durch Modifikation von Probe und Probenvorbereitung kann die Aussagekraft der Messung erhöht werden.	168
6	Fazit und Ausblick.....	170
7	Literaturverzeichnis	172
<i>VII.</i>	<i>Eidesstattliche Erklärung.....</i>	<i>187</i>
<i>VIII.</i>	<i>Danksagung.....</i>	<i>188</i>

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Myelinisiertes Axon. Elektronen-mikroskopische Aufnahme.....	15
Abbildung 2: Remyelinisierung im ZNS.	17
Abbildung 3: Synthese und Abbau von Sulfatid.....	18
Abbildung 4: Mögliche Struktur des Kupfer-Cuprizon-Komplexes.	24
Abbildung 5: Lokalisation der Schnittebene.....	41
Abbildung 6: Strukturformel von Alzian Blau.....	42
Abbildung 7: Strukturformel von Sudan Schwarz B.	44
Abbildung 8: Chemische Grundlage der Gewebefixierung mit Formaldehyd.	44
Abbildung 9: Nukleophile Addition unter Bildung einer Schiff-Base.....	45
Abbildung 10: Modell zur Ionenbildung im Elektrospray.	50
Abbildung 11: Schematische Darstellung einer Quadrupol-Ionenfalle.....	52
Abbildung 12: Aufbau des „Western Blot“ im halbtrockenen Verfahren.	55
Abbildung 13: Prinzip der xMap-Technologie von Luminex.....	56
Abbildung 14: Zeitlicher Ablauf der Cuprizon-Experimentes.....	58
Abbildung 15: Übersichtsdarstellung eines koronalen Gewebeschnittes durch das Großhirn.	62
Abbildung 16: Cuprizon-induzierte Demyelinisierung im Corpus callosum der konventionellen MLD-Maus nach einfacher Behandlung.....	63
Abbildung 17: Cuprizon-induzierte Demyelinisierung im Corpus callosum der konventionellen MLD-Maus ach wiederholter Behandlung.	64
Abbildung 18: Cuprizon-induzierte Demyelinisierung im Corpus callosum der CST-transgenen MLD-Maus.	65
Abbildung 19: IF-Färbung von MBP.	69
Abbildung 20: IF-Färbung von CNPase.	70
Abbildung 21: Exemplarische Darstellung der Immundetektion von MBP im „Western-Blot“-Verfahren.	71
Abbildung 22: Relative Proteinexpression von MBP im Gehirn der ASA(+/-)-Maus.	72
Abbildung 23: Relative Proteinexpression von MBP im Gehirn der ASA(-/-)-Maus.	73
Abbildung 24: Vergleichende Darstellung des Einflusses von CPZ auf die relative Expression von MBP im konventionellen MLD-Mausmodell.....	74
Abbildung 25: Relative Proteinexpression von MBP im Gehirn der transgenen MLD-Maus.....	76
Abbildung 26: Immundetektion von PLP im „Western-Blot“-Verfahren. Auftrennung im 10%igen SDS-Polyacrylamid-Gel.	78
Abbildung 27: Relative Proteinexpression von PLP im Gehirn der ASA(+/-)-Maus.	79
Abbildung 28: Relative Proteinexpression von PLP im Gehirn der ASA(-/-)-Maus.....	79
Abbildung 29: Genotypabhängiger Einfluss von CPZ auf die relative Expression von PLP im Gehirn der MLD-Maus.....	81
Abbildung 30: Relative Proteinexpression von PLP im Gehirn der CST-transgenen MLD-Maus.	82
Abbildung 31: Immundetektion von CNPase im „Western-Blot“-Verfahren. Auftrennung im 7.5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel.	85
Abbildung 32: Relative Proteinexpression von CNPase im Gehirn der ASA(+/-)-Maus.....	85
Abbildung 33: Relative Proteinexpression von CNPase im Gehirn der ASA(-/-)-Maus.....	86
Abbildung 34: Vergleichende Darstellung des Einflusses von CPZ auf die relative Expression von CNPase im konventionellen MLD-Mausmodell.....	87
Abbildung 35: Relative Proteinexpression von CNPase im Gehirn der CST-transgenen MLD-Maus.....	88
Abbildung 36: Immundetektion von Olig2 im „Western-Blot“-Verfahren. Auftrennung im 10%igen SDS-Polyacrylamid-Gel.	90
Abbildung 37: Relative Proteinexpression von Olig2 im Gehirn der ASA(+/-)-Maus.....	90
Abbildung 38: Relative Proteinexpression von Olig2 im Gehirn der ASA(-/-)-Maus.....	91
Abbildung 39: Vergleichende Darstellung des Einflusses von CPZ auf die relative Expression von Olig2 im konventionellen MLD-Mausmodell.....	92
Abbildung 40: Relative Proteinexpression von Olig2 im Gehirn der CST-transgenen MLD-Maus.....	93
Abbildung 41: Cuprizon-induzierte Zellinfiltration des Corpus callosum.	95
Abbildung 42: Identifizierung der in den Corpus callosum eingewanderten Zellen.....	96
Abbildung 43: Oligodendrozytenvorläuferzellen im Gehirn der ASA(-/-)-Maus.....	97
Abbildung 44: Cuprizon-induzierte Rekrutierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen in den Corpus callosum.....	99
Abbildung 45: Cuprizon-induzierte Sulfatidspeicherung im Großhirn der ASA(-/-)-Maus.	100
Abbildung 46: Cuprizon-induzierte Sulfatidspeicherung im Kleinhirn der ASA(-/-)-Maus.....	101

Abbildung 47: Cuprizon-induzierte und endogene Sulfatidspeicherung im Gehirn der ASA(-/-)-Maus.	101
Abbildung 48: Cuprizon-induzierte Sulfatidspeicherung im Corpus callosum konventioneller MLD-Mäuse nach einfacher Behandlung.	102
Abbildung 49: Cuprizon-induzierte Sulfatidspeicherung im Corpus callosum konventioneller MLD-Mäuse nach wiederholter Behandlung.	103
Abbildung 50: Cuprizon-induzierte Sulfatidspeicherung im Corpus callosum CST-transgener MLD-Mäuse.	104
Abbildung 51: Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Lipidextrakt aus Gehirn.	107
Abbildung 52: Einfluss von Alter und Genotyp auf die Lipidzusammensetzung im Gehirn der Maus.	108
Abbildung 53: ESI-MS-Kalibriergerade von N-Dodecanoylsulfatid.	110
Abbildung 54: MS ² -Spektrum von Lipidextrakt aus Gehirn.	110
Abbildung 55: N-Tetracosenoylsulfatid-Molekülon [M-H] ⁻ mit m/z 888.	111
Abbildung 56: Abhängigkeit des detektierten Fragmentions von der Lokalisierung der negativen Ladung im Molekülon.	111
Abbildung 57: Sulfatid-spezifische Fragmentierungskaskade.	112
Abbildung 58: Einfluss von Alter und Genotyp auf das Verhältnis von C18:0- zu C24:1-Sulfatid im Gehirn der Maus.	114
Abbildung 59: Einfluss von Alter und Genotyp auf die relativen Signalintensitäten von C18:0- und C24:1-Sulfatid im Massenspektrum von Lipidextrakt aus Gehirn.	114
Abbildung 60: Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Lipidextrakt aus Gehirn doppelt behandelter konventioneller MLD-Mäuse.	117
Abbildung 61: Cuprizon hat keinen Einfluss auf den Cholesterolgehalt im Gehirn der Maus.	117
Abbildung 62: Einfluss der Cuprizon-Behandlung auf den relativen Gehalt von Sulfatid und Galaktosylceramid im Gehirn der konventionellen MLD-Maus.	118
Abbildung 63: Einfluss von Cuprizon auf das Verhältnis von Sulfatid zu Galaktosylceramid im Gehirn der MLD-Maus.	120
Abbildung 64: Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Lipidextrakt aus Gehirn CST-transgener MLD-Mäuse.	121
Abbildung 65: Einfluss von Genotyp und Cuprizon-Behandlung auf den relativen Gehalt von Sulfatid und Galaktosylceramid im Gehirn der CST-transgenen MLD-Maus.	122
Abbildung 66: Einfluss von Genotyp und Cuprizon-Behandlung auf das Verhältnis von C18:0- zu C24:1-Sulfatid im Gehirn der Maus.	125
Abbildung 67: Cuprizon-induzierte Erhöhung der Konzentration von C18:0-Sulfatid im Gehirn der Maus.	126
Abbildung 68: Cuprizon-induzierte Astrogliose im konventionellen MLD-Mausmodell.	133
Abbildung 69: Cuprizon-induzierte Astrogliose im CST-transgenen MLD-Mausmodell.	134
Abbildung 70: Immundetektion von GFAP im „Western-Blot“-Verfahren. Auftrennung im 7,5%igen Polyacrylamid-Gel.	136
Abbildung 71: Relative Proteinexpression von GFAP im Gehirn der ASA(+/-)-Maus.	136
Abbildung 72: Relative Proteinexpression von GFAP im Gehirn der ASA(-/-)-Maus.	137
Abbildung 73: Vergleichende Darstellung des Einflusses von CPZ auf die relative Proteinexpression von GFAP im konventionellen MLD-Mausmodell.	138
Abbildung 74: Relative Proteinexpression von GFAP im Gehirn der CST-transgenen MLD-Maus.	140
Abbildung 75: Einfluss des Genotyps auf die Cuprizon-induzierte Mikrogliose im Gehirn der Maus.	142
Abbildung 76: Mikrogliale Lokalisation der Cuprizon-induzierten Sulfatid-Speicherung in der tgASA(-/-)-Maus. (....	144
Abbildung 77: Logistische Regressionsanalyse der BioPlex-Messung von Interleukin 1 β	146
Abbildung 78: Einfluss von Cuprizon auf die Zytokinexpression im Gehirn der MLD-Maus.	147
Abbildung 79: Einfluss von Cuprizon auf die Zytokinexpression im Gehirn der CST-transgenen MLD-Maus. ..	149
Abbildung 80: Einfluss des CST-Transgens auf den Aktivierungsstatus von Mikrogliazellen und T-Zellen im Gehirn der Maus.	152
Abbildung 81: Zuchtbedingte Veränderung des genetischen Hintergrunds.	154
Abbildung 82: Die Zonen des Corpus callosum.	156
Abbildung 83: Expression von MBP und Galaktosylceramid während der primären Myelinisierung des Gehirns der Maus.	158
Abbildung 84: Marker der Oligodendrozytenreifung.	160
Abbildung 85: Modell zur Integrin-vermittelten Regulation der Oligodendrozyten-Reifung.	162

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des PCR-Mastermix.....	35
Tabelle 2: Programm für ASA/CST-Genotypisierungs-PCR.....	35
Tabelle 3: Programm für NG2-Genotypisierungs-PCR.....	36
Tabelle 4: Spezifische Banden nach Agarose-Gelelektrophorese von Genotypisierungs PCR-Produkten.	36
Tabelle 5: Zusammensetzung des First Strand Master Mix für die cDNA-Synthese.....	39
Tabelle 6: Programm für die cDNA-Synthese.....	39
Tabelle 7: Zusammensetzung Mastermix für die qRT-PCR.....	40
Tabelle 8: Programm für die qRT-PCR.....	40
Tabelle 9: AZB-Färbung von unbehandeltem, sulfatiertem, carboxyliertem und phosphoryliertem Lebergewebe bei pH = 5,8.	43
Tabelle 10: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für SDS-PAGE.....	54
Tabelle 11: Mittleres Körpergewicht bei Präparation.	60
Tabelle 12: CPZ-induzierte Veränderung der Proteinexpression.....	80
Tabelle 13: Einfluss von CPZ auf die Expression der Myelinproteine im konventionellen MLD-Mausmodell.	158

III. Formelverzeichnis

Formel 1: Ausbreitung eines Membranpotentials im zylindrischen Kabel.....	14
Formel 2: Definition der Längenkonstante λ	14
Formel 3: Definition des elektrischen Widerstandes R.	14
Formel 4: Präzipitation eines Polyanions.....	43
Formel 5: Gleichgewichtskonstante der Präzipitation eines Polyanions.	43
Formel 6: Geschwindigkeit eines Ions nach dem Durchlaufen einer Beschleunigungsspannung.	50
Formel 7: Lorentz-Kraft im Magnetfeld.	51
Formel 8: Zentrifugalkraft.	51
Formel 9: Grundprinzip der Massenspektrometrie.....	51
Formel 10: Definition des t-Werts im Zweistichproben-t-Test.	59

IV. Abkürzungsverzeichnis

AIDA	Ankle Images Digital Analysis
ASA	Arylsulfatase A
ATPase1	Adenosintriphosphatase 1
AZB	Alzian Blau
BSA	Rinderserumalbumin
C12:0-Sulf	N-Dodecanoylsulfatid
C18:0-Sulf	N-Octadecanoylsulfatid
C24:1-Sulf	N-Tetracosenoylsulfatid
CC	Corpus Callosum
cDNA	Komplementär-DNA
CEC	Kritische Elektrolytkonzentration
Cers1	Ceramidsynthase 1
Chol	Cholesterol
CNPase	2',3'-Zyklische Nukleotid-3'-phosphodiesterase
CPZ	Cuprizon/Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazon
CST	Galaktose-3-O-sulfotransferase 1
Cu	Kupfer
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxiribonukleinsäure
E	Embryonaler Tag
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
EYFP	Enhanced Yellow Fluorescent Protein
ERT	Enzymersatztherapie
ESI	Elektrospray-Ionisation
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometer
GalCer	Galaktosylceramid
GFAP	Saures Glialfaserprotein
Gt	Ziege
HIV	Humanes Immunschwäche-Virus
Iba1	Kalzium-bindendes Adaptor-Molekül 1
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IR	Infrarot
ITS	Interner Standard
LC	Flüssigkeitschromatographie
M6P	Mannose-6-phosphat
MBP	Basisches Myelinprotein
MLD	Metachromatische Leukodystrophie
mRNA	Boten-Rinbonukleinsäure
Ms	Maus
MS	Massenspektrum
Myt1	Myelin Transcription Factor 1
NG2	Neural-Glial-Antigen 2
Nkx2.2	Nk2 Homebox 2 Protein

Olig1/Olig1	Oligodendrocyte Lineage Transcription Factor 1/2
OVZ	Oligodendrozyten-Vorläuferzellen
P	Postnataler Tag
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF α R	Platelet Derived Growth Factor α Receptor
PDGF α	Platelet Derived Growth Factor α
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Proteolipidprotein
PNS	Peripheres Nervensystem
qRT-PCR	Quantitative Real Time-PCR
Rb	Kaninchen
RNA	Ribonukleinsäure
rT	reverse Transkriptase
Rt	Ratte
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSB	Sudan Schwarz B
SOX2/SOX10	SRY-related HMG-box 10
SRT	Substratreduktionstherapie
Sulf	Sulfatid
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Triton X 100
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tg	transgen
TLC	Dünnschichtchromatographie
Tris	Trisaminomethan
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volumen
WB	Western Blot
YY1	Ying Yang 1
ZNS	Zentrales Nervensystem
(+/-)	heterozygot
(-/-)	knockout
Δ	Differenz

V. Verwendete Einheiten

g	Gramm
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
L	Liter
mL	Milliliter
μ L	Mikroliter
M	Molar
mM	Millimolar
μ M	Mikromolar
cm	Zentimeter
mm	Millimeter
μ m	Mikrometer
nm	Nanometer
H	Stunde
min	Minute
sec	Sekunde
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
g	Erdbeschleunigung
Hz	Hertz
kDa	Kilodalton
mA	Milliampere
V	Volt
psi	Pfund pro Quadratzoll

VI. Zusammenfassung

Metachromatische Leukodystrophie (MLD) ist eine Lipidspeicherkrankheit, die durch den Defekt des lysosomalen Enzyms Arylsulfatase A (ASA) hervorgerufen wird. ASA katalysiert den Abbau von Sulfatid, einem Hauptbestandteil des Myelins. Ist der Abbau gehemmt, reichert sich Sulfatid im Lysosom der Zelle an. Besonders schwer betroffen sind davon die Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems. Der Phänotyp des Patienten ist abhängig von der verbleibenden Enzymrestaktivität. Bei Nullmutation ist schon früh eine fortschreitende Demyelinisierung des Gehirns zu beobachten und die betroffenen Patienten versterben noch im Kindesalter.

Der gesunde Organismus besitzt die Fähigkeit, beschädigtes Myelin vollständig wiederherzustellen. Fortschreitende Demyelinisierung ist folglich dann zu beobachten, wenn der Remyelinisierungsprozess gestört ist. Ziel dieser Arbeit war es, zu überprüfen, ob die durch den Defekt der ASA hervorgerufene Akkumulation von Sulfatid störenden Einfluss auf den Remyelinisierungsprozess hat und somit Auslöser der Demyelinisierung ist.

Um den Pathomechanismus der MLD zu erforschen, ist durch Knockout des ASA-Gens ein MLD-Mausmodell (ASA(-/-)-Maus) generiert worden. Im Gegensatz zum Patienten entwickelt die ASA(-/-)-Maus aber keine Demyelinisierung, so dass die Demyelinisierung im Zuge dieser Arbeit künstlich induziert wurde. Cuprizin-induzierte Demyelinisierung ist ein etabliertes Modell, um Remyelinisierungsprozesse zu untersuchen. Cuprizin (Bis(cyclohexanon)oxaldihydraton) ist ein Kupfer-Chelator und induziert bei Fütterung die Demyelinisierung des Gehirns der Maus. Bei anschließendem Wechsel zu Standardhaltungsdiet kann Remyelinisierung stattfinden.

Im Zuge dieser Arbeit wurden sieben Wochen alte, männliche ASA(-/-)-Mäuse mit einer 0,2%igen Cuprizin-Diet gefüttert. Die Auswertung von Protein- und Lipidexpression zeigte, dass der Myelinisierungsprozess in ASA(-/-)-Mäusen sowohl während der primären Myelinisierung des ZNS, als auch bei Remyelinisierung verlangsamt ablief. Wahrscheinlich ist diese Verlangsamung auf die Akkumulation von Sulfatid in den Lipid-Rafts der ASA(-/-)-Maus zurückzuführen, die zu einer Störung der Oligodendrozytendifferenzierung führt. Da nicht nachgewiesen werden konnte, dass Zahl oder Migration der Oligodendrozytenvorläuferzellen in der ASA(-/-)-Maus beeinträchtigt sind, könnte die exogene Induktion der Oligodendrozytendifferenzierung ein potentieller Ansatz zur Behandlung der fortschreitenden Demyelinisierung in MLD-Patienten sein.

1. Einleitung

1.1 Die Myelinisierung des Nervensystems

Während die primitiven Meeresbewohner des Kambriums ein vergleichsweise sicheres Dasein in den Tiefen des Meeres fristeten, stellte der Landgang der Wirbeltiere im Devon hohe Ansprüche an das noch einfach entwickelte Nervensystem: Die Fähigkeit zur schnellen Reaktion sollte über den evolutionären Erfolg einer Spezies an Land entscheiden.

Der limitierende Faktor für die Schnelligkeit einer Reaktion ist die Geschwindigkeit, mit der ein Reiz entlang des Axons transportiert werden kann. Physikalisch betrachtet ist das Axon ein zylindrisches Kabel. Ein Membranpotential V an Position 0 des Axons erzeugt ein exponentiell abfallendes, sich in X-Richtung ausbreitendes Spannungsfeld, wie durch Formel 1 beschrieben wird. Da diese Form der elektrischen Leitung ohne aktiven Ladungstransport funktioniert, wird sie auch passive Leitung genannt.

$$V_x = e^{-\frac{x}{\lambda}} \times V_0$$

Formel 1: Passiver Ladungstransport. Ausbreitung eines Membranpotentials im zylindrischen Kabel. V_0 = Membranpotential an Position 0, V_x = Membranpotential an Position x , λ = *Längenkonstante*.

Wie weit sich das Spannungsfeld entlang der X-Achse ausbreiten kann, bevor die Spannung gegen Null geht, wird durch die Längenkonstante λ des Axons bestimmt. Die Längenkonstante λ , und somit die passive Leitfähigkeit eines Axons, ist abhängig von den Widerständen der Plasmamembran R_m , des intrazellulären Axioplasmas R_i und des extrazellulären Mediums R_0 .

$$\lambda = \sqrt{\frac{R_m}{(R_0 + R_i)}}$$

Formel 2: Definition der Längenkonstante λ . R_m = Widerstand der Plasmamembran, R_i = Widerstand des intrazellulären Axioplasmas, R_0 = Widerstand des extrazellulären Mediums.

Mathematisch gesehen entspricht die Optimierung der passiven Leitfähigkeit einer Vergrößerung von λ durch Verkleinerung des intrazellulären Plasmawiderstandes oder Vergrößerung des Membranwiderstandes.

Generell ist der elektrische Widerstand R eines Leiters abhängig vom spezifischen Widerstand ρ , seiner Länge l und dem Querschnitt A .

$$R = \rho \times \frac{l}{A}$$

Formel 3: Definition des elektrischen Widerstandes R . ρ = spezifischer Widerstand des Leiters, l = Länge, A = Querschnitt.

Die Vergrößerung des Axonquerschnitts führt demnach zu einer Abnahme des Axioplasma-widerstandes R_i , zur Vergrößerung der Längenkonstante λ und letztendlich zur Verbesserung der passiven Leitfähigkeit. Unter anderem finden sich solche vergrößerten Riesenaxone

im Nervensystem der Zephalopoden, wo sie die Nervenleitgeschwindigkeit myelinisierter Motoraxone erreichen können.

Doch der Vergrößerung des Axonquerschnitts sind Grenzen gesetzt, wie das Beispiel des Sehnervs zeigt. Der optische Nerv hat einen Durchmesser von drei bis sieben Millimetern und besteht aus rund einer Millionen myelinisierten Axonen.¹ Ein Sehnerv aus entsprechend leistungsstarken marklosen Axonen, mit je einem Millimeter Durchmesser, würde einen Gesamtdurchmesser von 75 Zentimetern haben.²

In hochentwickelten Nervensystemen, wie dem des Menschen, hat sich darum die Erhöhung des Membranwiderstandes R_m als Strategie zur Verbesserung der Reizweiterleitung etabliert. Die Axone sind von einer isolierenden Membran umhüllt: Myelin.

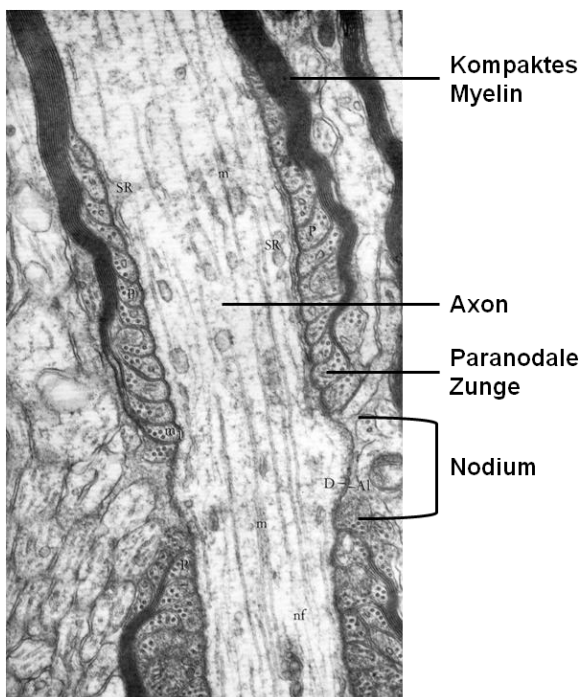


Abbildung 1: Myelinisiertes Axon. Elektronenmikroskopische Aufnahme.

Quelle: A. Peters, S. L. Palay, H. D. Webster: *The fine structure of the nervous system*. Philadelphia, London, Toronto: W. B. Saunders Company, 1976, 1. Auflage, p. 215.

Das Myelin umgibt die Axone des zentralen und peripheren Nervensystems der Wirbeltiere. Aufgrund des ungewöhnlich hohen Lipid- (70-85 %) und geringen Proteinanteils (15-30 %) hat Myelin einen hohen elektrischen Widerstand. Im Mikroskop erscheint die Myelinscheide als schlauchförmige Hülle des Axons, die in regelmäßigen Abständen durch Einschnürungen, die Nodien, unterbrochen ist. Abbildung 1 zeigt die elektronenmikroskopische Aufnahme eines Nodiums. Um das Nodium herum ist das Myelin nicht kompaktiert. Die dort vorhandenen paranodalen Kanäle sind für die Erhaltung der zytoplasmatischen Kontinuität zwischen Oligodendrozyten-Zellkörper und Myelin zuständig. Dieser Bereich wird auch paranodale Zone genannt. Die Bereiche kompakten Myelins zwischen den Nodien werden als Internodien bezeichnet.

Im Querschnitt des Axons zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen den periodischen Aufbau der Myelinscheide, bestehend aus Hauptlinien von hoher Elektronendichte sowie den weniger stark ausgeprägten Zwischenlinien. Diese charakteristische Struktur ist durch den Mechanismus der Myelinisierung bedingt.

Im Querschnitt des Axons zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen den periodischen Aufbau der Myelinscheide, bestehend aus Hauptlinien von hoher Elektronendichte sowie den weniger stark ausgeprägten Zwischenlinien. Diese charakteristische Struktur ist durch den Mechanismus der Myelinisierung bedingt.

Myelin wird nicht von den Neuronen selbst, sondern im peripheren Nervensystem (PNS) von Schwannzellen, im zentralen Nervensystem (ZNS) von Oligodendrozyten gebildet. Der größ-

te Unterscheid zwischen diesen Zelltypen ist, dass erstere nur ein axonales Segment, Oligodendrozyten aber bis zu 60 axonale Segmente zugleich myelinisieren können.

Oligodendrozyten zählen, wie Astrozyten und Mikrogliazellen, zu den Gliazellen des Gehirns. Die Myelinisierung der Axone ist nur eine ihrer Aufgaben, sie sind zum Beispiel auch an der trophischen Unterstützung der Neuronen beteiligt. Oligodendrozyten entstehen aus Vorläuferzellen, die von der ventrikularen Zone aus in alle Gehirnbereiche migrieren und dort zu Oligodendrozyten ausreifen können. Das Myelin ist eine spiralförmige Verlängerung der Plasmamembran des Oligodendrozyten.

Die Myelinisierung beginnt, wenn sich der plattenartig verbreiterte Zellfortsatz des Oligodendrozyten um ein noch markloses Axon legt. Zwei sich stetig verlängernde Membranlippen werden gebildet. Kommen sie miteinander in Kontakt, schiebt sich eine Membranlippe unter die andere und beginnt in Schichten um das Axon zu wachsen.

Durch spezifische Wechselwirkungen von Lipiden und Proteinen nähern sich die Zellmembranen im Zuge der Reifung des Myelins einander an und verdrängen das Zytoplasma. Durch Verschmelzung der intrazellulären Membranseiten entstehen die elektronendichten Hauptlinien, durch Anlagerung der extrazellulären Membranseiten entstehen die Zwischenlinien.

Das Basische Myelinprotein (MBP) ist maßgeblich an der Bildung der Hauptlinien beteiligt. Durch seine positive Molekülladung wechselwirkt es mit den negativ geladenen Phospholipiden der Plasmamembran, so dass die zytoplasmatischen Seiten der Membran zueinander gezogen werden. Neben der paranodalen Zone ist die innerste und äußerste Wicklung von der Verdichtung des Myelins ausgenommen.

In den nicht myelinisierten Bereichen des Axons, den Nodien, ist eine große Anzahl von Natriumkanälen lokalisiert. In Reaktion auf einen chemischen oder elektrischen Reiz öffnen sich diese Kanäle und Natrium-Ionen strömen, getrieben durch die Konzentrationsdifferenz, in das Zytosol des Axons ein. Die zuvor negativ geladene innere Zellmembran wird positiv aufgeladen und ein Aktionspotential ausgebildet. In nicht myelinisierten Axonen pflanzt sich das Potential durch passive Leitung entlang der Membran fort. Bei myelinisierten Axonen springt das Potential von Nodium zu Nodium. Man spricht von saltatorischer Reizweiterleitung. Die Leitungsgeschwindigkeit ist gegenüber nicht myelinisierten Axonen deutlich erhöht, da große Streckenabschnitte des Axons übersprungen werden.

Der Verlust der Myelinscheide wird als Demyelinisierung bezeichnet. Von primärer Demyelinisierung spricht man, wird sie durch einen direkten Schaden am Myelin oder an den Oligodendrozyten induziert. Die sekundäre Demyelinisierung, oder auch Waller-Degeneration, resultiert aus dem Untergang des Axons, zum Beispiel nach einer Verletzung. Das Resultat

ist in beiden Fällen dasselbe: Mit dem Abbau des Myelins kommt es zur Blockade der saltatorischen Reizweiterleitung.

Um der Blockade entgegen zu wirken, kann der Organismus die Zahl der Natriumkanäle im Axiolemma demyelinisierter Axone erhöhen. Die nicht-saltatorische (passive) Reizweiterleitung wird so unterstützt und die Funktionalität eines Axons zumindest teilweise aufrechterhalten. Die wichtigste Antwort des Organismus auf Demyelinisierung ist jedoch der Remyelinisierungsprozess.

Im Gegensatz zu vielen anderen Bestandteilen des Nervensystems kann, wie in Abbildung 2 A gezeigt, die Myelinscheide komplett regeneriert werden. Die saltatorische Reizweiterleitung wird dabei wiederhergestellt und funktionale Defizite behoben. Das „neue“ Myelin ist in seiner Zusammensetzung nicht von „altem“ zu unterscheiden und kann nur anhand der Relation von Schichtdicke zu Durchmesser des Axons identifiziert werden. Das Verhältnis von Myelin-Schichtdicke zu Axon-Durchmesser ist in Abbildung 2 B dargestellt. Es wird als g-Ratio bezeichnet. In remyelinisierten Bereichen des ZNS ist die g-Ratio erhöht, da die Myelinschicht dünner ist.

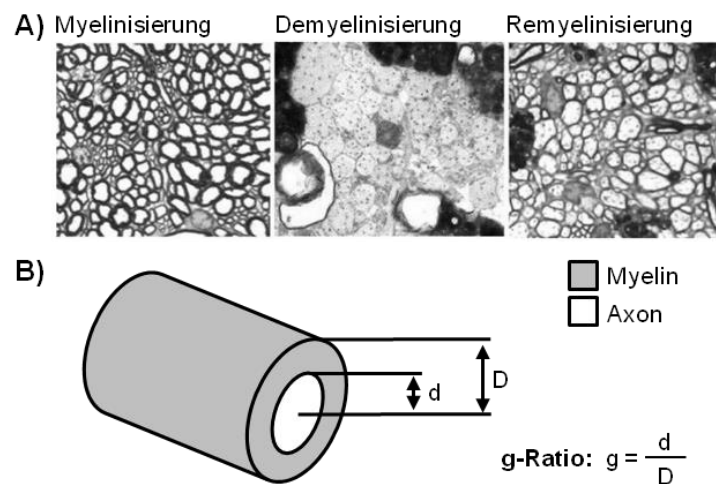


Abbildung 2: Remyelinisierung im ZNS.

Quelle: (A) J. M. Franklin, C. French-Constant: Remyelination in the CNS: from biology to therapy, *Nature Review Neuroscience* 9 (2008), pp. 839-855, (B) eigene Darstellung.

Remyelinisierung kann auch stattfinden, wenn keine Oligodendrozyten in der Läsion vorhanden sind.³ Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OVZ) infiltrieren das betroffene Gewebe und differenzieren dort zu myelinisierenden Oligodendrozyten.

Erstmals wurden die OVZ in den frühen 80er Jahren durch die Arbeitsgruppe von Martin Raff beschrieben.⁴ Es sind multipotente Zellen, die durch Expression der Oberflächenmarker Neural-Glial-Antigen 2 (NG2) und Platelet Derived Growth Factor α Receptor (PDGFR α) identifiziert werden können. Je nach Stimuli differenzieren sie zu Oligodendrozyten, Astrozyten oder Neuronen.⁵ Sie verteilen sich gleichermaßen über weiße und graue Substanz des

ZNS und machen rund fünf bis zehn Prozent aller Glia im ZNS aus. Detektieren Mikrogliazellen oder Astrozyten ein demyelinisierendes Ereignis, aktivieren sie durch Expression von Wachstumsfaktoren, wie dem Platelet Derived Growth Factor α (PDGF α), die im Gewebe ruhenden OVZ. Die OVZ wechseln in einen regenerativen Phänotyp, unter anderem verbunden mit der vermehrten Expression der Transkriptionsfaktoren Oligodendrocyte Lineage Transcription Factor 2 (OLIG2) und SRY-related HMG-box 10 (Sox10). Die aktivierten OVZ infiltrieren das betroffene Gewebe. Erst nachdem sie mit den entmarkten Axonen in Kontakt getreten sind, differenzieren zu Oligodendrozyten und beginnen mit der Remyelinisierung.

1.2 Metachromatische Leukodystrophie

Eine Reihe von genetisch bedingten Krankheiten wird von primärer Demyelinisierung begleitet, darunter die Leukodystrophien. Das Wort Leukodystrophie leitet sich aus dem Griechischen ab: *leukos* (weiß) - *dys* (schlecht) - *trophe* (Gedeihen). Es bezeichnet Stoffwechselkrankheiten, die sich durch die Degeneration der weißen Substanz auszeichnen. Zu ihnen zählt die autosomal rezessiv vererbte Metachromatische Leukodystrophie.

Die Metachromatische Leukodystrophie (MLD) zählt zu den lysosomalen Speicherkrankheiten und wird durch den Defekt des Enzyms Arylsulfatase A (ASA) hervorgerufen. Je nach Bevölkerungsgruppe schwankt die Inzidenz zwischen einer aus 40.000 bis zu einer aus 100.000 Geburten. Man zählt die MLD daher zu den seltenen Krankheiten.

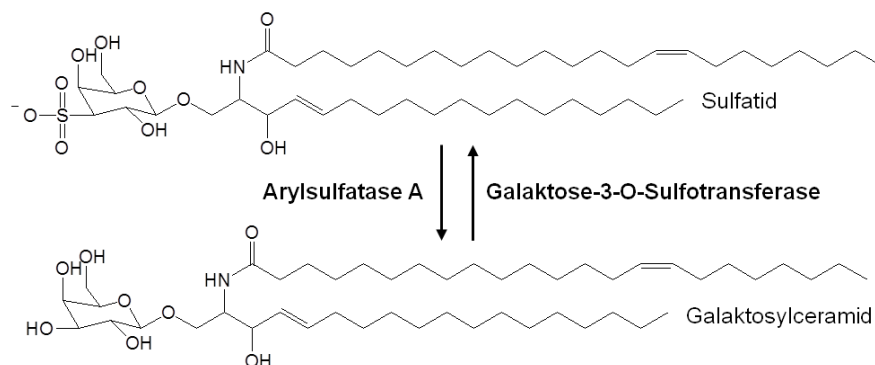


Abbildung 3: Synthese und Abbau von Sulfatid.

Die ASA katalysiert den lysosomalen Abbau von 3-O-Sulfogalaktosylceramid (Sulfatid) zu Galaktosylceramid (GalCer). Sulfatid ist ein Membranlipid, das sich auch in Leber und Niere findet, in besonders hohen Mengen aber im Myelin vorhanden ist. Im Falle der ASA-Defizienz kann Sulfatid nicht abgebaut werden und wird im Lysosom gespeichert. Betroffen sind neben dem zentralen und peripheren Nervensystem auch Niere, Gallenblase, Leber, Pankreas, Hypophyse, Netzhaut, Schweißdrüsen, Hoden und Darmgewebe.⁶ Am stärksten durch die Speicherung beeinträchtigt ist das Nervensystem, wo die Akkumulation von Speichermaterial mit einer fortschreitenden Demyelinisierung einhergeht.

Obwohl mittlerweile mehr als 80 Mutationen identifiziert wurden, sind nur drei von ihnen häufig:

- 1.) Durch Mutation der Spleiß-Stelle zwischen Exon 2 und Intron 2 des ASA-Gens wird die Transkription der ASA-mRNA verhindert. Die Enzymsynthese ist komplett unterbunden. Dieser Genotyp entspricht einem Nullallel.
- 2.) & 3.) Durch Punktmutationen entstehen zwei weitere, häufige Genotypen, bei denen die Aminosäuren Prolin426 gegen Leucin bzw. Isoleucin179 gegen Serin ausgetauscht sind. Die Transkription ist nicht betroffen, aber die Aktivität des Enzyms reduziert.

Phänotypen

Abhängig von der Art der Mutation treten drei unterschiedlich schwere Phänotypen auf.

Die **spät-infantile Form der MLD** zeichnet sich durch den schwersten Krankheitsverlauf aus. Im Allgemeinen sind diese Patienten homozygot für ein Nullallel. Die ersten Symptome treten noch vor Vollendung des zweiten Lebensjahres auf. Den anfänglichen Störungen des Bewegungsapparates folgen Verlust von Sprache, Gehör und Augenlicht, Krämpfe, die Entwicklung einer peripheren Neuropathie sowie einer Bulbärparalyse. Die Patienten versterben nach ein bis sieben Jahren.

Die **juvenile Form der MLD** setzt im Alter von vier bis zwölf Jahren ein und präsentiert sich zunächst mit Gangstörungen oder Abnahme der schulischen Leistung. Der weitere Krankheitsverlauf ähnelt dem infantilen Phänotyp. Die Patienten versterben, bevor sie das Erwachsenenalter erreichen. Juvenile Patienten sind meist heterozygot für ein Nullallel und ein Allel, das mit einer verbleibenden Enzymrestaktivität verbunden ist.⁷

Die **adulte Form der MLD** hat den mildesten Phänotyp und präsentiert sich oft als psychische Erkrankung mit psychotischen oder schizophrenen Zügen. Erst im späteren Verlauf treten neurologische Störungen auf. Der Krankheitsverlauf ist mild und Patienten können nach der Diagnose noch mehrere Jahrzehnte überleben. Adulte Patienten sind meist homozygot für ein Allel, das mit einer Restaktivität verbunden ist.

Da keine natürlich auftretende Mutation im Tier bekannt ist, die den Phänotyp der MLD wiedergibt, wurde durch gentechnischen Bruch des ASA-Gens ein Knock-Out-Mausmodell (ASA(-/-)) generiert.⁸ Genetisch entspricht das Mausmodell der spät-infantilen Form der MLD, denn es besitzt keine Enzymrestaktivität. Die Maus speichert, wie der Patient, Sulfatid in Leber, Niere und im zentralen sowie peripheren Nervensystem. Der Phänotyp ist im Vergleich zum Menschen aber nur mild ausgeprägt und ähnelt eher dem des adulten MLD-Patienten. Erst mit steigendem Alter entwickeln die Mäuse neurologische Symptome, die

aber nicht von einer Degeneration der weißen Substanz begleitet werden. Dennoch sind nahezu alle Zelltypen des ZNS der ASA(-/-)-Maus von Sulfatidspeicherung betroffen:

Die nachweislich als erstes betroffenen Zellen sind die Oligodendrozyten, in denen die Sulfatidspeicherung in Form zahlreicher kleiner, zytoplasmatischer Einschlüsse nachweisbar ist.⁹ Die betroffenen Zellen sind über das gesamte ZNS verteilt. Zeitgleich findet man auch von Speicherung betroffene Mikrogliazellen. Sie sind prall gefüllt mit Speichermaterial, das den Zellkern in Färbungen oft verdeckt. Ihre Zahl nimmt mit steigendem Alter stetig zu. In älteren Mäusen (> ein Jahr) ist der Großteil des Speichermaterials in Mikrogliazellen lokalisiert, die sich hauptsächlich in der weißen Substanz des Gehirns befinden.

Neben Oligodendrozyten und Mikrogliazellen sind auch Neuronen von Sulfatidspeicherung betroffen. Die Speicherung führt in diesen Zellen nicht zwingend zu einer Schädigung. Vor allem im Nucleus cochlearis sowie dem Corpus trapezoideum aber ist die Speicherung von Sulfatid mit dem vermehrter Untergang der Neuronen verbunden. Da die betroffenen Hirnregionen zur Hörbahn zählen, führt der beschriebene Zelluntergang in ASA(-/-)-Mäusen mit steigendem Alter zum Verlust des Gehörs.

Auch wenn das Tiermodell dem Patienten auf zellulärer Ebene sehr ähnlich ist, ist der wichtigste Unterschied doch, dass keine fortschreitende Demyelinisierung nachgewiesen werden kann. Die therapeutisch dringendste Frage nach der Ursache der Demyelinisierung kann mithilfe des konventionellen Mausmodells nicht beantwortet werden.

Was ist der Unterschied zwischen Patient und Mausmodell?

Sulfatid hat, verglichen mit anderen Lipiden des Gehirns, eine lange Halbwertszeit.¹⁰ Es akkumuliert nur langsam und auch Patienten ohne Restaktivität entwickeln sichtbare Symptome erst nach dem 18. Lebensmonat. Anscheinend bedarf es einer gewissen Zeit, eine ausreichende Menge Sulfatid zu akkumulieren, die in der Lage ist, neurologische Symptome bzw. Demyelinisierung hervorzurufen. Die kurze Lebensdauer der Maus könnte verhindern, dass ausreichend Speichermaterial akkumuliert, um diese Schwelle zu überschreiten.

Basierend auf diesen Überlegungen wurde eine transgene ASA(-/-)-Maus generiert, die über eine erhöhte Sulfatidsyntheserate verfügt.¹¹

Sulfatid wird im Golgi-Apparat durch den Transfer von Sulfat aus 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat auf Galaktosylceramid synthetisiert. Die Reaktion wird durch das Enzym Galaktose-3-O-Sulfotransferase-1 (CST) katalysiert. Durch Überexpression der CST konnte die gespeicherte Sulfatidmenge in der ASA(-/-)-Maus insgesamt verdoppelt werden. Die Erhöhung der Sulfatidspeicherung ist begleitet von einer signifikanten Verstärkung der neurologischen Symptome.

Der Phänotyp der CST-transgenen ASA(-/-)-Maus ist bis zu einem Alter von ca. einem Jahr nicht von der konventionellen ASA(-/-)-Maus zu unterscheiden. Danach treten schwere Verhaltensauffälligkeiten auf: Zunächst nur geschwächt, entwickeln die CST-transgenen ASA(-/-)-Mäuse mit zunehmendem Alter eine Paralyse der Hinterläufe. Unter anderem ist die Nervenleitgeschwindigkeit signifikant verschlechtert. Die Untersuchung des zentralen Nervensystems zeigt vermehrt hypo- oder unmyelinisierte Axone, die im konventionellen Mausmodell nicht nachweisbar sind. Die CST-transgene ASA(-/-)-Maus ist das erste Tiermodell der MLD, mit dem klassische Symptome der Erkrankung wiedergegeben und untersucht werden können.

Therapie

Die Therapie lysosomaler Speicherkrankheiten setzt bei der Reduktion des Speichermaterials an. Diese Reduktion kann auf zwei Wegen erreicht werden:

Der erste Ansatz verfolgt das Ziel, bereits entstandenes Speichermaterial zu reduzieren, indem das defekte Enzym substituiert wird. Tatsächlich ist die Behandlung lysosomaler Speicherkrankheiten mittels **Enzymersatztherapie** (ERT) eine etablierte Methode. Dem Therapieansatz zugrunde liegt der Mechanismus der Sortierung lysosomaler Enzyme zu ihrem Bestimmungsort, dem Lysosom. Über die spezifische Wechselwirkung von Mannose-6-Phosphat (M6P)-Einheiten am Enzym mit dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor werden lysosomale Enzyme vom Golgi-Apparat zum Lysosom transportiert. Da trotz der rezeptorvermittelten Sortierung ein Teil der lysosomalen Enzyme sekretiert wird, ist der M6P-Rezeptor auch in der Plasmamembran lokalisiert. Sekretierte Enzyme können so wieder in die Zelle aufgenommen werden. Ein intravenös verabreichtes Enzym wird also, besitzt es M6P-Einheiten, von den Zellen aufgenommen und ins Lysosom transportiert, wo es aktiv ist und Speichermaterial reduzieren kann. Etabliert hat sich dieser Behandlungsansatz z. B. für Patienten mit Morbus Gaucher Typ 1.

Morbus Gaucher wird durch den Defekt der β -Glukocerebrosidase hervorgerufen. Im Unterschied zum MLD-Patienten weisen Morbus Gaucher Typ 1-Patienten keine neurologische Symptomatik auf. Die Patienten leiden unter Anämie, Vergrößerung der Milz und Leber sowie Knochenschäden. Sie sprechen sehr gut auf die ERT an. Typ 2-Patienten, die unter starken neurologischen Symptomen leiden, sind mit diesem Ansatz nicht therapierbar. Auch im Falle der MLD ist dieser Therapieansatz nicht anwendbar, da die Bluthirnschranke den effektiven Übertritt des rekombinanten Enzyms in das Gehirn verhindert.

Vielversprechend, vor allem für Erkrankungen mit neurologischer Beteiligung, ist die **Substratreduktionstherapie** (SRT). Im Gegensatz zur ERT ist der Ansatz nicht bestehendes Speichermaterial zu reduzieren, sondern die Bildung von neuem Speichermaterial zu

verhindern. Im Fall von Sulfatid entspräche dies der Hemmung der CST. Der Vorteil der SRT gegenüber der ERT ist, dass es sich bei Enzyminhibitoren um kleine Moleküle handelt, die in der Lage sein können, die Bluthirnschranke zu überqueren.

Für die MLD konnte bis jetzt keiner der Therapieansätze etabliert werden, so dass die **Stammzelltherapie** zurzeit die einzige verfügbare Behandlungsmethode ist. Dabei werden hämatopoetische Stammzellen eines gesunden Individuums in den Patienten implantiert. Obwohl das funktionelle Enzym selber nicht in der Lage ist, die Bluthirnschranke in nennenswerten Mengen zu überwinden, ist ein positiver Effekt dieser EMthode beobachtet worden. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich darauf, dass die implantierten Stammzellen zu Mikrogliazellen differenzieren und die Bluthirnschranke überwinden. Kidd *et al.* beschreiben einen Patienten mit juveniler MLD, dessen Krankheitsverlauf nach einer Knochenmarkspende durch seine gesunde Schwester über einen Zeitraum von acht Jahren zum Stillstand kam.¹² Eine Verbesserung seines Zustandes konnte allerdings nicht beobachtet werden.

Experimente im Mausmodell lassen annehmen, dass der therapeutische Effekt mit der Menge des von den Spenderzellen produzierten Enzyms korreliert und sich bei ausreichender Enzymkonzentration auch bereits etablierte neurologische Symptome behandeln lassen können. Diesen Ansatz verfolgt auch die **Gentherapie**: Dem Patienten werden Stammzellen entnommen und mit einem viralen Vektor transduziert, der die Erbinformation für das defekte Enzym trägt. Die so veränderten Zellen werden anschließend in den Patienten reimplantiert. Biffi *et al.* beschrieben 2013 drei spät-infantile MLD-Patienten, in denen durch lentivirale Transduktion hämatopoetischer Stammzellen die Enzymaktivität über das Normallevel hinaus rekonstituiert werden konnte.¹³ Zwei Jahre nach der Behandlung war kein Fortschreiten der Erkrankung erkennbar. Eine Verbesserung war aber ebenfalls nicht nachweisbar. Endgültige Aussagen über Nutzen und Schaden der Gentherapie werden in diesem Fall erst in einigen Jahren zu treffen sein, wenn sich zeigt, ob die lentivirale Behandlung genotoxische Effekte auf den Patienten hat und wie lange das Gen tatsächlich in den transduzierten Zellen verbleibt.

Weiterhin besteht also keine Chance auf Heilung für MLD-Patienten. Unser Lösungsansatz umgeht daher die üblichen Therapieansätze und konzentriert sich auf das schwerwiegendste Symptom, die Demyelinisierung. **Wir fragen, ob die voranschreitende Demyelinisierung im MLD-Patienten durch den Defekt der körpereigenen Fähigkeit zur Remyelinisierung hervorgerufen wird?**

1.3 Cuprizon-induzierte Demyelinisierung

Kupfer im Organismus

Das Element Kupfer (Cu) zählt zu den Schwermetallen und ist in wässriger Lösung sowohl in Oxidationsstufe I, als auch II stabil. In biologischen Systemen findet sich hauptsächlich Cu^{II} , da dort in Gegenwart von Elektronenakzeptoren Cu^{I} schnell zu Cu^{II} oxidiert wird. Dieser Prozess ist reversibel: Stark reduzierende Biomoleküle wie Ascorbat sind in der Lage diese Reaktion umzukehren. Die Eigenschaft, ein Elektron abgeben oder aufnehmen zu können, bringt Kupfer, ähnlich wie Eisen, eine wichtige Rolle in biologischen Redoxreaktionen ein. Kupfer ist unter anderem ein essentieller Bestandteil der Cytochrom-C-Oxidase der mitochondrialen Atmungskette. Im Zusammenspiel mit Eisen katalysiert Kupfer dort die Reduktion von Luftsauerstoff zu Wasser.

Kupfer ist auch ein wichtiger Botenstoff zur Signaltransduktion im ZNS. Es ist in den Neuronen in Vesikeln gespeichert und kann Kalzium-abhängig freigesetzt werden, so dass an den Synapsen vorübergehende Konzentrationen von 100 - 250 μM auftreten können.¹⁴ Kupfer bindet und moduliert unter anderem die Funktion des γ Aminobuttersäure-Typ A- und des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors.

Cuprizon

Bedenkt man, dass das Gehirn die höchste metabolische Rate aller Organe hat und vorwiegend auf den oxidativen Energiegewinn angewiesen ist, sowie die Bedeutung von Kupfer als neuronaler Botenstoff, ist es naheliegend, dass ein Mangel an Kupfer dramatische Auswirkungen auf die Funktion des zentralen Nervensystems hat.

So führt Kupfermangel bei schwangeren Schafen zu einer schweren Störung der intrauterinen Entwicklung und der postnatalen Reifung des Nervensystems im Lamm. Nach der Geburt leiden die Lämmer unter motorischen Störungen und verenden schnell. Die morphologische Begutachtung des Gehirns zeigt Ödem- und interzerebrale Hohlräumbildung.¹⁵ Ausgehend von diesen Beobachtungen versuchten viele Forschungsgruppen in den 1950er bis 1960er Jahren durch Komplexierung von Kupfer *in vivo* Demyelinisierung oder fetale Entwicklungsdefekte zu erzeugen.

Sich auf diese Experimente stützend, etablierte William W. Carlton 1966 die durch Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazon (Cuprizon) induzierte Demyelinisierung in Mäusen und Ratten.¹⁶ Cuprizon ist ein Kupfer-spezifischer Chelator (Abbildung 4), der auch zur kolorimetrischen Quantifizierung von Kupfer eingesetzt wird.¹⁷ Carlton zeigte, dass die orale Gabe von Cuprizon in Mäusen die Demyelinisierung des zentralen Nervensystems induziert.

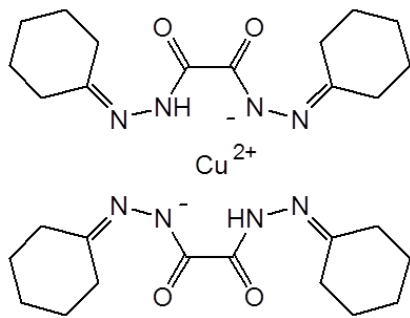


Abbildung 4: Mögliche Struktur des Kupfer-Cuprizon-Komplexes.

Die induzierte Demyelinisierung ist reversibel. Wird die Fütterung auf Haltdiät umgestellt, werden die Läsionen remyelinisiert.

Inzwischen hat sich die Cuprizon-induzierte Demyelinisierung als ein gängiges Modell zur Untersuchung von De- und Remyelinisierungsprozessen etabliert. Die orale Gabe durch Beimengung zum Futter ist wenig arbeitsintensiv und erzielt gut reproduzierbare Ergebnisse. Wie eine Maus im Einzelnen auf die Behandlung anspricht, ist stark von Mausstrang und Alter abhängig. Im Durchschnitt führt die sechswöchige Behandlung junger Mäuse aber zu einer fast vollständigen Demyelinisierung des Corpus callosum. Deutliche, aber weniger gut charakterisierte Demyelinisierung findet man auch im Cerebellum, Hippocampus, Caudate putamen und sogar in einigen Bereichen der grauen Substanz, wie dem Kortex.

Es existieren viele Hypothesen betreffend den **Wirkungsmechanismus von Cuprizon**, so zum Beispiel, dass durch Redoxreaktion unter physiologischen Bedingungen im Organismus zelltoxische Hydrazinderivate sowie reaktives Cu^{III} entstehen könnten.¹⁸ Entsprechende *in vitro* Experimente konnten jedoch keine neurotoxische Wirkung von Cuprizon nachweisen. Ebenso ist Cuprizon nicht in der Lage Caeruloplasmin-gebundenes Kupfer zu komplexieren, ferner überhaupt die Membran des *Duodenum*s zu überqueren.¹⁹ Die Effekte der Cuprizon-Behandlung scheinen letztendlich doch aus dem Mangel an Kupfer zu resultieren. Für diese Hypothese spricht auch die starke Ähnlichkeit der Effekte der Cuprizon-Behandlung zu den Symptomen des Menkes-Syndroms.²⁰

Das **Menkes-Syndrom** ist ein X-chromosomal-rezessiv vererbter Defekt der Adenosintriphosphatase 1 (ATPase 1). Die ATPase 1 wird in Hepatozyten exprimiert und ist unter anderem für den Transfer von aus der Nahrung aufgenommenem Kupfer auf Caeruloplasmin zuständig, das Kupfer im Blut transportiert. Die Aktivität Kupfer-abhängiger Enzyme, wie der Cytochrom-C-Oxidase, ist aufgrund des resultierenden Kupfermangels reduziert. Es kommt neben einer allgemeinen Gedeihstörung zu Leberversagen sowie Demyelinisierung mit zerebraler und zerebellarer Atrophie, Verlust von grauer Substanz und Untergang von Neuronen, speziell im Hippocampus und dem Cerebellum.

Da die konventionelle ASA(-/-)-Maus keine endogene Demyelinisierung aufweist, wurde die Demyelinisierung des ZNS durch Gabe von Cuprizone induziert.

1.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob die Remyelinisierungseffizienz im Mausmodell der MLD reduziert ist. Konventionelle und transgene ASA(-/-)-Mäuse wurden mit Cuprizone behandelt. Mittels histologischer und molekularbiologischer Methoden wurden Veränderungen der Protein- und Lipidexpression im Gehirn detektiert und in Abhängigkeit von Behandlung und Genotyp analysiert. Die Expression der Zytokine wurde mittels MultiPlex-Immunoassay untersucht.

2. Materialien

2.1 Geräte

Bezeichnung	Produktname, Hersteller
Agarose-Gelelektrophoresekammer	PerfectBlue™, PEQLAB, Deutschland
Elektrophoresekammer	Mini Protean 3 Gelkammer, BioRAD, USA
ESI-Massenspektrometer	HCT Ultra, Bruker, USA
Feinwaage	CP 124S-QCE, Sartorius, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Axiovert 100 M, Carl Zeiss AG, Deutschland
Heizblock	Thermomixer comfort, Eppendorf, Deutschland
Heiztisch	MEDAX, Deutschland.
IR-Scanner	Odyssey® Classic, LI-COR, UK
LC-System	Agilent Serie 1200, Agilent Technologies, USA
Lichtmikroskop	Zeiss Telaval 31, Carl Zeiss AG, Deutschland
Magnetrührer	Akamag RET, Ika-Werke, Deutschland
Mikrotom	Microm HM 650 V, Thermo Scientific, Deutschland
Ofen	Heraeus Instruments, Deutschland
PCR Thermocycler	T3 Thermocycler, Biometra, Deutschland
pH-Meter	646 Digital, Knick, Deutschland
Schüttler	Rotamax 120, Heidolph, Deutschland
Spannungsquelle	PowerPac 200, BioRAD, USA
TLC-Sprayer	Automatic TLC Sampler 4, Camag, Schweiz
Tischzentrifuge, gekühlt	5417 R, Eppendorf, Deutschland
Tischzentrifuge	Heraeus Pico 17, Thermo Scientific, Deutschland
Tischultrazentrifuge	Optima TLX Ultracentrifuge, Beckman Coulter, USA
Ultraschallwasserbad	Branson, Branson, USA
Ultraturrax	T25, Ika-Werke, Deutschland
UV-Transluminator	Biodoc Analyze, Biometra, Deutschland
Vortexer	Unimag Zx3 Classic, UniEquip, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q plus, Millipore, USA
„Western-Blot“ Semi-Dry System	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad, USA

2.2 Verbrauchsmaterialien

Alle Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen BD (USA), Greiner bio-one (Deutschland) und Sarstedt AG & Co. (Deutschland) bezogen. Materialien für die Lipidanalytik wurden ausschließlich von der Firma Merck (Deutschland) bezogen.

2.3 Verwendete Chemikalien

1.4.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von den Firmen Applichem (Deutschland), Merck (Deutschland), Sigma Aldrich (USA) und Thermo Scientific (USA) bezogen.

1.4.2 Reagenziensätze

- Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine 23-plex Assay, BioRad, M60-0009RDPD
- Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine 8-plex Assay, BioRad, M60-000007A
- BioRAD DC™ Protein Assay, BioRad, 5000112
- RedTaq® ReadyMix™ Reaction Kit, Sigma, R2523

1.4.3 Standards

- C12 Mono-Sulfo Galactosyl(β) Ceramide (d18:1/12:0), Avanti® Polar Lipids Inc., 860573P
- GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Thermo Fisher, SM0311
- Page Ruler™ Prestained Protein Ladder 10-180 kDa, Thermo Scientific, 26616

1.5 Verwendete Antikörper

1.5.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Aus	Hersteller Bestell Nr. (Lot Nr.)	Verdünnung
Anti-CNPase	Ms / IgG	Millipore, Deutschland MAB326 (2373391)	1:100 (IF) / 1:2000 (WB)
Anti-F4/80	Rt / IgG	Eigene Herstellung	1:50 (IF)
Anti-GFAP	Rb / IgG	Abcam, UK ab7260	1:1000 (IF) / 1:5000 (WB)
Anti-Iba1	Rt / IgG	Wako Chemicals, Japan 1919741	1:250 (IF)
Anti-MBP	Rb / IgG	Millipore, Deutschland AB980 (2136986)	1:200 (IF) / 1:5000 (WB)
Anti-NG2	Rb / IgG	Millipore, Deutschland AB5320 (2148254)	1:100 (IF)
Anti-Olig2	Rb / IgG	Millipore, Deutschland Ab9610 (2467174)	1:500 (IF) / 1:1000 (WB)

Anti-PLP	Ms / IgG	Millipore, Deutschland MAB388-100UG	1:250 (IF)
Anti-Tubulin	Rb, IgG	Rockland, USA 600401880	1:5000 (WB)
Anti-Tubulin	Ms, IgG	Sigma Aldrich, USA T5168	1:5000 (WB)

IgG = Immunglobulin G, Ms = Maus, Rb = Kaninchen, Rt = Ratte, WB = Western Blot, IF = Immunfluoreszenz.

1.5.2 Sekundärantikörper

Konjugat	Aus	Spezifität	Hersteller Bestell Nr.	Verdünnung
AlexaFluor 488	Gt	Anti-Ms / IgG	Thermo Scientific, USA A-1101	1:400
Cy2	Gt	Anti-Rb / IgG	Dianova, Schweiz 111-165-144	1:500
Cy3	Gt	Anti-Ms / IgG	Dianova, Schweiz 115-165-146	1:500
Cy3	Gt	Anti-Rb / IgG	Dianova, Schweiz 111-165-008	1:500
Cy3	Gt	Anti-Rt / IgG	Dianova, Schweiz 112-166-009	1:500
DyLight 680	Gt	Anti-Rb / IgG	Thermo Scientific, USA 35569	1:5000
DyLight 680	Gt	Anti-Ms / IgG	Thermo Scientific, USA 35519	1:5000
DyLight 800	Gt	Anti-Rb / IgG	Thermo Scientific, USA SA5-10036	1:5000
DyLight 800	Gt	Anti-Ms / IgG	Thermo Scientific, USA SA5-10176	1:5000

Gt = Ziege, IgG = Immunglobulin G, Ms = Maus, Rb = Kaninchen, Rt = Ratte.

1.6 Verwendete Mauslinien

1.6.1 NG2-EYFP-Knock-In-Maus

OVZ lassen sich unter anderem anhand der Expression des Typ-I-Membranproteins NG2 identifizieren. Durch Insertion des Enhanced Yellow Fluorescent Protein Gens (EYFP) in Exon 1 des NG2-Gens generierten Karram *et al.* ein Mausmodell, in dem die OVZ durch

EYFP markiert sind. Homozygote EYFP-Knock-In-Mäuse entsprechen einem NG2-Knock-Out.²¹ Bis jetzt konnte weder in hetero-, noch homozygoten Mäusen ein für die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen relevanter Phänotyp beobachtet werden.²²

Im Zuge dieser Arbeit wurde der EYFP-NG2-Knock-In durch Kreuzung mit dem MLD-Mausmodell zur Markierung der OVZ verwendet.

1.6.2 ASA-Knockout-Maus

Die ASA-Knockout-Maus ist das erste Tiermodell der Metachromatischen Leukodystrophie und wurde von Hess *et al.* durch die Zerstörung des ASA-Gens generiert.²³ Der Phänotyp der Maus ähnelt dem milden Krankheitsverlauf des adulten Patienten. Die ASA-Defizienz führt zu Sulfatidspeicherung in zentralem und peripherem Nervensystem. Es kann keine mit der Sulfatidspeicherung einhergehende Demyelinisierung beobachtet werden. Da der Phänotyp der ASA(+/-)-Maus aufgrund der ausreichend hohen Enzymrestaktivität der ASA nicht vom Wildtyp zu unterscheiden ist, wurden ASA(+/-)-Mäuse in dieser Arbeit als Kontrollgruppe verwendet.

1.6.3 CST-transgene ASA-Knockout-Maus

Um den Phänotypen der konventionellen ASA-Knock-Out-Maus dem des Patienten anzugleichen, wurde eine ASA(-/-)-Maus generiert, die über eine erhöhte Sulfatidsyntheserate verfügt.²⁴ Das entsprechende Transgen, die Galaktose-3-O-sulfotransferase 1, wird unter Kontrolle der PLP-Promotorkassette exprimiert und führt zur verstärkten Sulfatidsynthese in Oligodendrozyten. Es zu einer vermehrten Speicherung von Sulfatid und, im Gegensatz zum konventionellen Mausmodell, zur endogenen Demyelinisierung. Obwohl die Sulfatidsynthese auch in der tgASA(+/-)-Maus erhöht ist, konnte keine Sulfatidspeicherung, Demyelinisierung oder Veränderungen des Verhaltens beobachtet werden, so dass die tgASA(+/-)-Maus in dieser Arbeit ebenfalls als Kontrollgruppe eingesetzt wurde.

1.7 Verwendete Primer

Alle verwendeten Primer wurden von Eurofins MWG Synthesis GmbH, Ebersberg, bezogen.

1.7.1 Für Genotypisierungs-PCR

Nummer	Name	Sequenz	Produktlänge
L 1782	ASA sense	TAGGGTGGAAAGTTACCCTAGA	ASA-Wt 480 bp
L 1783	ASA antisense	TGACCCAGGCCTTGTTCCCAT	ASA-KO 1100 bp
L 1784	ASA neo	GGAGAGGCTATTCGGCTATGAC	
L 1780	CST sense	ATGACTCTGCTGCCAAGAAGC	CST-Endo 2146 bp

L 1781	CST antisense	CCACCTTAGAAAGTCCCTAAGG	CST-Tg 1272 bp
L 2881	P5 sense	TGACCTTGGATTCTGAGC	NG2-Wt 900 bp
L 2882	P7 antisense	ACAGCTTTCCTTCCAGAC	NG2-KO 750 bp

bp = Basenpaare, Endo = Endogen, KO = Knock-Out, Tg = Transgen, Wt = Wildtyp.

1.7.2 Für qReal Time PCR

Nr.	Gen	Sequenz (5'→3')	Produktlänge
L 2170/71	UbC	F: AGG CAA GAC CAT CAC CTT GGA CG R: CCA TCA CAC CCA AGA ACA AGC ACA	130 bp
L 3695/96	NG2	F: TCG ACC TCT CTG ACG GCG CA R: TGG GGG CCT CTT ACC ACC CG	311 bp

1.8 Puffer und Lösungen

1.8.1 Verwendete Puffer

Falls nicht anders angegeben, werden alle Puffer mit bidestilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS), 10 ×	100 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ 1,5 M NaCl 2,5 M KCl pH = 7,4
Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer (TAE), 50 ×	2,5 M Tris-HCl 250 mM EDTA 1 M Natriumacetat pH = 8,0
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) 10 ×	0,1 M Tris-HCl 1,5 mM NaCl pH = 7,4
„Western Blot“ Waschpuffer (TBS-T)	0,5 % Tween 20 <u>in TBS</u>

„Western Blot“ Blockierungspuffer	5 % Magermilchpulver <u>in TBS-T</u>
„Western Blot“ Entwicklungspuffer	1% Magermilchpulver <u>in TBS-T</u>
SDS-PAGE-Laufpuffer, 10 x	250 mM Trisaminoethan 1,9 M Glycin 1 % SDS pH = 8,6
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer, 10 x	500 mM Tris-HCl pH = 6,8
SDS-PAGE-Trenngelpuffer, 10 x	1,5 M Tris-HCl pH = 8,8
Laemmli-Puffer, 4 x	240 mM Tris-HCl 8 % SDS 40 % Glycerol 4 % β -Mercaptoethanol 0,01 % Bromphenolblau pH = 6,8
Denaturierender Harnstoff-Puffer	50 mM Tris-HCl 5 % SDS 4 M Harnstoff 2,5 % Glycerol 10 mM Dithiothreitol 0,01 % Bromphenolblau pH = 6,8

Blot-Puffer, normal	48 mM Trisaminoethan
	39 mM Glyzin
	0,037 % SDS
	20 % Methanol
Blot-Puffer, große Proteine	48 mM Tris
	39 mM Glyzin
	0,1 % SDS
	10 % Methanol
	pH = 8,3

1.8.2 Lösungen für Perfusion

Alle Lösungen werden mit 1 × PBS angesetzt.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Sedativ	2,5 % 2,2,2-Tribromethanol
Procain-Lösung	1 % Procainhydrochlorid
Fixativ	4 % Paraformaldehyd
Konservierungs-Lösung	0,05 % Natriumazid

1.8.3 Lösungen für Häkalaun-Gegenfärbung

Bezeichnung	Zusammensetzung
Häkalaun-Stocklösung	0,1 % Hämatoxylin
	0,02 % Natriumiodat
	5 % $KAl(SO_4)_2 \times 12 H_2O$
	in ddH ₂ O
Häkalaun-Färbelösung	5 % Chloralhydrat
	0,1 % Zitronensäure
	in Häkalaun-Stocklösung

1.8.4 Lösungen für Alzian-Blau-Färbung

Bezeichnung	Zusammensetzung
Scott´s Fixativ	40 mg/mL Paraformaldehyd 0,3 M Magnesiumchlorid 25 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ in ddH ₂ O pH = 5,7
Färbelösung	0,025 % Alcian Blau 8GX in Scott´s Fixativ

1.8.5 Lösungen für Immunfluoreszenz

Alle Lösungen werden, wenn nicht anders angegeben, mit 1 × PBS angesetzt.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Anti-Autofluoreszenzpuffer I	0,05 % Glyzin
Anti-Autofluoreszenzpuffer II	0,2 % Natriumborhydrid
Blockierungspuffer	2 % BSA, 0,4 % Triton X 100
Antikörperpuffer	1 % BSA, 0,1 % Triton X 100
Quenching-Reagenz	Gesättigte Lösung von Sudan Schwarz B in 70 % EtOH/ddH ₂ O

1.8.6 Lösungen für Lipide

Bezeichnung	Zusammensetzung
Equilibrierungspuffer für RP18	CHCl ₃ /MeOH/0,1 M KCl (6:96:94, v/v/v)
Entwickler	625 mM CuSO ₄ × 5 H ₂ O 1,4 M H ₃ PO ₄ in ddH ₂ O

1.8.7 Proteaseinhibitoren für Gewebehomogenate

Alle Lösungen werden bei -20°C gelagert.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Aprotinin	0,2 % in MeOH
Leupeptin	0,1 % in ddH ₂ O
Pefabloc	5 % in ddH ₂ O
Pepstatin	0,1 % in MeOH

3. Methoden

3.1 Versuchstiere

Die Genehmigung des hier durchgeführten Tierversuchs mit Antragsnummer 84-02.04.2012.A425 wurde mit Gültigkeit bis zum 29.02.2016 erteilt.

3.1.1 Haltung

Die Mäuse werden in speziellen Haltungsräumen (klimatisiert, 12:12-Hell-Dunkel-Rhythmus) unter Standardbedingungen im Tierstall des Institutes für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Bonn gehalten und von Versuchstierpflegern betreut.

3.1.2 Ohrmarken

Zur Identifikation werden im Alter von drei Wochen Ohrmarken gesetzt. Es wird ein Lochsystem zur Markierung der Mäuse verwendet. Die Ohrmarke entspricht den letzten zwei Ziffern der fortlaufenden Tiernummer (1-20).

Im Zuge der Markierung wird der Genotyp der Mäuse bestimmt. Dafür wird das bei der Lochmarkierung anfallende Gewebe verwendet.

3.2 Genotypisierung

3.2.1 Extraktion der genomischen DNA aus Gewebe

Zur Bestimmung des Genotyps der Mäuse wird die Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus dem bei der Lochmarkierung der Mäuse anfallenden Gewebe extrahiert.

Das Gewebe wird in einem 1,5 mL-Plastikreaktionsgefäß vorgelegt und mit 750 μ L DNA-Lyse-Puffer versetzt. Nach Zusatz von 100 μ g/mL Proteinase K wird das Gewebe unter Schütteln bei 55 °C im Heizblock über Nacht (ü. N.) verdaut. 250 μ L einer gesättigten Lösung von Natriumchlorid werden zugegeben und die Proben für weitere fünf Minuten bei 55 °C im Heizblock geschüttelt. Um die gelösten Proteine unter Kristallisierung von Natriumchlorid zu fällen, wird die Lösung 10 min bei ca. 18000 \times g, 4 °C zentrifugiert. Die DNA ist im Überstand gelöst. Der Überstand wird in ein 1,5 mL-Plastikreaktionsgefäß überführt, mit 500 μ L Isopropanol versetzt und durchmischt. Die DNA fällt aus. Nach 10 min Zentrifugation bei 18000 \times g, 4 °C befindet sich die DNA als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Der Überstand wird verworfen, das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet.

Die DNA wird in 300 μ L ddH₂O aufgenommen und für einige Stunden bei 37 °C inkubiert, um die Löslichkeit zu erhöhen.

3.2.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient zur technischen Vervielfältigung ausgesuchter DNA-Fragmente. Der Reaktionsansatz enthält neben der Templat-DNA spezifische Startermoleküle (Primer) und eine hitzestabile DNA-Polymerase. Die PCR unterteilt sich in mehrere Phasen: Während der Denaturierung wird die Templat-DNA bei hoher Temperatur in die Einzelstränge „geschmolzen“ (Denaturierung). In der folgenden Hybridisierungsphase lagern sich die Primer an den DNA-Einzelstrang an (Primer-Hybridisierung) und ermöglichen den Beginn der DNA-Replikation durch die Polymerase (Elongation). Die Konzentration des ausgesuchten DNA-Fragments steigt durch Wiederholung des Reaktionszyklus (Denaturierung / Primer-Hybridisierung / Elongation) exponentiell an.

1 μL DNA-Lösung wird in einem 0,2 mL-Plastikreaktionsgefäß vorgelegt und mit 19 μL des Mastermix versetzt. Die Durchführung der PCR erfolgt automatisiert mithilfe eines Thermocyclers.

Tabelle 1: Zusammensetzung des PCR-Mastermix

Reagenz	Volumen je Probe
RedTaq [®] ReadyMix [®] PCR Reaction Mix	10 μL
Primer [10 μM]	0,2 μL
ddH ₂ O	ad 19 μL

Tabelle 2: Programm für ASA/CST-Genotypisierungs-PCR

Stufe	Temperatur	Dauer [min:sec]	Anzahl Zyklen	Aktion
1	94 °C	5:00	1	Denaturierung / Aktivierung
2	94 °C	0:30	32	Denaturierung
	56 °C	0:30		Primerhybridisierung
	72 °C	1:00		Elongation
3	72 °C	10:00	1	Freie Elongation
4	4 °C	∞	1	Kühlung der PCR-Produkte

Tabelle 3: Programm für NG2-Genotypisierungs-PCR

Stufe	Temperatur	Dauer min:sec	Anzahl Zyklen	Aktion
1	94 °C	5:00	1	Denaturierung / Aktivierung
2	94 °C	0:30	32	Denaturierung
	52 °C	0:30		Primerhybridisierung
	72 °C	1:00		Elongation
3	72 °C	10:00	1	Freie Elongation
4	4 °C	∞	1	Kühlung der PCR-Produkte

3.2.3 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse der in der PCR synthetisierten DNA-Fragmente erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese. Aufgrund ihrer negativ Molekülladung bewegen sich DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. Durchlaufen sie dabei eine Matrix mit definierter Porengröße, kommt es zur Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe. Als Matrix wird ein Gel aus Agarose verwendet, dessen Porengröße direkt von der Agarose-Konzentration anhängig ist.

Für die Auftrennung der DNA-Fragmente aus der Genotypisierungs-PCR wird ein einprozentiges Agarose-Gel verwendet. Zur Visualisierung der DNA im ultravioletten Licht ist dem Gel 0,1 µg/mL Ethidiumbromid zugesetzt. Es werden ca. 15 µL des Reaktionsansatzes aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 120 V in Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer (TAE). Zur Identifizierung der DNA-Fragmente wird eine DNA-Leiter verwendet.

Tabelle 4: Spezifische Banden nach Agarose-Gelelektrophorese von Genotypisierungs-PCR-Produkten.

Genotyp	Produktgröße
ASA-Wildtyp	480 bp
ASA-Knockout	1100 bp
CST-endogen	2146 bp
CST-transgen	1272 bp
NG2-Wildtyp	900 bp
NG2-Knockout	750 bp

bp = Basenpaare.

3.3 Untersuchung der Genexpression

3.3.1 Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion von RNA nach Chomczynski und Sacchi, 1987²⁵

Guanidiniumthiocyanat (GTC) zeichnet sich durch seine stark Protein-denaturierende Wirkung aus. Eine Konsequenz dieser Eigenschaft ist, dass Ribonukleasen durch den Kontakt mit GTC inaktiviert werden. Aufgrund dieser Wirkung löste Guanidiniumthiocyanat die vorher gebräuchliche Phenolextraktion von Ribonukleinsäure (RNA) im Laborgebrauch ab. Chomczynski und Sacchi entwickelten 1987 ein Protokoll zur RNA-Isolation mit einem Gemisch aus Guanidiniumthiocyanat, Phenol und Chloroform.²⁶ Dieses Protokoll machte den bisher notwendigen Ultrazentrifugationsschritt überflüssig und verkürzte die Präparationszeit erheblich. Kurze Inkubationszeiten und geringer Arbeitsaufwand ermöglichen die Extraktion nicht degradierter RNA in weniger als zwei Stunden. Die hier verwendete Methode der RNA-Isolation mit TRIzol® orientiert sich am Originalprotokoll von 1987.

Gewebe wird in 1 mL TRIzol® je 100 mg Feuchtgewicht mit dem Ultra-Turrax und anschließend einer Spritze (21G Kanüle) homogenisiert. Die Gewebehomogenate werden 5 min bei RT inkubiert, um eine vollständige Auflösung der Zellstrukturen zu gewährleisten. Je eingesetztem mL TRIzol® werden 100 µL 1-Brom-3-chlorpropan (BCP) zugegeben und die Proben 30 sec durchmischt, bis eine milchige Suspension entsteht. Durch Zentrifugation (17000 × g, 15 min, 4 °C) werden organische und wässrige Phase getrennt. In der Interphase sammeln sich genomische DNA und Proteine. Die obere wässrige Phase wird abgenommen und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die organische Phase wird verworfen. Je eingesetztem mL TRIzol® werden der wässrigen Phase 500 µL Isopropanol zugesetzt, die Proben kurz durchmischt und 10 min bei RT inkubiert, um die RNA auszufällen. Nach Zentrifugation (17000 × g, 15 min, 4 °C) befindet sich die RNA im Pellet am Boden der Reaktionsgefäßes. Der Überstand wird verworfen. Um restliches Isopropanol zu entfernen, werden 500 µL 75 % Ethanol auf das Pellet gegeben. Die Proben werden geschüttelt und erneut zentrifugiert (17000 × g, 15 min, 4 °C). Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird an der Luft getrocknet, bis es farblos ist und wird dann mit maximal 100 µL Wasser versetzt. Nach 15 min Inkubation bei 55-60 °C werden die Proben durchmischt. Die RNA-Konzentration wird im Anschluss spektrophotometrisch bestimmt.

3.3.2 Aufreinigung von RNA

Um die isolierte RNA von Salzen, Proteinen und DNA-Kontaminationen zu befreien, wird das RNeasy® Mini Kit von Quiagen verwendet. Es ermöglicht die schnelle Reinigung von bis zu 100 µg RNA pro Ansatz. RNA-Moleküle mit einer Länge von mindestens 200 Basen werden

bei diesem Verfahren an eine stationäre Phase auf Siliziumdioxid-Basis gebunden. Kontaminationen und kleinere RNA-Moleküle (5.8S-rRNA, 5S-rRNA, tRNA) werden von der Säule eluiert. Um die geringe Menge an DNA zu entfernen, die nicht durch die Anwendung unterschiedlicher Elutionsmittel entfernt werden kann, kann der Ansatz optional einem DNase-Verdau unterzogen werden. Die RNA wird mit Wasser eluiert. Sie kann für Genexpressionsstudien verwendet werden.

3.3.3 Denaturierende RNA-Agarose-Gelelektrophorese

RNA liegt im Gegensatz zu DNA als Einzelstrang vor. Durch Wechselwirkungen innerhalb des Stranges sowie durch Hybridisierung mit einem zweiten RNA-Strang können daher Sekundärstrukturen gebildet werden, die die elektrophoretische Auftrennung der RNA stören. Um diese Sekundärstrukturen aufzubrechen, wird die RNA-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Als Reduktionsmittel werden Formaldehyd oder Formamid verwendet. Die Verwendung von Formamid erweist sich als vorteilhaft, da ein nicht denaturierendes Gel verwendet werden kann. Das gebildete Imin ist durch Mesomerie stabilisiert, so dass das Reaktionsgleichgewicht auf Produktseite liegt.

Ein Volumen entsprechend der Menge von 1-2 μg RNA wird mit RNA-Ladepuffer (Volumenverhältnis 1:1) versetzt und 10 min bei 70 °C denaturiert. Das komplette Volumen wird in einem 1,5%igen Agarose-Gel (ohne Ethidiumbromid) bei 120 V aufgetrennt. Zur Kontrolle wird eine RNA-Leiter mitlaufen gelassen. Eine RNA-Probe gilt als intakt, wenn das 28S-RNA-Signal ungefähr doppelt so intensiv wie das 18S-RNA Signal ist.

3.3.4 cDNA-Synthese

Der biologische Informationsfluss von DNA über RNA zum Protein kann seit der Entdeckung der reversen Transkriptase (rT) zumindest teilweise umgekehrt werden. Retroviren, wie das humane Immunschwäche-Virus (HIV), bedienen sich dieses Enzymes zur Transkription ihrer RNA in DNA, um sich in Wirtszellen vermehren zu können. Technisch wird die rT eingesetzt, um isolierte Messenger-RNA (mRNA) in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Der Vorteil dieser Methode im Vergleich zum Arbeiten mit RNA ist die größere Beständigkeit der DNA.

Zur Synthese der cDNA werden 5 μg der gereinigten RNA eingesetzt. Das Reaktionsprodukt wird als 1:10 Verdünnung in Wasser bei -20 °C gelagert.

Tabelle 5: Zusammensetzung des First Strand Master Mix für die cDNA-Synthese.

Reagenz	Volumen für 1 x Ansatz [μL]
Wasser	1
5 x First Strand Reaction Mix	4
DTT, 0,1 M	2
dNTP, 10 mM	1

Tabelle 6: Programm für die cDNA-Synthese.

Stufe	Temperatur	Dauer [min]	Phase
1	65 °C	10	Denaturierung
	4 °C	> 2	Zugabe First Strand Master Mix
2	42 °C	2	Annealing
	4 °C	> 2	Zugabe SuperScript™ II rT
3	42 °C	60	cDNA-Synthese
4	70 °C	15	Inaktivierung
5	4 °C	> 10	Lagerung

3.3.5 Quantitative Real Time-Polymerase-Kettenreaktion

Die Reaktionsfähigkeit und Veränderlichkeit einer Zelle durch die Regulation der Genexpression gesteuert. Zu den regulatorischen Mechanismen gehören unter Anderem die Methylierung von DNA, die Ausschüttung von Transkriptionsfaktoren und post-transkriptionale Regulationsmechanismen.

In welchem Maße ein Gen exprimiert wird, lässt sich über die Menge an mRNA oder Protein definieren, die sich in der Zelle befindet. Die Quantifizierung von mRNA ist seit Entwicklung der quantitativen Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) in den 1990er Jahren mit hoher Genauigkeit durchführbar. Diese Methode vereint zwei Techniken: die Replikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion und die Detektion des Reaktionsverlaufes durch Fluoreszenzmessung.

Die qRT-PCR wird in 96-Well-Platten durchgeführt. Die Reagenzien werden als Master-Mix angesetzt und bis zur Verwendung unter Lichtausschluss auf Eis gelagert. Je Ansatz werden 5 μL cDNA und 15 μL Mastermix vorgelegt. Zum Schutz vor Substanzverlust wird die Platte mit Klebefolie abgedichtet.

Tabelle 7: Zusammensetzung Mastermix für die qRT-PCR.

Reagenz	Konzentration Stocklösung	Volumen [μL]
Wasser		2,8
ROX Reference Dye	100 x	0,2
Forward-Primer	10 μM	1,0
Reverse-Primer	10 μM	1,0
SYBR Green Jump Start™ Taq Ready Mix™	0,025 U/ μL	10,0

Tabelle 8: Programm für die qRT-PCR.

Stufe	Temperatur	Dauer [min:sec]	Anzahl Zyklen	Aktion
1	94 °C	2:00	1	Denaturierung / Aktivierung
2	94 °C	0:15	40	Denaturierung
	60 °C	1:00		Amplifikation
3	60 °C	0:20	1	Schmerzlkurve
	95 °C	0:15		
	60 °C	0:15		

3.4 Cuprizon-Behandlung nach Carlton, 1966

3.4.1 Einfacher Zyklus

Sieben Wochen alte männliche Mäuse werden sechs Wochen lang mit einer 0,2%igen CPZ-Diät gefüttert. Um die Akzeptanz der Diät zu steigern, wird das CPZ mit zuckerfreier Erdnusspaste (Rapunzel Naturkost, Deutschland) verfüttert. Zur Kontrolle erfolgt eine sechswöchige Behandlung ausschließlich mit Erdnusspaste (= Mock).

Die Remyelinisierung erfolgt spontan, sobald auf Haltdiät (Altromin, Deutschland) umgestellt wird. Nach sechs Wochen bei Haltdiät ist die Erholungsphase abgeschlossen. Die Mäuse werden zur histologischen und molekularbiologischen Analyse präpariert.

3.4.2 Zweifacher Zyklus

In einem erweiterten Versuchsansatz wird der komplette Behandlungszyklus nach Abschluss der Erholungsphase wiederholt, um die Sulfatidspeichermenge in den ASA-defizienten Mäusen zu erhöhen. Anschließend werden die Mäuse zur histologischen und molekularbiologischen Analyse präpariert.

3.5 Histologische und immunhistologische Methoden

3.4.1 Perfusion und Fixierung

Die Maus wird durch intraperitoneale Injektion einer letalen Dosis von 2,2,2-Tribromethanol (1 mg/g Körpergewicht) sediert. Zur Überprüfung der adäquaten Betäubung der Maus wird mit einer Pinzette ein Schmerzreiz an Vorder- und Hinterpfoten ausgelöst. Erst wenn keine Reaktion zu beobachten ist, wird fortgefahren.

Die Maus wird auf einer stabilen Unterlage fixiert und nach Absprühen mit 70%igem Ethanol mit einer sterilen Schere entlang der Mittellinie eröffnet. Die Rippen werden beidseitig des Brustbeins durchtrennt, um durch Hochklappen des Brustkorbes einen freien Zugang zum Herzen zu erlangen. Die Kanüle der Perfusorspritze wird am linken Ventrikel in das Herz eingeführt, dann der rechte Vorhof eröffnet. Um die Perfusionseffizienz zu steigern, wird das Tier zunächst mit 30 mL Procain-Lösung, anschließend mit 50 mL des Fixativs perfundiert. Das Gehirn wird im Ganzen entnommen und ü. N. bei 4 °C in Fixativ nachfixiert, dann mit 1 × PBS gewaschen und bei 4 °C in Konservierungs-Lösung gelagert.

3.4.2 Gewebeschnitte

Zur Anfertigung der Gewebeschnitte mit dem Vibratom wird das fixierte Gehirn, wie in Abbildung 5 gezeigt, ungefähr 1 mm vor und 2,5 mm hinter dem Bregma mithilfe einer Rasierklinge koronal geteilt.

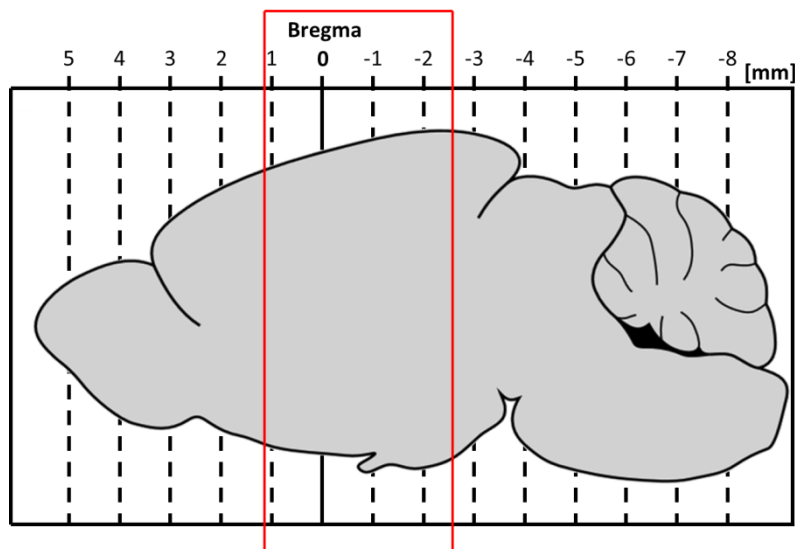


Abbildung 5: Lokalisation der Schnittebene. Sagittale Darstellung des Gehirnes einer Maus. Alle hier gezeigten Färbungen wurden an Schnitten aus dem rot markierten Bereich durchgeführt. Quelle: Eigene Darstellung.

Der entstandene Gewebekblock wird über die kaudale Schnittfläche mit Cyanoacrylat-Kleber auf dem Probenhalter fixiert. Das Gewebe ist sofort bereit zum Schneiden. Der so präparierte Probenträger wird in der Pufferwanne platziert und diese mit 1 × PBS befüllt, bis das Gewebe komplett von Puffer bedeckt ist.

Mit einer Schnittgeschwindigkeit von 2 mm/sec wird das Gewebe bei einer Vibrationsfrequenz von 90 Hz und einer Amplitude von 0,1 mm zunächst in 100 μm -Schritten begradigt, bis eine vollständige Schnittfläche freigelegt ist. Dann wird die Schnittdicke auf 30 μm reduziert. Die Gewebeschnitte werden mit einem Pinsel in 24-Well-Platten überführt und freischwimmend in Konservierungs-Lösung bei 4 °C gelagert.

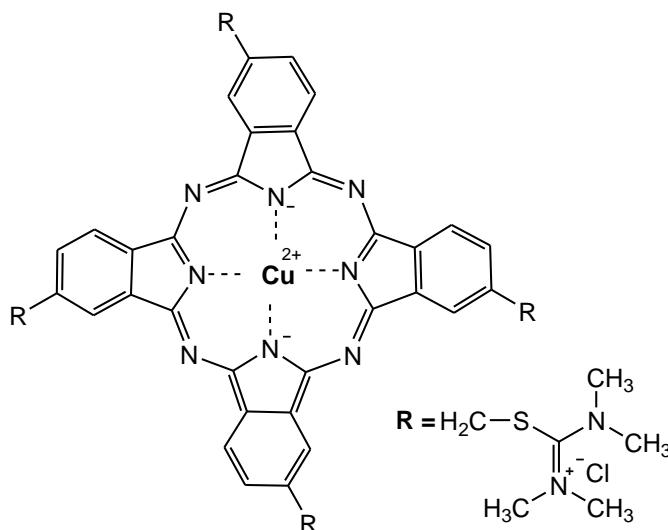
3.4.3 Färbung der Zellkerne mit Hämalaun

Zur histochemischen Färbung der Zellkerne werden die Gewebeschnitte mit Hämalaun gefärbt.

Die freischwimmenden Gewebeschnitte werden auf Objektträger aufgezogen und bei 40 °C auf einer Heizplatte getrocknet. Die Färbung der Zellkerne erfolgt durch 5 min Inkubation in Hämalaun-Färbelösung. Die Gewebeschnitte werden nach der Färbung 30 sec unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Dazu wird der Objektträger in einem Winkel von 45° unter den Wasserstrahl halten, so dass sich die Schnitte auf der dem Wasser abgewandten Seite des Objektträgers befinden, damit sie nicht beschädigt werden. Zum Entfärben werden die Objektträger 5 x in 1% HCl/EtOH getaucht und anschließend erneut 30 sec unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Nach dem Trocknen können die so behandelten Gewebeschnitte eingedeckt werden.

Die gefärbten Zellkerne erscheinen dunkelviolet, das umliegende Gewebe hell rosa bis farblos.

3.4.4 Alzian Blau Färbung von Sulfatid nach Scott & Dorling, 1965²⁷



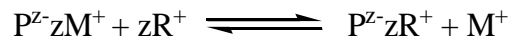
Alzian Blau (AZB) ist ein Farbstoff der Familie der Kupfer-Phtalocyanine und ist intensiv blau gefärbt. Aufgrund seiner positiven Molekülladung wird es eingesetzt, um durch Komplexbildung anionische Makromoleküle zu färben.

Im Gewebe der Säugetiere sind drei anionische Molekülreste anzutreffen, die alle mit AZB wechselwirken können: Carboxylat-, Phosphat- und Sulfatgruppen.

Abbildung 6: Strukturformel von Alzian Blau. Darstellung des chromophoren Phtalocyanin-Kern und der kationischen Iosthiouronium-Reste.

Die elektrostatische Wechselwirkung zwischen diesen anionischen Resten und AZB kann generell, wie in Formel 4 beschrieben, als die Präzipitation eines Polyanions

P^{z-} mittels des organischen Kations R^+ beschrieben werden und ist in Anwesenheit eines anorganischen Elektrolyten M^+ reversibel.



Formel 4: Präzipitation eines Polyanions. P^{z-} = anionisches Polymer mit negativer Ladung z , M^+ = anorganisches Gegenion mit positiver Ladung, R^+ = präzipitierendes Kation.

Die Gleichgewichtskonstante K für die Färbungsreaktion kann aus Formel 4 abgeleitet werden und ist in Formel 5 dargestellt.

$$K = CEC = \frac{[M^+]z}{[R^+]z}$$

Formel 5: Gleichgewichtskonstante oder kritische Elektrolytkonzentration der Präzipitation eines Polyanions.

Ist die Konzentration des organischen Kations R^+ konstant, liegt R^+ also in ausreichend großem Überschuss vor, ist das Gleichgewicht nur von der Konzentration des anorganischen Kations M^+ abhängig. Darum wird K auch als kritische Elektrolytkonzentration (CEC) bezeichnet.

In der Praxis haben Carboxylat-haltigen Polyanionen niedrige und Sulfat-haltige Polyanionen hohe CECs. Sie werden bei gleicher Konzentration von M^+ unterschiedlich gut gefärbt, wie in Tabelle 9 gezeigt. Die spezifische Färbung der Sulfatide mit Alzian Blau wird im Zuge dieser Arbeit bei einer Magnesiumkonzentration von 0,3 M/L und pH 5,7 durchgeführt.

Tabelle 9: AZB-Färbung von unbehandeltem, sulfatiertem, carboxyliertem und phosphoryliertem Lebergewebe bei pH = 5,8. Intensivität der Färbung: +++ sehr stark, ++ stark, + moderat, ± schwach, - keine.

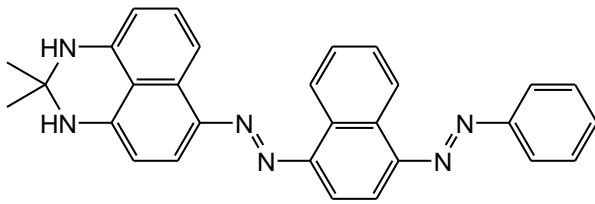
	Konzentration $MgCl_2$ [M/L]					
	0	0,1	0,2	0,3	0,4	1,0
Unbehandelt	++	+	±	±	-	-
Sulfatiert	+	++	++	++	+++	+++
Carboxyliert	+++	+++	+	±	-	-
Phosphoryliert	++	+	-	-	-	-

Quelle: J. E. Scott, J. Dorling: Differential staining of acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) by alcian blue in salt solutions, *Histochemie* 5 (1965), pp. 221-233.

Alle Inkubationsschritte erfolgen unter Schütteln bei RT.

Der pH-Wert und die Magnesiumkonzentration im Gewebe werden durch Inkubation in Scott's Fixativ eingestellt. Die Lösung wird dreimal im Abstand von 2-4 h erneuert und die Gewebeschnitte dann ü. N. in Scott's Fixativ inkubiert. Zur Färbung wird das Gewebe 4 h in Färbelösung inkubiert. Unspezifisch gebundenes Alzian Blau wird im anschließenden Waschschrift mit Scott's Fixativ entfernt. Sulfatid-haltiges Speicher material ist kräftig blau gefärbt, umgebendes Gewebe erscheint je nach Dauer des Waschschriftes hellblau bis farblos.

3.4.5 Sudan Schwarz B Färbung von Myelin nach Stilwell, 1956²⁸



Sudan Schwarz B (SSB) ist ein unpolarer Diazofarbstoff, der zur Färbung von Lipiden und lipidhaltigen Substanzen, wie auch Myelin, verwendet wird.

Abbildung 7: Strukturformel von Sudan Schwarz B.

Alle Inkubationsschritte erfolgen unter Schütteln bei RT.

Um das Gewebe zu dehydrieren, werden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von 20-70 % EtOH/ddH₂O gewaschen und anschließend 3 h in der gesättigten SSB-Färbelösung inkubiert. Unspezifisch gebundener Farbstoff wird durch Waschen mit 70 % EtOH/ddH₂O entfernt.

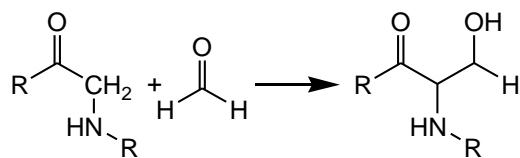
Das nicht myelinisierte Gewebe erscheint farblos bis hell bläulich, myelinisierte Bereiche dunkelblau bis schwarz.

3.4.6 Immunfluoreszenzfärbung

3.4.6.1 Reduktion von Aldimin-bedingter Autofluoreszenz nach Clancy und Cauller, 1998²⁹

Die Fixierung von Gewebe mit Formaldehyd beruht auf dem Mechanismus der Aldol-Reaktion, wie in Abbildung 8 gezeigt: In Anwesenheit azider Wasserstoffatome in α -Position zu einem Carbonyl-Kohlenstoff-Atom reagiert Formaldehyd unter Bildung des entsprechenden Aldols. Das entstandene Aldol kann unter Kondensation mit weiteren Carbonyl-Verbindungen reagieren, die azide Wasserstoffatome in α -Position tragen.

A) Aldolreaktion



B) Kondensation

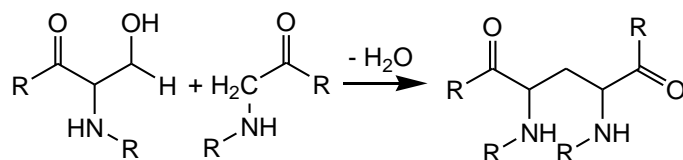


Abbildung 8: Chemische Grundlage der Gewebefixierung mit Formaldehyd.

Da Formaldehyd hoch reaktiv ist, können neben der Aldol-Reaktion eine Reihe weiterer Reaktionen eingegangen werden, die zur Bildung unerwünschte Nebenprodukte führen.

Problematisch ist in diesem Zusammenhang vor allem die nukleophile Addition von freien Aminogruppen an Formaldehyd, wie in Abbildung 9 am Beispiel von Lysin gezeigt.

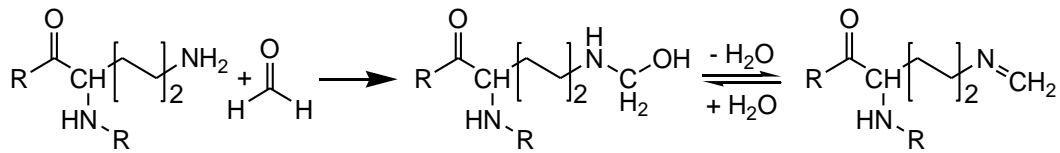


Abbildung 9: Nukleophile Addition unter Bildung einer Schiff-Base.

Die entstehenden Schiff-Basen reagieren schnell mit weiteren Nucleophilen. Zur Immundetektion eingesetzte Antikörper können so kovalent an Gewebeschnitte gebunden werden und unspezifische Signale erzeugen.

Die Strategie zur Reduktion der Autofluoreszenz umfasst daher zwei Ansätze: Durch Behandlung mit Glycin wird im Gewebe verbliebenes Formaldehyd in Form von 2-Methylenglycin abgefangen und die Bildung von Schiff-Basen verhindert. Bereits entstandene Schiff-Basen werden durch Reduktion mit elementarem Wasserstoff in korrespondierende unproblematische Verbindungen überführt.

Zur Reduktion der aus der PFA-Fixierung resultierenden Autofluoreszenz werden die Gewebeschnitte 30 min im Glycin-haltigen Autofluoreszenzpuffer I, dann 10 min im Natriumborhydrid-haltigen Autofluoreszenzpuffer II inkubiert. Die Gewebeschnitte sind nun bereit für die Bindung des Antikörpers.

3.4.6.2 Immunfluoreszenzfärbung

Die spezifische Bindung zwischen Antikörper und Antigen bildet die Grundlage zur Visualisierung von Zellstrukturen, die durch Lichtmikroskopie nicht darstellbar sind. Mittels spezifischer Antikörper, die zum Beispiel mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt sind, können zytosolische und membranständige Antigene in der Zelle detektiert werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe besitzen ein definiertes Absorption- und Emissionsmaximum, so dass ein hoch spezifisches Signal erhalten wird.

Im Allgemeinen bedient man sich nicht der direkten, sondern indirekten Immunfluoreszenz (IF) über Kombination eines primären und sekundären Antikörpers. Der primäre Antikörper ist gegen ein ausgewähltes Protein gerichtet und nicht mit einem Fluorophor konjugiert. Er wird mit einem sekundären, fluoreszenzgekoppelten Antikörper detektiert, der gegen das Immunglobulin des primären Antikörpers gerichtet ist. Der Vorteil dieser Methode liegt in der wesentlichen Verstärkung des Signals und großen Kombinationsmöglichkeit von primären und sekundären Antikörpern.

Alle verwendeten Lösungen werden mit 1 × PBS angesetzt. Alle Inkubationsschritte erfolgen unter Schütteln bei RT. Wenn nicht anders angegeben, erfolgt zwischen den Inkubationsschritten ein dreimaliger Waschschrift mit 1 × PBS, um Hintergrundfärbung und Artefaktbildung zu reduzieren.

Nach der Autofluoreszenzbehandlung werden die Gewebeschnitte 2 h in Blockierungspuffer inkubiert. Anschließend wird der primäre Antikörper, verdünnt in Antikörperpuffer, ohne nochmaliges Waschen ü. N. auf dem Gewebe inkubiert. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper wird, ebenfalls in Antikörperpuffer verdünnt, in Dunkelheit 90 min auf dem Gewebe inkubiert. Zur Gegenfärbung der Zellkerne wird 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) eingesetzt.

3.4.6.3 Reduktion der Lipofuszin-bedingten Autofluoreszenz mit Sudan Schwarz B nach Schnell *et al.*, 1999³⁰

Während des Alterungsprozesses entsteht im Zytoplasma postmitotischer Zellen, wie Neuronen, das Speichermaterial Lipofuszin. Lipofuszin lässt sich bei nahezu allen für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie verwendeten Wellenlängen zur Fluoreszenz anregen und stört so die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Gewebe erheblich.³¹ Schnell *et al.* haben eine effektive und einfache Methode entwickelt, diese Autofluoreszenz auszulöschen:

Aufgrund ihrer unpolaren Natur können Lipofuszin und SSB durch z. B. Van-der-Waals-Kräfte in Wechselwirkung treten. Die Energie des angeregten Lipofuszins wird dann auf SSB übertragen, ohne dass es zur Emission von Photonen kommt. Man spricht von Fluoreszenzauslöschung durch Förster-Resonanzenergietransfer. Das SSB-Molekül ist in der Lage die übertragene Energie innerhalb seines konjugierten π -Systems zu stabilisieren, ohne selbst zur Fluoreszenz angeregt zu werden.

Die Gewebeschnitte werden nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper 5 min mit Quenching-Reagenz inkubiert, dann mit 70 % EtOH/ddH₂O gewaschen und in 1 × PBS rehydriert.

3.4.7 Eindecken von Gewebeschnitten

Um die Bildung von störenden Salzkristallen zu vermeiden, werden die Gewebeschnitte mit ddH₂O gewaschen und dann auf Objektträger aufgezogen. Nach dem Trocknen werden die Gewebeschnitte mit ProLong® Gold Eindeckmedium eingedeckt und ü. N. bei RT in Dunkelheit getrocknet. Die Lagerung erfolgt in Dunkelheit bei 4 °C.

3.6 Molekularbiologische Methoden: Lipide

3.6.1 Gewebehomogenisierung

1 × TBS wird mit 1 µg/mL Aprotinin, 2 µg/mL Leupeptin, 100 µg/mL Pefabloc und 0,7 µg/mL Pepstatin versetzt und auf Eis vorgekühlt.

Je Hemisphäre werden 1,5 mL des so vorbereiteten TBS in einem 14 mL-Polypropylen-Reaktionsgefäß vorgelegt und das Gewebe wird in dieser Lösung 3 × 10 sec mit dem Dispergierer homogenisiert. Zwischen den Dispergierungsschritten wird das Homogenat 30 sec in Eiswasser gekühlt.

Das Gewebehomogenat wird in 2 mL-Plastikreaktionsgefäße überführt und bei -80 °C gelagert.

3.6.2 Lipidextraktion

Zur Abtrennung des nicht-wasserlöslichen Materials werden 250 µL Gewebehomogenat 1 h bei 100.000 × g, 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Pellet enthält die gesamte Lipidmasse des Homogenats. Das Pellet wird in 5 mL CHCl₃/MeOH (Volumenverhältnis 2:1) aufgenommen und in ein Pyrex-Glas überführt. Das Pellet wird mit dem Dispergierer homogenisiert. Die apolaren Lipide werden unter Rühren bei 60 °C Badtemperatur 4 h extrahiert.

Die Suspension wird 10 min bei 750 × g, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird über eine mit Glaswolle gestopfte Pasteurpipette in ein frisches Pyrex-Glas überführt und bei -20 °C gelagert. Das Pellet wird in 5 mL CHCl₃/MeOH (Volumenverhältnis 1:1) resuspendiert. Die polaren Lipide werden unter Rühren bei 60 °C Badtemperatur 4 h extrahiert. Anschließend wird die Suspension 10 min bei 750 × g, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird über die schon im ersten Extraktionsschritt verwendete Pasteurpipette mit dem apolaren Extrakt vereint und das Gesamtlipidextrakt dann im Stickstoff-Strom bei 50 °C Badtemperatur bis zur Trockene eingengt. Das eingedampfte Lipidextrakt wird bis zur alkalischen Hydrolyse bei -20 °C gelagert.

3.6.3 Alkalische Hydrolyse

Das eingedampfte Lipidextrakt wird in 5 mL MeOH aufgenommen und 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Nach Zugabe von 125 µL NaOH [4 M] wird das Extrakt unter Rühren bei 37 °C Badtemperatur 2 h hydrolysiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 20 µL Eisessig gestoppt. Die Lösung wird im Stickstoff-Strom bei 50 °C Badtemperatur bis zur Trockene eingengt.

3.6.4 Umkehrphasenchromatographie nach Williams und McCluer, 1980³²

Da hohe Salzkonzentrationen analytische Verfahren stören können, werden die Lipidextrakte vor der weiteren Analyse entsalzt.

3.6.4.1 Herstellung des RP-18-Sorptionsmittels

Der trockene Lichroprep-RP-18-Sorbent wird im doppelten Volumen $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1, v/v) suspendiert und 30 min gerührt. Die Suspension wird 20 min auf Eis gelagert, bis die Partikel sich abgesetzt haben. Der Überstand wird dekantiert und der sedimentierte Sorbent insgesamt viermal mit dem doppelten Volumen Methanol gewaschen. Zwischen den Waschschritten wird die Suspension jeweils 20 min auf Eis gelagert und der Überstand dekantiert. Der so vorbereitete RP-18-Sorbent wird bei 4 °C als Suspension in MeOH (1:1, v/v) gelagert.

3.6.4.2 Umkehrphasenchromatographie

Bei dem hier verwendeten RP-18 Sorbenten handelt es sich um eine chemisch modifizierte Siliziumdioxid-Matrix, die durch Alkylierung mit C18-Kohlenstoffketten konjugiert wurde. Die im Extrakt enthaltenen Lipide binden durch hydrophobe Wechselwirkung an die Matrix, so dass enthaltene Ionen mit einem polaren Lösungsmittel (ddH_2O) eluiert werden können. Die gebundenen Lipide werden mit apolaren Lösungsmitteln ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) eluiert.

Zur Präparation der Chromatographiesäulen werden mit Glaswolle gestopfte Pasteurpipetten mit je 1,5 mL RP-18-Sorptionsmittelsuspension befüllt. Nach dem Leertropfen werden die Säulen mit 2 × 1 mL Equilibrierungspuffer gewaschen.

Währenddessen wird das hydrolysierte Lipidextrakt in 2 mL MeOH gelöst und 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Die Lipidlösung wird mit 2 mL Ammoniumacetatlösung [300 mM] versetzt, durchmischt und auf die Säule aufgetragen. Nach dem Leertropfen wird das Pyrex-Glas mit 2 × 1 mL $\text{MeOH}/\text{Ammoniumacetatlösung}$ [200 mM] (1:1, v/v) gewaschen und die Waschlösungen nacheinander auf die Säule gegeben. Nach dem Leertropfen werden die Salze mit 6 × 1 mL ddH_2O eluiert. Die Elution der Lipide erfolgt der Reihe nach mit 1 × 1 mL MeOH und 6 × 1 mL $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1, v/v). Das Eluat wird im Stickstoffstrom bei 50 °C Badtemperatur bis zur Trockene eingengt.

Das Lipidextrakt wird in 300 μL $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1, v/v) aufgenommen und in 1,5 mL-Glasgefäßen mit Schraubverschluss und Teflondichtung bei -80 °C gelagert.

3.6.5 Dünnschichtchromatografie (TLC)

Die Auftrennung eines Stoffgemischs durch Verteilung seiner Einzelbestandteile zwischen stationärer und mobiler Phase wird als Chromatographie bezeichnet.

Zur Auftrennung von Lipidgemischen wird eine polare stationäre Phase (Siliziumdioxid auf Glas oder Aluminium) verwendet. Die mobile Phase besteht aus einem beliebigen Gemisch polarer und apolarer Lösungsmittel. Die genaue Zusammensetzung richtet sich nach der analytischen Fragestellung.

Fließt die mobile über die stationäre Phase, werden die löslichen Bestandteile des Lipidgemischs, das sich auf der stationären Phase befindet, entlang der Flussrichtung aufgetrennt. Umso besser ein Bestandteil in der mobilen Phase löslich ist, umso weiter wird er auf der stationären Phase transportiert.

30 min vor Verwendung wird die Chromatographiekammer mit dem Laufmittelgemisch ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{ddH}_2\text{O}$, 60:27:4, v/v/v) befüllt, damit sich im Inneren ein Gleichgewicht zwischen flüssiger und gasförmiger Phase einstellt. Da das Laufmittel Wasser enthält, wird ein Stück Filterpapier in die Kammer gestellt, um die homogene Verteilung des Wasserdampfes in der Kammer zu beschleunigen. Die Kammer wird dicht verschlossen.

Um gebundenes Wasser zu entfernen, das die Laufeigenschaften des Analyten verändern kann, werden die TLC-Platten vor Gebrauch 15 min bei 180 °C getrocknet. Die Proben werden anschließend mithilfe eines TLC-Sprayers aufgetragen.

Die beladene TLC-Platte wird senkrecht in die Chromatographiekammer gestellt und inkubiert, bis die Laufmittelfront sich ca. 1 cm unter dem oberen Rand der TLC-Platte befindet. Zur Detektion der aufgetrennten Lipide wird die TLC-Platte anschließend mit Entwicklerlösung getränkt. Die Lipide werden bei 180°C 5 min verascht und als dunkle Banden sichtbar.

3.6.6 Massenspektrometrische Analyse des Lipidextrakte

Der Begriff der **Spektroskopie** bezeichnet die Beobachtung der Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung und Materie. Im engeren Sinne verstehen sich darunter Methoden wie Röntgen- und Infrarot-Spektroskopie. Auch die Wechselwirkung von bewegter Materie mit dem magnetischen Feld fällt unter den Begriff der Spektroskopie, genauer unter den Begriff der Massenspektroskopie.

Die spektrometrischen Methoden dienen allgemein der **Substanzidentifizierung**, liefern Informationen über die Struktur eines Analyten oder die quantitative Zusammensetzung untersuchter Systeme. Im Massenspektrometer werden diese Information durch Ionisation

der Probe und Auftrennung der erzeugten Ionen nach Masse und Ladung erhalten. Heute ist die Massenspektrometrie eine der bedeutendsten analytischen Methoden, da das Probenvolumen minimal und der Datengehalt des aufgenommenen Spektrums maximal ist.

Im ersten Schritt der Messung wird die Probe in die Gasphase überführt, damit sie ionisiert werden kann. Besonders im Falle komplexer Biomoleküle, wie auch in den im Zuge dieser Arbeit analysierten Proben enthalten, stellt dieser Vorgang den limitierenden Faktor der Methode dar. Viele der enthaltenen funktionellen Gruppen sind thermolabil, so dass die Probe beim Erhitzen zerstört wird. Aufgrund des hohen Interesses an der Analyse komplexer Substanzen ist eine ganze Reihe von Methoden entwickelt worden, die eine schonende Überführung in die Gasphase ermöglichen, von denen aber nur die im Zuge dieser Arbeit verwendete Elektrospray-Ionisation genauer vorgestellt werden soll.

Bei diesem Ionisationsverfahren liegt die Probe in Lösung vor und wird durch eine Kapillare in die Ionenquelle gesprüht. Dem Sprühnebel entgegen gerichtet strömt ein Trockengas in die Kammer. Zwischen der Kapillare und dem Mantel der Ionenquelle ist eine Spannung von einigen Kilovolt angelegt. Das Prinzip ist in Abbildung 10 dargestellt: Es entstehen geladene Tröpfchen (Abb. 10 A), die durch die Verdampfung des Lösungsmittels immer kleiner werden (Abb. 10 B), bis nur noch die befreiten Ionen vorliegen (Abb. 11 C).

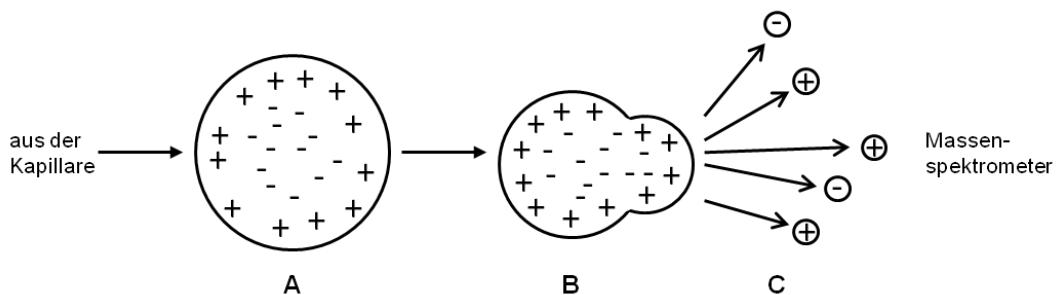


Abbildung 10: Modell zur Ionenbildung im Elektrospray. Quelle: Modifiziert nach M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Stuttgart, New York: Thieme, **2005**, 7. Auflage, p. 290.

Wie Formel 6 zeigt, werden diese geladenen Tröpfchen bzw. Ionen noch in der Ionenquelle des Massenspektrometers durch die angelegte Spannung in Abhängigkeit von ihrer Masse m und Ladung z auf einer geraden Flugbahn beschleunigt.

$$v = \sqrt{\frac{2 \cdot z \cdot e \cdot U}{m}}$$

Formel 6: Geschwindigkeit eines Ions nach dem Durchlaufen einer Beschleunigungsspannung.
 v = Geschwindigkeit, z = Ladung, e = Elementarladung, U = Spannung, m = Masse.

Beim Eintreten in den Analysatorteil des Massenspektrometers erfährt das beschleunigte Ion im angelegten Magnetfeld durch Lorentz- (Formel 7) und Zentrifugalkraft (Formel 8) eine Ablenkung von seiner geraden auf eine kreisförmige Flugbahn.

$$F_L = z \cdot e \cdot B \cdot v$$

Formel 7: Lorentz-Kraft im Magnetfeld. F_L = Lorentz-Kraft, z = Ladung, e = Elementarladung, B = Flussdichte, v = Geschwindigkeit.

$$F_Z = \frac{m \cdot v^2}{r}$$

Formel 8: Zentrifugalkraft. F_Z = Zentrifugalkraft, m = Masse, v = Geschwindigkeit, r = Radius.

Stehen Lorentz- und Zentrifugalkraft im Kräftegleichgewicht und sind die Beschleunigungsspannung U sowie die Flussdichte B des Magnetfeldes konstant, ergibt sich, dass der Radius r der durch das Ion beschriebenen Kreisbahn direkt abhängig vom Masse zu Ladung Verhältnis des Ions ist.

$$\frac{m}{z} = \frac{e \cdot B^2 \cdot r^2}{2U} = k \cdot r^2$$

Formel 9: Grundprinzip der Massenspektrometrie. m = Masse, z = Ladung, e = Elementarladung, B = Flussdichte, r = Radius, U = Spannung, $k = e \cdot B^2 \cdot 2U^{-1}$ = konstant.

Die Masse eines abgelenkten Ions kann also, wie in Formel 9 dargestellt, anhand der von ihm beschriebenen Kreisbahn bestimmt werden.

Bei dem im Zuge dieser Arbeit verwendeten Massenspektrometer handelt es sich um ein gekoppeltes System aus dem **Elektrospray-Ionisation-Ionenfallen-Massenspektrometer** HCTultra der Firma Bruker und einem **Flüssigkeitschromatographie (LC)-System** der Firma Agilent Technologies aus der 1200er Serie. Durch Kopplung des Massenspektrometers mit dem LC-System kann die Probe bereits vor die Ionisierung anhand der Eigenschaften ihrer Bestandteile aufgetrennt werden. Die Sättigung des Detektors und resultierender Informationsverlust werden so verhindert.

Das verwendete Massenspektrometer verfügt über eine sogenannte **Quadrupol-Ionenfalle**, die auf Nobelpreisträger Wolfgang Paul zurück geht (Abbildung 11). Ionenfallen-Massenspektrometer sind in der Lage, mehrere Generationen von Fragment-Ionen eines Ziel-Ions zu erzeugen, was wichtig für die Strukturaufklärung ist. Die Ionenfalle besteht, wie in Abbildung 11 gezeigt, aus einer Ringelektrode und zwei Endkappen-Elektroden. Sie erzeugt ein auf das ausgewählte Ion abgestimmtes magnetisches Feld, in dem sich das Ion auf einer zyklischen Bahn bewegt. Die ausgewählte Ionenspezies akkumuliert in der Ionenfalle und kann mithilfe von Helium-Atomen fragmentiert werden. Die Fragment-Ionen werden ebenfalls in der Ionenfalle gesammelt und dann „ausgegossen“, so dass ein Massen-

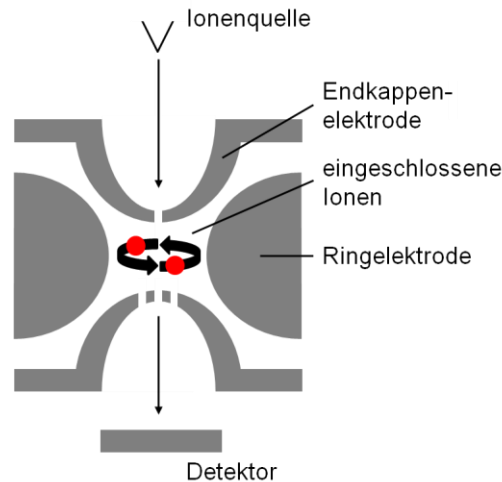


Abbildung 11: Schematische Darstellung einer Quadrupol-Ionenfalle. Quelle: Eigene Darstellung.

spektrum der Fragment-Ionen erzeugt wird (MS^2 -Spektrum).³³ Auf entsprechende Weise können beliebige MS^n -Spektren aufgenommen werden. Neben der qualitativen Zusammensetzung eines Substanzgemisches lässt die massenspektrometrische Analyse auch Schlüsse über die quantitative Zusammensetzung zu. Die Messdaten enthalten neben der Identität der Probenbestandteile in Form der Masse-zu-Ladung-Verhältnisse auch Informationen zur Häufigkeit jedes Ions in Form der Signalintensität. Da die Signalintensität durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst wird, darunter Stärke des Vakuums, Sättigung des Detektors oder Effizienz der Ionisierung, ist der Einsatz eines internen Standards (ITS) für die absolute Quantifizierung eines Analyten zwingend notwendig. Für die relative Quantifizierung mehrerer Substanzen in einer Probe dahingegen nicht.

Idealerweise handelt es sich beim ITS um ein isotoopenmarkiertes Derivat des Analyten, damit Retention auf der Chromatographiesäule, Ionisierung und Flugeigenschaften im Massenspektrometer vergleichbar sind. Alternativ bietet sich die Verwendung eines nicht natürlich vorkommenden Homologes an. Im Zuge dieser Arbeit wurde das natürlich nicht vorkommende N-Dodecanoyl-Sulfatid als ITS verwendet.

50 μL Lipidextrakt werden in einem 1,5 mL-Glasgefäß mit Schraubverschluss und Teflon-dichtung vorgelegt. Das Lipidextrakt wird mit dem ITS versetzt (10 $\mu\text{mol/mg}$ Einwaage) und das Extrakt dann mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1, v/v) auf 100 μL Gesamtvolumen verdünnt.

Je 10 μL der so vorbereiteten Proben werden mit einer Flussrate von 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ über eine LichroCART® 125-4 Lichrosorb Si-60 Säule (30 °C Säulentemperatur) in die Ionenquelle des ESI-MS injiziert. Das Trockengas wird mit 9 L/min und einer Temperatur von 365 °C eingeleitet. Der Zerstäuber-Druck beträgt 40 psi. Die Messdauer beträgt 15 min je Spektrum.

3.7 Molekularbiologische Methoden: Proteine

3.7.1 Lyse

Alle verwendeten Lösungen werden mit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Aprotinin, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Leupeptin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Pefabloc und 0,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Pepstatin versetzt und auf Eis vorgekühlt.

250 μL Homogenat werden mit 750 μL TBS verdünnt und werden 1 h bei 196000 x g, 4 °C zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile des Gewebes zu sedimentieren. Der Überstand wird für die Zytokin-Quantifizierung abgenommen und bei -20 °C gelagert.

Das Pellet wird in 300 μL einer Lösung von 1 % SDS/PBS aufgenommen und durch pipettieren grob resuspendiert. Zur vollständigen Lyse auch schwerlöslicher Proteine werden die Proben 2 h auf Eis inkubiert und alle 15 min geschüttelt. Die verbleibenden, ungelösten Bestandteile werden durch 20 min Zentrifugation bei 21700 x g, 4 °C sedimentiert. Der Überstand enthält die gelösten Proteine.

3.7.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung nach Bradford, 1976³⁴

Das verwendete BioRad DC™ Protein Assay-Kit ermöglicht die Quantifizierung von Proteinen in Lösung nach der Methode von Bradford.

Ausgehend von einer Stocklösung der Konzentration 4 mg/mL BSA wird in einer Reihe von Zweifachverdünnungen eine Kalibriergerade hergestellt. Die Kalibriergerade wird im selben Puffer angesetzt wie die zu vermessenden Proben.

Die Reaktion wird gemäß den Angaben des Herstellers in einer 96-Well-Platte durchgeführt. Nach 15 min Inkubation bei RT werden die Proben bei einer Wellenlänge von $\lambda = 750 \text{ nm}$ mit Hilfe eines Plate-Readers ausgelesen. Die hier angegebenen Proteinkonzentrationen ergeben sich immer als Mittelwert einer Dreifachbestimmung.

3.7.3 Natriumdodecyl-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli, 1970³⁵

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in einer Gel-Matrix aus Polyacrylamid erfordert die vorherige Zerstörung von Sekundär- und Tertiärstruktur, damit ein direkter Zusammenhang zwischen Größe und Wanderungsgeschwindigkeit beobachtet werden kann. Nach Laemmli erfolgt die Denaturierung durch Reduktion der vorhandenen Disulfidbrücken mit β -Mercaptoethanol und Komplexbildung mit Natriumdodecylsulfat (SDS). SDS ist ein anionisches Tensid und bindet unter Zerstörung der Sekundärstruktur an apolare Proteinabschnitte. Durch seine negative Molekülladung überdeckt SDS die Eigenladung des Proteins.

Drei Teile Proteinlysate werden mit einem Teil 4 x Laemmli-Puffer versetzt und 10 min auf 95 °C erhitzt. Bei den hier gezeigten Experimenten entspricht das Auftragungsvolumen ei-

nem Proteingehalt von 20 µg. Die Auftrennung der Proben erfolgt auf einem diskontinuierlichen Gel aus niederprozentigem Sammelgel und höherprozentigem Trenngel bei 80-120 V. Zur Bestimmung der Proteingröße wird ein kommerziell erhältlicher Größenmarker auf das Gel aufgetragen.

Stark hydrophobe Proteine, wie das Proteolipidprotein des Myelins, neigen in wässriger Umgebung zur Aggregation und werden durch Aufkochen mit Laemmli-Puffer nicht ausreichend denaturiert. Taylor *et al.* haben einen entsprechend modifizierten Denaturierungspuffer entwickelt.³⁶ Durch Zugabe von Harnstoff wird die Struktur des Wassers gestört und hydrophobe Effekte verringert.

Zur Analyse von PLP wird ein Teil Proteinlysats mit zwei Teilen denaturierendem Harnstoff-Puffer 2 min auf 95 °C erhitzt.

Tabelle 10: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für SDS-PAGE.

Bezeichnung	Sammelgel ^a	Trenngel ^b	Trenngel ^b	Trenngel ^b
	5 %	7,5 %	10 %	12,5 %
ddH ₂ O	3,02 mL	5,16 mL	4,79 mL	4,17 mL
Puffer	1,25 mL	2,13 mL	2,5 mL	3,13 mL
40 % Acrylamid	0,625 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
10 % SDS	50 µL	100 µL	100 µL	100 µL
10 % APS	50 µL	100 µL	100 µL	100 µL
TEMED	5 µL	10 µL	10 µL	10 µL

^a Gesamtvolumen 5 mL, ^b Gesamtvolumen 10 mL

APS = Ammoniumpersulfat, SDS = Natriumdodecylsulfat, TEMED = Tetramethylethylen-diamin.

3.7.4 “Western Blot” nach Burnette, 1981³⁷

Nach der elektrophoretischen Auftrennung einer Probe im Polyacrylamidgel sollen die enthaltenen Proteine weiter untersucht werden, sind für die meisten Methoden aber nicht ausreichend verfügbar. Als effektiver Weg zur Extraktion der Proteine aus dem Gel hat sich der „Western Blot“ (WB) etabliert. Die im Gel enthaltenen Proteine werden dabei elektrophoretisch auf eine Membran aus Nitrozellulose übertragen. Das Muster der gelelektrophoretischen Auftrennung bleibt beim Transfer der Proteine erhalten. Die an die Membran gebundenen Proteine sind für weitere Methoden zugänglich.

Zur Identifikation und Quantifizierung der an die Membran gebundenen Proteine wird das Prinzip der Immundetektion angewendet. Wie in Kapitel 3.4.6.2 erläutert, bedient man sich der indirekten Detektion eines Proteins über Kombination eines primären und sekundären Antikörpers. Im Zuge dieser Arbeit werden zum Auslesen des WB Fluorophor-gekoppelte

Sekundärantikörper mit Emissionsmaximum im Infrarot (IR)-Bereich verwendet. Der Vorteil der Verwendung von Fluorophoren im IR-Bereich liegt in der geringen materialspezifischen Autofluoreszenz.. Das Signal-Rausch-Verhältnis ist daher hoch und die Methode gut zur Quantifizierung von Proteinen geeignet. Die Detektion erfolgt mit einem IR-Scanner.

Der WB wird im halbtrockenen Verfahren durchgeführt. Das Polyacrylamidgel wird nach der Elektrophorese fünf Minuten in Blot-Puffer gewaschen, zwei Lagen dickes Filterpapier mit Blot-Puffer getränkt. Filterpapier, Membran und Gel werden, wie Abbildung 12 gezeigt, geschichtet und das Transfer-System verschlossen.

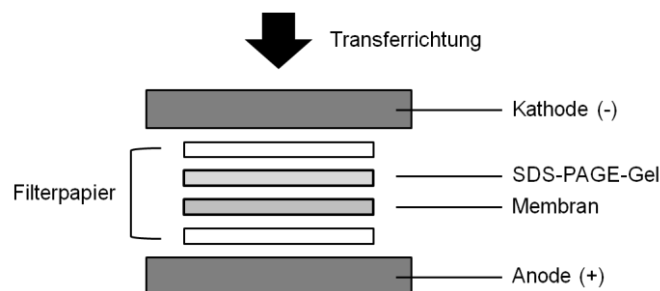


Abbildung 12: Aufbau des „Western Blot“ im halbtrockenen Verfahren. Quelle: Eigene Darstellung.

Der Protein-Transfer erfolgt bei 1 mA pro Quadratcentimeter Membranfläche. Die Dauer richtet sich nach der Größe des zu untersuchenden Proteins (<100 kDa 60 min, >100 kDa 180 min). Die densitometrische Auswertung erfolgt mithilfe AIDA Software.

3.7.5 Quantifizierung von Zytokinen mit dem Bio-Plex® Immunoassay System von BioRad

Die antikörperbasierten Nachweisverfahren, wie der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), ermöglichen die Detektion eines weiten Spektrums von Analyten (Proteine, Hormone, Toxine). Grundlage des ELISA-Verfahrens ist die Bindung des Analyten an einen auf einer Mikrotiterplatte immobilisierten, spezifischen Antikörper. Die Detektion und Quantifizierung erfolgt über einen Enzym- oder Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper.

Nachteil des traditionellen ELISA-Verfahrens ist, dass nur ein Analyt pro Ansatz detektiert werden kann. Die von Luminex entwickelte xMap-Technologie ermöglicht jetzt die zeitgleiche Detektion und Quantifizierung von bis zu 100 verschiedenen Analyten pro Ansatz. Grundlegend ist dabei, wie in Abbildung 13 dargestellt, die Bindung des Antikörpers an einen farblich definierten Trägerpartikel.

Die Detektion des Analyten im Durchflusszytometer erfolgt in zwei Schritten: Mittels eines roten Lasers wird zunächst die Farbe des Trägerpartikels, also die Art des Analyten erfasst. Dann wird mit einem grünen Laser der Reporter (Fluoreszenz-gekoppelter Sekundärantikörper) angeregt, um die Konzentration des Analyten zu messen.

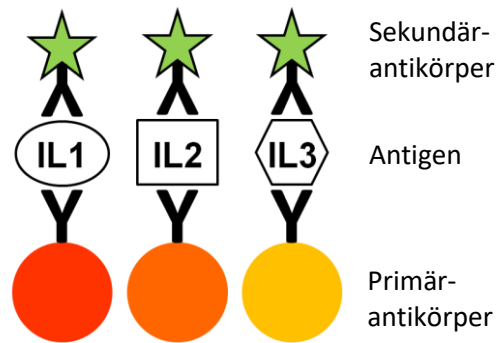


Abbildung 13: Prinzip der xMap-Technologie von Luminex. Quelle: Eigene Darstellung.

Die Reaktion wird gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die hier angegebenen Zytokinkonzentrationen verstehen sich immer als Mittelwert eines biologischen Triplikates.

3.8 Quantifizierung von NG2-positiven Zellen in Gehirn mittels Immunfluoreszenzfärbung

3.8.1 Gemischte Primärkultur

Alle Arbeitsschritte werden unter Verwendung steriler Verbrauchsmaterialien in der Sterilbank durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgt bei 37 °C, 5 % CO₂ in einem Feuchtluftinkubator. Alle Medien und Lösungen werden, wenn nicht anders angegeben, vor der Verwendung in einem Wasserbad auf 37 °C temperiert.

Die Gehirne drei Tage alter Mäuse werden präpariert und die Meningen durch Umherwälzen auf Filterpapier entfernt. Das so vorbereitete Gewebe wird mit Hanks Buffered Salt Solution gewaschen, in 5 mL 10 % FCS/DMEM je Gehirn aufgenommen und manuell (Pipette) zerkleinert. Die entstandene Zellsuspension wird bei 1200 RPM für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und die im Pellet enthaltenen Zellen werden in 6 mL 10 % FCS/DMEM je Gehirn resuspendiert. Zur Immunfluoreszenzfärbung werden die Zellen auf 18 mm-Deckgläschen in 12-Well-Platten kultiviert. Je Well wird 1 mL 10 % FCS/DMEM vorgelegt und 1 mL Zellsuspension zugegeben. Die Zellen werden für 24 Stunden kultiviert, das Medium erneuert. Nach weiteren 24 Stunden werden die Zellen für die IF-Färbung verwendet.

3.8.2 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Die Zellen werden mit 1 x PBS gewaschen und mit 4 % PFA/PBS für zehn Minuten fixiert. Zur Permeabilisierung werden die Zellen 10 min in 0.3% Triton X-100/PBS inkubiert und anschließend 30 Minuten in 1% BSA/PBS blockiert. Der primäre Antikörper wird nach Anga-

ben des Herstellers in Blockierungspuffer verdünnt. Bei RT werden die Zellen in einer feuchten Kammer für zwei Stunden mit dem primären AB inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit 1 x PBS werden die Zellen bei RT für zwei Stunden mit dem Sekundärantikörper (in Blockierungspuffer) in einer lichtdichten Kammer inkubiert. Während des letzten Waschschrilles nach der Sekundärfärbung erfolgt die Färbung der Zellkerne mit DAPI.

Zum Fixieren der Deckgläser auf den Objektträgern wird Pro Long Gold verwendet. Die Lagerung erfolgt bei 4°C unter Lichtausschluss.

4. Ergebnisse

Um zu untersuchen, ob die Remyelinisierungseffizienz im Mausmodell der Metachromatischen Leukodystrophie beeinträchtigt ist, wurden vier Tiergruppen mit CPZ behandelt:

1. **Konventionelles MLD-Mausmodell:** ASA(-/-) Maus.
2. **Kontrollgruppe:** ASA(+/-)-Maus.
3. **CST-transgenes MLD-Mausmodell:** tgASA(-/-)-Maus.
4. **Kontrollgruppe:** tgASA(+/-)-Maus.

Alle behandelten Mäuse waren außerdem heterozygot für den NG2-EYFP-Knock-In [NG2(+/-)].

Die CPZ-Behandlung erstreckte sich über einen Zeitraum von sechs Wochen, beginnend im Alter von sieben Wochen (p49). Es folgte eine Erholungsphase von sechs Wochen, in der alle Tiere auf Standardhaltungsdiät gesetzt wurden, um Remyelinisierung zuzulassen. Um den Effekt wiederkehrender Demyelinisierung zu untersuchen, wurde die CPZ-Behandlung wiederholt. Die Parameter (Behandlungszeitraum, Zusammensetzung des Futters, Erholungsphase) waren identisch zur der ersten Behandlung. Die Präparation der Mäuse und Analyse des Gewebes erfolgte zu vier definierten Zeitpunkten (siehe auch Abbildung 14):

1. Abschluss erste Diätphase (Demyelinisierung) – p91
2. Abschluss erste Erholungsphase (Remyelinisierung) – P133
3. Abschluss zweite Diätphase (Demyelinisierung) – p175
4. Abschluss zweite Erholungsphase (Remyelinisierung) – p217

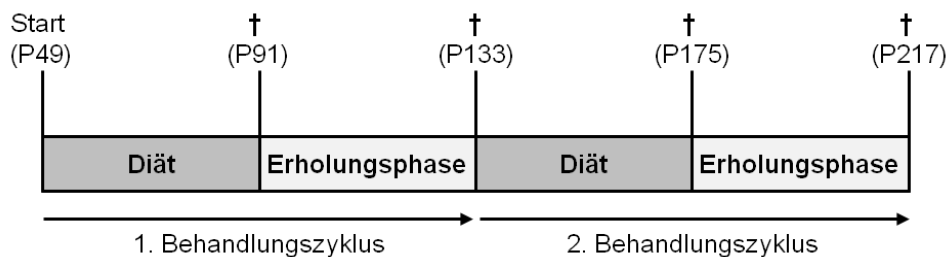


Abbildung 14: Zeitlicher Ablauf der Cuprizon-Experimente. P = Tage nach Geburt, † = Präparation. Quelle: Eigene Darstellung.

Alle im Folgenden gezeigten oder beschriebenen Ergebnisse sind mit der Laborbuchnummer des dazugehörigen Experimentes versehen. Die Nummer setzt sich zusammen aus persönlichem Kürzel (KBR), Laborbuchnummer, Seitenzahl und fortlaufender Versuchsnummer.

4.1 Genetischer Hintergrund der Versuchstiere und statistische Auswertung des Tierexperiments

Aufgrund der Bedingungen, unter denen die Zucht der verwendeten Mäuse stattfand (für genauere Diskussion siehe Kapitel 4.1), war zu erwarten, dass der genetische Hintergrund der Versuchstiere über die Gesamtdauer des Experiments nicht konstant sein würde. Da der Effekt der CPZ-Behandlung jedoch stark vom genetischen Hintergrund der verwendeten Mauslinie abhängt,³⁸ konnte noch vor Abschluss der Experimente vermutet werden, dass die Schwankungen zwischen den biologischen Replikaten und somit die resultierenden **Standardabweichungen** der Messwerte groß sein würden.

4.1.1 Definition der Signifikanzgrenzen

Wird zur statistischen Auswertung der Ergebnisse der **Student'sche t-Test** angewendet, hat die Standardabweichungen s direkten Einfluss auf den t-Wert, wie Formel 10 zeigt.³⁹

$$T = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{s_x^2 + s_y^2}} \times \sqrt{n}$$

Formel 10: Definition des t-Werts im Zweistichproben-t-Test. Prüfung der Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben aus Grundgesamtheiten gleicher Varianz bei gleicher Stichprobengröße. n = Stichprobengröße, s = Standardabweichung, T = t-Wert, \bar{x}, \bar{y} = Mittelwerte der Stichproben x und y .

Über den t-Wert T wird der Signifikanzwert p aus der t-Verteilung abgelesen, die in Form tabellarischer Auflistungen über entsprechende Lehrbücher zugänglich ist. Vergleicht man, wie im Zuge dieser Arbeit für die meisten Experimente gültig, zwei Stichproben mit jeweils drei Messwerten, kann man aus der t-Verteilung ablesen, dass, wenn die **Signifikanzschranke** bei $p = 0,05$ gesetzt wurde, der t-Wert $T \geq 2,7764$ sein muss, damit der gemessene Effekt signifikant ist.⁴⁰

Wie aus Formel 10 abzuleiten, führen große Standardabweichungen zu kleinen t-Werten und die Signifikanzschranke kann nur erreicht werden, wenn die **Effektstärke** (der Unterschied zwischen den Stichproben) oder die **Stichprobengröße** n ausreichend groß ist. Im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit war es aber nicht möglich, die Effektstärke durch Modifizierung des Versuchsaufbaus (Behandlungsdauer, Dosierung, Probenvorbereitung) zu erhöhen oder die Stichprobengröße deutlich zu steigern, um den Einfluss der Standardabweichungen zu relativieren. In Erwartung der auf dem genetischen Hintergrund der Mäuse basierenden großen Standardabweichungen wurde daher, in Anlehnung an Matthes *et al.*⁴¹, neben der „traditionellen“ Signifikanzgrenze ($p \leq 0,05$) eine zweiter Bereich in der t-Verteilung definiert ($0,05 < p \leq 0,10$), der bei der Auswertung der Experimente berücksichtigt werden sollte. Mathematisch betrachtet umfasst dieser Bereich solche t-Werte, die bei Erhöhung der Stichprobengröße n um je ein Replikat unterhalb der Quantile $p = 0,05$ liegen würden.

Im Folgenden soll dieser zweite Konfidenzintervall als **tendenzielle Zu- oder Abnahme** bezeichnet werden.

4.2 CPZ-induzierte Reduktion des Körpergewichts in ASA-defizienten Mäusen

Das Körpergewicht ist der am schnellsten zugängliche Indikator für den Gesundheitszustand eines Versuchstieres. Der Verlust von Körpergewicht kann durch organische Schäden oder Veränderungen des Fressverhaltens hervorgerufen werden. Die Ursachen eines solchen veränderten Verhaltens können sowohl physischer, als auch psychischer Natur sein: Die Ausschüttung von Zytokinen bei Infektion und Inflammation kann die Nahrungsaufnahme hemmen (= physischer Auslöser für Gewichtsverlust).⁴² Die Fütterung mit CPZ kann aufgrund des Geschmacks oder der veränderten Darreichungsform in der ersten Woche der Behandlung zu einer Gewichtsabnahme durch reduzierte Nahrungsaufnahme führen (= psychischer Auslöser für Gewichtsverlust).⁴³

Tabelle 11: Mittleres Körpergewicht bei Präparation.

	Diät		Erholungsphase	
	<i>Mock</i>	<i>CPZ</i>	<i>Mock</i>	<i>CPZ</i>
ASA(+/-)	22,98 ± 2,79 (N = 5)	21,73 ± 0,73 (N = 6)	27,50 ± 2,03 (N = 4)	26,85 ± 1,69 (N = 4)
ASA(-/-)	23,16 ± 1,09 (N = 5)	17,98 ± 3,25 * (N = 6)	24,08 ± 2,62 (N = 6)	26,67 ± 2,16 (*) (N = 6)
tg ASA(+/-)	22,12 ± 1,88 (N = 3)	21,63 ± 0,74 (N = 4)	26,00 ± 0,85 (N = 4)	29,37 ± 3,77 (N = 3)
tg ASA(-/-)	22,00 ± 1,21 (N = 5)	17,00 ± 3,64 * (N = 5)	26,44 ± 1,78 (N = 5)	27,00 ± 1,71 (N = 5)
	2. Diät		2. Erholungsphase	
	<i>Mock</i>	<i>CPZ</i>	<i>Mock</i>	<i>CPZ</i>
ASA(+/-)	27,10 ± 2,23 (N = 5)	25,53 ± 2,95 (N = 6)	27,30 ± 2,47 (N = 3)	27,88 ± 3,66 (N = 5)
ASA(-/-)	25,35 ± 1,14 (N = 4)	21,78 ± 0,25 * (N = 3)	30,63 ± 1,51 (N = 5)	25,05 ± 2,01 * (N = 4)

Körpergewicht in [g]. Der angegebene Fehler entspricht der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Gegenüber der Mock-behandelten Kontrolle signifikant erniedrigt ($p \leq 0,05$) war das Körpergewicht aller mit einem Stern gekennzeichneten CPZ-behandelten Gruppen. Mit einem in Klammern gesetzten Stern gekennzeichnet sind nicht signifikante Veränderungen im Konfidenzintervall von ($0,05 < p \leq 0,10$). Quelle: KBR-4-165-726.

Um noch vor der molekularbiologischen Untersuchung des Gehirns einen Überblick über Genotyp-spezifische Effekte der CPZ-Behandlung zu erhalten, wurde das Körpergewicht der behandelten Mäuse zum Zeitpunkt der Präparation bestimmt. Das mittlere Körpergewicht ist in Abhängigkeit von Genotyp und Behandlung in Tabelle 11 dargestellt.

4.2.1 Körperwachstum

Das Körperwachstum einer C57BL/6-Maus ist nach durchschnittlich 16 Wochen abgeschlossen.⁴⁴ Dementsprechend wurde, unabhängig vom Genotyp, ein signifikanter Anstieg des mittleren Körpergewichts um durchschnittlich $3,4 \pm 1,7$ g zwischen Abschluss der ersten Diät (= 13. Lebenswoche) und ersten Erholungsphase (= 19. Lebenswoche) gemessen. Im zweiten Behandlungszyklus (19.-31. Lebenswoche) waren ASA(+/-)-Mäuse ausgewachsen und das Körpergewicht veränderte sich nicht. Mock-behandelte ASA(-/-)-Mäuse nahmen durchschnittlich weitere $5,28 \pm 2,65$ g zu. **Das Körperwachstum der ASA(-/-)-Maus war verzögert.**

4.2.2 CPZ-induzierter Gewichtsverlust

Die Behandlung mit CPZ führte ausschließlich in ASA-defizienten Mäusen zu einer signifikanten Reduktion des mittleren Körpergewichts. Da nach Abschluss der Erholungsphase keine Erniedrigung gegenüber der Mock-behandelten Kontrollgruppe mehr feststellbar war, ist ein andauernder organischer Schaden zu diesem Zeitpunkt auszuschließen. Das mittlere Körpergewicht CPZ-behandelter ASA(+/-)-Mäuse blieb gegenüber der Mock-behandelten Kontrollgruppe über den gesamten Behandlungszeitraum unverändert. Die Wiederholung der CPZ-Behandlung führte ebenfalls nur in ASA-defizienten Mäusen zu einer signifikanten Gewichtsabnahme. Im Gegensatz zum ersten Behandlungszyklus normalisierte sich das Gewicht in der darauf folgenden Erholungsphase nicht.

Die **Beschränkung der Gewichtsabnahme auf ASA-defiziente Mäuse** weist darauf hin, dass die Behandlung mit CPZ je nach Genotyp unterschiedlich starken Effekt auf den Gesundheitszustand hatte. Wahrscheinlich wurde die Gewichtsabnahme im ersten Behandlungszyklus durch eine reversible Veränderung des Fressverhaltens hervorgerufen. Da das durchschnittliche Körpergewicht ASA-defizienter Mäuse in der Erholungsphase des zweiten Behandlungszyklus gegenüber der Mock-behandelten Gruppe signifikant erniedrigt blieb, scheint die Wiederholung der CPZ-Behandlung mit einer dauerhaften Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes der ASA(-/-)-Maus, eventuell begleitet durch organischen Schaden oder die Expression von Zytokinen, verbunden zu sein.

4.3 Sudan Schwarz B-Färbung von Myelin

Nachdem die Analyse des Körpergewichts erste Hinweise auf die unterschiedliche Reaktion von ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäusen auf die Behandlung mit CPZ erbracht hatte, stellte sich die Frage, ob das Ausmaß der induzierten Demyelinisierung im Gehirn ebenfalls abhängig vom Genotyp ist. Um Demyelinisierung und die Effizienz der Remyelinisierung zu visualisieren, wurden koronale Gewebeschnitte des Gehirns mit SSB gefärbt.

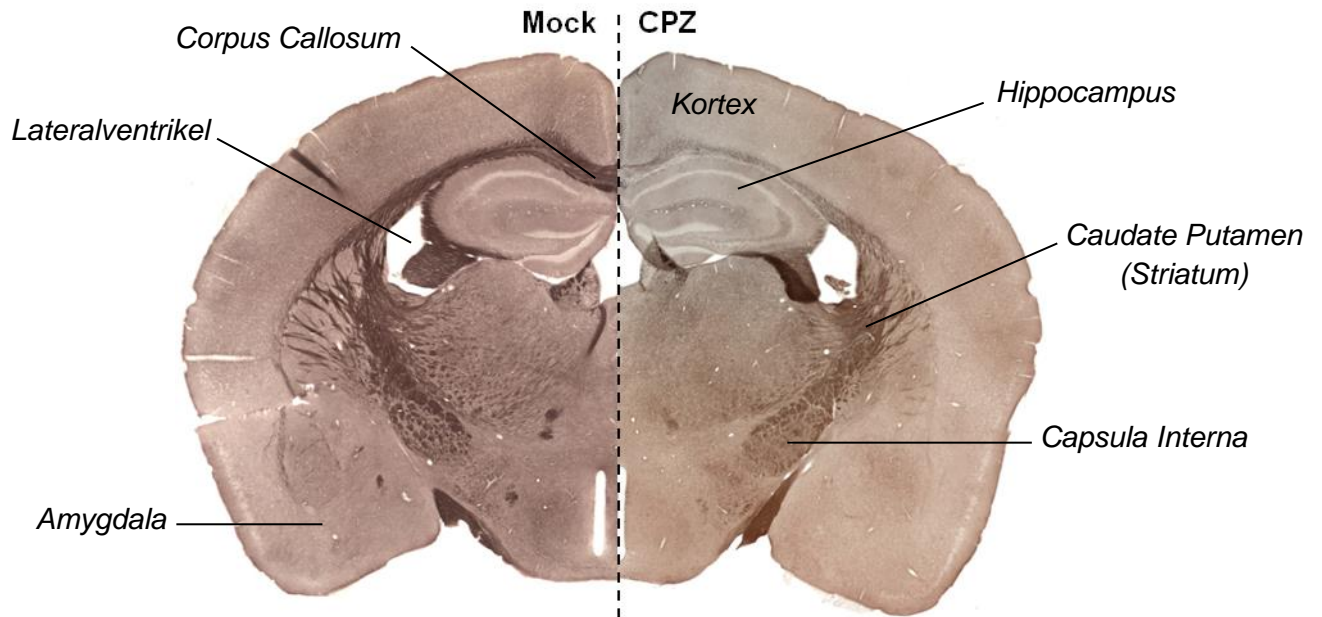


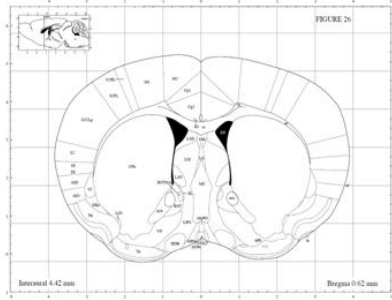
Abbildung 15: Übersichtsdarstellung eines koronalen Gewebeschnittes durch das Großhirn. Myelinfärbung mit SSB. Die linke Bildhälfte zeigt das dunkel gefärbte Myelin im Gehirn einer Mock-behandelten ASA(-/-)-Maus. Die rechte Bildhälfte zeigt den durch die CPZ-induzierte Demyelinisierung hervorgerufenen Verlust der Färbung, der am deutlichsten im Corpus callosum zu sehen war. Quelle: KBR-4-189-736.

Abbildung 15 zeigt exemplarisch den durch SSB visualisierten Effekt der CPZ-Behandlung auf die weiße Substanz des Großhirns. In der linken Bildhälfte (Mock) ist die dunkle Färbung myelinreicher Strukturen zu sehen. Die rechte Bildhälfte (CPZ) zeigt den Verlust der Färbungsintensität aufgrund von Demyelinisierung nach Behandlung mit CPZ. Besonders deutlich war der Effekt im Corpus callosum (CC) zu sehen. Auch im Kleinhirn der behandelten Mäuse war, in Übereinstimmung mit Skripuletz *et al.*⁴⁵, Demyelinisierung detektierbar. Am deutlichsten war der Verlust des Myelins in den Vestibulariskernen des Kleinhirns zu sehen (Daten nicht gezeigt: KBR-4-12-602).

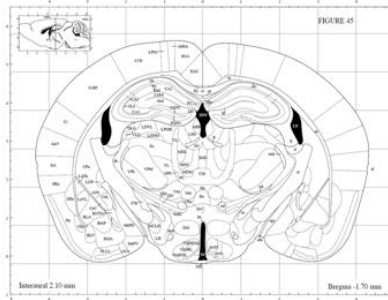
Die Ergebnisse der SSB-Färbungen sind in den folgenden Abbildungen 16, 17 und 18 zusammengefasst.

Abbildung 16: **Cuprizon-induzierte Demyelinisierung im Corpus callosum der konventionellen MLD-Maus nach einfacher Behandlung.**

A) Rostrale Schnittebene

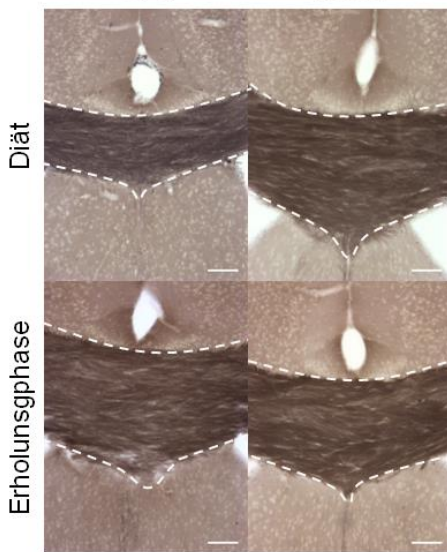


B) Kaudale Schnittebene



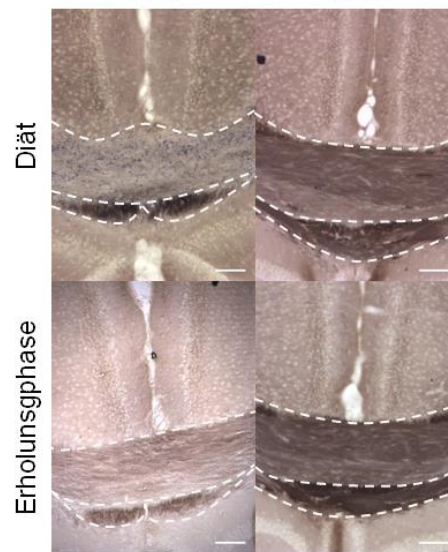
C) ASA(+/-), rostral

CPZ Mock



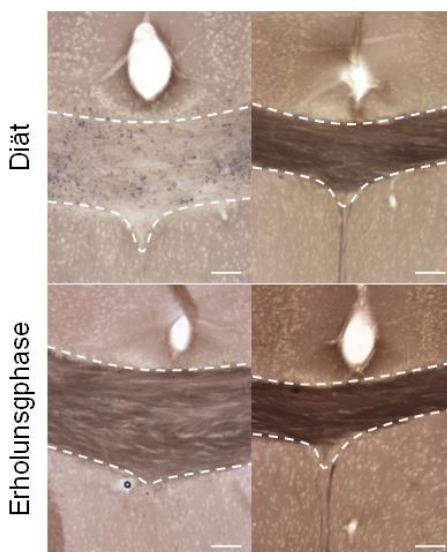
D) ASA(+/-), kaudal

CPZ Mock



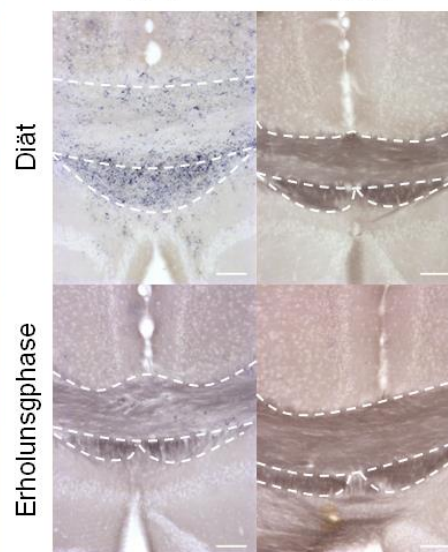
E) ASA(-/-), rostral

CPZ Mock



F) ASA(-/-), kaudal

CPZ Mock



SSB-Färbung der **(A)** 0,62 mm rostral und **(B)** 1,7 mm kaudal vom Bregma gelegenen Schnittebenen. In ASA(+/-)-Mäusen war rostral vom Bregma **(C)** keine CPZ-induzierte Veränderung der SSB-Färbung zu beobachten. In der kaudal gelegenen Schnittebene **(D)** trat eine vollständige Demyelinisierung des CC auf. Der unter dem CC gelegene dorsale Fornix war nicht betroffen. Im Gegensatz dazu war in ASA(-/-)-Mäusen nach CPZ-Behandlung sowohl in der rostral zum Bregma gelegenen Schnittebene **(E)**, als auch in der kaudal gelegenen Schnittebene **(F)** die vollständige Demyelinisierung des CC zu sehen. In der kaudal gelegenen Schnittebene war auch der dorsale Fornix betroffen. Nach Abschluss der Erholungsphase kehrte die SSB-Färbung sowohl im CC, als auch im dorsalen Fornix zurück, Remyelinisierung hatte stattgefunden.

Die Bildbearbeitung (Tonwertkorrektur) erfolgte mit Adobe-Photoshop. Die Bearbeitung war für alle Bilder gleich. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm. Quelle: (A, B) G. Paxinos, K. B. Franklin: *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press, **2001**, 2. Auflage, pp.

76 & 95; (C) KBR-3-84-422, KBR-2-278-344, KBR-3-84-422, KBR-2-278-344; (D) KBR-2-239-319, KBR-2-278-344, KBR-2-223-302, KBR-2-278-344; (E) KBR-2-239-319, KBR-3-84-422; KBR-3-84-422, KBR-3-84-422; (F) KBR-2-194-278, KBR-3-68-411, KBR-3-25-372, KBR-3-55-401.

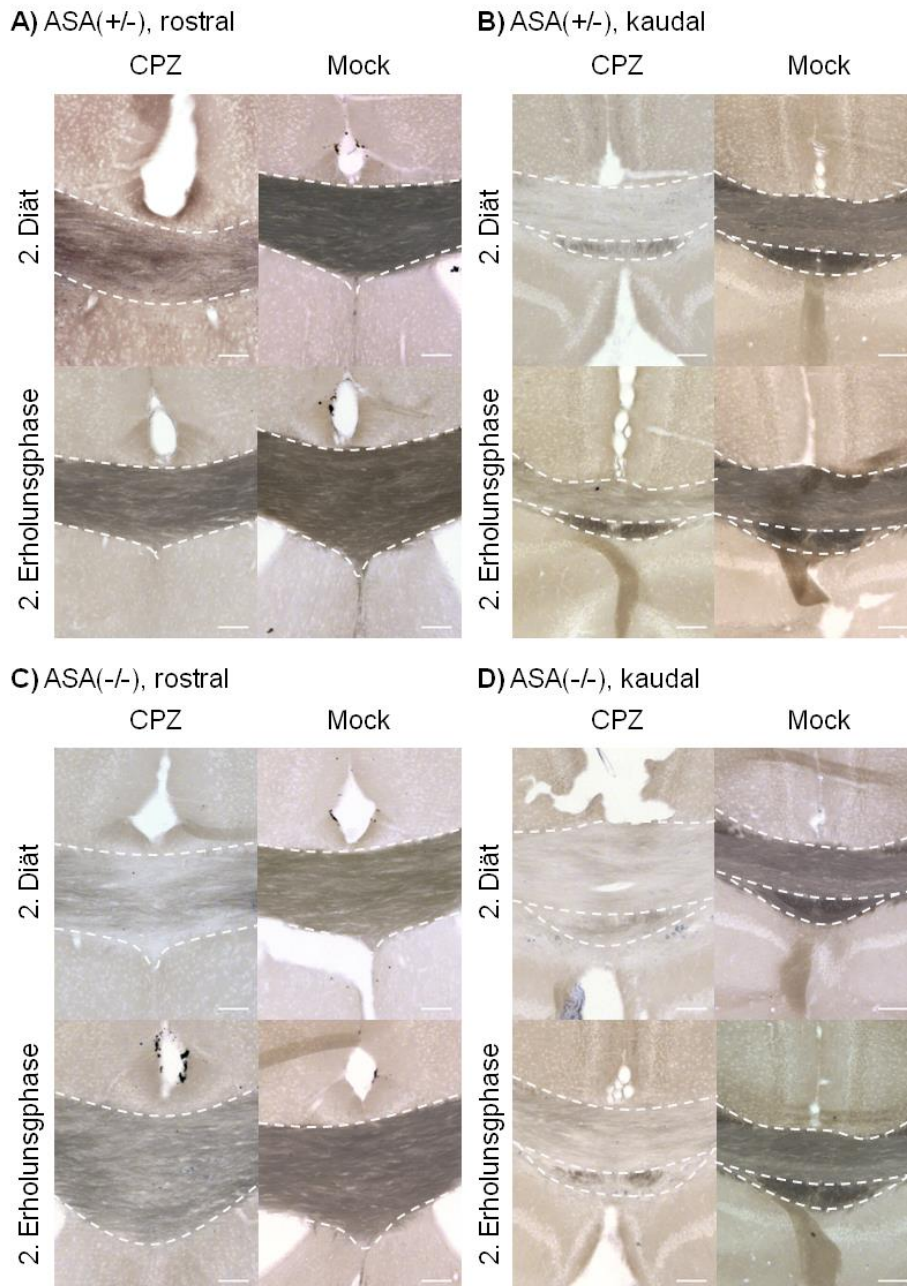


Abbildung 17: Cuprizon-induzierte Demyelinisierung im Corpus callosum der konventionellen MLD-Maus nach wiederholter Behandlung. SSB-Färbung der 0,62 mm rostral und 1,7 mm kaudal vom Bregma gelegenen Schnittebenen. Auch die wiederholte Behandlung mit CPZ führte zur Demyelinisierung des CC. Im Gegensatz zu einfach behandelten ASA(+/-)-Mäusen zeigte sich nach wiederholter CPZ-Behandlung auch in der **(A)** rostral vom Bregma gelegenen Schnittebene eine ungleichmäßige Entfärbung des CC. In allen Schnittebenen schien die Demyelinisierung des CC weniger gleichmäßig als bei einfacher CPZ-Behandlung und stellenweise war noch gefärbtes Myelin sichtbar. Die Zunahme der Färbungsintensität nach Abschluss der Erholungsphase war nur in der **(A, C)** rostral vom Bregma gelegenen Schnittebene deutlich zu erkennen. Dort hatte, unabhängig vom Genotyp, Remyelinisierung stattgefunden. Die Bildbearbeitung (Tonwertkorrektur) erfolgte mit Adobe-Photoshop. Die Bearbeitung war für alle Bilder gleich. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 μ m. Quelle: (A) KBR-3-206-513, KBR-4-213-749. (B) KBR-4-213-749, (C) KBR-4-213-749, (D) KBR-4-213-749.

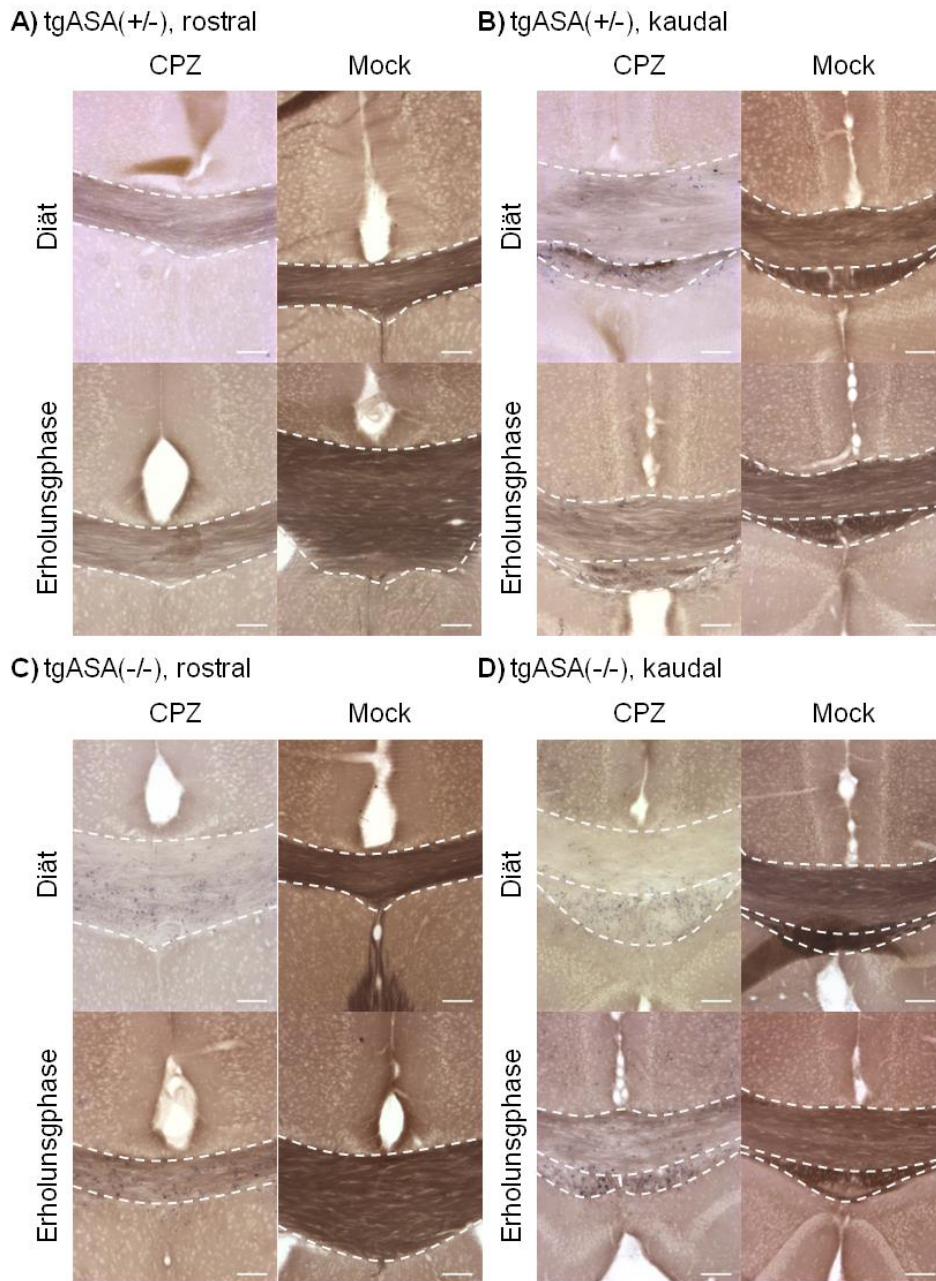


Abbildung 18: Kuprizon-induzierte Demyelinisierung im Corpus callosum der CST-transgenen MLD-Maus. SSB-Färbung der 0,62 mm rostral und 1,7 mm kaudal vom Bregma gelegenen Schnittebenen. Wie in konventionellen ASA(+/-)-Mäusen, war in tgASA(+/-)-Mäusen die CPZ-induzierte Demyelinisierung des CC rostral vom Bregma (**A**) deutlich schwächer als in der (**B**) kaudalen gelegenen Schnittebene. In tgASA(-/-)-Mäusen hingegen war die komplette Entfärbung des CC auch (**C**) rostral vom Bregma zu beobachten. In der (**D**) kaudalen Schnittebene war, neben dem CC, auch der darunter gelegene dorsale Fornix entfärbt. Unabhängig vom Genotyp nahm die Intensität der SSB-Färbung nach Abschluss der Erholungsphase wieder zu. Remyelinisierung hatte stattgefunden. Die Bildbearbeitung (Tonwertkorrektur) erfolgte mit Adobe-Photoshop. Die Bearbeitung war für alle Bilder gleich. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 μ m. Quelle: (A) KBR-2-194-278, KBR-4-10-597, KBR-2-278-344, KBR-2-280-580; (B) KBR-2-194-278; KBR-4-10-597, KBR-2-278-344, KBR-3-280-580; (C) KBR-3-133-461, KBR-4-46-639, KBR-3-189-497, KBR-3-220-527; (D) KBR-3-133-461, KBR-4-64-639, KBR-3-189-497, KBR-3-220-527.

4.3.1 Konventionelles MLD-Mausmodell

4.3.1.1 Einfache Behandlung

Abbildung 16 zeigt die SSB-Färbungen konventioneller ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäuse im ersten Behandlungszyklus.

Im Vergleich zwischen den rostral und kaudal vom Bregma gelegenen Schnittebenen (Abbildung 16 A & B) zeigte sich, dass die Demyelinisierung im CC der ASA(+/-)-Maus (Abbildung 16 C & D) entlang der rostral-kaudalen Achse nicht gleichmäßig war. In der rostral vom Bregma gelegenen Schnittebene war die SSB-Färbung nach CPZ-Behandlung nicht deutlich verändert. In der kaudal gelegenen Schnittebene jedoch war ein deutlicher Verlust der Färbungsintensität, also Demyelinisierung, begleitet vom Erscheinen blau gefärbter Myelintrümmer zu beobachten. Auch Steelman *et al.* hatten berichtet, dass die Demyelinisierungseffizienz im Gehirn von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen einem rostral-kaudal ansteigendem Gradienten unterliegt.⁴⁶

In ASA(-/-)-Mäusen war der CC nach Abschluss der CPZ-Behandlung auch in der rostral vom Bregma gelegenen Schnittebene (Abbildung 16 E) komplett demyelinisiert. In der kaudal gelegenen Schnittebene (Abbildung 16 F) war neben dem CC auch der darunter gelegene dorsale Fornix betroffen. In beiden Ebenen war die Demyelinisierung mit dem Erscheinen von Myelintrümmern verbunden.

Unabhängig von Genotyp und Schnittebene konnte beobachtet werden, dass die Färbungsintensität nach Abschluss der Erholungsphase wieder zunahm. **Remyelinisierung hatte anscheinend stattgefunden.** Im Gehirn der ASA(-/-)-Maus schien die Remyelinisierungseffizienz einem rostral-kaudal abfallenden Gradienten zu unterliegen (Abbildung 16 E & F).

4.3.1.2 Wiederholte CPZ-Behandlung

Es ist beschrieben worden, dass die CPZ-Behandlung älterer Mäuse die Erhöhung von Dosis und Behandlungszeitraum erfordert, um Demyelinisierung zu induzieren.⁴⁷ Dementsprechend war unklar, ob die wiederholte Behandlung mit CPZ unter gleichbleibenden Bedingungen erneut zu Demyelinisierung führen würde. Die SSB-Färbung (Abbildung 17) zeigte jedoch, dass, unabhängig vom Genotyp, Demyelinisierung stattfand. Im Gegensatz zum ersten Behandlungszyklus war in ASA(+/-)-Mäusen nach Abschluss der zweiten Behandlungsphase Demyelinisierung auch im rostralen CC zu beobachten (Abbildung 17 A).

Nach Abschluss der Erholungsphase war die Remyelinisierung des rostralen CC, unabhängig vom Genotyp, gut zu erkennen und die Färbungsintensität nicht von Mock-behandelten Mäusen zu unterscheiden. In der kaudal gelegenen Schnittebene hingegen war die Remyelinisierung nicht deutlich sichtbar.

4.3.2 CST-transgenes MLD-Mausmodell

In CST-transgenen Mäusen (Abbildung 18) war dieselbe Tendenz wie im konventionellen MLD-Mausmodell zu beobachten. Während in tgASA(+/-)-Mäusen in der rostral vom Bregma gelegenen Schnittebene (Abbildung 18 A) keine deutliche Abnahme der Färbungsintensität sichtbar war, war der CC in tgASA(-/-)-Mäusen (Abbildung 18 C) sowohl rostral, als auch kaudal komplett ungefärbt. Unabhängig vom Genotyp nahm die Intensität der SSB-Färbung nach Abschluss der Erholungsphase wieder zu. **Auch in CST-transgenen Mäusen hatte Remyelinisierung stattgefunden.**

4.3.3 Fazit

Insgesamt bestätigt die SSB-Färbung die aus der Analyse des Körpergewichts resultierende Vermutung, der Effekt der CPZ-Behandlung sei in Abhängigkeit vom Genotyp unterschiedlich stark ausgeprägt. Die vollständige Demyelinisierung des rostralen und kaudalen CC in ASA-defizienten Mäusen korrelierte mit dem signifikant reduzierten Körpergewicht nach Abschluss der CPZ-Behandlung. In ASA(+/-)-Mäusen, in denen die Demyelinisierung sich auf den kaudalen Teil des CC beschränkte, war kein Gewichtsverlust nachzuweisen. Selbes gilt für das CST-transgene MLD-Mausmodell.

Remyelinisierung hatte in allen Gruppen stattgefunden, unabhängig davon, ob sich das Körpergewicht während der Erholungsphase normalisierte. Die Remyelinisierungseffizienz war im kaudalen CC geringer als im rostralen Teil.

Die Ergebnisse der SSB-Färbung waren grundlegend für die weitere Auswertung des CPZ-Experimentes. Da in ASA-heterozygoten Mäusen nur in der kaudalen Schnittebene deutliche Demyelinisierung nachgewiesen werden konnte, war ein aussagekräftiger Vergleich zu ASA-defizienten Mäusen nur zwischen Färbungen in dieser Schnittebene zu ziehen. Alle im Folgenden gezeigten Färbungen wurden dementsprechend auf Gewebeschnitten 1-2 mm kaudal vom Bregma gelegen angefertigt.

Dieses Verfahren ist konform mit den Empfehlungen von Steelman *et al.*⁴⁸, die gezeigt haben, dass der Hauptanteil der durch CPZ induzierten Demyelinisierung sowie Astro- und Mikrogliose im kaudalen Teil des CC stattfindet.

4.4 IF-Färbung der Myelinproteine

Morell *et al.* haben gezeigt, dass die Diätphase im CPZ-Experiment kein geradlinig fortschreitender Prozess, sondern ein Wechselspiel von De- und Remyelinisierung ist.⁴⁹ Während der ersten drei Wochen sinken die mRNA-Level der Myelinproteine durch das CPZ-induzierte Absterben der Oligodendrozyten rapide ab. Der Verlust von Myelin ist zu diesem

Zeitpunkt mittels immunhistologischer Methoden noch nicht nachzuweisen.⁵⁰ Erst mit dem massiven Einströmen von Mikrogliazellen während der dritten Behandlungswoche wird Demyelinisierung sichtbar. Das Maximum ist fünf Wochen nach Behandlungsbeginn erreicht. Parallel zur fortschreitenden Demyelinisierung vermehren sich residente und eingewanderte OVZ. Sobald die Demyelinisierung komplett ist, differenzieren sie zu myelinisierenden Oligodendrozyten. Schon zwischen fünfter und sechster Behandlungswoche erreichen die mRNA-Level von MBP und PLP wieder das Niveau unbehandelter Mäuse.⁵¹ Die Remyelinisierung beginnt noch in der Diät-Phase.

Es ist nicht auszuschließen, dass die über den Zeitpunkt der vollständigen Demyelinisierung (Woche 5) fortdauernde Fütterung mit CPZ den einsetzenden Remyelinisierungsprozess beeinträchtigt. In ihrem 2014 veröffentlichten Review zur CPZ-induzierten Demyelinisierung empfehlen Gudi *et al.* daher, den Zeitraum der CPZ-Behandlung in Zukunft auf fünf Wochen zu verkürzen.⁵² So sei gewährleistet, dass De- und Remyelinisierung getrennt voneinander untersucht werden können. Diese Arbeit war zum Zeitpunkt der Veröffentlichung 2014 schon zu weit fortgeschritten, um entsprechende Änderungen am Versuchsablauf vorzunehmen zu können. Die gezeigten Endpunktanalysen nach sechs Wochen CPZ-Behandlung geben also nur bedingt Auskunft über den Demyelinisierungsprozess.

Um einzuschätzen, in welchem Maße Remyelinisierung während der Diät-Phase stattgefunden hatte und ob Remyelinisierung die Ergebnisse der Endpunktanalyse beeinflusst, wurde die Expression von MBP und 2',3'-Zyklischer Nukleotid-3'-phosphodiesterase (CNPase) mittels IF-Färbung untersucht. Die Darstellung von De- und Remyelinisierung mittels IF-Färbung ist zeitaufwändiger und kostenintensiver als die histochemische Färbung von Myelin, zeichnet sich aber durch eine weitaus höhere Sensitivität aus. Die Auswahl des detektierten Proteins entscheidet dabei über die Empfindlichkeit des Nachweises. Die ausgewählten Proteine MBP und CNPase weisen sich durch eine besonders hohe Empfindlichkeit bei CPZ-induzierter Demyelinisierung aus.⁵³

Abbildung 19 zeigt die IF-Färbung von MBP im Gehirn einer CPZ-behandelten ASA(-/-)-Maus. Dargestellt sind unterschiedliche Ausschnitte des CC (Abbildung 19 A-C) sowie des Hippocampus (Abbildung 19 D). Obwohl der mediale Bereich des CC in der entsprechenden SSB-Färbung komplett demyelinisiert schien (Abbildung 16 F), war eine kräftige IF-Färbung von MBP vorhanden (Abbildung 19 A). Dieser Widerspruch zwischen SSB-Färbung von Myelin und IF-Färbung von MBP kann durch Arbeiten anderer Arbeitsgruppen belegt werden. Auch Woodruff *et al.*, die mit der SSB-Färbung von Myelin gearbeitet haben, konnten nach Abschluss der CPZ-Diät kein Myelin im CC behandelter Mäuse anfärben,⁵⁴ während

Gudi *et al.* mittels IF-Färbung von MBP vollständige Demyelinisierung des CC nach Abschluss der fünften und einen deutlichen Anstieg der Proteinexpression bis zum Abschluss der sechsten Behandlungswoche nachwiesen.⁵⁵ Die gezeigte IF-Färbung von MBP bestätigt, dass Remyelinisierung, auch in ASA(-/-)-Mäusen, bereits während der Diätphase einsetzt.

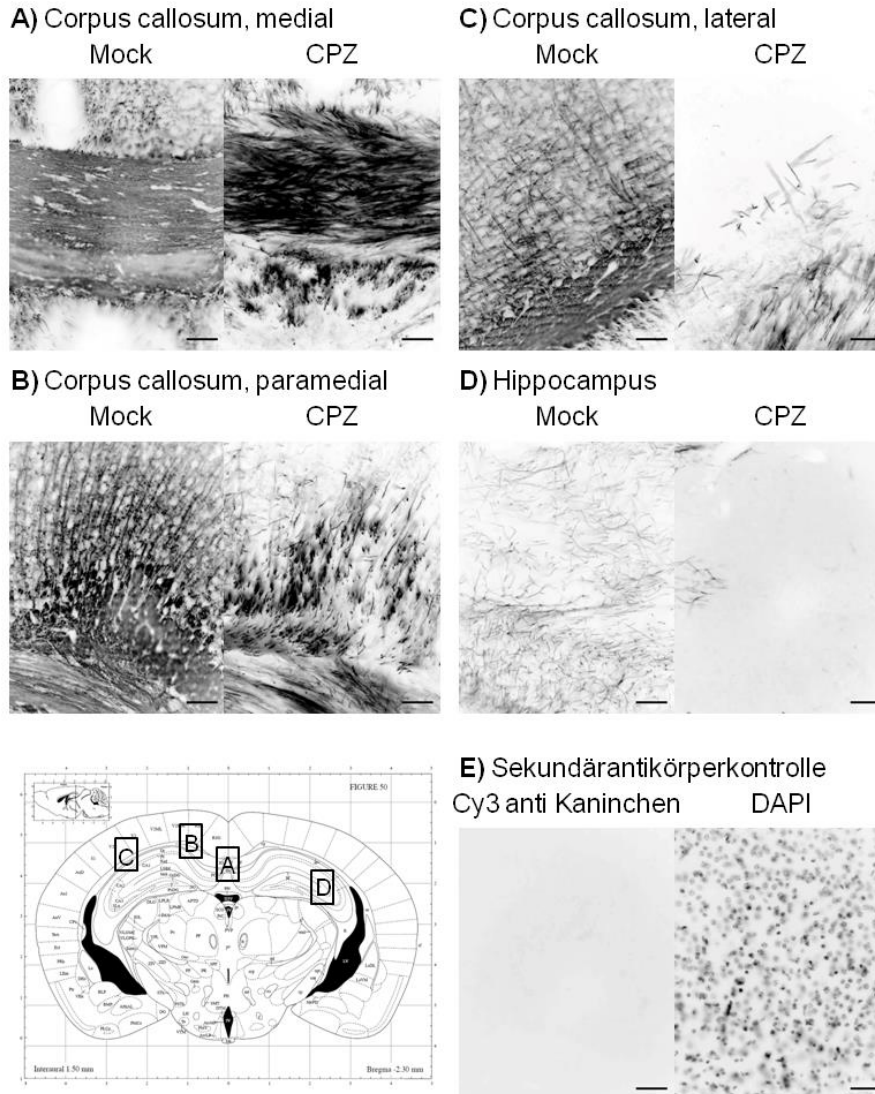


Abbildung 19: IF-Färbung von MBP. Fluoreszenzaufnahmen unterschiedlicher Ausschnitte des Gehirns Mock- und CPZ-behandelter ASA(-/-)-Tiere im roten Kanal (590 nm). **(A)** Im mittleren Teil des CC war die MBP-Expression nach CPZ-Behandlung sichtbar, obwohl zuvor kein Myelin mit SSB-angefärbt worden war. **(B, C)** Die IF-Färbung zeigte Demyelinisierung in Bereichen des Kortex, die mittels SSB-Färbung nicht darstellbar war. **(D)** Auch im Hippocampus war ein Verlust von MBP zu beobachten. **(E)** Die Sekundärantikörper-Kontrolle zeigte keine unspezifische Reaktivität. Alle Aufnahmen wurden mit konstanter Belichtungszeit aufgenommen. Die Bildbearbeitung erfolgte mit Adobe-Photoshop: Zur Verbesserung der Kontrastwahrnehmung wurden die Kanal-Aufnahmen in Schwarz-Weiß-Abbildungen konvertiert und invertiert. Die Bearbeitung war für alle Bilder gleich. Die Maßstabsbalken entsprechen 50 μm . Quelle: KBR-2-205-287; G. Paxinos, K. B. Franklin: *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press, 2001, 2. Auflage, pp. 95;.

Dass die MBP-Färbung nach CPZ-Behandlung intensiver erscheint als im CC der Mock-behandelten Maus (vgl. Abbildung 19 A), kann auf das Anwenden von SSB zum Quenchen der Autofluoreszenz zurückgeführt werden (Kapitel 3.4.6.3). Durch die Behandlung mit SSB

wird nicht nur die Autofluoreszenz, sondern auch die Fluoreszenz des Sekundärantikörpers reduziert.⁵⁶ Da Myelin SSB mit hoher Affinität bindet, wird der Sekundärantikörper im myelinreichen CC der Mock-behandelten Maus stärker gequenchet als im myelinarmen CC der CPZ-behandelten Maus, so dass das Signal in der CPZ behandelten Maus intensiver erscheint.

Aufgrund der höheren Sensitivität ist die IF-Färbung der Myelinproteine besser zur Detektion **pathologischer Vorgänge abseits des CC** geeignet als SSB.⁵⁷ In den Bereichen der grauen Substanz, wie Kortex und Hippocampus, zeigte die IF-Färbung nach CPZ-Behandlung, obwohl die SSB-Färbung keine CPZ-induzierte Demyelinisierung vermuten ließ, einen deutlichen Verlust von MBP (Abbildung 19 B & D) und CNPase (Abbildung 20 A). Auch andere Arbeitsgruppen hatten über CPZ-induzierte Demyelinisierung in diesen Bereichen berichtet.^{58,59}

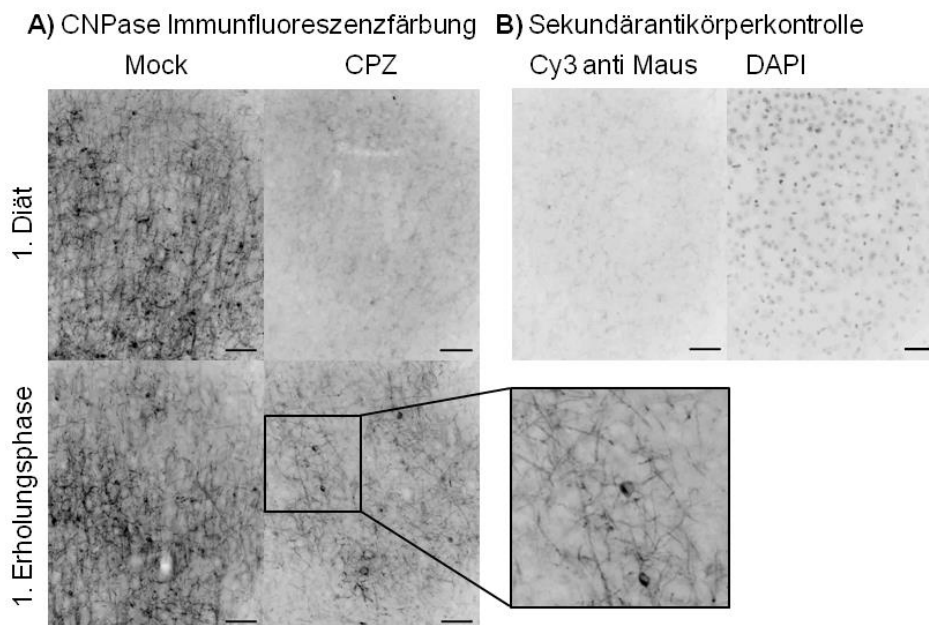


Abbildung 20: IF-Färbung von CNPase. Fluoreszenzaufnahme des Kortex einer ASA(-/-)-Maus im roten Kanal (590 nm). **(A)** Die deutliche Reduktion der Immunreaktivität nach CPZ-Behandlung zeigte, dass, obwohl in der SSB-Färbung nicht sichtbar, auch im Kortex Demyelinisierung stattfand. Nach Abschluss der Erholungsphase waren CNPase-positive Zellen und myelinisierte Axone wieder sichtbar. Remyelinisierung hatte stattgefunden. **(B)** Die Sekundärantikörperkontrolle zeigte eine vernachlässigbar geringe unspezifische Reaktivität des Sekundärantikörpers. Alle Aufnahmen wurden mit konstanter Belichtungszeit aufgenommen. Die Bildbearbeitung erfolgte mit Adobe-Photoshop: Zur Verbesserung der Kontrastwahrnehmung wurden die Kanal-Aufnahmen in Schwarz-Weiß-Abbildungen konvertiert und invertiert. Die Bearbeitung war für alle Bilder gleich. Die Maßstabebenen entsprechen 50 µm. Quelle: KBR-3-85-423.

Insgesamt bestätigte die IF-Färbung der Myelinproteine, dass Remyelinisierung, auch im Gehirn der ASA(-/-)-Maus, schon während der Diätphase einsetzte. Wie groß der Einfluss dieser Beobachtung auf die Ergebnisse der Endpunktanalyse ist, konnte nicht quantifiziert werden. Bei der Interpretation der Ergebnisse soll diese Beobachtung berücksichtigt werden.

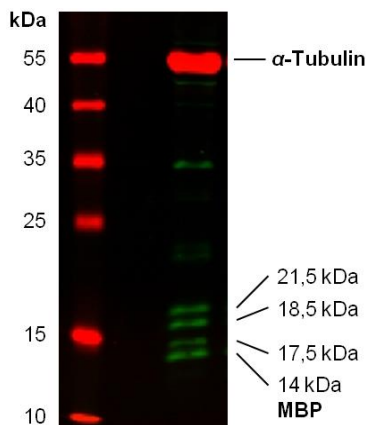
Die IF-Färbung von MBP und CNPase zeigte außerdem, dass die **CPZ-induzierte Demyelinisierung kein streng auf den CC begrenzter Prozess** ist, sondern auch in anderen Bereichen, wie Kortex und Hippocampus, stattfindet. Die SSB-Färbung konnte diese Prozesse nicht abbilden und ist daher nicht ausreichend, um eine fundierte Aussage über Effizienz von De- und Remyelinisierung zu treffen.

4.5 Quantifizierung der Myelinproteine

Der direkte Schluss von Färbungsintensität mit SSB auf die Expression der Myelinproteine war, wie im vorangehenden Kapitel gezeigt, nicht möglich. Darum wurde zur Detektion von De- und Remyelinisierung auf molekularer Ebene die Expression ausgewählter Myelinproteine im „Western Blot“-Verfahren untersucht. Die hier angegebenen Proteinexpressionen sind Relativwerte bezogen auf die Expression von α -Tubulin und verstehen sich als Mittelwert der biologischen Replikate.

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden alle Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von bis zu 5 % ($p \leq 0,05$) bezeichnet. Als Tendenz zur Veränderung sei hier eine Irrtumswahrscheinlichkeit bis zu 5 % über dem Signifikanzniveau ($0,05 < p \leq 0,10$) definiert.

4.5.1 Basisches Myelinprotein



MBP ist nach PLP das zweithäufigste Protein im Myelin des ZNS. Es ist maßgeblich an der Kompaktierung des Myelins beteiligt. Im Gehirn der Maus finden sich vier Spleißformen mit einem Molekulargewicht zwischen 14 kDa und 21,5 kDa. Abbildung 21 zeigt exemplarisch die Auftrennung der Spleißvarianten im 12%igen SDS-Gel. Die Expressionsstärke der Spleißvarianten ist altersabhängig. In der adulten Maus haben die 14 kDa- und 18,5 kDa-Varianten gemeinsam einen Anteil von über 90 %, ihre spezifische Funktion ist aber noch unbekannt.⁶⁰

Abbildung 21: Exemplarische Darstellung der Immundetektion von MBP im „Western-Blot“-Verfahren. Detektion mit IR-Scanner. Proteinstandard und Ladekontrolle α -Tubulin detektiert bei $\lambda = 680$ nm (rot dargestellt), MBP bei $\lambda = 800$ nm (grün dargestellt). Die Bezeichnungen der MBP-Isoformen entsprechen nicht dem apparenten, sondern dem theoretischen Molekulargewicht. Quelle: KBR-3-229-534.

Die Expression von MBP ist essenziell für die Bildung funktionalen Myelins. Die natürlich vorkommende MBP-Nullmutante, die Shiverer-Maus, exprimiert kein MBP und zeigt eine schwere Hypomyelinisierung des ZNS.⁶¹ Dort, wo Myelin vorhanden ist, fehlt die Hauptlinie. Die Lebenserwartung ist deutlich reduziert.

4.5.1.1 Konventionelles MLD-Mausmodell

4.5.1.1.1 Kontrollgruppe ASA(+/-)

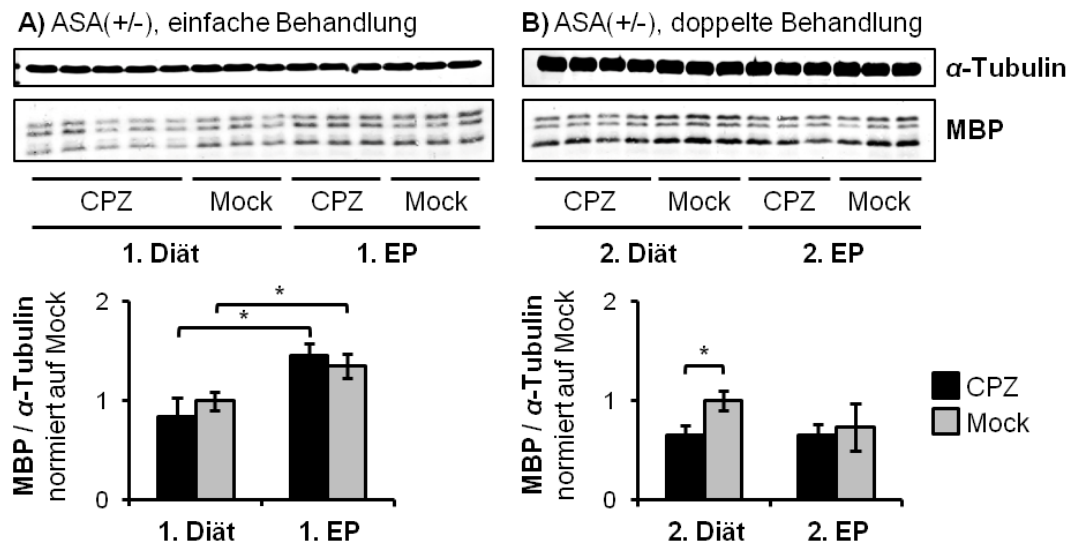


Abbildung 22: Relative Proteinexpression von MBP im Gehirn der ASA(+/-)-Maus. Darstellung der Proteinbanden im WB: α -Tubulin 50 kDa, MBP 21,5; 18,5; 17; 14,5 kDa. **(A)** Die densitometrische Auswertung der WBs zeigte im ersten Behandlungszyklus keinen Verlust von MBP in CPZ-behandelten Tieren. **(B)** Erst nach wiederholter Behandlung war Demyelinisierung über die signifikante Abnahme der Proteinexpression von MBP nachweisbar. Nach Abschluss der Erholungsphase war kein Unterschied zwischen CPZ- und Mock-behandelten Mäusen vorhanden, Remyelinisierung hatte also stattgefunden. Die Darstellungen wurden auf das relative Expressionslevel in Mock-behandelten Mäusen normiert. Die Anzahl der biologischen Replikate war N = 3, ausgenommen für 1. Diät, CPZ N = 5, 2. Diät, CPZ N = 4. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. Die Bildbearbeitung der WBs erfolgte mit Adobe-Photoshop. Die Bearbeitung war für alle Bilder gleich. EP = Erholungsphase. Quelle: KBR-3-261-563, KBR-4-159-723.

Obwohl die SSB-Färbung in ASA(+/-)-Mäusen schon im ersten Behandlungszyklus Demyelinisierung im kaudalen CC gezeigt hatte (Abbildung 16 D), konnte im WB-Verfahren kein entsprechender Verlust von MBP nachgewiesen werden (Abbildung 22 A). Stattdessen stieg die Proteinexpression von MBP in CPZ- und Mock-behandelten Mäusen über den ersten Behandlungszyklus signifikant an. Wahrscheinlich ist dieser Anstieg auf die fortschreitende Reifung des ZNS zurückzuführen. Entweder war die CPZ-induzierte Demyelinisierung lokal so begrenzt, oder die Remyelinisierung schon in der Diätphase so effizient, dass über die Gesamtheit des Gehirns kein Verlust von MBP nachweisbar war.

Erst im zweiten Behandlungszyklus, wenn rostraler und kaudaler CC von Demyelinisierung betroffen sind (Abbildung 18 A & B), war Demyelinisierung im WB-Verfahren nachweisbar. Die Proteinexpression von MBP war nach Abschluss der Diätphase in CPZ-behandelten

Mäusen signifikant erniedrigt (Abbildung 22 B). Entweder hatte tatsächlich mehr Demyelinisierung stattgefunden als im ersten Behandlungszyklus, oder die Effizienz der noch während der Diätphase einsetzenden Remyelinisierung hatte abgenommen. Nach Abschluss der Erholungsphase war kein Unterschied zwischen CPZ- und Mock-behandelten Mäusen vorhanden, Remyelinisierung hatte stattgefunden.

4.5.1.1.2 Konventionelle MLD-Maus ASA(-/-)

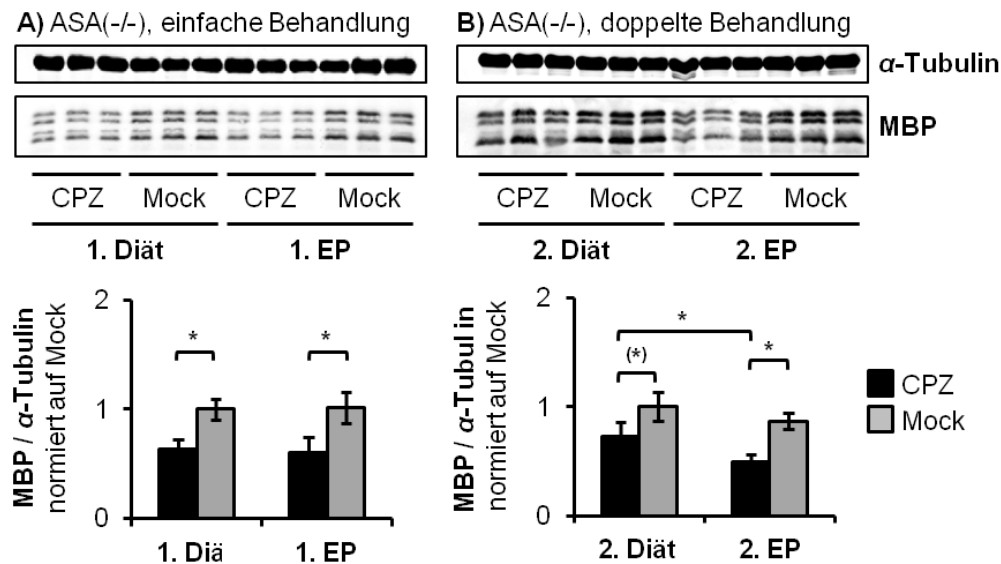


Abbildung 23: Relative Proteinexpression von MBP im Gehirn der ASA(-/-)-Maus. Darstellung der Proteinbanden im WB: Tubulin 50 kDa, MBP 21,5; 18,5; 17; 14,5 kDa. Die densitometrische Auswertung der WBs zeigte, sowohl in einfach (A), als auch wiederholt behandelten ASA(-/-)-Tieren (B) eine signifikante Erniedrigung der relativen Expression von MBP. Auch nach der Erholungsphase blieb die relative Expression von MBP erniedrigt. Die Darstellungen wurden auf das relative Expressionslevel in Mock-behandelten Tieren normiert. Die Anzahl der biologischen Replikate war N = 3. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. Mit einem in Klammern gesetzten Stern gekennzeichnet sind nicht signifikante Veränderungen im Konfidenzintervall $0,05 < p \leq 0,10$. Die Bildbearbeitung der WBs erfolgte mit Adobe-Photoshop. Die Bearbeitung war für alle Bilder gleich. EP = Erholungsphase. Quelle: KBR-3-229-534, KBR-4-139-710.

Anders als im Gehirn der ASA(+/-)-Maus hatte die SSB-Färbung im Gehirn der ASA(-/-)-Maus schon im ersten Behandlungszyklus vollständige Demyelinisierung von rostralem (Abbildung 16 E) und kaudalem CC (Abbildung 16 F) gezeigt. Dementsprechend war auch die Proteinexpression von MBP in ASA(-/-)-Mäusen schon nach Abschluss der ersten Diätphase signifikant erniedrigt (Abbildung 23 A). Da die Proteinexpression auch nach Abschluss der Erholungsphase erniedrigt blieb, kann davon ausgegangen werden, dass die Remyelinisierung nicht vollständig war. Die Wiederholung der CPZ-Behandlung führte wider Erwarten nicht zu einer Verstärkung der Demyelinisierung (Abbildung 23 B). Die Proteinexpression von MBP blieb nach Abschluss der Erholungsphase erniedrigt. Die Remyelinisierung war nicht vollständig.

4.5.1.1.3 Vergleichende Auswertung

Bei den in Abbildung 22 und Abbildung 23 dargestellten Ergebnissen handelte es sich um unabhängige Experimente, so dass sie nicht direkt miteinander verglichen werden konnten. Um den Vergleich zu ermöglichen, wurde die Proteinexpression von MBP in einfach und doppelt Mock-behandelten ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäusen im WB-Verfahren miteinander verglichen (Abbildung 24 A). Es wurden dieselben Proben verwendet, deren Einzelanalysen in Abbildung 22 und Abbildung 23 dargestellt sind.

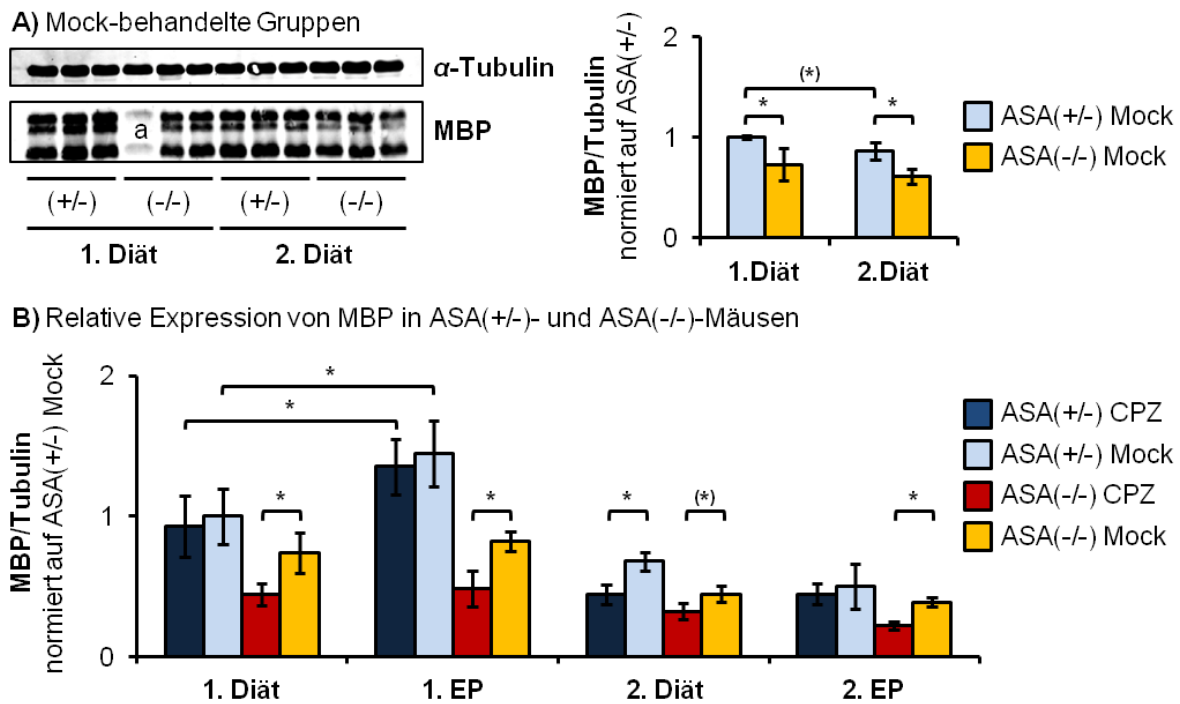


Abbildung 24: Vergleichende Darstellung des Einflusses von CPZ auf die relative Expression von MBP im konventionellen MLD-Mausmodell. (A) Darstellung der Proteinbanden im WB: α -Tubulin 50 kDa, MBP 21,5; 18,5; 17; 14,5 kDa. Die densitometrische Auswertung des vergleichenden WBs von Mock-behandelten ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäusen zeigte, unabhängig vom Alter, eine signifikante Reduktion der Proteinexpression von MBP im Gehirn der ASA(-/-)-Maus. Die Tendenz zur Abnahme der Proteinexpression von MBP in ASA(+/-)-Mäusen resultiert wahrscheinlich aus der Normierung auf α -Tubulin und zeigt keinen Verlust von MBP. Die Darstellung wurde auf das relative Expressionslevel in Mock-behandelten ASA(+/-)-Mäusen normiert. Die mit ^a bezeichnete Probe unterlag einem Präparationsfehler und wurde nicht in die Auswertung miteinbezogen. Die Anzahl der biologischen Replikate war pro Gruppe N = 3, ausgenommen ASA(-/-) Mock, 1. Diät (N = 2). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) sind alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. Mit einem in Klammern gesetzten Stern gekennzeichnet sind nicht signifikante Veränderungen im Konfidenzintervall $0,05 < p \leq 0,10$. Die Bildbearbeitung der WBs erfolgte mit Adobe-Photoshop. **(B)** Durch den vergleichenden WB aus (A) konnten die Ergebnisse der Einzelexperimente (Abb. 23, Abb. 24) in Relation zueinander gesetzt werden. Da es sich nicht um ein geschlossenes Experiment handelte, konnte keine statistische Aussage über den Unterschied zwischen ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Tieren getroffen werden. Die gezeigten Signifikanzen entstammen den entsprechenden Einzelexperimenten. EP = Erholungsphase. Quelle: (A) KBR-4-184-733, (B) KBR-3-261-563, KBR-4-159-723, KBR-3-229-534, KBR-4-139-710.

Die densitometrische Auswertung des vergleichenden WB (Abbildung 24 A) zeigte, dass die Proteinexpression von MBP im Gehirn der ASA(-/-)-Maus sowohl im Alter von 13 Wochen (= nach 1. Diätphase), als auch 25 Wochen (= nach 2. Diätphase) gegenüber der ASA(+/-)-Maus signifikant erniedrigt war. Es ist bekannt, dass die Gen- und Proteinexpression von

MBP in den ersten Lebenswochen der ASA(-/-)-Maus gegenüber dem Wildtypen reduziert sind. Yaghootfam *et al.* schlussfolgerten, die **primäre Myelinisierung des Gehirns verlaufe in ASA(-/-)-Mäusen zeitverzögert**.⁶² Im Unterschied zu den hier gezeigten Ergebnissen berichten Yaghootfam *et al.* allerdings, dass sich die Expressionslevel mit Abschluss der dritten Lebenswoche einander angleichen. Möglicherweise ist dieser Widerspruch durch die angewendete Methode begründet. Yaghootfam *et al.* bedienten sich der auf Chemolumineszenz basierenden Detektion der Proteinbanden. Chemolumineszenz ist sehr sensitiv, aber nur bedingt zur Quantifizierung der Signalstärke geeignet, denn der Zusammenhang zwischen Proteinkonzentration und Signalstärke ist nur über einen kleinen Konzentrationsbereich linear. Bei Detektion mittels IR-gekoppelter Antikörper, wie im Zuge dieser Arbeit angewendet, ist der Bereich direkt linearen Zusammenhangs etwa 15mal so groß.⁶³ Anscheinend war die Myelinisierung des ZNS auch im Alter von 25 Wochen in ASA(-/-)-Mäusen weniger weit fortgeschritten, als in ASA(+/-)-Mäusen.

Abbildung 24 B zeigt die auf dem vergleichenden WB basierende Gesamtdarstellung der zuvor beschriebenen Ergebnisse (Abbildung 22, Abbildung 23). Da es sich bei der Darstellung nicht um ein einzelnes Experiment handelte, sondern die vergleichende Darstellung mehrerer Experimente, konnte die statistische Signifikanz nur innerhalb der Einzelexperimente angegeben werden. In der Gesamtdarstellung fiel auf, dass die Proteinexpression von MBP sowohl im Gehirn der ASA(+/-)-, als auch der ASA(-/-)-Maus über den Gesamtzeitraum von 13. bis 31. Lebenswoche zu sinken schien. MBP ist aufgrund seiner großen metabolischen Stabilität im Gehirn aber als verlässlicher Marker für den Myelinisierungszustand des Gehirns etabliert.⁶⁴ Wahrscheinlich resultiert die Abnahme aus der Normierung auf α -Tubulin. α -Tubulin ist ein Bestandteil des Zytoskeletts und es ist beobachtet worden, dass der relative Gehalt von α -Tubulin im Gehirn mit dem Alter steigt.⁶⁵

4.5.1.1.4 Fazit

Zusammengefasst bestätigte die Quantifizierung von MBP den Eindruck der SSB-Färbung, dass der CPZ-induzierte Verlust von Myelin im Gehirn der ASA(-/-)-Maus größer war als in der ASA(+/-)-Maus. Erst bei Wiederholung der CPZ-Behandlung konnte auch in ASA(+/-)-Mäusen Demyelinisierung auf Proteinebene detektiert werden. Während die Remyelinisierung in der ASA(+/-)-Maus auf Ebene von MBP vollständig war, konnte in ASA(-/-)-Mäusen keine Wiederherstellung des Normalzustandes beobachtet werden.

4.5.1.2 CST-transgenes MLD-Mausmodell

Wie zu Beginn der Ergebnisteils beschrieben, war zu erwarten, dass die Schwankungen zwischen den biologischen Replikaten groß sein würden. Diese Vermutung bestätigte sich

bei Auswertung der WBs CST-transgener Mäuse, wie die Darstellung der MBP-Proteinbanden in Abbildung 25 zeigt. **Die Schwankungen zwischen den biologischen Replikaten waren trotz Normierung der Auftragungsmenge auf den Gesamtproteingehalt der Probe groß.**

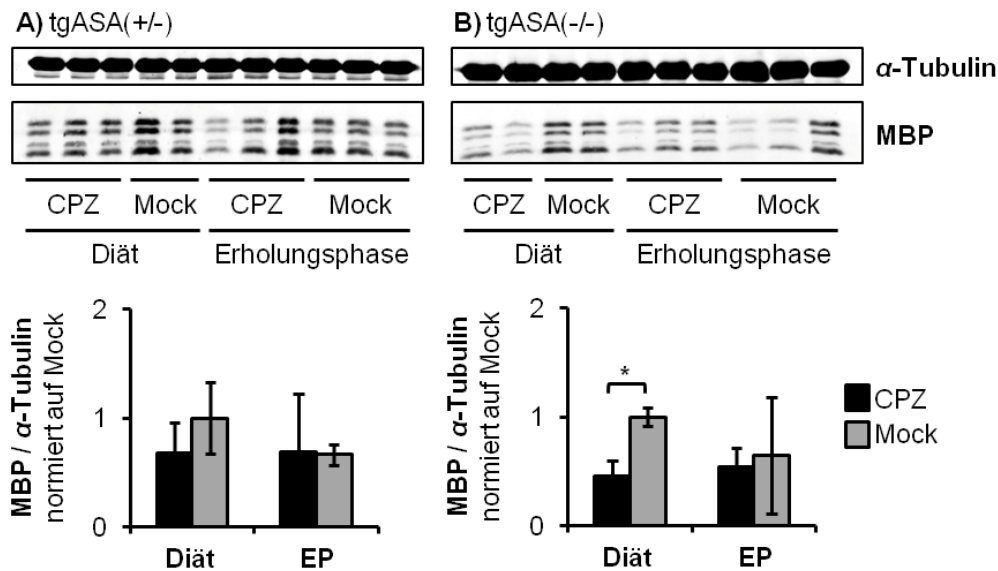


Abbildung 25: Relative Proteinexpression von MBP im Gehirn der transgenen MLD-Maus. Darstellung der Proteinbanden im WB: Tubulin 50 kDa, MBP 21,5; 18,5; 17; 14,5 kDa. Die densitometrische Auswertung der WBs zeigte in (A) tgASA(+/-)-Mäusen keinen signifikanten Effekt von CPZ auf das relative Expressionslevel von MBP. (B) In tgASA(-/-)-Mäusen war die relative Expression von MBP nach Behandlung mit CPZ erniedrigt. Nach Abschluss der Erholungsphase war kein Unterschied nachweisbar. Wie an den Abbildungen der Proteinbanden erkennbar, war die biologische Varianz in transgenen Mäusen sehr hoch und erschwerte die Interpretation der Messwerte. Die Darstellungen wurden auf das relative Expressionslevel in Mock-behandelten Mäusen normiert. Die Anzahl der biologischen Replikate war N = 3, außer in tgASA(+/-) Mock, tgASA(-/-) Mock und tgASA(-/-) CPZ. Für diese Gruppen war die Anzahl der biologischen Replikate N = 2. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher T-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. Die Bildbearbeitung der WBs erfolgte mit Adobe-Photoshop. Die Bearbeitung war für alle Bilder gleich. EP = Erholungsphase. Quelle: KBR-4-109-692.

Die densitometrische Auswertung ergab, dass in tgASA(+/-)-Mäusen (Abbildung 25 A), wie in konventionellen ASA(+/-)-Mäusen (Abbildung 22 A), kein CPZ-induzierter Verlust von MBP nachweisbar war, obwohl Demyelinisierung in der SSB-Färbung sichtbar gewesen war (Abbildung 18 B).

In tgASA(-/-)-Mäusen war die Proteinexpression von MBP, wie in konventionellen ASA(-/-)-Mäusen (Abbildung 23 A) nach Behandlung mit CPZ erniedrigt (Abbildung 25 B). Ob Remyelinisierung in den beiden Mausgruppen stattgefunden hatte, konnte aufgrund der hohen Standardabweichungen anhand des MBP-WB nicht mit Sicherheit beantwortet werden.

Wie auch in den folgenden Kapiteln zu sehen sein wird, erschwerte die Unterschiedlichkeit der biologischen Replikate CST-transgener Mäuse die Interpretation der Ergebnisse erheblich.

4.5.2 Proteolipid-Protein

PLP ist das häufigste Protein der weißen Substanz im ZNS und wie MBP ein strukturgebender Faktor des kompakten Myelins.⁶⁶ PLP ist ein Transmembranprotein mit stark hydrophobem Charakter und vermittelt durch Wechselwirkung seiner extrazellulär gelegenen Domänen die Bildung der Intermediär-Linie im Myelin. Durch alternatives Spleißen wird die

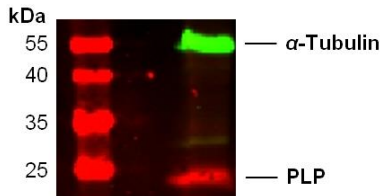


Abbildung 26: Immundetektion von PLP im „Western-Blot“-Verfahren. Auftrennung im 10%igen SDS-Polyacrylamid-Gel. Detektion mittels IR-Scanner. Proteinstandard und PLP detektiert bei $\lambda = 680 \text{ nm}$ (rot dargestellt), Ladekontrolle α -Tubulin bei $\lambda = 800 \text{ nm}$ (grün dargestellt).
Quelle: KBR-3-233-535

leichtere Isoform DM20 (20 kDa) gebildet, deren zytoplasmatische Domäne gegenüber PLP (25 kDa, Abbildung 26) verkürzt ist. Die strukturgebende Funktion des Proteins wird durch Verkürzung der zytoplasmatischen Domäne in DM20 nicht beeinflusst. Im Mausmodell konnte allerdings gezeigt werden, dass die ausschließliche Expression von DM20 anstelle von PLP zum vermehrten Absterben von Oligodendrozyten führt.⁶⁷ PLP hat neben seiner Funktion als Strukturgeber im Myelin daher vermutlich auch Einfluss auf die Proliferation und das Überleben der Oligodendrozyten.

In der PLP-Knockout-Maus, die weder PLP, noch die Spleißvariante DM20 exprimiert, ist das ZNS entgegen der Erwartung vollständig myelinisiert.⁶⁸ Auch wenn die mechanische Stabilität des Myelins reduziert ist, ist bis zu einem Alter von einem Jahr kein Anzeichen für Demyelinisierung zu erkennen. Das macht deutlich, dass PLP im Vergleich zu MBP weniger essentiell für die strukturelle Integrität des Myelins ist. Im Zuge dieser Arbeit soll PLP neben MBP als Marker für kompaktes Myelins interpretiert werden.

4.5.2.1 Konventionelles MLD-Mausmodell

Im Durchschnitt ist PLP das häufigste Protein des Myelins im ZNS und hat einen ungefähr doppelt so großen Anteil an dessen Proteinzusammensetzung wie MBP.⁶⁹ Theoretisch wird bei Demyelinisierung also mehr PLP abgebaut als MBP. Man könnte schlussfolgern, dass Demyelinisierung daher über Immundetektion von PLP besonders gut nachgewiesen werden kann. Tatsächlich ist PLP sowohl in der immunhistologischen⁷⁰, als auch IF-Färbung⁷¹ ein weniger empfindlicher Marker für Demyelinisierung als MBP oder CNPase. Wie im Folgenden gezeigt wird, waren **MBP und PLP auch im Zuge dieser Arbeit nicht gleichermaßen empfindliche Marker für die CPZ-induzierte Demyelinisierung.**

Die nachfolgenden Abbildungen 27 und 28 fassen die Ergebnisse der Quantifizierung von PLP im WB-Verfahren zusammen.

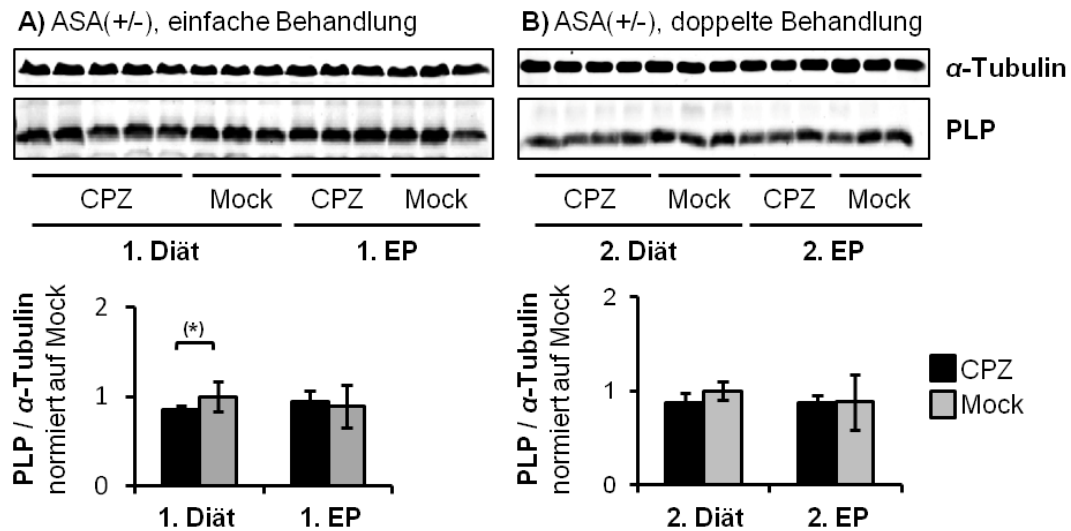


Abbildung 27: Relative Proteinexpression von PLP im Gehirn der ASA(+/-)-Maus. Darstellung der Proteinbanden im WB: Tubulin 50 kDa, PLP 25 kDa. Die densitometrische Auswertung der WBs zeigte weder im ersten (A), noch im zweiten (B) Behandlungszyklus einen Effekt von CPZ auf die relative Expression von PLP. Die Darstellungen wurden auf das relative Expressionslevel in Mock-behandelten Tieren normiert. Die Anzahl der biologischen Replikate war pro Gruppe N = 3-5. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. Mit einem in Klammern gesetzten Stern gekennzeichnet sind nicht signifikante Veränderungen im Konfidenzintervall $0,05 < p \leq 0,10$. EP = Erholungsphase. Quelle: KBR-3-233-535, KBR-4-157-722.

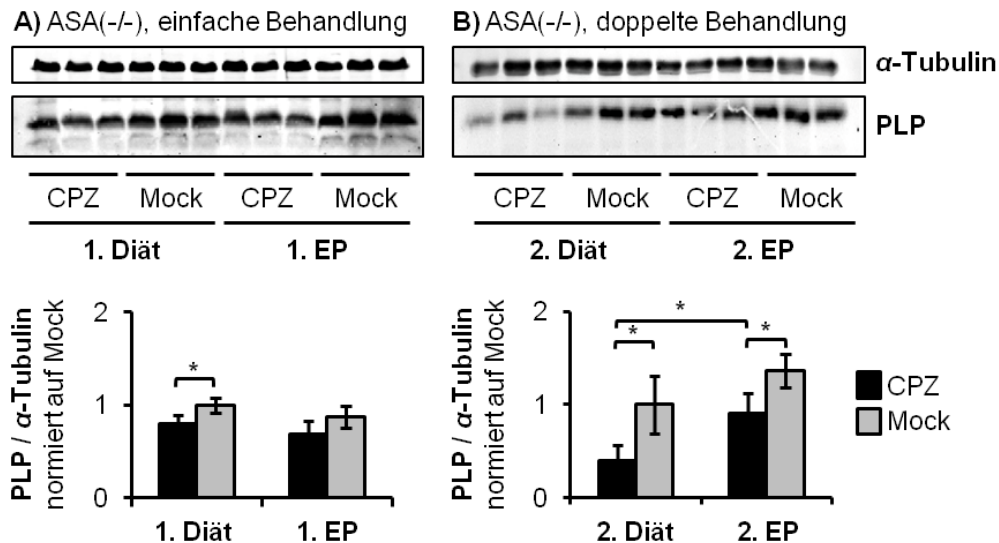


Abbildung 28: Relative Proteinexpression von PLP im Gehirn der ASA(-/-)-Maus. Darstellung der Proteinbanden im WB: Tubulin 50 kDa, PLP 25 kDa. (A) Die densitometrische Auswertung der WBs zeigte in einfach behandelten ASA(-/-)-Mäusen eine CPZ-induzierte Reduktion der relativen Expression von PLP nach Abschluss der Diätphase. Obwohl die Intensität der Proteinbanden im WB auch nach der Erholungsphase reduziert schien, war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Mock- und CPZ-behandelten Tieren nachweisbar. (B) Im zweiten Behandlungszyklus war die relative Expression von PLP sowohl nach Abschluss der Diät, als auch der Erholungsphase, in CPZ-behandelten Tieren erniedrigt. Gleichzeitig stieg die relative PLP-Expression in CPZ-behandelten Tieren während der Erholungsphase an. Die Darstellungen wurden auf das relative Expressionslevel in Mock-behandelten Tieren normiert. Die Anzahl der biologischen Replikate war pro Gruppe N = 3. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. EP = Erholungsphase. Quelle: KBR-3-233-535, KBR-4-176-730.

In **ASA(+/-)**-Mäusen war Demyelinisierung nach wiederholter CPZ-Behandlung über den signifikanten Verlust von MBP nachgewiesen worden (Abbildung 22 B). Wie Abbildung 27 zeigt, war die Proteinexpression von PLP weder im ersten (Abbildung 27 A), noch zweiten Behandlungszyklus (Abbildung 27 B) signifikant verändert.

In **ASA(-/-)**-Mäusen hatte die Quantifizierung von MBP gezeigt, dass die Remyelinisierung beeinträchtigt ist (Abbildung 23). Weder nach der ersten, noch zweiten Erholungsphase erreichte die Proteinexpression von MBP im Gehirn CPZ-behandelter Mäuse das Niveau der Mock-behandelten Kontrolle. Auf Ebene von PLP konnte ein Fehlschlagen der Remyelinisierung im ersten Behandlungszyklus nicht nachgewiesen werden (Abbildung 28 A).

Tabelle 12 zeigt eine Übersicht über die CPZ-induzierten Veränderungen der Proteinexpression von MBP und PLP. Tatsächlich waren die **Veränderungen der Proteinexpression von MBP und PLP immer gleichgerichtet**, aber nicht gleichermaßen statistisch signifikant.

Tabelle 12: CPZ-induzierte Veränderung der Proteinexpression.

	ASA(+/-)		ASA(-/-)	
	1. Diät	1. Erholungsphase	1. Diät	1. Erholungsphase
MBP	-13,7 ± 14,5 %	+7,9 ± 8,9 %	-37,4 ± 9,6 % *	-41,0 ± 14,1 % *
PLP	-15,4 ± 4,5 % (*)	+6,5 ± 13,5 %	-19,8 ± 8,7 % *	-20,9 ± 15,8 %
	2. Diät	2. Erholungsphase	2. Diät	2. Erholungsphase
MBP	-34,8 ± 9,9 % *	-11,0 ± 14,6 %	-27,6 ± 13,3 % (*)	-43,0 ± 7,2% *
PLP	-13,3 ± 11,4 %	-1,4 ± 10,2 %	-59,8 ± 15,8 % *	-34,0 ± 16,3 % *

Veränderung der Proteinexpression in CPZ-behandelten Mäusen relativ zur Mock-behandelten Kontrolle (Mock = 100 %). Fett gedruckt dargestellt sind die Ergebnisse der PLP-Quantifizierung, für die keine Signifikanz nachweisbar war, obwohl die Proteinexpression von MBP signifikant verändert war. Signifikant (t-Test, $p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Veränderungen. Mit einem in Klammern gesetzten Stern gekennzeichnet sind nicht signifikante Veränderungen im Konfidenzintervall $0,05 < p \leq 0,10$. Quelle: ASA(+/-) KBR-3-261-563/KBR-3-233-535, KBR-4-159-723/ KBR-4-157-722; ASA(-/-) KBR-3-229-534/KBR-3-233-535; KBR-4-139-710/KBR-4-176-730.

Der Grund, warum die Ergebnisse der Quantifizierung von MBP und PLP nicht exakt übereinstimmen, kann sowohl biologischer als auch präparativer Natur sein.

Im Durchschnitt ist PLP zwar das häufigste Protein des Myelins im ZNS und hat einen ungefähr doppelt so großen Anteil wie MBP⁷², Hartman *et al.* haben im Gehirn der Ratte aber beobachtet, dass das Verhältnis beider Proteine zueinander nicht in allen Bereichen des Myelins konstant ist und mit dem Durchmesser der Axone korreliert⁷³. Da der Axondurchmesser im CC über die unterschiedlichen Zonen variiert^{74, 75}, wäre es denkbar, dass auch die Zusammensetzung des Myelins im CC der Maus nicht homogen ist. Unter Berücksichtigung der SSB-Färbung, in der zu sehen war, dass nicht alle Teile des CC in ASA(+/-)- und ASA(-/-

)-Mäusen bzw. im ersten und zweiten Behandlungszyklus gleichermaßen von Demyelinisierung betroffen waren (Abbildung 16, Abbildung 17), wäre zu erwarten, dass die Proteinexpression von MBP und PLP im WB ebenfalls nicht gleichermaßen verändert sind.

Technisch betrachtet kann die Probenvorbereitung ein Grund für die fehlende Signifikanz der Ergebnisse sein. Die Probenvorbereitung für den WB von PLP (Kapitel 3.7.3) unterschied sich von der Probenvorbereitung für alle anderen gezeigten WBs, die mit einem einzigen Probenansatz durchgeführt wurden. Abweichende Pipettierfehler etc. könnten durch Vergrößerung der Standardabweichung die Signifikanz des Ergebnisses beeinflussen.

4.5.2.1.1 Vergleichende Auswertung

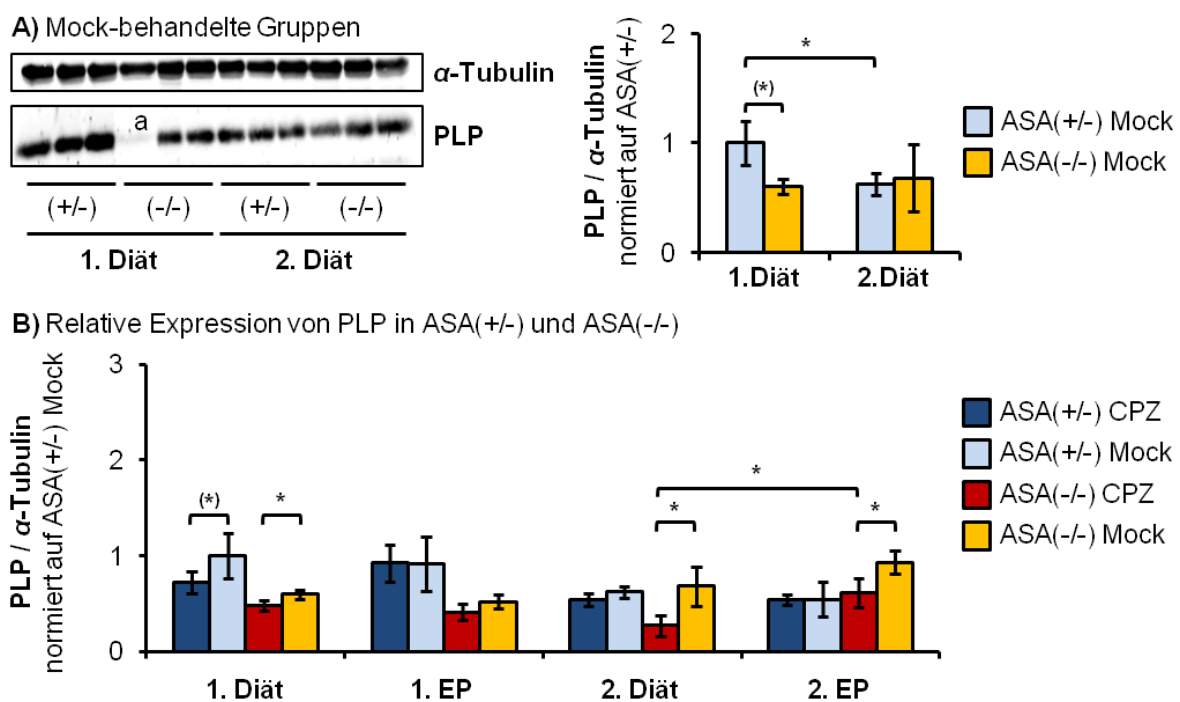


Abbildung 29: Genotypabhängiger Einfluss von CPZ auf die relative Expression von PLP im Gehirn der MLD-Maus. (A) Darstellung der Proteinbanden im WB: Tubulin 50 kDa, PLP 25 kDa. Die densitometrische Auswertung des vergleichenden WB von Mock-behandelten ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäusen zeigte eine Tendenz zur Reduktion von PLP in 13 Wochen (= nach 1. Diät) alten ASA(-/-)-Mäusen. Im Alter von 25 Wochen, also nach Abschluss der zweiten Diätphase, war kein Unterschied nachweisbar. Die Darstellung wurde auf das relative Expressionslevel in Mock-behandelten ASA(+/-)-Mäusen normiert. Die mit ^a bezeichnete Probe wurde nicht in die Auswertung mit einbezogen. Die Anzahl der biologischen Replikate war demnach pro Gruppe N = 3, ausgenommen ASA(-/-) Mock, 1. Diät (N = 2). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. Mit einem in Klammern gesetzten Stern gekennzeichnet sind nicht signifikante Veränderungen im Konfidenzintervall $0,05 < p \leq 0,10$. (B) Durch den vergleichenden WB von Mock-behandelten ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäusen konnten die Ergebnisse der Einzelexperimente (Abb. 30, Abb. 31) in Relation zueinander gesetzt werden. Da es sich nicht um ein geschlossenes Experiment handelte, konnte keine statistische Aussage über den Unterschied zwischen ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Tieren getroffen werden. Die gezeigten Signifikanzen entstammen den entsprechenden Einzelexperimenten. EP = Erholungsphase. Quelle: (A) KBR-4-184-731, (B) KBR-3-233-535, KBR-4-157-722, KBR-3-233-535, KBR-4-176-730.

Die Gesamtdarstellung der vorangehend beschriebenen Ergebnisse ist in Abbildung 29 gezeigt. Im vergleichenden WB Mock-behandelter Mäuse war die Proteinexpression von

PLP in 13 Wochen alten ASA(-/-)-Mäusen (nach 1. Diät) gegenüber ASA(+/-)-Mäusen tendenziell erniedrigt ($p = 0,08$, Abbildung 29 A). Im Alter von 25 Wochen (nach 2. Diät) war kein Unterschied vorhanden (Abbildung 29 A). Yaghoofam *et al.* hatten ebenfalls berichtet, dass die Genexpression von PLP in der ASA(-/-)-Maus während der Myelinogenese erniedrigt ist.⁷⁶ Mit dem Abschluss der Myelinisierung, wenn die Genexpression auf ein stabiles Grundniveau abfällt, gleicht sich das Genexpressionslevel von ASA(-/-)- und Wildtypmaus einander an.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der PLP-WBs, trotz fehlender Signifikanz, dieselbe Tendenz wie die Quantifizierung von MBP. **Auch auf Ebene von PLP war die Remyelinisierung in ASA(-/-)-Mäusen gegenüber ASA(+/-)-Mäusen beeinträchtigt.**

4.5.2.2 CST-transgenes MLD-Mausmodell

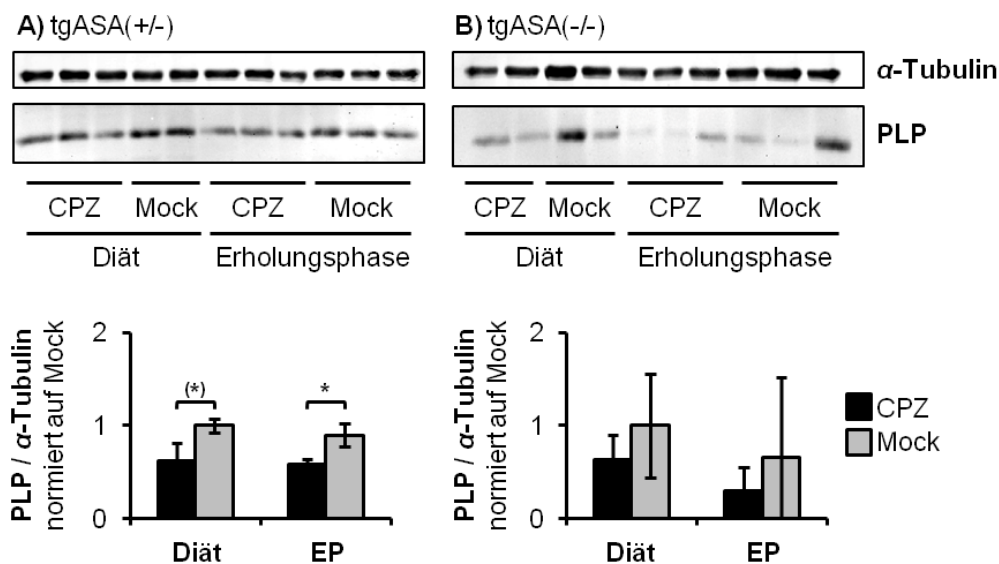


Abbildung 30: Relative Proteinexpression von PLP im Gehirn der CST-transgenen MLD-Maus. Darstellung der Proteinbanden im WB: Tubulin 50 kDa, PLP 25 kDa. Die densitometrische Auswertung der WB zeigte, vor allem in tgASA(-/-)-Mäusen, eine große Varianz der biologischen Replikate. Wie schon in den vorangehend gezeigten Analysen, erschwerte dies die Interpretation der Messwerte. **(A)** Die Darstellung der Proteinbanden im WB zeigt in tgASA(+/-)-Mäusen eine sichtbare Reduktion von PLP nach CPZ-Behandlung und Erholungsphase. Nach der densitometrischen Auswertung war jedoch nur nach Abschluss der Erholungsphase ein signifikanter Unterschied nachweisbar. **(B)** In tgASA(-/-)-Mäusen war die Varianz der biologischen Replikate so groß, dass keine Aussage über den Einfluss von CPZ auf die PLP-Expression getroffen werden konnte. Die Darstellung wurde auf das relative Expressionslevel in Mock-behandelten Mäusen normiert. Die Anzahl der biologischen Replikate war pro Gruppe $N = 3$, außer in tgASA(+/-) Mock, tgASA(-/-) Mock und tgASA(-/-) CPZ. Für diese Gruppen ist die Anzahl der biologischen Replikate $N = 2$. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. Mit einem in Klammern gesetzten Stern gekennzeichnet sind nicht signifikante Veränderungen im Konfidenzintervall $0,05 < p \leq 0,10$. EP = Erholungsphase. Quelle: KBR-4-176-730.

Die Analyse der Proteinexpression von PLP in CST-transgenen Mäusen ist in Abbildung 30 dargestellt. Im Widerspruch zur bereits gezeigten Quantifizierung von MBP (Abbildung 25 A), war in tgASA(+/-)-Mäusen eine über die Remyelinisierungsphase hinaus anhaltenden Er-

niedrigung des PLP-Proteinexpressionslevels nachweisbar. Es stellt sich die Frage, ob dieses Ergebnis als ein Fehlschlagen der Remyelinisierung interpretiert werden kann, wenn die Proteinexpression von MBP (Abbildung 25 A) und CNPase (Abbildung 34 A) in CPZ-behandelten tgASA+/-)-Mäusen nach Abschluss der Erholungsphase gegenüber der Mock-behandelten Kontrolle nicht signifikant verändert waren.

In tgASA(-/-)-Mäusen war, wie schon bei Quantifizierung von MBP (Abbildung 25 B), die Standardabweichung vom Mittelwert der biologischen Replikate so groß, dass keine Information über die Expression von PLP gewonnen werden konnte.

4.5.2.2.1 CST-Transgen und Expression von PLP

Es ist nicht auszuschließen, dass die Expression von PLP in CST-transgenen Mäusen durch das Transgen beeinflusst wird.

Sulfatid ist ein Regulator des transzytotischen Transportes von PLP:⁷⁷ PLP wird nach Synthese im Endoplasmatischen Retikulum und posttranslationaler Modifikation im Golgi-Apparat in Transportvesikeln zur Plasmamembran des Oligodendrozyten transportiert. PLP ist in diesen Vesikeln in TritonX100-resistenten Membrandomänen lokalisiert. Die Vesikel verschmelzen mit der Plasmamembran des Oligodendrozyten. In der Plasmamembran kommt es durch Wechselwirkung zwischen PLP und Sulfatid zur Umlokalisierung von PLP aus der TritonX100-resistenten Membrandomäne des Transportvesikels in eine TritonX100-lösliche, CHAPS-resistente Membrandomäne (Lipid-Raft) der Plasmamembran. PLP wird dann, lokalisiert in der CHAPS-resistenten Mikrodomäne, wieder endozytiert und weiter zur Myelinmembran transportiert. Dass ein erhöhter Sulfatidanteil in der Oligodendrozyten-Plasmamembran CST-transgener Mäuse die Lokalisierung von PLP beeinflusst, ist nicht auszuschließen.

Die Expression des CST-Transgens erfolgt unter Kontrolle des PLP-Promotors: Die vermehrte Expression von PLP-mRNA im Zuge der Remyelinisierung⁷⁸ führt vermutlich auch zur vermehrten Expression der CST-mRNA und somit zu einer Erhöhung der Sulfatidsyntheserate. Die Erhöhung der Sulfatidsyntheserate führt nachweislich zu einer Reduktion von Galaktosylceramid im Gehirn der CST-transgene Maus.⁷⁹ Galaktosylceramid hat wie Sulfatid eine essenzielle Rolle in der korrekten Lokalisierung von PLP. In der UDP-Galaktose:Ceramid-Galaktosyltransferase-Knockout-Maus, die kein Galaktosylceramid synthetisiert, ist eine Umverteilung von PLP aus den Raft-Domänen in Nicht-Raft-Bereiche der Membran zu beobachten.⁸⁰ Schon in der konventionellen ASA(-/-)-Maus ist die Umverteilung von PLP bei gleichzeitiger Reduktion des Galaktosylceramid-Anteils in der Plasmamembran beobachtet worden.⁸¹ Wahrscheinlich wird PLP auch in CST-transgenen Mäusen aus den

Lipid-Rafts umverteilt, denn der Anteil von Galaktosylceramid im Gehirn der tgASA(+/-)- und tgASA(-/-)-Maus ist gegenüber der ASA(+/-)- bzw. ASA(-/-)-Maus erniedrigt.⁸²

Es ist daher es fraglich, ob PLP in der CST-transgenen Maus als ein verlässlicher Marker kompakten Myelins interpretiert werden kann.

4.5.3 2',3'-Zyklische Nukleotid-3'-phosphodiesterase

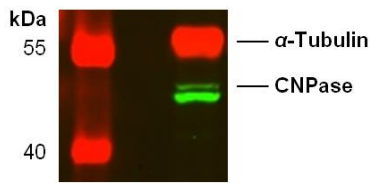


Abbildung 31: Immundetektion von CNPase im „Western-Blot“-Verfahren. Auftrennung im 7,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel. Detektion mit IR-Scanner. Proteinstandard und Ladekontrolle α -Tubulin detektiert bei $\lambda = 680$ nm (rot dargestellt), CNPase bei $\lambda = 800$ nm (grün dargestellt). Quelle: KBR-4-109-692.

Die 2',3'-Zyklische Nukleotid-3'-phosphodiesterase (CNPase) ist ein weniger prominentes Myelin-Protein, dessen biologische Funktion bislang nicht komplett verstanden ist. Die CNPase ist auf der intrazellulären Plasmamembranseite des Oligodendrozyten lokalisiert und konzentriert sich vor allem in den nicht kompaktierten Bereichen des Myelins. Es existieren, wie in Abbildung 31 dargestellt, die zwei Spleißvarianten CNPase 1 (46 kDa) und CNPase 2 (48 kDa), deren Verhältnis zueinander entwicklungsabhängig, ihre spezifischen Funktionen aber noch unbekannt ist.⁸³ Die Expression der CNPase setzt während der Myelinogenese noch vor der Expression

der Strukturproteine MBP und PLP ein, wenn der unreife Oligodendrozyt mit dem marklosen Axon in Kontakt tritt und ist daher ein empfindlicher Marker für den Beginn des Myelinisierungsprozesses.⁸⁴

4.5.3.1 Konventionelles MLD-Mausmodell

4.5.3.1.1 Kontrollgruppe ASA(+/-)

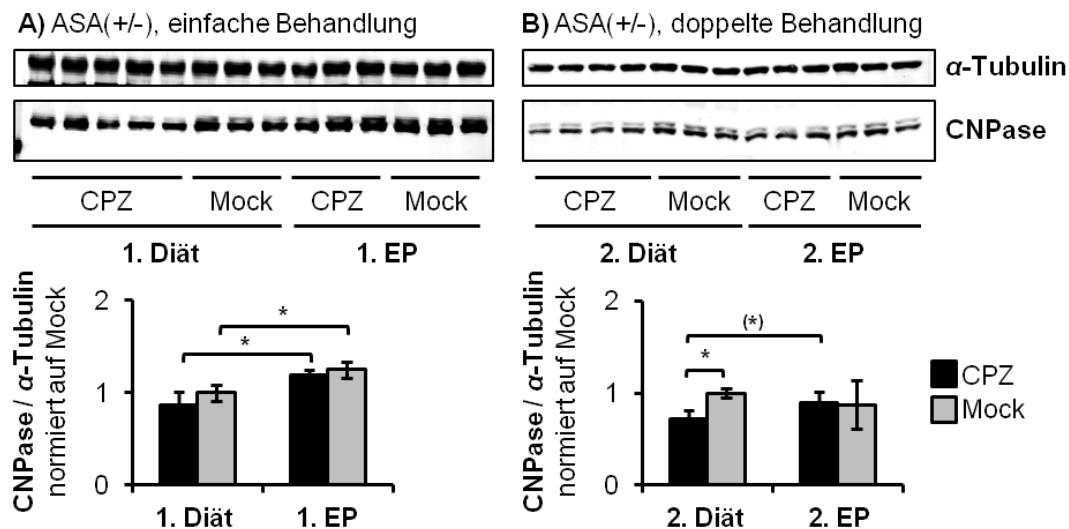


Abbildung 32: Relative Proteinexpression von CNPase im Gehirn der ASA(+/-)-Maus. Darstellung der Proteinbanden im WB: Tubulin 50 kDa, CNPase 48, 46 kDa. (A) Die densitometrische Auswertung der WBs zeigte keinen Effekt von CPZ auf die relative Expression der CNPase im ersten Behandlungszyklus. (B) Bei wiederholter Behandlung mit CPZ war die relative CNPase-Expression nach Abschluss der Diät erniedrigt. Nach Abschluss der Erholungsphase war kein Unterschied feststellbar. Die Darstellungen wurden auf das relative Expressionslevel in Mock-behandelten Mäusen normiert. Die Anzahl der biologischen Replikate war N = 3, ausgenommen die Gruppen 1. Diät CPZ (N = 5) und 2. Diät CPZ (N = 4). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. Mit einem in Klammern gesetzten Stern gekennzeichnet sind nicht signifikante Veränderungen im Konfidenzintervall $0,05 < p \leq 0,10$. Die Bildbearbeitung der WBs erfolgte mit Adobe-Photoshop. Die Bearbeitung war für alle Bilder gleich. EP = Erholungsphase. Quelle: KBR-3-261-563, KBR-4-159-723.

Im Gehirn der ASA(+/-)-Maus war der Einfluss von CPZ auf die Proteinexpression von CNPase (Abbildung 32) gleich dem Effekt auf die Proteinexpression von MBP (Abbildung 22): Im ersten Behandlungszyklus konnte kein signifikanter Verlust von CNPase nach Behandlung mit CPZ nachgewiesen werden (Abbildung 32 A), obwohl die SSB-Färbung (Abbildung 16) Demyelinisierung gezeigt hatte. Stattdessen stieg die relative Expression der CNPase in Mock- wie CPZ-behandelten ASA(+/-)-Mäusen über den Gesamtzeitraum des ersten Behandlungszyklus an. Erst im zweiten Behandlungszyklus (Abbildung 32 B) war die CPZ-induzierte Demyelinisierung durch Reduktion der relativen CNPase-Expression nachweisbar. Im ersten wie im zweiten Behandlungszyklus war nach Abschluss der Erholungsphase kein Unterschied zwischen CPZ- und Mock-behandelten Mäusen vorhanden. **Auf Ebene von CNPase hatte Remyelinisierung stattgefunden.**

4.5.3.1.2 Konventionelle MLD-Maus ASA(+/-)

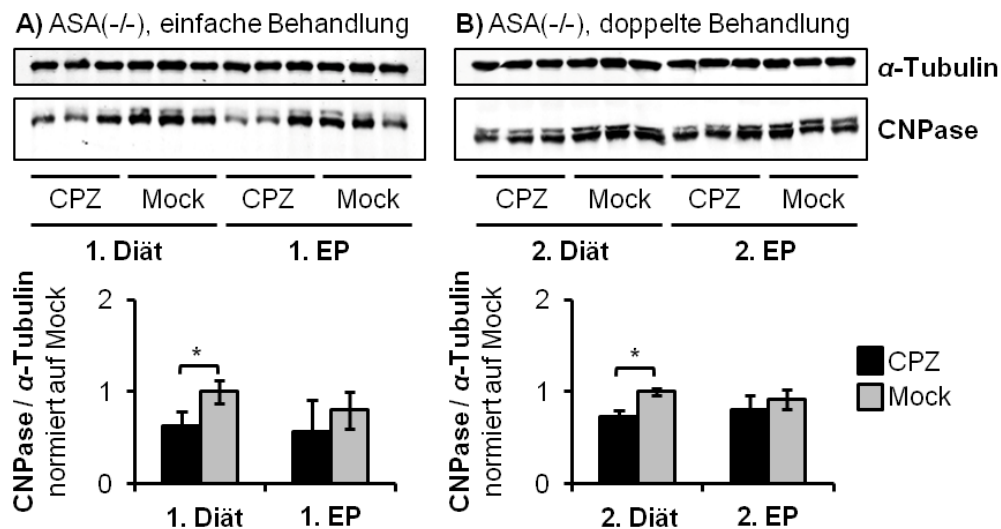


Abbildung 33: Relative Proteinexpression von CNPase im Gehirn der ASA(-/-)-Maus. Darstellung der Proteinbanden im WB: Tubulin 50 kDa, CNPase 48, 46 kDa. Die densitometrische Auswertung der WBs zeigte die CPZ-induzierte Reduktion der relativen CNPase-Expression nach der ersten (A) und zweiten (B) Diätphase. Nach Abschluss der Erholungsphase war in beiden Behandlungszyklen kein Unterschied mehr nachweisbar. Die Darstellungen wurden auf das relative Expressionslevel in Mock-behandelten Mäusen normiert. Die Anzahl der biologischen Replikate war pro Gruppe N = 3. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher T-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. EP = Erholungsphase. Die Bildbearbeitung der WBs erfolgte mit Adobe-Photoshop. Die Bearbeitung war für alle Bilder gleich. Quelle: KBR-3-214-521, KBR-4-139-710.

In ASA(-/-)-Mäusen waren Proteinexpression von MBP und CNPase in CPZ-behandelten Mäusen nicht gleichermaßen verändert: In Übereinstimmung mit den in Abbildung 23 gezeigten Ergebnissen der Quantifizierung von MBP war die Proteinexpression der CNPase in CPZ-behandelten ASA(-/-)-Mäusen nach Abschluss der ersten (Abbildung 33 A) und zweiten Diätphase (Abbildung 33 B) gegenüber den Mock-behandelten Kontrollgruppen erniedrigt. Demyelinisierung hatte stattgefunden. Nach Abschluss der Erholungsphasen (Remyelinisie-

rung) war kein Unterschied zwischen CPZ- und Mock-behandelten Mäusen vorhanden, obwohl das Expressionslevel von MBP erniedrigt blieb (Abbildung 23 B).

Da die Expression der CNPase im Zuge der Myelinogenese vor der Expression der Strukturproteine MBP und PLP einsetzt, kann die **CNPase ein Marker für den Beginn des Myelinierungsprozesses** interpretiert werden.⁸⁵ Dass das Expressionslevel der CNPase in ASA(-/-)-Mäusen nach der Erholungsphase auf Mock-Niveau lag, MBP aber erniedrigt blieb, weist darauf hin, dass der **Remyelinisierungsprozess begonnen hatte, aber nicht vollständig abgelaufen** war.

4.5.3.1.3 Vergleichende Auswertung

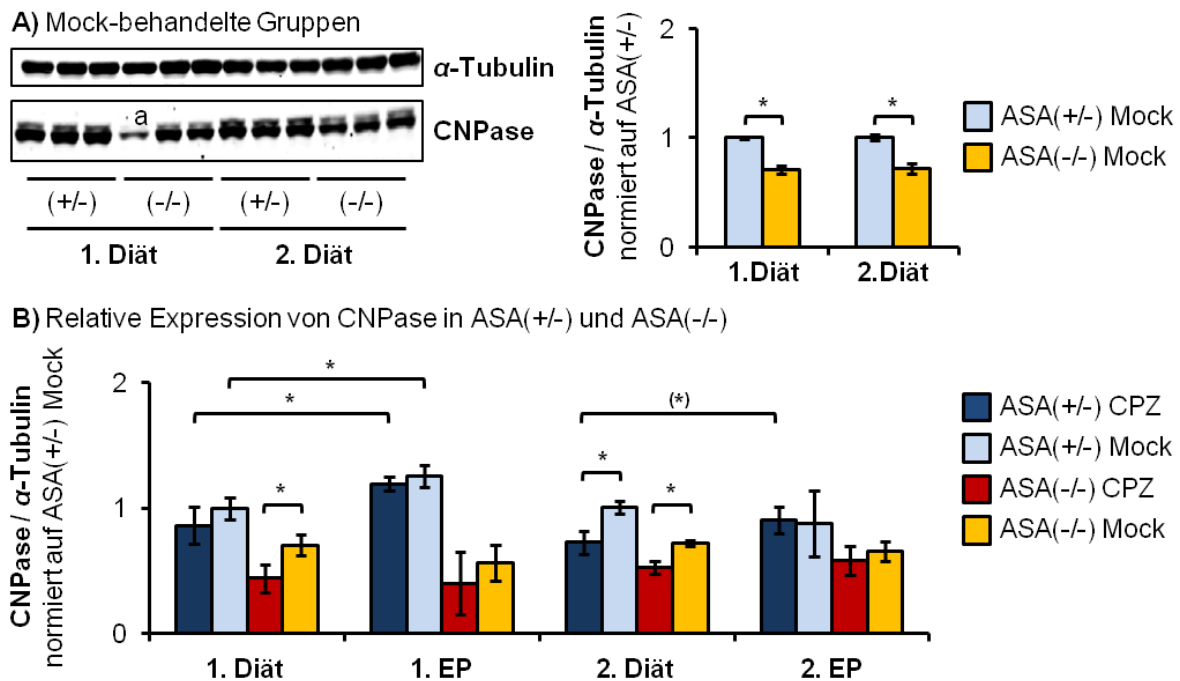


Abbildung 34: Vergleichende Darstellung des Einflusses von CPZ auf die relative Expression von CNPase im konventionellen MLD-Mausmodell. (A) Darstellung der Proteinbanden im WB: Tubulin 50 kDa, CNPase 48, 46 kDa. Die densitometrische Auswertung des vergleichenden WB von Mock-behandelten ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäusen zeigte, unabhängig vom Alter, eine signifikante Reduktion der relativen Expression von CNPase in ASA(-/-)-Mäusen. Die Darstellung wurde auf das relative Expressionslevel in Mock-behandelten ASA(+/-)-Mäusen normiert. Die mit ^a bezeichnete Probe unterlag einem Fehler bei der Präparation und ist nicht in die Auswertung mit einbezogen worden. Die Anzahl der biologischen Replikate war demnach pro Gruppe N = 3, ausgenommen ASA(-/-) Mock, 1. Diät (N = 2). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. Mit einem in Klammern gesetzten Stern gekennzeichnet sind nicht signifikante Veränderungen im Konfidenzintervall $0,05 < p \leq 0,10$. **(B)** Durch den vergleichenden WB von Mock-behandelten ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäusen konnten die Ergebnisse der Einzelexperimente (Abb. 30, Abb. 31) in Relation zueinander gesetzt werden. Die gezeigten Signifikanzen entstammen den entsprechenden Einzelexperimenten. EP = Erholungsphase. Quelle: (A) KBR-4-184-731, (B) KBR-3-261-563, KBR-4-159-723, KBR-3-214-521, KBR-4-139-710.

Der vergleichende WB Mock-behandelter ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäuse ist in Abbildung 34 A dargestellt. Wie auch im Falle von MBP war die relative Expression der CNPase in ASA(-/-)-Mäusen gegenüber gleichaltrigen ASA(+/-)-Mäusen erniedrigt.

Die Überexpression der CNPase führt im Mausmodell zu einer Beschleunigung des Wachstums und der Reifung von Oligodendrozyten.⁸⁶ Daher wird vermutet, dass die CNPase ein **positiver Regulator der Myelinisierung im ZNS** ist. Im Umkehrschluss könnte die erniedrigte Expression von CNPase im Gehirn der ASA(-/-)-Maus zur Verlangsamung der Myelinisierung in ASA-defizienten Mäusen führen, von der Yaghoofam *et al.*⁸⁷ bereits berichteten. Abbildung 34 B zeigt die aus dem vergleichenden WB resultierende Gesamtdarstellung der vorangehend gezeigten Einzelexperimente.

4.5.3.1.4 Fazit

Insgesamt bestätigte die Quantifizierung von CNPase, wie zuvor die Quantifizierung von MBP, dass die CPZ-induzierte Demyelinisierung in ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäusen unterschiedlich stark ausgeprägt war. Erst bei Wiederholung der CPZ-Behandlung war in ASA(+/-)-Mäusen Demyelinisierung auf Ebene der Proteinexpression von CNPase nachweisbar. Außerdem konnte gezeigt werden, dass, im Gegensatz zur vollständigen Remyelinisierung in ASA(+/-)-Mäusen, der Remyelinisierungsprozess in der ASA(-/-)-Maus zwar einsetzte, aber nicht vollständig ablaufen konnte. Die Differenzierung der OVZ zu myelinisierenden Oligodendrozyten hatte begonnen, kompaktes Myelin war aber anscheinend noch nicht, oder nicht in messbarer Menge, gebildet worden.

4.5.3.2 CST-transgenes MLD-Mausmodell

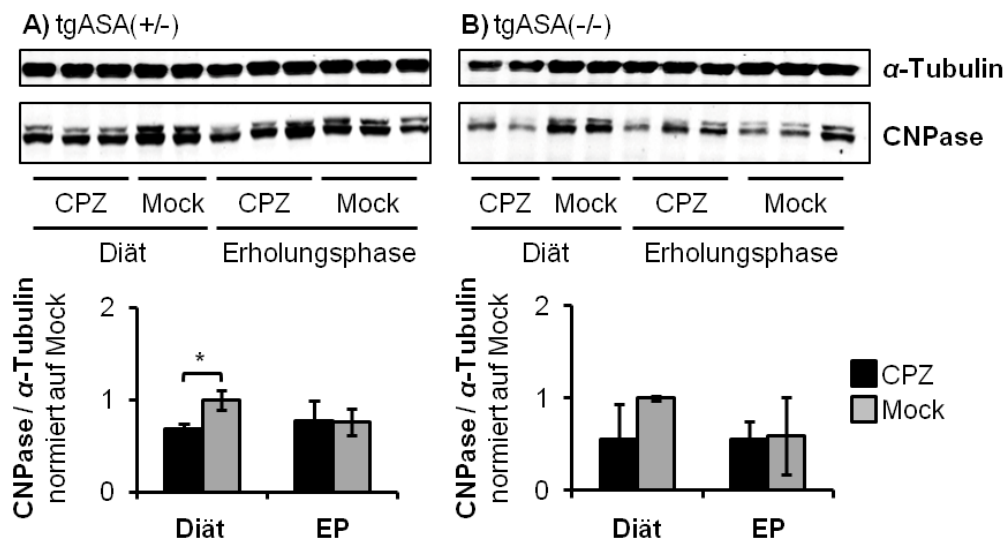


Abbildung 35: Relative Proteinexpression von CNPase im Gehirn der CST-transgenen MLD-Maus. Darstellung der Proteinbanden im WB: Tubulin 50 kDa, CNPase 48, 46 kDa. Densitometrische Auswertung der WBs zeigte in (A) tgASA(+/-)-Mäusen die CPZ-induzierte Erniedrigung der relativen CNPase-Expression. Nach Abschluss der Erholungsphase war kein Unterschied zu Mock-behandelten Mäusen mehr feststellbar. (B) In tgASA(-/-)-Mäusen war die Expression der CNPase rein optisch, wie in der Abbildung des WB zu sehen, in CPZ-behandelten Tieren reduziert. Aufgrund der großen Varianz der biologischen Replikate konnte dieser Eindruck statistisch nicht belegt werden. Nach Abschluss der Erholungsphase war kein Unterschied zwischen Mock- und CPZ-behandelten Mäusen nachweisbar. Die Darstellungen wurden auf das relative Expressionslevel in Mock-behandelten Tieren normiert. Die Anzahl der biologischen Replikate war pro Gruppe N = 3, außer in tgASA(+/-)

Mock, tgASA(-/-) Mock und tgASA(-/-) CPZ. Für diese Gruppen war die Anzahl der biologischen Replikate $N = 2$. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher T-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. EP = Erholungsphase.. Quelle: KBR-4-109-692.

Auch die Analyse der Proteinexpression von CNPase in CST-transgenen Mäusen wurde durch die großen Schwankungen zwischen den biologischen Replikaten erschwert. Abbildung 35 zeigt die densitometrische Auswertung der WBs.

Demyelinisierung konnte in **tgASA(+/-)**-Mäusen über den Verlust von CNPase mit statistischer Signifikanz nachgewiesen werden (Abbildung 35 A), obwohl im MBP-WB (Abbildung 25) nicht nachzuweisen. Der genauere Vergleich der Messwerte zeigte, dass die Effektstärke in von CPZ tgASA(+/-)-Mäusen auf Ebene von MBP und CNPase tatsächlich gleich war. Die Expression beider Proteine sank bei Behandlung mit CPZ gegenüber Mock-behandelten Mäusen um durchschnittlich $31,8 \pm 0,8 \%$. Aufgrund der großen Standardabweichung war der Effekt auf Ebene von MBP (Abbildung 25 A) aber nicht signifikant.

In **tgASA(-/-)**-Mäusen war, obwohl die CPZ-Behandlung zu einem Verlust von MBP (Abbildung 25 B) geführt hatte, kein Verlust von CNPase nachweisbar (Abbildung 35). Der visuelle Eindruck der Proteinbanden (Abbildung 35) ließ trotzdem vermuten, dass Demyelinisierung stattgefunden hatte. Die Standardabweichungen waren in Relation zur Effektstärke und geringen Stichprobengröße ($N = 2$) jedoch zu groß, als dass statistische Signifikanz erreicht werden konnte. Nach Abschluss der Erholungsphase war kein Unterschied zur Mock-behandelten Kontrollgruppe nachweisbar.

Die Aussagekraft der gezeigten Ergebnisse ist aufgrund der fehlenden Signifikanz und Übereinstimmung mit vorangehend gezeigten Daten gering. Die Definition des Konfidenzintervalls $0,05 < p \leq 0,10$ als nicht signifikanter Effekt von Interesse scheint kein adäquates Mittel zu sein, um die Interpretation von Messergebnissen aus der Gruppe der CST-transgenen Mäusen zu erleichtern.

4.5.4 Oligodendrozyten-spezifischer Transkriptionsfaktor 2

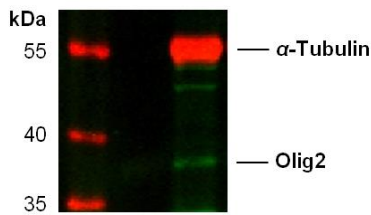


Abbildung 36: Immundetektion von Olig2 im „Western-Blot“-Verfahren. Auftrennung im 10%igen SDS-Polyacrylamid-Gel. Detektion mit IR-Scanner. Proteinstandard und Ladekontrolle α -Tubulin detektiert bei $\lambda = 680$ nm (rot dargestellt), Olig2 bei $\lambda = 800$ nm (grün dargestellt). Quelle: KBR-4-109-692.

Der Oligodendrozyten-spezifische Transkriptionsfaktor 2 (Olig2) ist, im Gegensatz zu den vorangehend beschriebenen Proteinen, kein Bestandteil des Myelins, sondern ein im Nukleus des Oligodendrozyten lokalisierter Transkriptionsfaktor. Im Jahr 2000 von Zhou *et al.* identifiziert, zählt Olig2 zur Familie der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)-Transkriptionsfaktoren. Die bHLH regulieren die Zelltyp-spezifische Differenzierung von multipotenten Zellen.⁸⁸ Die Expression von Olig2 setzt in den OVZ ein, wenn diese in der subventrikulären Zone gebildet werden. Olig2 steuert die Expression weitere Transkriptionsfaktoren, die die Reifung der OVZ zum Oligodendrozyten induzieren. Auch in myelinisierenden Oligodendrozyten wird Olig2 exprimiert, weshalb Olig2 kein spezifischer Marker für OVZ ist.⁸⁹ Fancy *et al.* haben gezeigt, dass die Expression von Olig2 in Läsionen Toxin-induzierter Demyelinisierung steigt.⁹⁰ Sie definieren eine Subpopulation PDGF α -R/Olig1/Olig2/Nkx2.2-positiver Zellen als OVZ, die in die Läsion einwandern und dort zu remyelinisierenden Oligodendrozyten differenzieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Quantifizierung von Olig2 dazu dienen, das Entstehen einer remyelinisierenden Population von OVZ bzw. Oligodendrozyten zu nachzuweisen.

4.5.4.1 Konventionelles MLD-Mausmodell

4.5.4.1.1 Kontrollgruppe ASA(+/-)

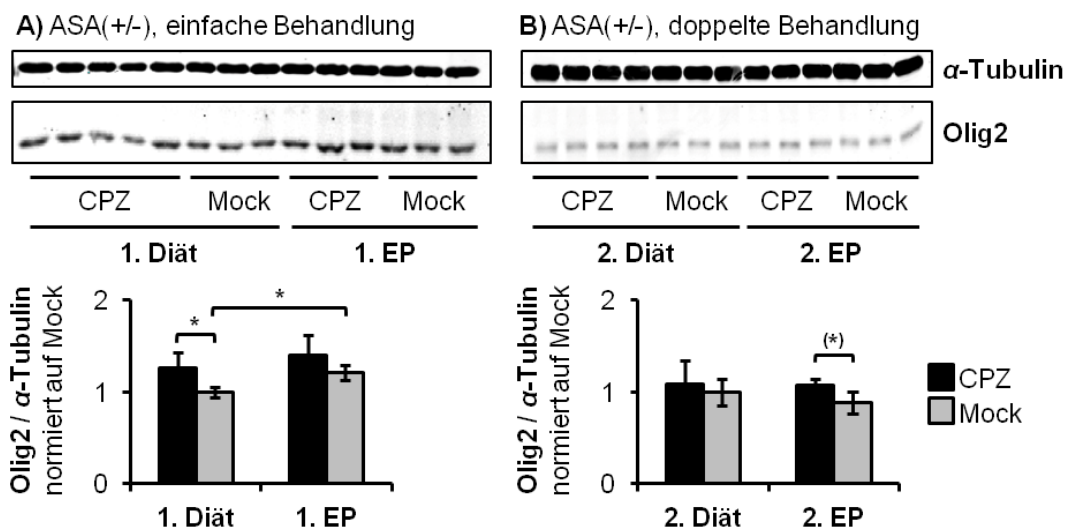


Abbildung 37: Relative Proteinexpression von Olig2 im Gehirn der ASA(+/-)-Maus. Darstellung der Proteinbanden im WB: Tubulin 50 kDa, Olig2 37 kDa. (A) Die densitometrische Auswertung der WBs zeigte im ersten Behandlungszyklus nach Abschluss der Diät eine signifikante Erhöhung der Proteinexpression von Olig2. Nach Abschluss der Erholungsphase war kein Unterschied mehr nachweisbar. (B) Im zweiten Behandlungszyklus kam es zu einer Veränderung des Expressionsmusters. Erst nach Abschluss der Erholungsphase war eine Tendenz zur

Erhöhung der Proteinexpression von Olig2 ($p = 0,08$) vorhanden. Die Darstellungen wurden auf das relative Expressionslevel in Mock-behandelten Tieren normiert. Die Anzahl der biologischen Replikate war pro Gruppe $N = 3-5$. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. Mit einem in Klammern gesetzten Stern gekennzeichnet sind nicht signifikante Veränderungen im Konfidenzintervall $0,05 < p \leq 0,10$. EP = Erholungsphase. Quelle: KBR-3-264-576, KBR-4-159-723.

Abbildung 37 zeigt die Analyse der Proteinexpression von Olig2 im Gehirn der ASA(+/-)-Maus. Die CPZ-Behandlung induzierte einen signifikanten Anstieg von Olig2 gegenüber der Mock-behandelten Kontrollgruppe, was für das **Entstehen einer Population von remyelinisierenden Zellen**⁹¹ spricht (Abbildung 37 A). Nach Abschluss der Erholungsphase war kein behandlungsabhängiger Unterschied mehr vorhanden, die Remyelinisierung anscheinend abgeschlossen.

Bei Wiederholung der CPZ-Behandlung veränderte sich das Expressionsmuster (Abbildung 37 B). Direkt nach Abschluss der Diätphase war keine Erhöhung der Proteinexpression von Olig2 nachweisbar. Erst nach Abschluss der Erholungsphase war eine Tendenz zur Erhöhung ($p = 0,08$) vorhanden. Möglicherweise sind diese Verzögerung und die Reduktion der Effektstärke im zweiten Behandlungszyklus durch das steigende Alter der Mäuse bedingt. **Remyelinisierung verläuft in alternden Mäusen zeitverzögert**⁹², da die Expression der Transkriptionsfaktoren Sox10 und Olig2 durch die altersbedingte Abnahme der Histon-Deacetylierung und Histon-Methylierung gehemmt wird.⁹³

4.5.4.1.2 Konventionelle MLD-Maus ASA(-/-)

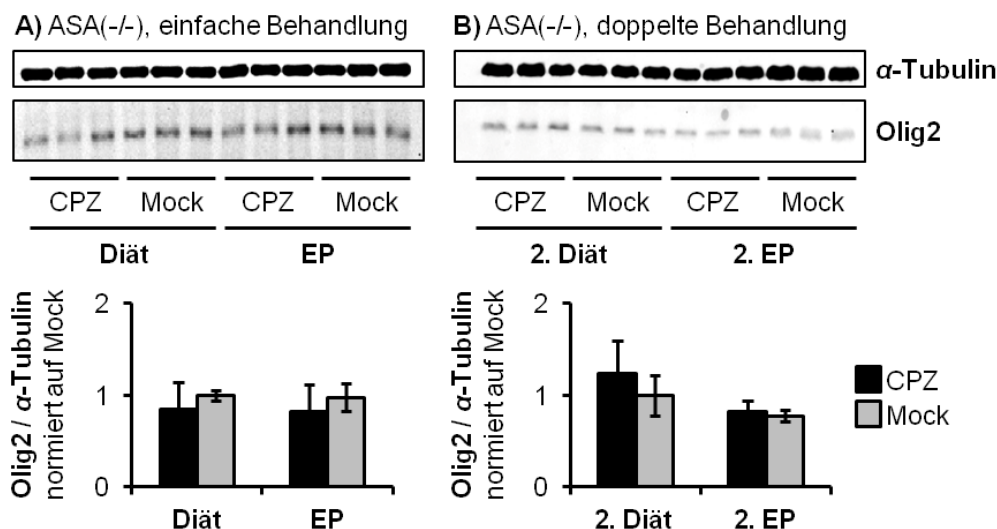


Abbildung 38: Relative Proteinexpression von Olig2 im Gehirn der ASA(-/-)-Maus. Darstellung der Proteinbanden im WB: Tubulin 50 kDa, Olig2 37 kDa. Die densitometrische Auswertung der WBs zeigte weder im ersten (A), noch im zweiten Behandlungszyklus (B) eine CPZ-induzierte Veränderung der Proteinexpression von Olig2. Die Darstellungen wurden auf das relative Expressionslevel in Mock-behandelten Tieren normiert. Die Anzahl der biologischen Replikate war pro Gruppe $N = 3$. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. EP = Erholungsphase. Quelle: KBR-3-236-538, KBR-4-139-710.

In ASA(-/-)-Mäusen war weder eine alters-, noch eine behandlungsbedingte Veränderung der Proteinexpression von Olig2 nachweisbar, wie in Abbildung 38 zu sehen. Das Entstehen einer remyelinisierenden Zellpopulation konnte über die Proteinexpression von Olig2 nicht nachgewiesen werden, was die reduzierte Remyelinisierungseffizienz in ASA(-/-)- gegenüber ASA(+/-)-Mäusen erklären würde.

4.5.4.1.3 Vergleichende Auswertung

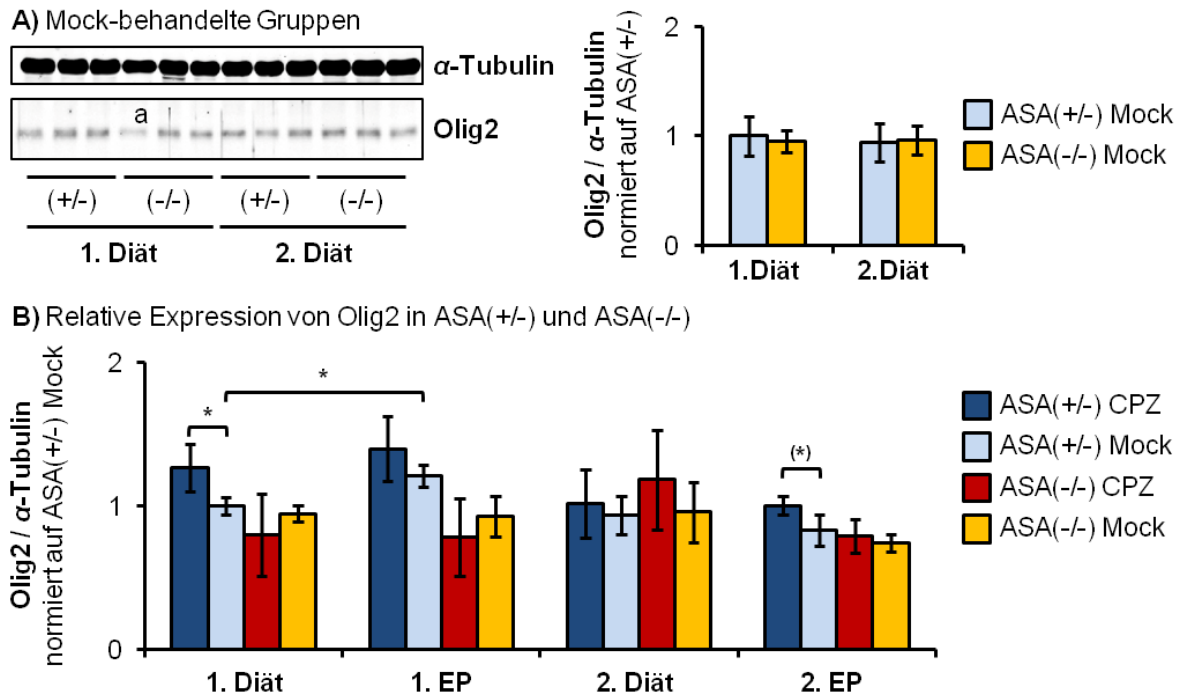


Abbildung 39: Vergleichende Darstellung des Einflusses von CPZ auf die relative Expression von Olig2 im konventionellen MLD-Mausmodell. (A) Darstellung der Proteinbanden im WB: Tubulin 50 kDa, Olig2 37 kDa. Die densitometrische Auswertung des vergleichenden WB von Mock-behandelten ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Tieren zeigte keine genotypabhängigen Unterschiede. Im Gehirn der ASA(-/-)-Maus scheint kein genereller Mangel an Olig2-positiven OVZ oder Oligodendrozyten vorzuliegen, der hemmenden Einfluss auf den Myelinisierungsprozess hat. Die Darstellung wurde auf das relative Expressionslevel in Mock-behandelten ASA(+/-)-Tieren normiert. Die mit ^a bezeichnete Probe wurde nicht in die Auswertung mit einbezogen. Die Anzahl der biologischen Replikate war demnach pro Gruppe N = 3, ausgenommen ASA(-/-) Mock, 1. Diät (N = 2). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. **(B)** Durch den vergleichenden WB von Mock-behandelten ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäusen konnten die Ergebnisse der vorangehend gezeigten Einzelexperimente in Relation zueinander gesetzt werden. Da es sich nicht um ein geschlossenes Experiment handelte, konnte keine statistische Aussage über den Unterschied zwischen ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäusen getroffen werden. Die gezeigten Signifikanzen entstammen den entsprechenden Einzelexperimenten. Im ersten wie zweiten Behandlungszyklus reagierten ASA(+/-)-Mäuse mit einer Erhöhung der Proteinexpression von Olig2 auf die Fütterung mit CPZ, wobei die Reaktion im zweiten Behandlungszyklus verzögert war. In ASA(-/-)-Mäusen war keine Veränderung zu detektieren. Im zweiten Behandlungszyklus war in keiner der beiden Gruppen eine Veränderung der relativen Olig2-Expression nachweisbar. EP = Erholungsphase. Quelle: (A) KBR-4-184-731, (B) KBR-3-264-576, KBR-4-159-723, KBR-3-236-538, KBR-4-139-710.

Im Vergleich mit den Ergebnissen der Quantifizierung von MBP (Abbildung 24) wird deutlich, dass Demyelinisierung, gekennzeichnet durch einen signifikanten Verlust von MBP, nur in Gruppen detektierbar war, die keine signifikante Erhöhung von Olig2 aufwiesen.

Olig2 reguliert durch Interaktion mit weiteren Transkriptionsfaktoren die Myelinisierung.^{94,95} Der induktive Effekt von Olig2 ist dabei Dosis-abhängig.⁹⁶ Im Mausmodell führt die Überexpression von Olig2 zu einer vermehrten Expression von Sox10 und einer Beschleunigung der primäre Myelinisierung des ZNS. Im Rückschluss kann vermutet werden, dass die reduzierte Expression oder ein Ausbleiben der Hochregulation von Olig2 nach Demyelinisierung mit einer Verlangsamung oder einem Versagen der Remyelinisierung verbunden ist, wie bei CPZ-Behandlung von ASA(-/-)-Mäusen zu sehen.

Ein genereller Mangel von Olig2-positiven OVZ oder Oligodendrozyten, der die Myelinisierung beeinträchtigt, scheint im Gehirn der ASA(-/-)-Maus nicht vorzuliegen, denn das relative Proteinexpressionslevel von Olig2 war in Mock-behandelten ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäusen gleich (Abbildung 39 A).

4.5.4.2 CST-transgenes MLD-Mausmodell

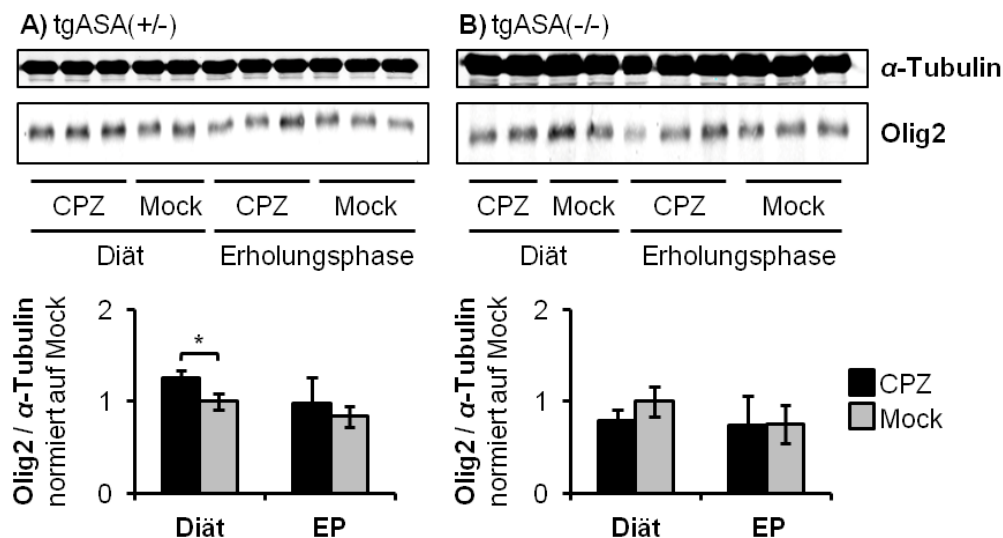


Abbildung 40: Relative Proteinexpression von Olig2 im Gehirn der CST-transgenen MLD-Maus. Darstellung der Proteinbanden im WB: Tubulin 50 kDa, Olig2 37 kDa. **(A)** Die densitometrische Auswertung der WBs zeigte nach Abschluss der Diät eine CPZ-induzierte Erhöhung des relativen Olig2-Expressionslevels in tgASA(+/-)-Mäusen. Nach Abschluss der Erholungsphase war kein Unterschied zwischen CPZ- und Mock-behandelten Mäusen mehr vorhanden. **(B)** In tgASA(-/-)-Mäusen hatte die Behandlung mit CPZ keinen Einfluss auf die relative Expression von Olig2. Die Darstellungen wurden auf das relative Expressionslevel in Mock-behandelten Tieren normiert. Die Anzahl der biologischen Replikate war pro Gruppe N = 3, außer in tgASA(+/-) Mock, tgASA(-/-) Mock und tgASA(-/-) CPZ. Für diese Gruppen war die Anzahl der biologischen Replikate N = 2. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. EP = Erholungsphase. Quelle: KBR-4-109-692.

Die Ergebnisse der Quantifizierung von Olig2 im CST-transgenen MLD-Mausmodell stimmen mit den Beobachtungen im konventionellen Modell überein und bestätigen die vorangehend aufgestellte Hypothese über den Zusammenhang von Olig2-Expression und erfolgreicher Remyelinisierung.

Wie Abbildung 40 zeigt, induzierte die Behandlung mit CPZ in tgASA(+/-)-Mäusen eine signifikante Erhöhung des Olig2-Proteinexpression. Entsprechend war auf Ebene von MBP (Ab-

bildung 25 A) keine Demyelinisierung nachweisbar. In tgASA(-/-)-Tieren war die Proteinexpression von Olig2 nach der Behandlung mit CPZ nicht erhöht (Abbildung 40 B) und die Expression von MBP erniedrigt (Abbildung 25 B).

4.6 Histologische Untersuchung des Corpus callosum

4.6.1 Cuprizin-induzierte Zellmigration: Oligodendrozytenvorläuferzellen

Der Corpus callosum ist ein Bündel von Nervenfasern, das rechte und linke Hemisphäre des Gehirns miteinander verbindet. In der Kernfärbung mit Hämatoxylin oder DAPI ist zu sehen, dass im Normalfall nur wenige Zellkerne im CC lokalisiert sind (Abbildung 41 A Mock & B Mock).

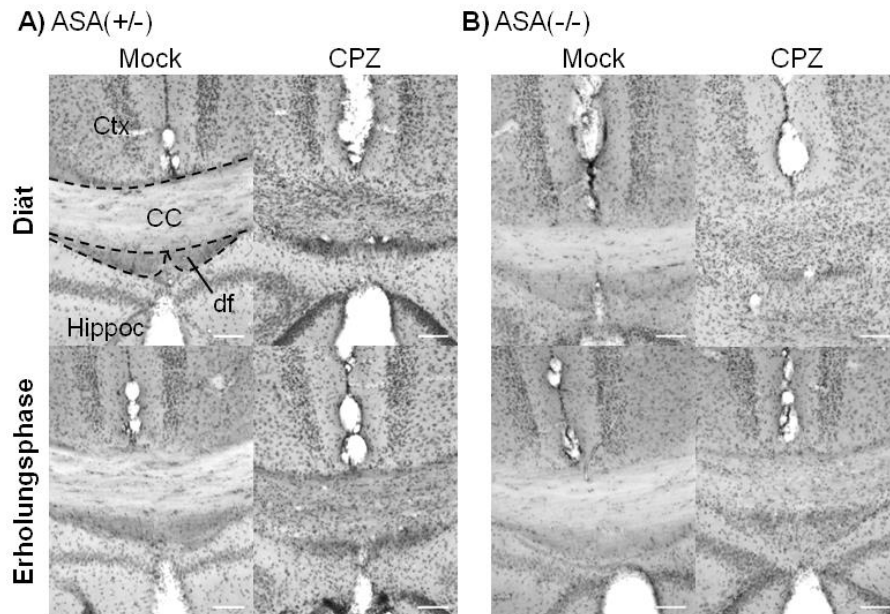


Abbildung 41: Cuprizin-induzierte Zellinfiltration des Corpus callosum. Kernfärbung mit Hämatoxylin. Die Behandlung mit CPZ führte in (A) ASA(+/-)- und (B) ASA(-/-)-Mäusen zu einer massiven Erhöhung der Zellzahl im CC. Nach Abschluss der Erholungsphase nahm die Zellzahl ab, war aber gegenüber Mock-behandelten Mäusen immer noch erhöht. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 μm . Ctx = Kortex, CC = Corpus Callosum, df = dorsaler Fornix, Hippoc = Hippocampus. Quelle: KBR-4-18-608.

Es handelte sich dabei hauptsächlich um Oligodendrozyten (Abbildung 42 A Mock), die auch in der Kernfärbung anhand ihrer kettenartigen Anordnung im CC identifiziert werden können.

Die CPZ-induzierte Demyelinisierung des CC war von einer Vermehrung der Zellkerne begleitet, wie die Kernfärbung koronaler Gewebeschnitte Mock- und CPZ-behandelter Mäuse in zeigte (Abbildung 41 A) CPZ & B) CPZ). Die Zählung der Zellkerne zeigte eine signifikante Erhöhung der Zellzahl von durchschnittlich $18,5 \pm 2,8$ auf $66,2 \pm 8,2$ Zellkerne pro $0,01 \text{ nm}^2$ (KBR-4-18-608). Ein genotypabhängiger Unterschied war nicht nachzuweisen, **die Zellmigration in ASA(-/-)-Mäusen ist nicht nachweislich gestört.**

Durch IF-Färbung entsprechender Marker-Proteine, wie in Abbildung 42 gezeigt, konnten die infiltrierenden Zellen als OVZ bzw. Oligodendrozyten (Abbildung 42 A), Astrozyten (Abbildung 42 B) und Mikrogliazellen bzw. Makrophagen (Abbildung 42 C) identifiziert werden. Das Einwandern dieser Zelltypen ist Voraussetzung für das erfolgreiche Ablaufen der Remyelinisierung: Nach dem Einsetzen der Astroglieose infiltrieren Mikrogliazellen und OVZ den CC.⁹⁷

Wenn die rekrutierten Mikroglia apoptotische Oligodendrozyten und aus deren Zelltod resultierende Myelintrümmer vollständig phagozytiert haben, können die OVZ differenzieren und die Axone remyelinisieren.⁹⁸ Wird der Abbau von Zell- und Myelintrümmern inhibiert, kann keine Remyelinisierung stattfinden, denn Myelin hemmt die Differenzierung der OVZ.⁹⁹

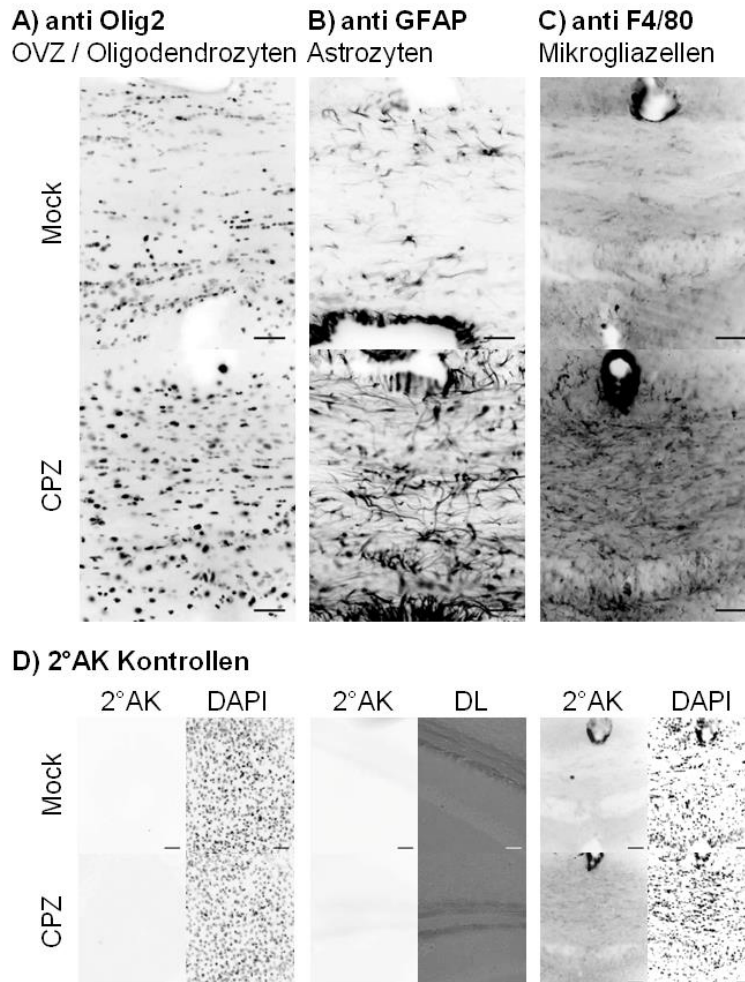


Abbildung 42: Identifizierung der in den Corpus callosum eingewanderten Zellen. Mittels IF-Färbung von **(A)** Olig2, **(B)** GFAP und **(C)** F4/80 konnten die eingewanderten Zellen im CC als **(A)** OVZ bzw. Oligodendrozyten, **(B)** Astrozyten und **(C)** Mikrogliazellen bzw. Makrophagen identifiziert werden. Die Bildbearbeitung der IF-Aufnahmen erfolgte mit Adobe-Photoshop: Zur Verbesserung der Kontrastwahrnehmung wurde die Kanal-Aufnahme in Schwarz-Weiß konvertiert und dann invertiert. Die Maßstabsbalken entsprechen 50 μ m. Quelle: **(A)** KBR-2-177-269, **(B)** KBR-2-168-265, **(C)** KBR-4-35-629.

Die Ergebnisse der SSB-Färbung sowie die Quantifizierung der Myelinproteine haben darauf hingewiesen, dass die Remyelinisierung in ASA-defizienten Mäusen beeinträchtigt ist. Ursachen für ein solches Versagen der Remyelinisierung können grundsätzlich in entweder der **Rekrutierungsphase** oder der **Differenzierungsphase** lokalisiert sein.

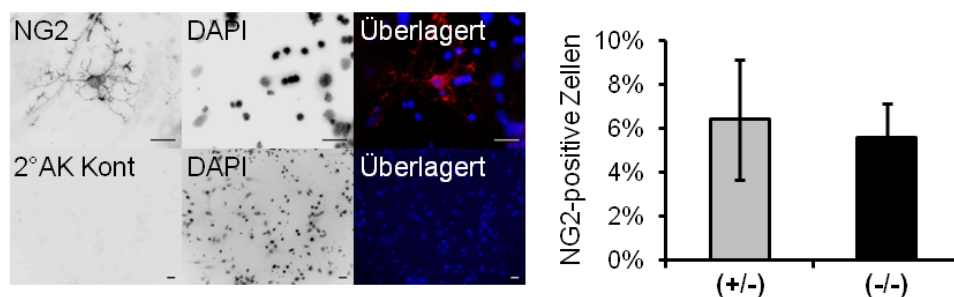
4.6.1.1.1 Rekrutierungsphase

Die Rekrutierungsphase beginnt mit der Aktivierung der ruhenden OVZ unter vermehrter Expression der Transkriptionsfaktoren Olig2, Nkx Homebox 2 Protein (Nkx2.2), Myelin

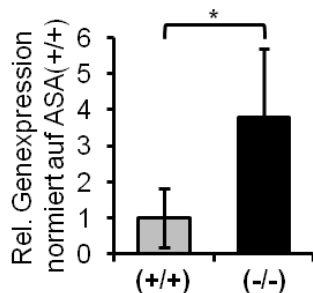
Transcription Factor 1 (Myt1) und SRY-related HMG-box 2 (Sox2), die die Differenzierung der OVZ zum Oligodendrozyten steuern.¹⁰⁰ Aktivierte OVZ migrieren dann in die demyelinisierten Bereiche des Gehirns.

Die Rekrutierungsphase kann gestört sein, wenn ein **primärer Mangel an OVZ** besteht. Bislang konnte nicht bewiesen werden, dass die Anzahl von OVZ im Gehirn der ASA(-/-)-Maus erniedrigt ist.¹⁰¹ Auch im Zuge dieser Arbeit konnte kein Hinweis darauf erbracht werden: Die Proteinexpression von Olig2 war, wie im vorangehenden Kapitel gezeigt, in ASA(-/-)-Mäusen gegenüber ASA(+/-)-Mäusen nicht verändert (Abbildung 39). Da Olig2 auch in Oligodendrozyten exprimiert wird, wurde im Zuge dieser Arbeit auch die Expression von NG2 im MLD-Mausmodell untersucht. **NG2 ist ein spezifischer Marker für Oligodendrozytenvorläuferzellen.**¹⁰² Die Ergebnisse sind in Abbildung 43 zusammengefasst dargestellt.

A) P2 Primärkultur aus Gehirn, IF-Färbung NG2



B) RT-PCR, 7 Wochen



C) RT-PCR, 2 Jahre

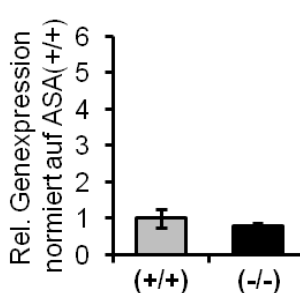


Abbildung 43: Oligodendrozytenvorläuferzellen im Gehirn der ASA(-/-)-Maus. Zur Beantwortung der Frage, ob die Zahl der OVZ in ASA(-/-)-Mäusen generell reduziert ist, wurde **(A)** die Anzahl NG2-positiver Zellen im Gehirn zwei Tage alter ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäuse, sowie **(B)** die relative Genexpression von NG2 im Gehirn sieben Wochen und **(C)** zwei Jahre alter Wildtyp- und ASA(-/-)-Mäuse bestimmt. **(A)** IF-Färbung von NG2 ($\lambda = 590$ nm) in Primärkulturen aus Gesamtgehirn. NG2-positive Zellen zeigten die typische Morphologie von OVZ mit kleinem Zellkörper und einer Vielzahl verzweigter Ausläufer. Es war zuvor ausgeschlossen worden, dass der NG2-Antikörper andere Zelltypen (Astrozyten, Neuronen, Mikroglia, reife Oligodendrozyten) anfärbt (Daten nicht gezeigt: KBR-2-76-208, KBR-3-78-419). Die Sekundärantikörperkontrolle ($\lambda = 590$ nm) zeigte ebenfalls keine unspezifische Reaktivität. Die Auswertung zeigt den Anteil NG2-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl (DAPI) in Prozent. Es konnte kein genotypabhängiger Unterschied nachgewiesen werden. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert der biologischen Replikate. Die Anzahl der biologischer Replikate war $N = 2$, die Anzahl der technischer Replikate $N = 3$. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Die Bildbearbeitung der IF-Aufnahmen erfolgte mit Adobe-Photoshop: Zur Verbesserung der Kontrastwahrnehmung wurde die Kanal-Aufnahme in Schwarz-Weiß konvertiert und dann invertiert. Die Maßstabsbalken entsprechen $20 \mu\text{m}$. **(B, C)** Die relative Genexpression von NG2 (bezogen auf Ubiquitin) wurde mittels RT-PCR bestimmt. Im Alter von sieben Wochen war die relative Genexpression in ASA(-/-)- gegenüber gleichaltrigen Wildtypmäusen signifikant erhöht. Im Alter von zwei Jahren war kein Unterschied nachweisbar. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert der biologischen Replikate mit **(B)** $N = 5$ und **(C)** $N = 3$. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$)

waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. Quelle: **(A)** KBR-3-75-418, **(B)** KBR-2-5-167, **(C)** KBR-2-13-172.

Die direkte Quantifizierung der NG2-positiven Zellen in Primärkulturen aus Gehirn junger Mäuse (P2) zeigte keine Reduktion von NG2-positiven OVZ in ASA(-/-)-Mäusen (Abbildung 43 A). Auch die Analyse der Genexpression mittels RT-PCR lieferte keinen Hinweis auf einen primären Mangel an OVZ.

Stattdessen war die Genexpression von NG2 im Gehirn sieben Wochen alter ASA(-/-)-Mäuse signifikant höher, als in ASA(+/-)-Mäusen (Abbildung 43 B). Wie lässt sich das erklären? Die primäre Myelinisierung des Gehirns der ASA(-/-)-Maus verläuft nachweislich zeitverzögert.¹⁰³ Anscheinend betrifft diese Verzögerung auch die Expression von NG2, die ihr Maximum normalerweise während der frühen postnatalen Entwicklung im Zeitraum zwischen P8 und P12 erreicht.¹⁰⁴

Mit der Reifung des Nervensystems fällt die Expression von NG2 in Gehirn schnell auf ein geringes Basislevel ab. Die Auswertung der qRT-PCR zeigte, dass die Genexpression von NG2 im Gehirn 24 Monate alter ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Maus gleich stark war (Abbildung 43 C). **Die Zahl NG2-positiver OVZ scheint in ASA(-/-)-Mäusen nicht reduziert zu sein.** Dass die Zahl der OVZ erniedrigt, aber die Genexpression von NG2 erhöht war, ist allerdings nicht mit absoluter Sicherheit auszuschließen.

Die Rekrutierungsphase kann gestört sein, wenn die **Migration der OVZ zum Ort der Demyelinisierung gehemmt** ist. Bei der Bestimmung der Gesamtzellzahl im CC (Abbildung 41) war ein entsprechender Unterschied zwischen ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäusen nicht zu beobachten. Die verwendete Kernfärbung ermöglichte es allerdings nicht, einzelne Zelltypen im CC auszuzählen. Um die Zahl von eingewanderten OVZ und differenzierten Oligodendrozyten zu bestimmen, wurde daher die IF-Färbung von Olig2 angewendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 44 zusammengefasst.

In Mock-behandelten Mäusen waren nahezu alle im CC lokalisierten Zellkerne Olig2-positiv (Abbildung 44 C & D). Wahrscheinlich handelte es sich dabei hauptsächlich um reife Oligodendrozyten. Die Zahl Olig2-positiver Zellen in Bezug auf die Fläche war in ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäusen gleich. In CPZ-behandelten Mäusen waren zum Ende der Erholungsphase nur ca. 75 % aller Zellkerne auch Olig2-positiv. Diese Differenz entspricht den eingewanderten Astrozyten, Mikrogliazellen und Makrophagen, die anscheinend auch nach Abschluss der Erholungsphase im CC verblieben. Da die Anzahl Olig2-positiver Zellen in Bezug auf die Fläche im CC der CPZ-behandelten ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Maus gleich war (Abbildung 44 D), **konnte kein Fehlschlagen der Rekrutierung nachgewiesen werden.**

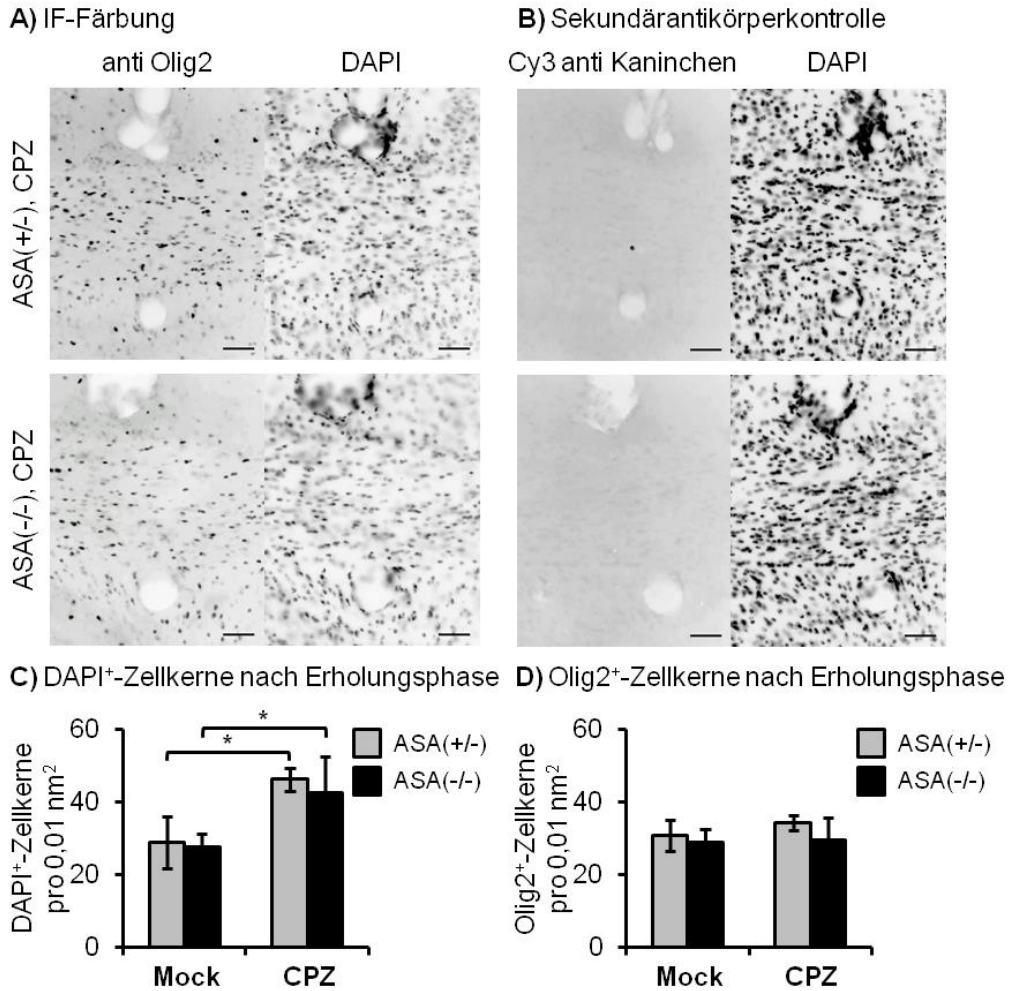


Abbildung 44: Cuprizon-induzierte Rekrutierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen in den Corpus callosum. (A) Die IF-Färbung von Olig2 ($\lambda = 590 \text{ nm}$) zeigte keinen erkennbaren Unterschied zwischen ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäusen. (B) Die Sekundärantikörperkontrolle ($\lambda = 590 \text{ nm}$) zeigte keine unspezifische Reaktivität. (C) Die quantitative Auswertung der IF-Färbung bestätigte den visuellen Eindruck der IF-Färbung und zeigte keinen Unterschied zwischen ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäusen. In Mock-behandelten Mäusen waren nahezu alle im CC lokalisierten Zellen Olig2-positiv. Wahrscheinlich handelt es sich um reife Oligodendrozyten. Nach Abschluss der Erholungsphase war die Gesamtzellzahl in CPZ-behandelten Mäusen erhöht, was durch die Infiltration des CC durch Mikrogliazellen und Astrozyten zu erklären ist. Die Zahl der Olig2-positiven Zellen war gegenüber Mock-behandelten Mäusen unverändert. Ob es sich dabei auch um reife Oligodendrozyten oder OVZ handelte, konnte mit dieser Methode nicht festgestellt werden. Die Anzahl der biologischen Replikate war $N = 1$, Anzahl der technischen Replikate war $N = 6$. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. Quelle: KBR-4-24-616.

Da mittels der verfügbaren Methoden weder ein primärer Mangel an OVZ (Abbildung 43), noch ein Fehlschlagen der Rekrutierung von OVZ zum Ort der Demyelinisierung (Abbildung 44) nachgewiesen werden konnten, kann vermutet werden, dass ein **Defekt in der Differenzierungsphase Ursache für die reduzierte Remyelinisierungseffizienz in ASA(-/-)-Mäusen** ist.

4.6.1.1.2 Differenzierungsphase

Die Differenzierungsphase unterteilt sich in drei wichtige Schritte:

1. Die Kontaktaufnahme zwischen prä-Oligodendrozyt und Axon.
2. Die Expression der Myelengene sowie die Produktion von Myelinmembran.
3. Das Wickeln und Kompaktieren der Myelinmembran.

Der Vergleich der Proteinexpression von MBP (Abbildung 23) und CNPase (Abbildung 33) hatte bereits vermuten lassen, dass in CPZ-behandelten ASA(-/-)-Mäusen der Kontakt zwischen prä-Oligodendrozyt und Axon hergestellt werden konnte, die Synthese von kompaktem Myelin aber beeinträchtigt war. **Möglicherweise ist die Ursache für die reduzierte Remyelinisierungseffizienz in ASA(-/-)-Mäusen im zweiten oder dritten Schritt der Differenzierungsphase lokalisiert.**

4.6.2 Cuprizin-induzierte Zellmigration: Mikrogliazellen

Aufgrund der Blockade des Sulfatidabbaus in ASA(-/-)-Mäusen war zu erwarten, dass die Phagozytose von Myelintrümmern während der CPZ-Diät in ASA(-/-)-Mäusen zu einer gesteigerten Akkumulation von Speichermaterial im Lysosom von Mikrogliazellen bzw. Makrophagen führen würde. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden koronale Gewebeschnitte des Großhirns mit Alzian Blau (AZB) gefärbt.

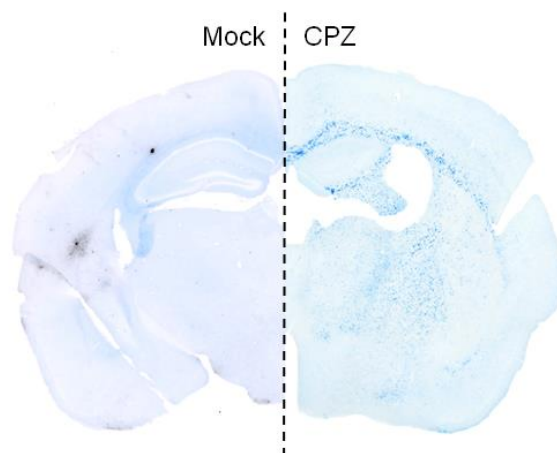


Abbildung 45: Cuprizin-induzierte Sulfatidspeicherung im Großhirn der ASA(-/-)-Maus. Die histochemische Färbung von Sulfatid mit AZB zeigte nach CPZ-Behandlung (rechts) eine sichtbare Zunahme der Sulfatidspeicherung. Speichermaterial war in allen Bereichen zu finden, in denen auch Demyelinisierung detektiert worden war, darunter CC, Kortex und Fimbria. In der gleichaltrigen Mock-behandelten ASA(-/-)-Maus war nahezu kein Speichermaterial angefärbt worden (links). Quelle: KBR-4-189-736.

Wie Abbildung 45 zeigt, **führte die Behandlung mit CPZ im Gehirn ASA-defizienter Mäuse tatsächlich zu einer verstärkten Akkumulation von Sulfatid-haltigem Speichermaterial.** Speichermaterial war in allen Bereichen zu finden, in denen zuvor Demyelinisierung detektiert worden war (Kapitel 4.3). Auch im Kleinhirn konnte vermehrte Sulfatidspeicherung nachgewiesen werden (Abbildung 46).

Die Lokalisierung der CPZ-induzierten Sulfatidspeicherung stimmte mit der endogenen Verteilung von Speichermaterial in alternden ASA(-/-)-Mäusen überein.¹⁰⁵ Vergleicht man die AZB-Färbung nach CPZ-Behandlung (Abbildung 47 B) mit der AZB-Färbung eines Gewebeschnittes aus dem Gehirn einer 23 Monate alten ASA(-/-)-Maus (Abbildung 47 B), wird jedoch deutlich, dass die Menge des CPZ-induzierten Speichermaterials im Vergleich gering ist.

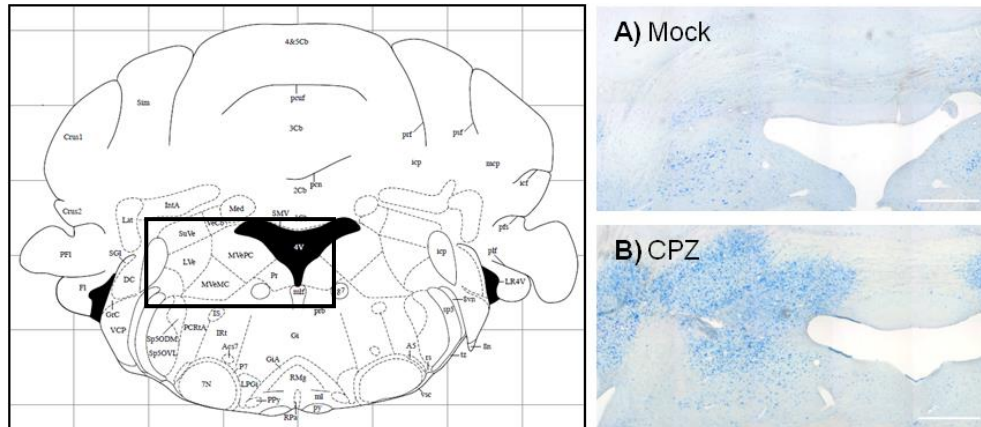


Abbildung 46: Cuprizon-induzierte Sulfatidspeicherung im Kleinhirn der ASA(-/-)-Maus. Das Schema (links) zeigt die Übersicht der Schnittebene (Bregma -5,88 mm). Die Markierung entspricht dem in der Färbung dargestellten Bereich. **(A)** In der Mock-behandelten ASA(-/-)-Maus war nach Abschluss der CPZ-Behandlung in den Vestibulariskernen nur eine schwache endogene Sulfatidspeicherung vorhanden. **(B)** Nach Behandlung mit CPZ war deutlich mehr Speichermaterial angefärbt worden. Maßstabsbalken entsprechen 200 μm . Quelle: KBR-4-12-602; G. Paxinos, K. B. Franklin: *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press, **2001**, 2. Auflage, pp. 130.

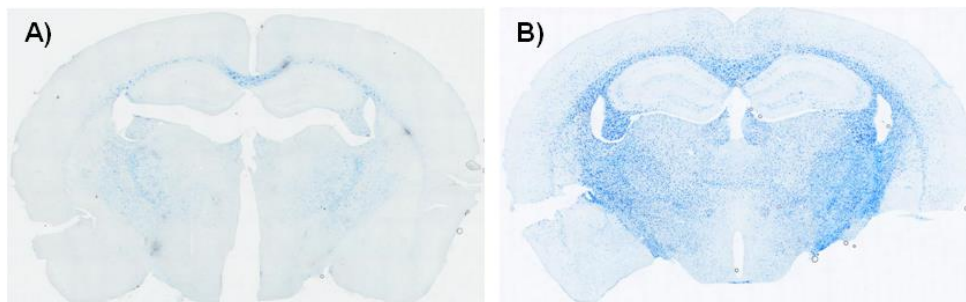


Abbildung 47: Cuprizon-induzierte und endogene Sulfatidspeicherung im Gehirn der ASA(-/-)-Maus. **(A)** CPZ-induzierte Sulfatidspeicherung nach Abschluss der ersten Diät-Phase. **(B)** Endogene Sulfatidspeicherung im Gehirn einer 23 Monate alten ASA(-/-)-Maus. Quelle: KBR-3-205-511.

Die folgenden Abbildung 48 bis Abbildung 50 geben einen vergleichenden Überblick über die AZB-Färbungen aller behandelten Tiergruppen.

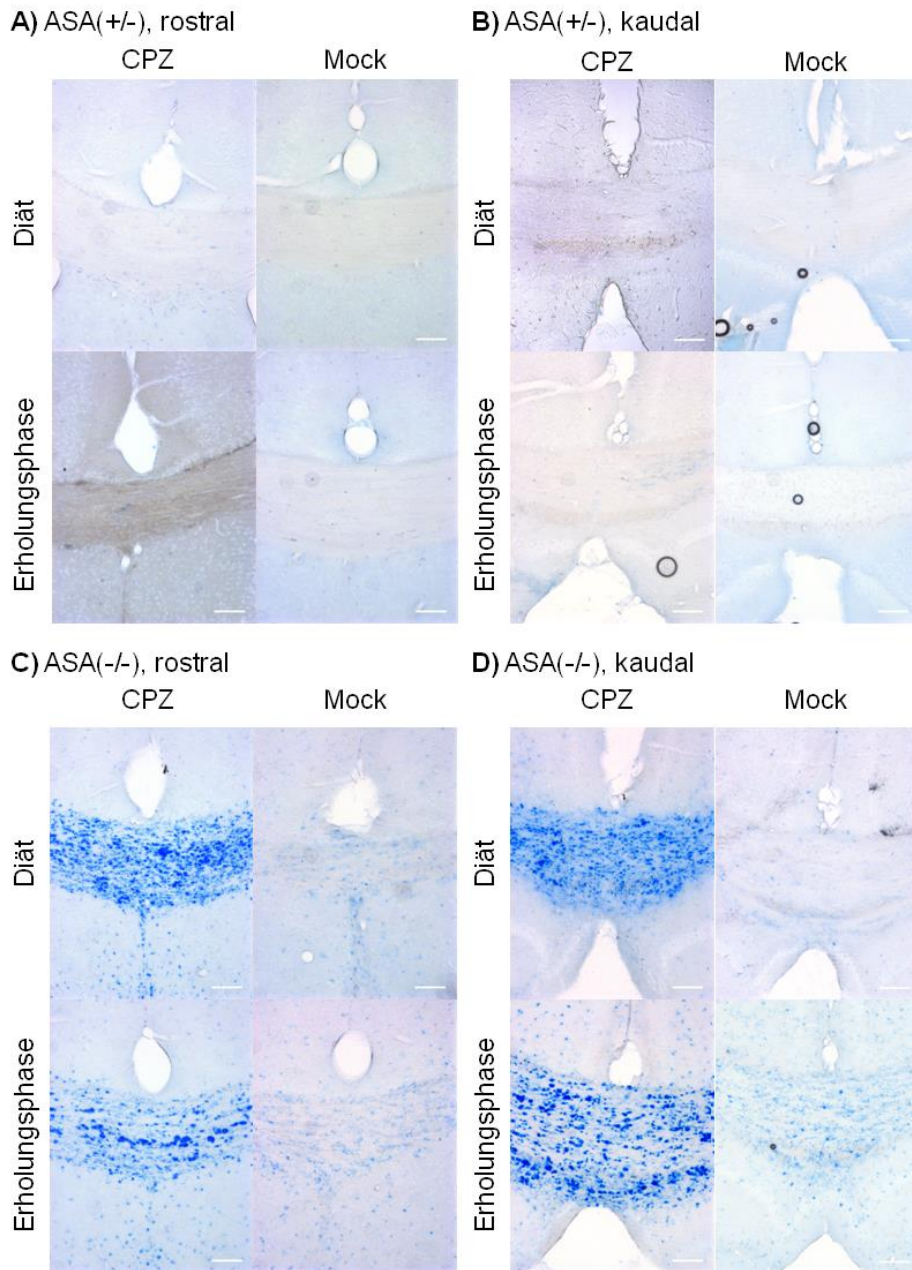


Abbildung 48: Cuprizon-induzierte Sulfatidspeicherung im Corpus callosum konventioneller MLD-Mäuse nach einfacher Behandlung. (A, B) In ASA(+/-)-Mäusen konnte kein Sulfatid-haltiges Speichermaterial mit AZB angefärbt werden, da die Aktivität der ASA ausreichte, anfallende Myelinrümpfer rückstandslos abzubauen. (C, D) In ASA(-/-)-Mäusen führte die Behandlung mit CPZ zu einer verstärkten Speicherung von Sulfatid im CC. Die endogene Speicherung in Mock-behandelten Mäusen war deutlich schwächer, aber bereits vorhanden. Es bestand kein Unterschied zwischen der rostral und kaudal vom Bregma gelegenen Schnittebene. Nach Abschluss der Erholungsphase schien die AZB-Färbung weniger diffus, sondern konzentriert auf große, dunkel gefärbte Kompartimente. Die Morphologie ließ darauf schließen, dass es sich dabei um Mikrogliazellen handelte. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 μm . Quelle: (A) KBR-4-4-592, KBR-4-4-592, KBR-3-90-428, KBR-4-4-592, (B) KBR-2-201-284, KBR-4-213-749, KBR-3-205-511, KBR-4-15-604, (C) KBR-4-4-592, KBR-3-90-428, KBR-4-4-592, KBR-4-4-592, (D) KBR-3-205-511, KBR-3-205-511, KBR-3-90-428, KBR-4-213-749.

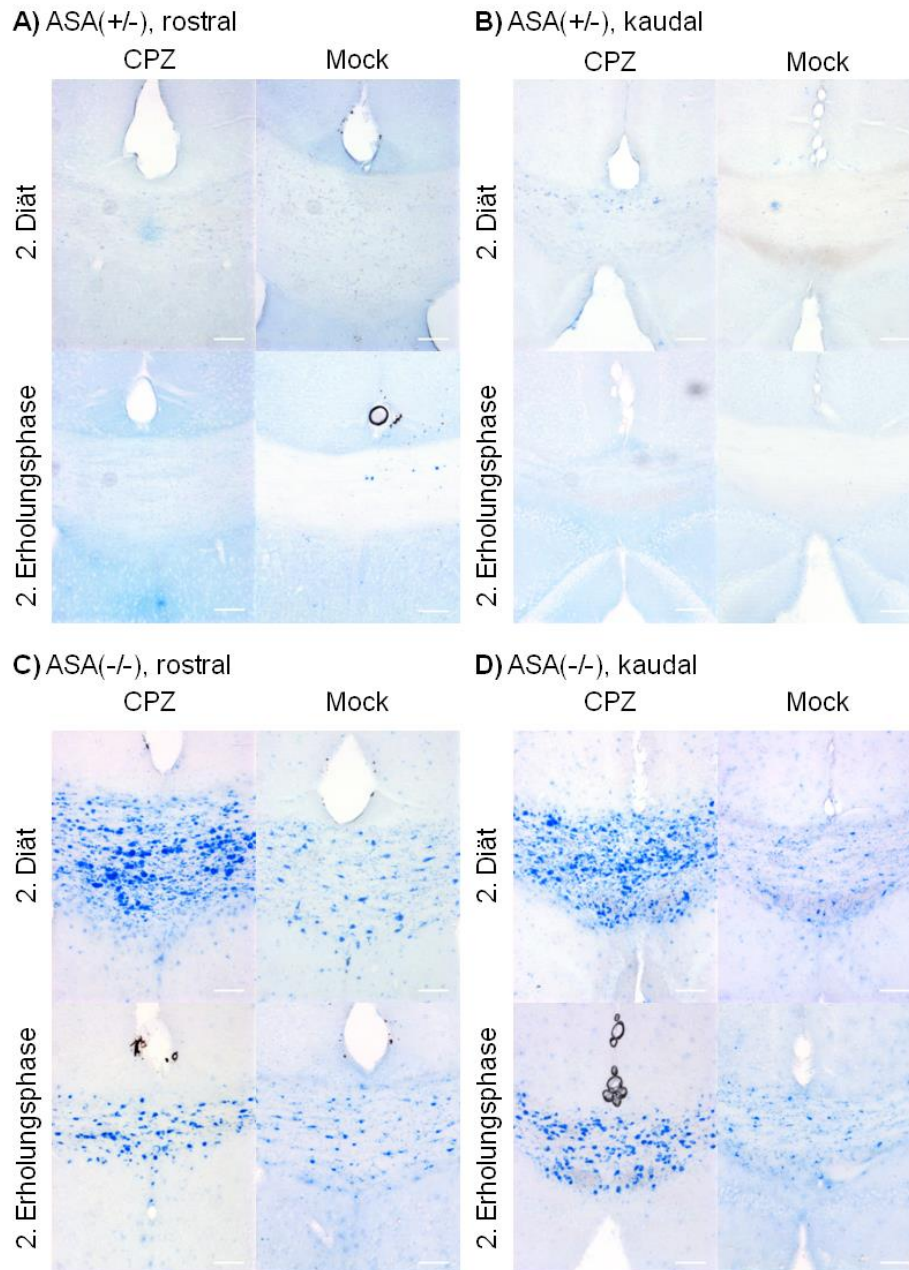


Abbildung 49: Cuprizon-induzierte Sulfatidspeicherung im Corpus callosum konventioneller MLD-Mäuse nach wiederholter Behandlung. (A, B) In ASA(+/-)-Mäusen konnte auch nach wiederholter Behandlung mit CPZ kein Sulfatid-haltiges Speichermaterial angefärbt werden. (C, D) In ASA(-/-)-Mäusen führte die wiederholte Behandlung mit CPZ nicht zu einer sichtbaren Vermehrung des angefärbten Speichermaterials. Die endogene Speicherung in Mock-behandelten Mäusen war, verglichen mit dem ersten Behandlungszyklus, verstärkt, aber immer noch deutlich schwächer als in CPZ-behandelten Mäusen. In der rostral vom Bregma gelegenen Schnittebene schienen mehr Mikrogliazellen von endogener Sulfatidspeicherung betroffen sein als in der kaudal gelegenen Schnittebene. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 μ m. Quelle: (A) KBR-4-4-592, KBR-4-4-592, KBR-4-150-781, KBR-4-100-682, (B) KBR-3-207-514, KBR-3-207-514, KBR-4-150-718, KBR-4-100-682 (C) KBR-3-268-569, KBR-4-4-592, KBR-4-137-708, KBR-4-101-686, (D) KBR-3-268-569, KBR-3-232-537, KBR-4-137-708, KBR-4-101-686.

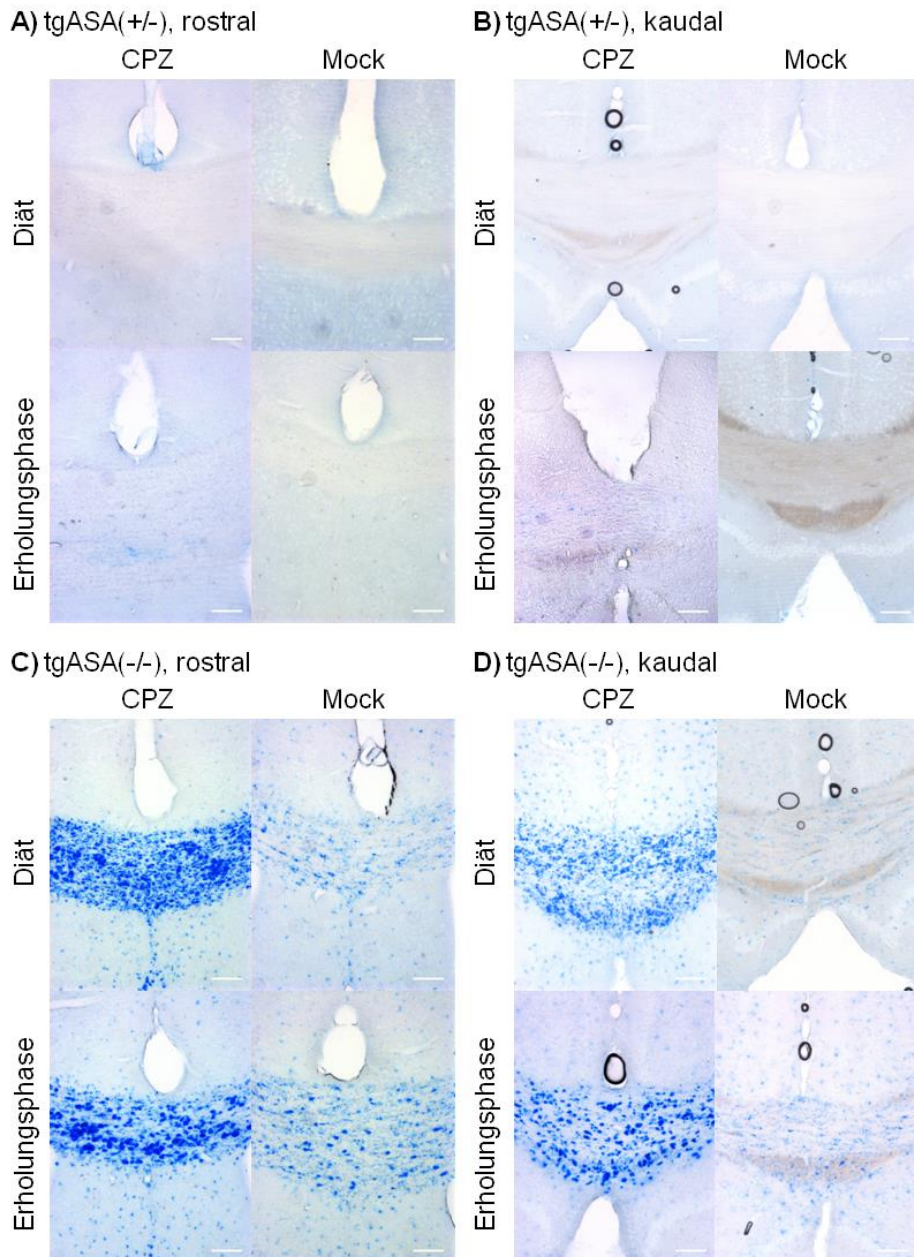


Abbildung 50: Kuprizon-induzierte Sulfatidspeicherung im Corpus callosum CST-transgener MLD-Mäuse. (A, B) In tgASA(+/-)-Mäusen konnte mit AZB kein Sulfatid-haltiges Speichermaterial angefärbt werden. (C, D) In tgASA(-/-)-Mäusen führte die Behandlung mit CPZ zu einer verstärkten Speicherung von Sulfatid im CC. Die endogene Speicherung in Mock-behandelten Mäusen war im Vergleich deutlich schwächer, aber bereits vorhanden. Es bestand kein Unterschied zwischen der rostral und kaudal vom Bregma gelegenen Schnittebene. Nach Abschluss der Erholungsphase schien die AZB-Färbung weniger diffus, sondern konzentriert auf große, dunkel gefärbte Kompartimente. Die Morphologie ließ darauf schließen, dass es sich dabei um Mikrogliazellen handelte. Im Vergleich zu konventionellen ASA(-/-)-Mäusen war die endogene Sulfatid-Speicherung deutlich stärker und mehr gefärbte Mikrogliazellen vorhanden. Im Vergleich von rostral und kaudal vom Bregma gelegener Schnittebene schien die endogene Speicherung in der rostral gelegenen Schnittebene stärker. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 μm . Quelle: (A) KBR-4-4-592, KBR-4-10-598, KBR-4-4-592, KBR-4-4-592, (B) KBR-2-201-284, KBR-4-213-749, KBR-4-213-749, KBR-4-10-598 (C) KBR-4-4-592, KBR-4-4-592, KBR-4-4-592, KBR-4-4-592, (D) KBR-4-32-625, KBR-4-213-749, KBR-3-205-511, KBR-3-220-528.

In ASA-heterozygoten Mäusen war keine Sulfatidspeicherung vorhanden (Abbildung 48 A & B, Abbildung 49 A & B, Abbildung 50 A & B). Die Enzymaktivität der ASA reichte aus, das Sulfatid anfallender Myelinrümpfer komplett abzubauen. In konventionellen wie transgenen ASA-defizienten Mäusen hingegen zeigte die AZB-Färbung nach Behandlung mit CPZ eine deutlich verstärkte Akkumulation von Speichermaterial (Abbildung 48 C & D, Abbildung 49 C & D, Abbildung 50 C & D).

Das **Speichermaterial war morphologisch nicht homogen**. Ein Großteil stellte sich in Form großer runder Kompartimente kräftiger Färbung dar. Basierend auf den Untersuchungen von Wittke *et al.* zur zelltypischen Morphologie von Speichermaterial in der AZB-Färbung konnten diese Kompartimente mit hoher Wahrscheinlichkeit als speichernde Mikrogliazellen identifiziert werden.¹⁰⁶ Neben den Sulfatideinschlüssen in den Mikrogliazellen trat eine diffuse Färbung auf, die im Zuge der Erholungsphase deutlich abnahm. Sich auf die Ergebnisse von Wittke *et al.* stützend, könnte es sich dabei um Sulfatideinschlüsse in Oligodendrozyten oder Astrozyten handeln. Oligodendrozyten sind einer der ersten Zelltypen, die in der ASA(-/-)-Maus von Sulfatidspeicherung betroffen sind, weshalb ihre charakteristisch diffuse Färbung auch in Mock-behandelten ASA(-/-)-Mäuse zu sehen war (Abbildung 48 C & D).

Warum der Anteil der diffusen Färbung über die Erholungsphase abnahm, ist unklar. Da auch die Zahl der Zellkerne im CC während der Erholungsphase abnahm (Abbildung 41), kann vermutet werden, dass Zellen mit diffusem Speichermaterial, eventuell apoptotische Oligodendrozyten, phagozytiert wurden. Insgesamt schien es, als ob sich das Speichermaterial während der Erholungsphase lokal konzentrierte, so dass große Kompartimente intensiver Färbung entstehen. Es ist beschrieben worden, dass aktivierte Mikroglia im Gewebe akkumulieren, um degenerierende Neuronen zu phagozytieren (Neuronophagie). Möglicherweise entstanden im Zuge der Erholungsphase solche Cluster von Mikrogliazellen, die in der AZB-Färbung als lokale Häufung von gefärbtem Speichermaterial erschienen. Eine über die Erholungsphase anhaltende Hypomyelinisierung, wie sie die Ergebnisse der Proteinquantifizierung vermuten lassen, könnte das einer Neuronophagie zugrundeliegende Auftreten dystrophischer und apoptotischer Axone induzieren.

Die Wiederholung der CPZ-Behandlung (Abbildung 49) erzeugte wider Erwarten keine deutliche Vermehrung des Speichermaterials. Auch im zweiten Behandlungszyklus schien das Speichermaterial während der Erholungsphase weniger zu werden und sich in großen Kompartimenten zu sammeln (Abbildung 49 C & D).

Die AZB-Färbung der Gewebeschnitte tgASA(-/-)-Mäuse zeigte ebenfalls keine deutlich gesteigerte Menge von Speichermaterial nach Behandlung mit CPZ, obwohl die Menge des endogenen Speichermaterials in der tgASA(-/-)-Maus etwa zweimal so hoch ist, wie in kon-

ventionellen ASA(-/-)-Mäusen¹⁰⁷. Die AZB-Färbung der **endogene Sulfatidspeicherung** hingegen war, wie in Abbildung 50 C & D gezeigt, **in CST-transgenen Mäusen deutlich stärker als in gleichaltrigen ASA(-/-)-Mäusen** (Abbildung 48 C & D).

Insgesamt bestätigten die Ergebnisse der AZB-Färbung die Hypothese, dass der Abbau von Myelintrümmern in ASA-defizienten Mäusen zur verstärkten Akkumulation von sulfatidhaltigem Speichermaterial führt. Allerdings war den Färbungen **keine Information über die Menge des akkumulierenden Materials** zu entnehmen. Diese Information ist von Interesse, um den Zusammenhang zwischen Menge des Speichermaterials und De- bzw. Remyelinisierung im Hirn verstehen zu können.

4.7 Lipidanalytik

Die im vorangehenden Kapitel beschriebene CPZ-induzierte Sulfatidspeicherung kann nicht über die AZB-Färbung quantifiziert werden. Um die Menge des CPZ-induzierten Speichermaterials zu quantifizieren und zu überprüfen, ob die Behandlung mit CPZ weitere Effekte auf die Lipidzusammensetzung des Gehirns hatte, wurden Lipidextrakte aus Gehirn sowohl chromatographisch, als auch massenspektrometrisch untersucht.

4.7.1 Altersabhängige Veränderungen

4.7.1.1 Densitometrische Analyse

Um einen Überblick über die altersbedingten Veränderungen der Lipidzusammensetzung des Gehirns zu erhalten und CPZ-induzierte Veränderungen besser beurteilt zu können, wurden Lipidextrakte aus Gehirn sieben und 52 Wochen alter ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäuse gewonnen. Die Lipidextrakte wurden, wie in Abbildung 51 gezeigt, per TLC nach steigender Hydrophobie aufgetrennt. Cholesterol, Sulfatid und Galaktosylceramid (GalCer) wurden densitometrisch quantifiziert.

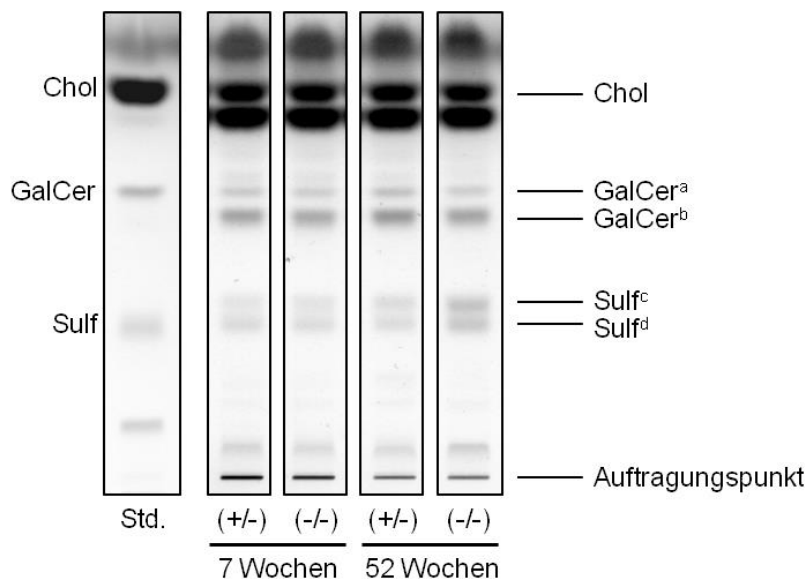
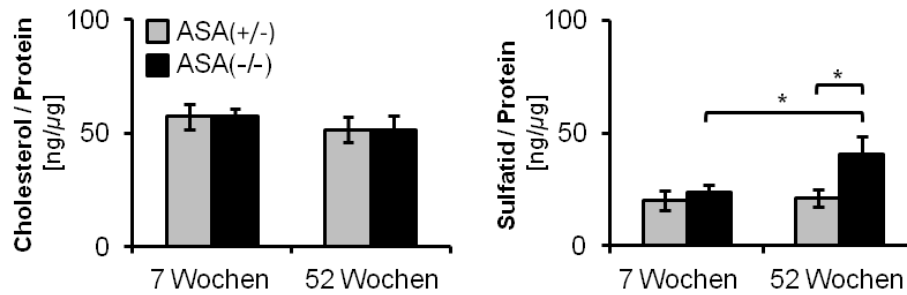


Abbildung 51: Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Lipidextrakt aus Gehirn. Zur Vereinfachung der Darstellung wurde nur eine Spur je Tiergruppe abgebildet. Auftragungsmenge normiert auf Proteingehalt des zur Lipidextraktion verwendeten Gewebehomogenats [= 80 µg]. Bei Auftrennung nach steigender Hydrophobie läuft Cholesterol knapp unter der Laufmittelfront als erste Bande, es folgen GalCer, Sulfatid und die Phospholipide. GalCer und Sulf erscheinen als Doppelbanden. Die Spezies der unteren Banden sind durch Modifikationen wie Hydroxylgruppen oder kürzere Fettsäuren weniger hydrophob (GalCer^a = nicht hydroxyliert, GalCer^b = hydroxyliert, Sulf^c = nicht hydroxyliert langkettig, Sulf^d = hydroxyliert langkettig und nicht hydroxyliert kurzkettig). In der 52. Lebenswoche war die Sulfatidspeicherung in ASA(-/-)-Mäusen auf der TLC-Platte mit bloßem Auge zu erkennen. Gleichzeitig war die Intensität der GalCer-Banden gegenüber ASA(+/-)-Mäusen reduziert. Chol = Cholesterol, GalCer = Galaktosylceramid, Std = Standard, Sulf = Sulfatid. Quelle: KBR-4-175-729.

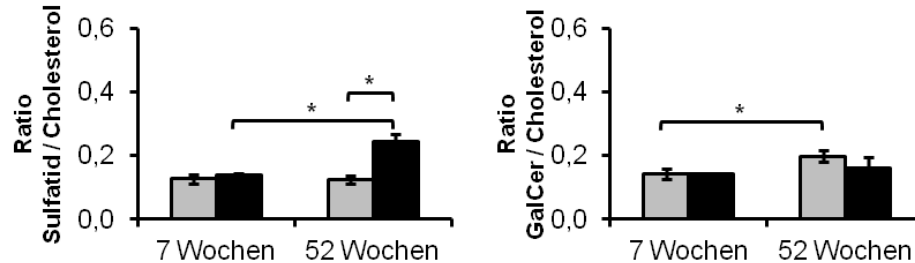
Die oberste Bande der TLC entspricht Cholesterol, dem unpolaren Bestandteil des Lipidextrakts. Es folgen GalCer und Sulfatid. Beide Substanzen erscheinen in der Dünnschicht-

chromatographie als Doppelbande. Die unterschiedlichen Spezies dieser Stoffklassen können Hydroxygruppen oder variable Fettsäurereste besitzen, die ihre Polarität beeinflussen. Die hydrophoberen Spezies (lange Fettsäuren bzw. keine Hydroxygruppen) befinden sich jeweils in der oberen Bande. Die densitometrische Auswertung der TLC ist in Abbildung 52 dargestellt.

A) Altersabhängigkeit von Cholesterol- und Sulfatidkonzentration



B) Relative Quantifizierung von Sulfatid und Galaktosylceramid



C) Verhältnis von Sulfatid zu Galaktosylceramid

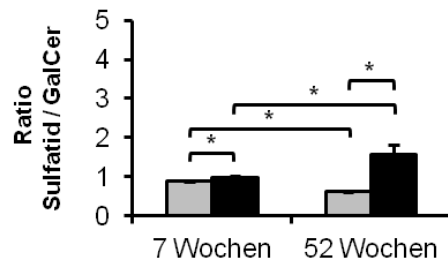


Abbildung 52: Einfluss von Alter und Genotyp auf die Lipidzusammensetzung im Gehirn der Maus. Densitometrische Auswertung (ImageJ) der TLC von Lipidextrakt aus Gehirn. **(A)** Die absolute Quantifizierung von Cholesterol zeigte, dass Alter und Genotyp keinen Einfluss auf den Cholesterolgehalt im Gehirn der Maus hatten. Während der Sulfatidgehalt im Gehirn der ASA(+/-)-Maus ebenfalls konstant war, konnte im Gehirn der ASA(-/-)-Maus eine durch die Akkumulation von Speichermaterial hervorgerufene Verdopplung des Sulfatidgehalts beobachtet werden. **(B)** Da der Cholesterolgehalt von Alter und Genotyp unabhängig war, konnte der Gehalt von Sulfatid und GalCer auf den Cholesterolgehalt normiert werden. Entsprechend der absoluten Quantifizierung von Sulfatid **(A)** zeigte die relative Bestimmung die Verdopplung des Sulfatidgehalts im ersten Lebensjahr der ASA(-/-)-Maus. In ASA(+/-)-Mäusen war der relative Sulfatidgehalt konstant. Der relative Gehalt an GalCer verhielt sich umgekehrt: Im Gehirn der ASA(-/-)-Maus war der GalCer-Gehalt konstant, Im Gehirn der ASA(+/-)-Maus konnte ein Anstieg nachgewiesen werden. **(C)** Das Verhältnis von Sulfatid zu GalCer ist ein empfindliches Maß für die Veränderung des Lipidstoffwechsels in der ASA(-/-)-Maus. Schon im Alter von sieben Woche war eine signifikante Erhöhung des Quotienten in ASA(-/-)-Mäusen nachweisbar, obwohl zuvor **(A, B)** in dieser Altersstufe keine Akkumulation von Sulfatid gemessen werden konnte. Die Anzahl der biologischen Replikate war pro Gruppe N = 3, außer in ASA(+/-), 52 Wochen (N = 2) und ASA(-/-), 52 Wochen Anzahl (N = 4). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. Quelle: KBR-4-175-729.

Da keine Abhängigkeit des Cholesterolgehalts von Alter und Genotyp nachgewiesen werden konnte, wurde Cholesterol für alle folgenden TLCs als Bezugspunkt zur relative Quantifizierung von Sulfatid und GalCer im Gehirn genutzt. Dass diese Vorgehensweise korrekt ist, zeigt auch der Vergleich absoluter und relativer Quantifizierung von Sulfatid in Abbildung 52 A & B. Beide Methoden führen zum selben Ergebnis: Während der Sulfatidgehalt im Gehirn der ASA(+/-)-Maus zwischen siebter und 52. Lebenswoche konstant war, stieg er im Gehirn der ASA(-/-)-Maus im Zuge der Akkumulation von Sulfatid-haltigem Speichermaterial um etwa 75 % (Abbildung 52 A & B) an.

Neben Sulfatid wurde auch der Gehalt von GalCer bestimmt. GalCer wird im Gehirn hauptsächlich von Oligodendrozyten produziert und stellt die direkte Vorstufe von Sulfatid dar. Im MLD-Mausmodell ist der GalCer-Gehalt im Gehirn reduziert.¹⁰⁸ Dementsprechend war im Gehirn der ASA(-/-)-Maus zwischen siebter und 52. Lebenswoche keine signifikante Zunahme des GalCer-Gehalts messbar, während er im Gehirn der ASA(+/-)-Maus um etwa 10 % stieg.

Bildet man den **Quotienten aus Sulfatid- und GalCer-Gehalt**, so erhält man ein empfindlicheres Maß für die Veränderung des Lipidstoffwechsels in der ASA(-/-)-Maus als durch direkte Quantifizierung der Lipide. Schon im Alter von sieben Wochen war, wie in Abbildung 52 C dargestellt, das Verhältnis von Sulfatid zu GalCer in ASA(-/-)-Mäusen erhöht, obwohl weder Sulfatid-, noch GalCer-Gehalt zu diesem Zeitpunkt gegenüber ASA(+/-)-Mäusen signifikant verändert waren. Die CPZ-Behandlung beginnt mit dem Abschluss der siebten Lebenswoche, der Lipidhaushalt der ASA(-/-)-Maus war also schon vor Beginn der CPZ-Behandlung nachweislich verändert. Möglicherweise haben diese Veränderungen Einfluss auf De- und Remyelinisierung.

Nach Abschluss des ersten Lebensjahres war das Verhältnis von Sulfatid zu GalCer in ASA(-/-)- gegenüber ASA(+/-)-Mäusen um das 2,5-fache erhöht.

4.7.1.2 Massenspektrometrische Analyse

4.7.1.2.1 Überprüfung des linearen Zusammenhangs von Signalintensität und Stoffkonzentration im Massenspektrum

Um Aussagen über die Konzentration eines Analyten mittels seiner Signalintensität im Massenspektrum zu treffen, muss ein linearer Zusammenhang zwischen Stoffmenge und Intensität bestehen. Zur Überprüfung, ob die gewählten Messbedingungen für diese Art der Analyse geeignet waren, wurde eine Kalibrierreihe von N-Dodecanoylsulfatid (C12:0-Sulfatid) im Bereich von 0-1000 pmol gemessen.

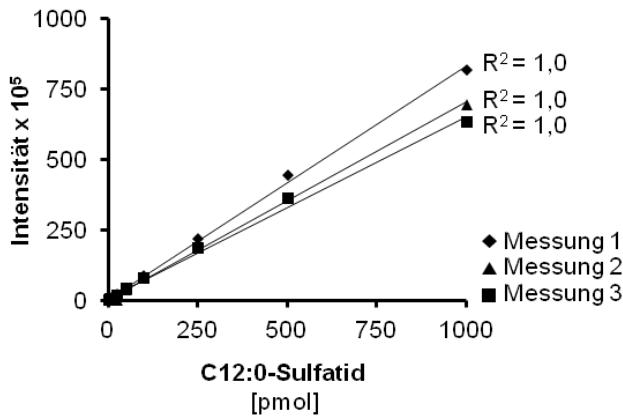


Abbildung 53: ESI-MS-Kalibriergerade von N-Dodecanoylsulfatid.

Auftragung von injizierter Stoffmenge gegen gemessene Signalintensität bei m/z 722. Der Korrelationskoeffizient R^2 ist Maß für den Grad des linearen Zusammenhanges der Messpunkte. $R^2 = 1$ bedeutet vollständig linearer Zusammenhang zwischen den betrachteten Merkmalen. Quelle: KBR-2-58-195.

Wie in Abbildung 53 gezeigt, konnte für den gesamten Messbereich von 0-1000 pmol ein linearer Zusammenhang zwischen Signalintensität und Stoffmenge nachgewiesen werden. Alle im Folgenden gezeigten Signalintensitäten sind demnach als direkt proportional zur Stoffmenge zu verstehen.

4.7.1.2.2 Identifizierung von N-Tetracosenoylsulfatid und N-Octadecanoylsulfatid im Massenspektrum von Lipidextrakt aus Gehirn

Eine Reihe von Publikationen hat sich in der Vergangenheit bereits ausführlich mit der massenspektrometrischen Identifizierung und Quantifizierung von Sulfatiden in biologische Proben auseinander gesetzt, so dass die Etablierung der hier verwendeten Methode vor allem auf der Vorleistung durch Hsu *et al.*¹⁰⁹ sowie Whitfield *et al.*¹¹⁰ beruhte. Zur Validierung der gewählten Einstellungen wurde die Identität zweier Sulfatid-Molekülsignale mit Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) 888 und m/z 806 im Massenspektrum von Gehirn-Lipidextrakt einer zwölf Monate alten ASA(-/-)-Maus mittels Fragmentierung überprüft. Abbildung 54 zeigt die aufgenommenen Fragmentierungsmuster.

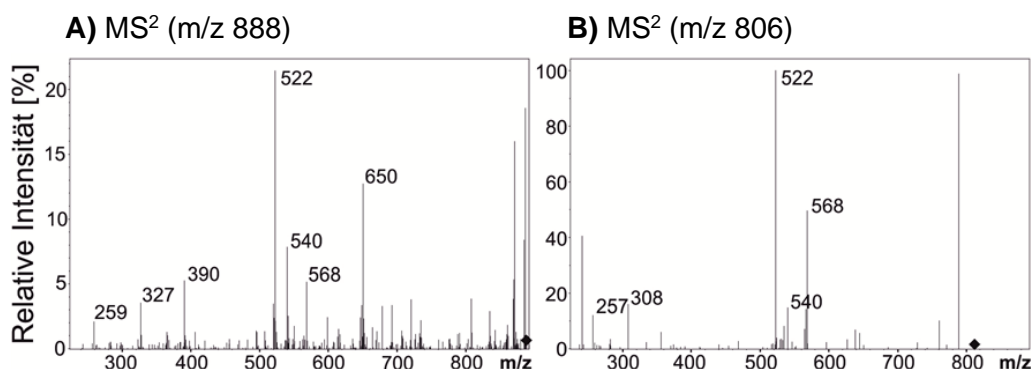


Abbildung 54: MS²-Spektrum von Lipidextrakt aus Gehirn. Fragmentierung der Molekülonen (schwarze Raute) (A) m/z 888 und (B) m/z 806. Die bezeichneten Signale konnten spezifischen Fragmentationen zugeordnet werden. Die Fragmentierungskaskade m/z 568 – 540 – 522 war in beiden Spektren detektierbar und entspricht dem Zerfall von Lysosulfatid. m/z = Masse-zu-Ladung-Verhältnis. Quelle: KBR-4-198-741.

Obwohl es sich um unterschiedliche Sulfatide handelt, ist ihnen die **Fragmentierungskaskade m/z 568 – 540 – 522** gemein. Wie im Folgenden gezeigt wird, handelt es sich dabei

um den **Zerfall von Lysosulfatid**, anhand dessen Sulfatide im Massenspektrum zuverlässig identifiziert werden können.

Da die Sulfat-Gruppe des Sulfatid-Moleküls leicht negativ ionisierbar ist, wurden alle Spektren im Negativ-Modus des Massenspektrometers aufgenommen. Alle detektierten Ionen tragen eine negative Gesamtladung. In Sulfatid-Molekülonen $[M-H]^-$ kann die negative Ladung sowohl an der Sulfat-Kopfgruppe als auch am Stickstoff- bzw. Sauerstoffatom der Peptidbindung lokalisiert sein, wie in Abbildung 55 am Beispiel von N-Tetracosenoylsulfatid (C24:1-Sulfatid) gezeigt.

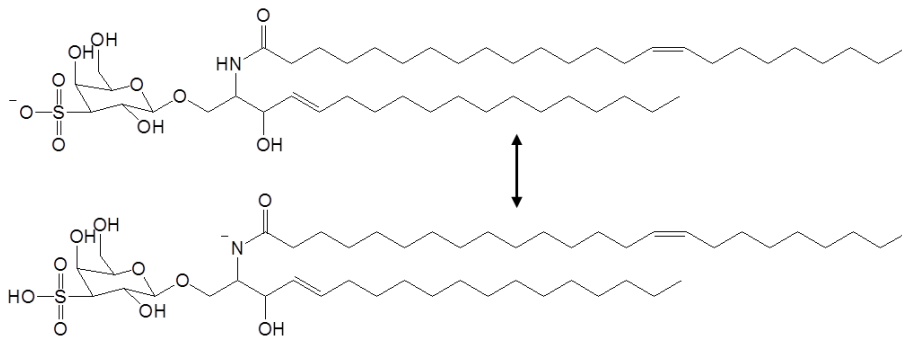


Abbildung 55: N-Tetracosenoylsulfatid-Molekülon $[M-H]^-$ mit m/z 888. Dem Fragmentierungsmuster unter Abb. 47 A zugrunde liegendes Molekülon. Sulfatide sind durch das Vorhandensein der Sulfat-Kopfgruppe leicht negativ ionisierbar. Die resultierende negative Ladung kann an unterschiedlichen Stellen im Molekül lokalisiert sein.

Je nach Lokalisation der Ladung können unterschiedliche Fragmentationen detektiert werden, wie in Abbildung 56 dargestellt.

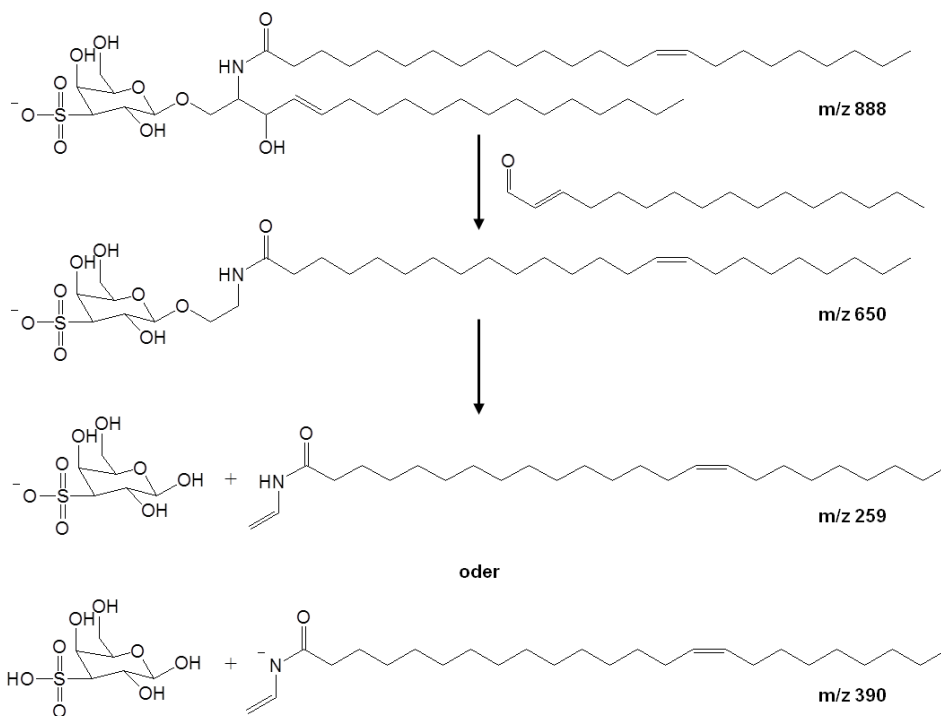


Abbildung 56: Abhängigkeit des detektierten Fragmentations von der Lokalisation der negativen Ladung im Molekülon. Beispiel C24:1-Sulfatid. Im letzten Fragmentierungsschritt entstehen zwei Fragmente, die beide eine negative Ladung tragen können und somit beide detektierbar sind.

Durch Abspaltung von 2-Hexadecenal aus dem Molekülion $[M-H]^-$ m/z 888 entsteht das Fragment-Ion m/z 650. Im nächsten Reaktionsschritt wird 3-O-sulfogalaktose abspalten. Es entstehen zwei Fragmentionen m/z 259 (3-O-sulfogalaktose-Ion) und m/z 390 (Abbildung 54 A), die beide eine negative Ladung tragen und somit detektiert werden können. N-Octadecanoylsulfatid (C18:0-Sulfatid) mit m/z 806 zerfällt analog in die Fragmentionen m/z 568 und m/z 308 (Abbildung 54 B).

Alternativ zum Fragmentierungsschema in Abbildung 56 kann der Zerfall des Molekülions auch mit dem Verlust der Fettsäurekette beginnen, wie in Abbildung 57 dargestellt.

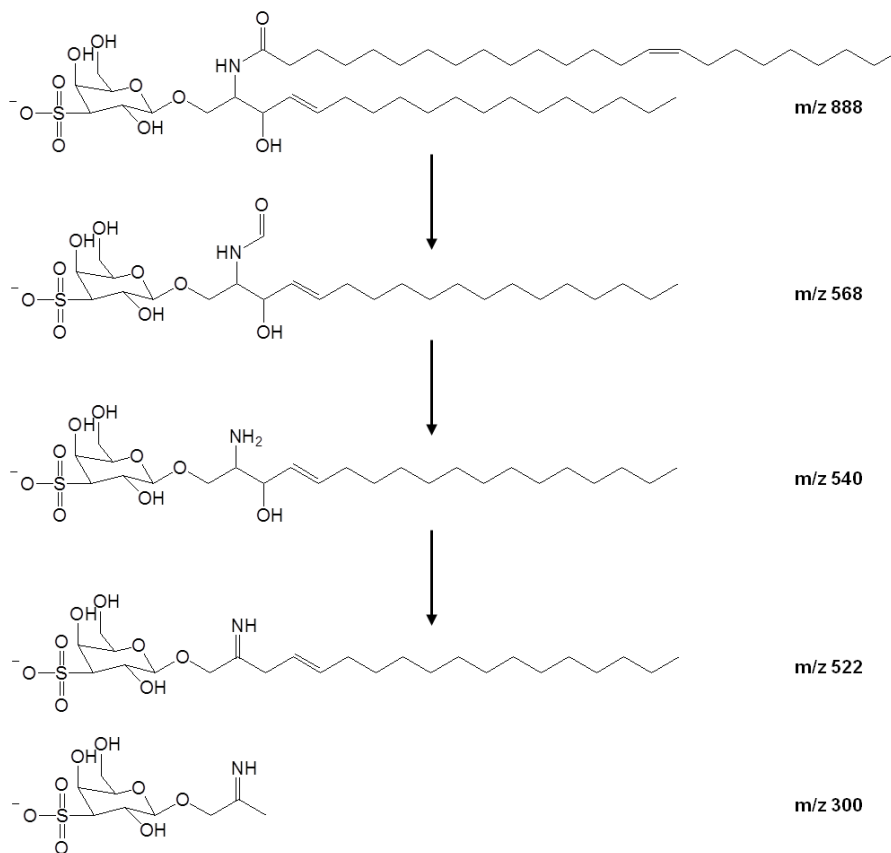


Abbildung 57: Sulfatid-spezifische Fragmentierungskaskade. Durch Abspaltung der Fettsäure aus einem Sulfatid-Molekülion entsteht das Lysosulfatid-Ion (m/z 540). Die Differenz $\Delta m/z$ von Molekülion und Lysosulfatid-Ion ermöglicht die genaue Identifizierung der fragmentierten Sulfatidspezies

Es resultiert das Fragmention m/z 540, das 3-O-sulfogalatosylsphingosin- oder **Lysosulfatid-Ion**. Dieser Fragmentierungsschritt kann in zwei Stufen ablaufen, wenn zunächst der Neutralverlust der Fettsäure-Kohlenstoffkette an α -Position zum Heteroatom erfolgt. Das resultierende Fragmention m/z 568 reagiert dann unter Abspaltung von Kohlenstoffmonoxid zum Lysosulfatid-Ion m/z 540. Die Abspaltung von Wasser aus dem Lysosulfatid-Ion führt zur Bildung des signalstärksten Fragmentions m/z 522. Wird nicht Wasser, sondern die Acylkette des Sphingosins abgespalten, entsteht das Fragment-Ion m/z 300, welches dem 1-

O-2'-aminoethenylgalaktosyl-3-sulfat-Ion entspricht. Das Sulfat-Ion (m/z 97) kann aufgrund der Begrenzung des Messbereichs auf m/z 200-1000 nicht als Fragmentation detektiert werden.

Die in Abbildung 57 gezeigte **Fragmentierungskaskade m/z 568 – 540 – 522 – 300 ist typisch für alle Sulfatide und kann als Identifizierungsmerkmal genutzt werden** (Abbildung 54). Die Differenz zwischen Molekülsignal $[M-H]^+$ und Lysosulfatid-Ion gibt dabei Aufschluss über die an Sphingosin gebundenen Fettsäure. Für das betrachtete Molekülion m/z 888 entspricht die Differenz ($\Delta m/z = 348$) dem Molekulargewicht der Nervonsäure (C24:1-Fettsäure, $M = 366,6$ g/mol) minus dem Molekulargewicht von Wasser ($M = 18,0$ g/mol), das bei der Bildung der Peptidbindung zwischen Sphingosin und Fettsäure abgespalten wird. **Das untersuchte Molekülsignal m/z 888 kann eindeutig als C24:1-Sulfatid identifiziert werden.**

Die Differenz zwischen dem Molekülsignal m/z 806 und dem Lysosulfatid-Ion beträgt, unter Berücksichtigung des abgespaltenen Wassermoleküls, $\Delta m/z = 284$. Dies entspricht der Molmasse von Stearinsäure (C18:0-Fettsäure, $M = 284,5$ g/mol). **Das untersuchte Molekülsignal m/z 806 kann eindeutig als C18:0-Sulfatid identifiziert werden.**

Die ausgewählten Molekülsignale konnten in Übereinstimmung mit diversen Publikationen zweifelsfrei als C24:1- und C18:0-Sulfatid identifiziert werden, so dass die hier entwickelte Methode zur Quantifizierung dieser Sulfatidspezies im Gehirn angewendet werden konnte.

4.7.1.2.3 Einfluss von Alter und Genotyp auf das Verhältnis von C18:0- zu C24:1-Sulfatid im Gehirn der Maus

Im Gehirn ist das Verhältnis kurzkettiger Sulfatide zu langkettigen Sulfatide altersabhängig.¹¹¹ In jungen Mäusen ist der Anteil kurzkettiger Sulfatide hoch und sinkt während der Reifung des Gehirns. Der Anteil an langkettigen Sulfatiden hingegen ist konstant. **Mit der Reifung des ZNS ist daher eine Abnahme des Verhältnisses von C18:0- zu C24:1-Sulfatid zu beobachten.**

Nachdem die Molekülsignale m/z 806 und m/z 888 zweifelsfrei als C18:0- und C24:1-Sulfatid identifiziert wurden, konnte das relative Vorkommen von C18:0- und C24:1-Sulfatid im Gehirn-Lipidextrakt sieben und 52 Wochen alter ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäuse massenspektrometrisch bestimmt und Genotyp-spezifische Veränderungen genauer charakterisiert werden. Abbildung 58 fasst die Ergebnisse zusammen.

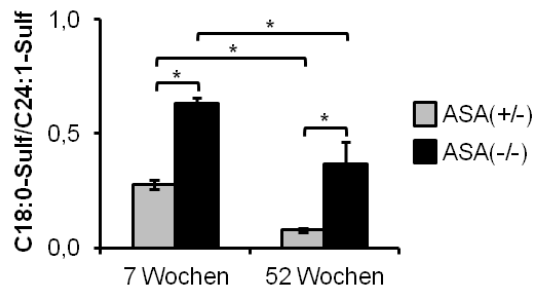
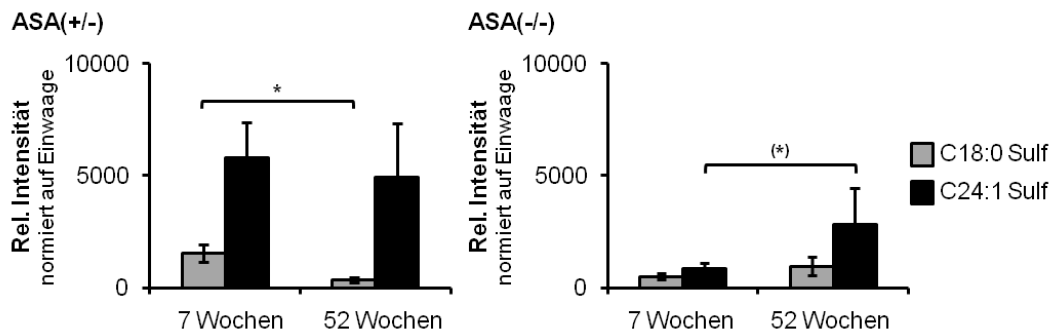


Abbildung 58: Einfluss von Alter und Genotyp auf das Verhältnis von C18:0- zu C24:1-Sulfatid im Gehirn der Maus. Quotient der absoluten Signalintensitäten. Unabhängig vom Genotyp nahm das C18:0-/C24:1-Sulf-Verhältnis im Gehirn mit steigendem Alter ab. Im Vergleich mit ASA(+/-)-Mäusen war das Verhältnis im Gehirn der ASA(-/-)-Maus in beiden Altersstufen höher. Die Anzahl der biologischen Replikate war pro Gruppe N = 3, außer in ASA(+/-), 52 Wochen (N = 2) und ASA(-/-), 52 Wochen Anzahl (N = 4). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. Sulf = Sulfatid. Quelle: KBR-4-170-728.

Sowohl in ASA(+/-)- als auch ASA(-/-)-Mäusen nahm das Verhältnis von C18:0- zu C24:1-Sulfatid entsprechend den Informationen aus der Literatur im Zeitraum zwischen siebter und 52. Lebenswoche ab (Abbildung 58). Die in Abbildung 59 dargestellte Auswertung der Signalintensitäten gab Aufschluss über die Veränderung der Konzentration der einzelnen Sulfatide.

A) Altersabhängige Veränderung der Expression einzelner Sulfatid-Spezies



B) Genotyp-abhängige Unterschiede der Expression einzelner Sulfatid-Spezies

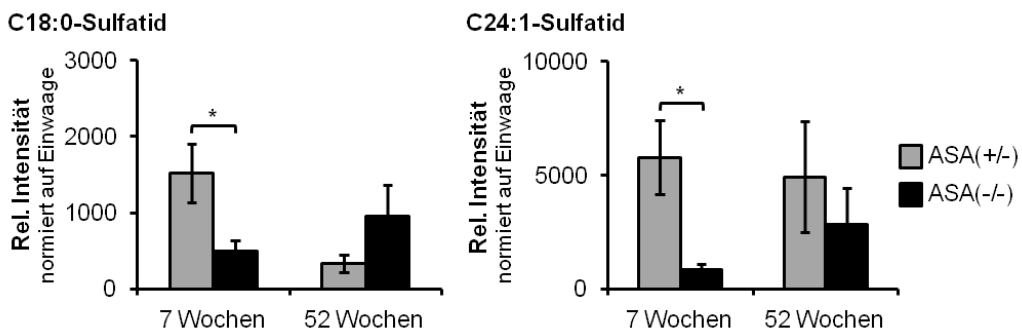


Abbildung 59: Einfluss von Alter und Genotyp auf die relativen Signalintensitäten von C18:0- und C24:1-Sulfatid im Massenspektrum von Lipidextrakt aus Gehirn. Signalintensitäten normiert auf Feuchtgewicht, angegeben in [Zählpulse/mg]. **(A)** In ASA(+/-)-Mäusen war eine altersabhängige Abnahme von C18:0-Sulfatid zu beobachten, während der Gehalt an C24:1-Sulfatid konstant blieb. In ASA(-/-)-Mäusen zeigt die graphische Darstellung zwar eine Zunahme von C18:0-, wie auch C24:1-Sulfatid, aufgrund der hohen Standardabweichung konnte aber keine Signifikanz festgestellt werden. **(B)** Der Vergleich von ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäusen zeigte, dass sowohl der Gehalt von C18:0-, als auch C24:1-Sulfatid im Gehirn 7 Wochen alten ASA(-/-)-Mäusen reduziert war. In älteren Tieren war kein signifikanter Unterschied zwischen ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäusen vorhanden, aber auch hier erschwerte die hohe Standardabweichung die Interpretation der Daten. Die Anzahl der biologi-

schen Replikate war pro Gruppe N = 3, außer in ASA(+/-), 52 Wochen (N = 2) und ASA(-/-), 52 Wochen Anzahl (N = 4). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. Mit einem in Klammern gesetzten Stern gekennzeichnet sind nicht signifikante Veränderungen im Konfidenzintervall $0,05 < p \leq 0,10$. Quelle: KBR-4-170-728.

In Übereinstimmung mit den Daten von Isaac *et al.*¹¹² nahm die Konzentration von C18:0-Sulfatid im Gehirn der ASA(+/-)-Maus im Zeitraum zwischen 7. und 52. Lebenswoche ab (Abbildung 59 A). Die Konzentration von C24:1-Sulfatid hingegen veränderte sich nicht.

Die Reduktion kurzkettiger Sulfatide wird allgemein mit dem Reifungsprozess des ZNS in Verbindung gebracht, ohne dass der verantwortliche Mechanismus genauer bekannt wäre. Unter anderem hatte die Analyse der Lipid-Rafts im Gehirn gezeigt, dass auch die Zusammensetzung der Rafts einer entsprechenden altersabhängigen Veränderung unterliegt.¹¹³ Im unreifen Gehirn der Maus (**P3**) liegt der Anteil **kurzkettiger Lipide in den Lipid-Rafts bei 75 %**. Im voll myelinisierten Gehirn (**6 Monate**) hingegen liegt der Anteil **langkettiger Sulfatide in den Lipid-Rafts bei 75 %**. C18:0-Sulfatid scheint demnach mit den Lipid-Rafts in Membranen assoziiert zu sein, die nicht zum reifen Myelin zählen.

Im Gehirn der ASA(-/-)-Maus war keine altersabhängige Abnahme von C18:0-Sulfatid zu beobachten (Abbildung 59 A), was aus dem Fehlen der Fähigkeit zum Abbau von Sulfatid resultiert. Der aus der Akkumulation von Speichermaterial resultierende Anstieg von C18:0-Sulfatid war jedoch nicht mit Signifikanz nachzuweisen.

Dass C18:0-Sulfatid eine Komponente des Speichermaterials ist, konnte durch Überexpression von UDP-Galaktose : Ceramid Galaktosyltransferase (CGT) unter Kontrolle eines Neuronen-spezifischen Promotors in der ASA(-/-)-Maus bewiesen werden. Die CGT katalysiert die Synthese von Galaktosylceramid aus Ceramid. Die Bildung von C18-Ceramid, der Vorstufe von C18:0-GalCer und somit C18:0-Sulfatid, wird durch das Stearoyl-CoA-spezifische Enzym Ceramidsynthase 1 (Cers1) katalysiert.¹¹⁴ Da Neuronen eine Reihe von Sphingolipiden auf C18:0-Basis synthetisieren, exprimieren sie ein hohes Level von Cers1.¹¹⁵ Bei Überexpression von CGT in den Neuronen der ASA(-/-)-Maus kommt es daher zu einer vermehrten Speicherung von C18:0-Sulfatid in den Neuronen.¹¹⁶ Die neuronale Akkumulation von C18:0-Sulfatid führt zu einer gegenüber der konventionellen ASA(-/-)-Maus signifikanten Reduktion der Lebensdauer, begleitet von axonaler Degeneration und Defiziten der neuromotorischen Koordination, aber ohne Demyelinisierung.

Der direkte Vergleich der Signalintensitäten zwischen ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäusen (Abbildung 59 B) zeigte überraschenderweise, dass sowohl der Gehalt von C18:0-, als auch C24:1-Sulfatid im Gehirn der ASA(-/-)-Maus im Alter von sieben Wochen signifikant geringer war als in der ASA(+/-)-Maus (Abbildung 59 B). Diese Beobachtung kann als weiterer Hinweis darauf

interpretiert werden, dass die Myelinisierung des Gehirns in der ASA(-/-)-Maus zu Beginn der CPZ-Diät weniger weit fortgeschritten war als in der ASA(+/-)-Maus.

Wie auch für das Verhältnis von Sulfatid zu GalCer zeigte sich, dass der **Quotient von C18:0- und C24:1-Sulfatid ein empfindlicheres Maß für die Veränderungen des Lipidhaushaltes in der ASA(-/-)-Maus war als die Konzentrationen der einzelnen Sulfatidspezies**, denn das C18:0-/C24:1-Sulf-Verhältnis war in ASA(-/-)-Mäusen sowohl im Alter von sieben, als auch 52 Wochen signifikant erhöht (Abbildung 60), obwohl die Konzentrationen der Sulfatidspezies zu einem großen Teil nicht signifikant verändert waren.

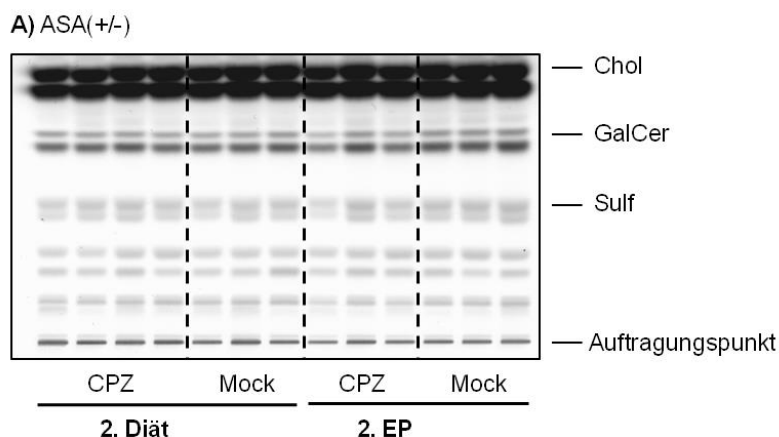
4.7.2 Cuprizin-induzierte Veränderungen der Lipidzusammensetzung des Gehirns

4.7.2.1 Densitometrische Analyse

Um den CPZ-induzierte Abbau von Myelin über die Konzentration der Myelinbestandteile Sulfatid und GalCer nachzuverfolgen, wurden Lipidextrakte aus Gehirn CPZ- und Mock-behandelter Mäuse gewonnen und mittels TLC nach steigender Hydrophobie aufgetrennt. Die Konzentrationen von Cholesterol, Sulfatid und GalCer wurden densitometrisch bestimmt.

4.7.2.1.1 Konventionelles MLD-Mausmodell

Abbildung 60 zeigt exemplarisch die dünnenschichtchromatographische Auftrennung der Lipidextrakte aus dem Gehirn doppelt behandelter MLD-Mäuse. In ASA(+/-)-Mäusen war auch nach wiederholter CPZ-Behandlung mit bloßem Auge keine der Lipidbanden erkennbar in ihrer Intensität verändert (Abbildung 60 A). In CPZ-behandelten ASA(-/-)-Mäusen hingegen war die Intensität der GalCer-Banden sichtbar reduziert (Abbildung 60 B). Die densitometrische Auswertung der TLC, gezeigt in Abbildung 62, bestätigte diese Beobachtung.



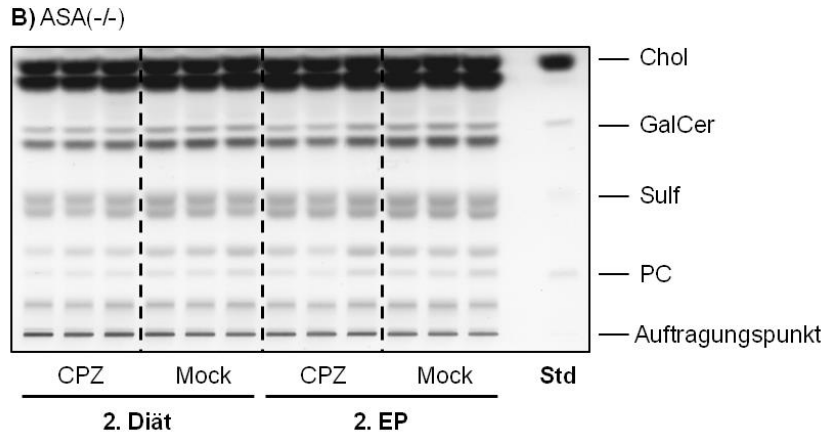


Abbildung 60: Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Lipidextrakt aus Gehirn doppelt behandelte konventioneller MLD-Mäuse. Die Auftrennung erfolgte nach steigender Hydrophobie. Auftragungsmenge normiert auf den Gesamtproteingehalt des zur Lipidextraktion verwendeten Gewebehomogenats [= 80 µg]. **(A)** In ASA(+/-)-Mäusen war mit bloßem Auge keine CPZ-induzierte Veränderung der Zusammensetzung der Lipidextrakte zu erkennen. **(B)** In CPZ-behandelten ASA(-/-)-Mäusen war die Intensität der GalCer-Bande gegenüber der Mock-behandelten Gruppe reduziert. Chol = Cholesterol, EP = Erholungsphase, GalCer = Galaktosylceramid, PC = Phosphatidylcholin, Std = Standard, Sulf = Sulfatid. Quelle: KBR-4-164-725, KBR-4-155-721

Obwohl Cholesterol im Myelin in hoher Konzentration vorkommt, zeigte die densitometrische Auswertung der Dünnschichtchromatographien keine Veränderung des Cholesterolgehalts im Gehirn CPZ-behandelter Mäuse (Abbildung 61). Auf Basis dieser Beobachtung konnte entschieden werden, den Cholesterolgehalt zur Normierung von Sulfatid und GalCer zu verwenden.

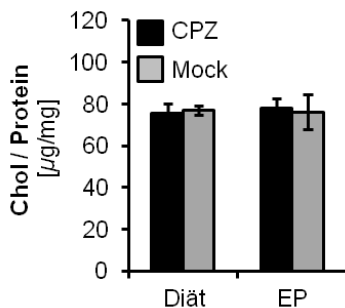


Abbildung 61: Cuprizon hat keinen Einfluss auf den Cholesterolgehalt im Gehirn der Maus. Densitometrische Auswertung der TLC mittels ImageJ. Cholesterolgehalt normiert auf Proteingehalt [µg/mg]. Am Beispiel der ASA(-/-)-Maus ist gezeigt, dass die Behandlung mit CPZ keinen Einfluss auf den Cholesterolgehalt im Gehirn hatte und als Bezugspunkt für die relative Quantifizierung von Sulfatid- und GalCer verwendet werden kann. Anzahl der biologischen Replikate pro Gruppe N = 3. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Chol = Cholesterol, EP = Erholungsphase. Quelle: KBR-4-200-742.

Abbildung 62 gibt einen Überblick über die Auswirkung der CPZ-Behandlung auf die relativen Expressionslevel von Sulfatid und GalCer im konventionellen MLD-Mausmodell.

4.7.2.1.1.1 Kontrollgruppe ASA(+/-)

ASA(+/-)-In Übereinstimmung mit der Quantifizierung der Myelinproteine (Kapitel 4.5) konnte in ASA(+/-)-Mäusen während des ersten Behandlungszyklus keine Demyelinisierung, verbunden mit dem Verlust von Sulfatid oder GalCer, nachgewiesen werden (Abbildung 62 A & B). Wie schon in Kapitel 4.5 vermutet, könnte das Ausmaß der Demyelinisierung zu gering, oder die Remyelinisierung zu effizient gewesen sein, als dass zum Zeitpunkt der Analyse ein Unterschied zwischen CPZ- und Mock-behandelten Mäusen detektiert werden könnte.

Im zweiten Behandlungszyklus war die Proteinexpression von MBP (Abbildung 22 B) und CNPase in ASA(+/-) Mäusen (Abbildung 32 B) nach Abschluss der zweiten Diätphase erniedrigt gewesen. **Auf Lipidebene konnte kein der Demyelinisierung entsprechender Verlust von Sulfatid oder GalCer beobachtet werden.** Wider Erwarten scheint die Dünnschichtchromatographie keine empfindliche Methode zur Detektion von Demyelinisierung zu sein.

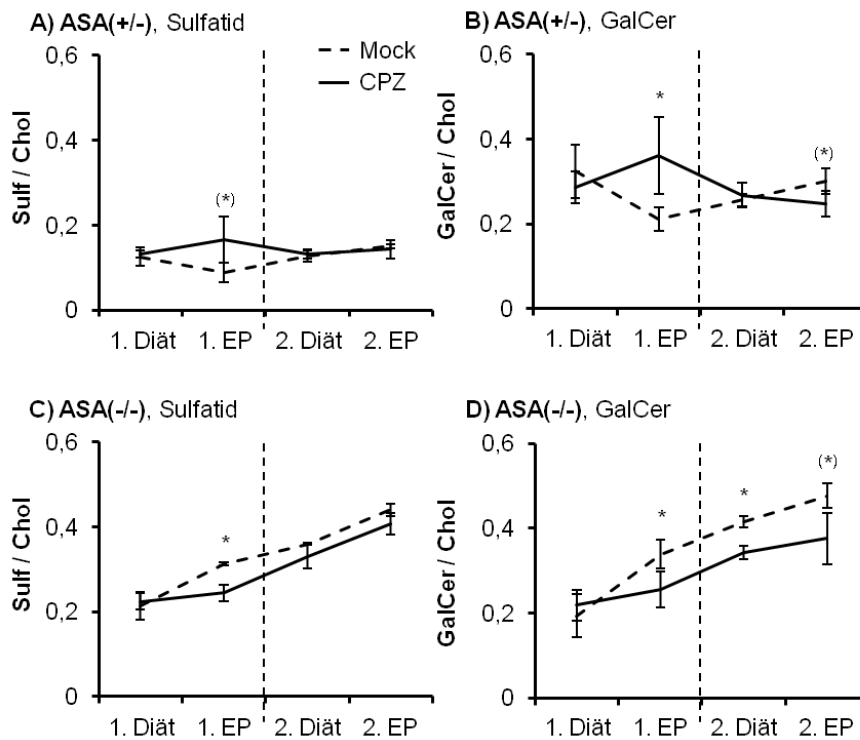


Abbildung 62: Einfluss der Cuprizon-Behandlung auf den relativen Gehalt von Sulfatid und Galaktosylceramid im Gehirn der konventionellen MLD-Maus. Densitometrische Auswertung (ImageJ) der TLCs von Lipidextrakt aus Gehirn. Darstellung der Lipidkonzentration in Relation zu Cholesterin. **(A)** In ASA(+/-)-Mäusen konnte kein mit der Demyelinisierung einhergehender Verlust von Sulfatid nachgewiesen werden. **(B)** Erst nach Abschluss der zweiten Erholungsphase war der relative Gehalt an GalCer in CPZ-behandelten ASA(+/-)-Mäusen tendenziell erniedrigt ($p = 0,10$). **(C)** In ASA(-/-)-Mäusen konnte eine altersabhängige Zunahme von Sulfatid und **(D)** GalCer im Gehirn beobachtet werden. Wie in ASA(+/-)-Mäusen war kein durch Demyelinisierung hervorgerufener Verlust von Sulfatid oder GalCer nachzuweisen, aber die Akkumulation beider Lipide war in CPZ- gegenüber Mock-behandelten Mäusen verlangsamt. Anzahl der biologischen Replikate war pro Gruppe $N = 3$, außer in ASA(+/-), 2. Diät, CPZ ($N = 4$). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. Mit einem in Klammern gesetzten Stern gekennzeichnet sind nicht signifikante Veränderungen im Konfidenzintervall $0,05 < p \leq 0,10$. EP = Erholungsphase, GalCer = Galaktosylceramid, Sulf = Sulfatid. Quelle: (A, C) KBR-3-258-560, KBR-4-164-725, (B, D) KBR-4-200-742, KBR-4-155-721.

4.7.2.1.1.2 Konventionelle MLD-Maus ASA(-/-)

Entsprechend den Ergebnissen der Voruntersuchung zur altersbedingten Veränderung der Lipidzusammensetzung des Gehirns (Abbildung 52), stieg der Gehalt von Sulfatid im Gehirn sowohl CPZ-, als auch Mock-behandelter ASA(-/-)-Mäuse über den gesamten Behandlungs-

zeitraum an (Abbildung 62 C). **Im ersten Behandlungszyklus war ein hemmender Effekt von CPZ auf die Akkumulationsrate von Sulfatid zu beobachten:** Während der relative Sulfatidgehalt in Mock-behandelten Mäusen um 48 % anstieg, war die Zunahme von 9 % in CPZ-behandelten Mäusen zwar vorhanden, aber nicht signifikant. Im zweiten Behandlungszyklus hingegen hatte CPZ keinen Einfluss auf die Sulfatid-Akkumulation, die mit 22 % in Mock- und 24 % in CPZ-behandelten Mäusen etwa gleich stark war.

Dass CPZ die Akkumulation von Sulfatid nur im ersten Behandlungszyklus hemmte, weist darauf hin, dass die **Quelle des synthetisierten Sulfatids im ersten und zweiten Behandlungszyklus nicht identisch** war: Die Behandlung mit CPZ führt zum Absterben von Oligodendrozyten.¹¹⁷ Hemmt CPZ also die Sulfatid-Akkumulation im ersten Behandlungszyklus, sind myelinisierende Oligodendrozyten in diesem Zeitraum wahrscheinlich die Hauptquelle des gebildeten Sulfatids. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Myelinisierung des Gehirns in der ASA(-/-)-Maus im ersten Behandlungszyklus noch nicht abgeschlossen war. Im zweiten Behandlungszyklus wurden die Sulfatid-synthetisierenden Zellen durch Behandlung mit CPZ nicht beeinträchtigt. Wahrscheinlich handelte es sich dabei hauptsächlich um Neuronen und Astrozyten.

Im Gegensatz zu Sulfatid wurde die Akkumulation von GalCer, das ein Marker für den Myelinisierungszustand des Gehirns ist¹¹⁸, durch die CPZ-Behandlung sowohl im ersten, als auch zweiten Behandlungszyklus (Abbildung 62 D) gehemmt. **Der GalCer-Spiegel blieb in CPZ-gegenüber Mock-behandelten Mäusen über beide Behandlungszyklen erniedrigt.** Diese dauerhafte Reduktion kann als **anhaltende Hypomyelinisierung**, also ein Scheitern der Remyelinisierung interpretiert werden und steht im Einklang mit der Quantifizierung der Myelinproteine in Kapitel 4.5.

4.7.2.1.1.3 Die relative Expression von Sulfatid zu Galaktosylceramid als Mittel zur Detektion von CPZ-induzierter Demyelinisierung im konventionellen MLD-Mausmodell

Wie in Kapitel 4.7.1.1 gezeigt, ist das Verhältnis von Sulfatid zu GalCer ein empfindlicheres Maß für die Veränderung des Lipidhaushalts im Gehirn, als die absoluten Konzentrationen der einzelnen Lipidspezies (Abbildung 53). Das Verhältnis verändert sich theoretisch immer dann, wenn Sulfatid- und GalCer-Gehalt sich unabhängig voneinander verändern, wie z. B. im Zuge der Akkumulation von Sulfatid-haltigem Speichermaterial. Solange die Veränderungen von Sulfatid- und GalCer-Gehalt gleichgerichtet sind, wie es im Falle von De- und Remyelinisierung zu erwarten wäre, bliebe das Verhältnis konstant. **Die nachstehende Abbildung 63 bestätigt, dass das Verhältnis der Myelinlipide zueinander kein spezifisches Werkzeug ist, CPZ-induzierte Demyelinisierung abzubilden:**

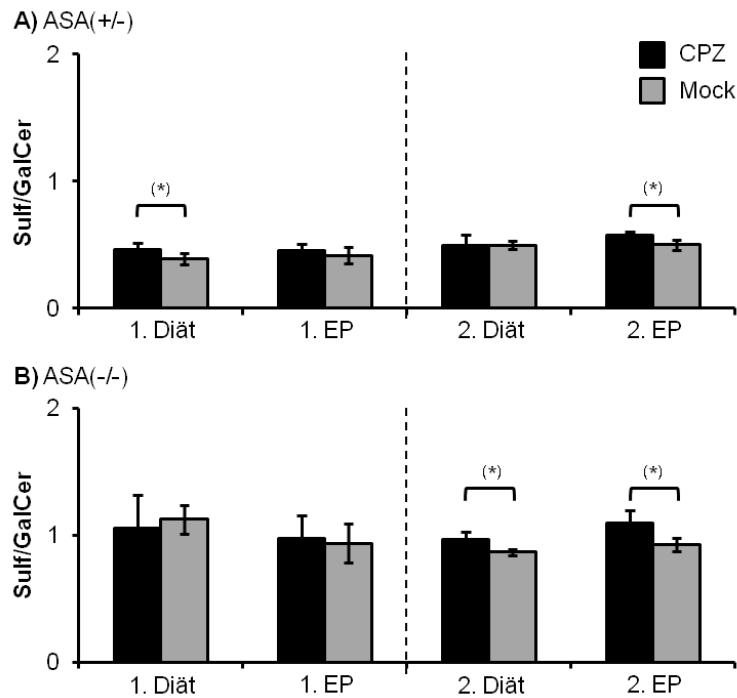


Abbildung 63: Einfluss von Cuprizon auf das Verhältnis von Sulfatid zu Galaktosylceramid im Gehirn der MLD-Maus. Densitometrische Auswertung (ImageJ) der TLCs von Lipidextrakt aus Gehirn. In keiner der behandelten Gruppen konnte eine statistisch signifikante Veränderung des Verhältnisses von Sulfatid zu GalCer nachgewiesen werden. Eine Veränderung tritt theoretisch dann auf, wenn Sulfatid- und GalCer-Gehalt sich unabhängig voneinander verändern. Solange die Veränderung von Sulfatid- und GalCer-Gehalt gleichgerichtet ist, wie es im Zuge von De- und Remyelinisierung zu erwarten wäre, verändert sich das Verhältnis nicht. **(A)** Die tendenzielle Erhöhung des Sulf/GalCer-Quotienten nach Abschluss der zweiten Erholungsphase ($p = 0,06$) wurde in der ASA(+/-)-Maus durch den erniedrigten Gehalt von GalCer in CPZ-behandelten verglichen mit Mock-behandelten Mäusen hervorgerufen. **(B)** Das Verhältnis von Sulfatid zu GalCer war in ASA(-/-)-Mäusen aufgrund der Akkumulation von Sulfatid generell höher als in ASA(+/-)-Mäusen. Im zweiten Behandlungszyklus führte die CPZ-Behandlung im Gehirn der ASA(-/-)-Maus zu einer tendenziellen Erhöhung des Sulf/GalCer-Verhältnisses (2. Diät $p = 0,06$; 2. EP $p = 0,09$). Diese Erhöhung resultierte aus der Erniedrigung des GalCer-Gehalts bei gleichbleibendem Sulfatidgehalt. Die Anzahl der biologischen Replikate war pro Gruppe $N = 3$, außer in ASA(+/-), 2. Diät, CPZ ($N = 4$). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) sind alle mit einem Stern gekennzeichneten Vergleiche. Mit einem in Klammern gesetzten Stern gekennzeichnet sind nicht signifikante Veränderungen im Konfidenzintervall $0,05 < p \leq 0,10$. EP = Erholungsphase, GalCer = Galaktosylceramid, Sulf = Sulfatid. Quelle: (A) KBR-3-258-560, KBR-4-164-725, (B) KBR-4-200-742, KBR-4-155-721.

In **ASA(+/-)-Mäusen** war CPZ-induzierte Demyelinisierung bei wiederholter Behandlung über den Verlust von MBP und CNPase nachweisbar. Obwohl die Expression der Myelinproteine nach Abschluss der zweiten Erholungsphase nicht verändert war, Remyelinisierung also erfolgreich stattgefunden hatte, zeigte das Verhältnis von Sulfatid zu GalCer eine Tendenz zur Erhöhung gegenüber Mock-behandelten ASA(+/-)-Mäusen (Abbildung 63 A). Unter Berücksichtigung der in Abbildung 62 dargestellten Daten, war diese Tendenz zur **Erhöhung durch die Reduktion von GalCer bedingt**, während der Sulfatid-Gehalt im Gehirn CPZ-behandelter ASA(+/-)-Mäuse unverändert war.

In **ASA(-/-)-Mäusen** war CPZ-induzierte Demyelinisierung auf Ebene der Myelinproteine schon im ersten Behandlungszyklus nachgewiesen worden. Eine Veränderung des Verhältnisses von Sulfatid zu GalCer konnte in diesem Zeitraum nicht gemessen werden (Abbil-

dung 63 B), denn Sulfatid- und GalCer-Konzentration waren gleichermaßen verändert (Abbildung 62 C & D). Erst im zweiten Behandlungszyklus konnte sowohl nach Abschluss der Diät, als auch der Erholungsphase eine Tendenz zur Erhöhung des Sulf/GalCer-Quotienten beobachtet werden. Diese **Erhöhung resultierte aus der Hemmung der GalCer-Synthese**, während die Sulfatid-Synthese gegenüber Mock-behandelten Tieren unverändert war (Abbildung 62 C & D).

Es ist bekannt, dass Sulfatidspeicherung in ASA-defizienten Mäusen zu einer Reduktion von GalCer im Gehirn¹¹⁹ und auch im Myelin¹²⁰ führt, ohne dass der genaue Mechanismus hinter dieser Beobachtung aufgeklärt ist. Da der Effekt in CST-transgenen Mäusen deutlich stärker ist, scheint eine Konzentrationsabhängigkeit von Sulfatid zu bestehen. Es ist nicht auszuschließen, dass durch CPZ-induzierte Akkumulation von Speichermaterial weniger GalCer gebildet werden kann. Die Konzentration von GalCer im Gehirn der ASA(-/-)-Maus als Marker für den Myelinisierungszustand zu werten, ist demnach nicht unproblematisch.

4.7.2.1.2 CST-transgenes MLD-Mausmodell

Auch die dünnschichtchromatographische Analyse der Lipidextrakte aus dem Gehirn CST-transgener Mäuse, dargestellt untenstehend in Abbildung 64, ließ mit bloßem Auge nur wenige Rückschlüsse auf die Wirkung von CPZ auf die Lipidzusammensetzung des Gehirns zu.

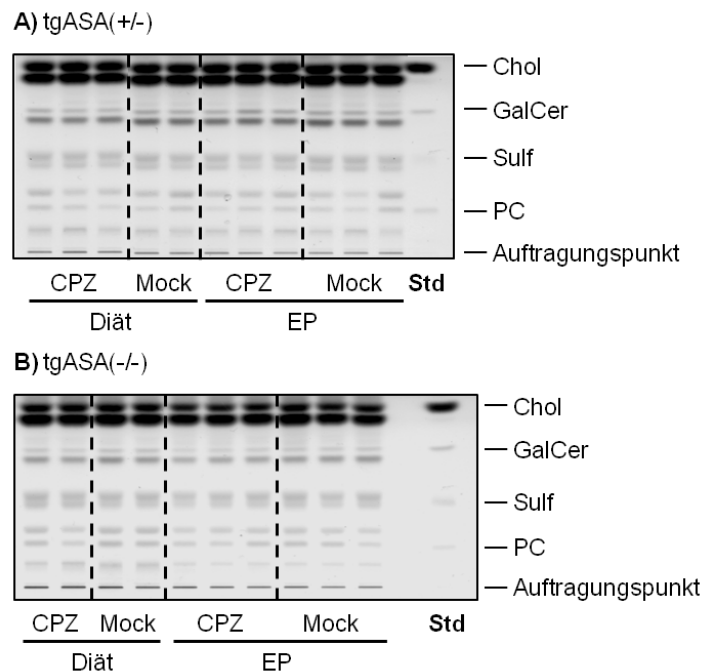


Abbildung 64: Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Lipidextrakt aus Gehirn CST-transgener MLD-Mäuse. Die Auftrennung erfolgte nach steigender Hydrophobie. Auftragungsmenge normiert auf den Gesamtproteingehalt des zur Lipidextraktion verwendeten Gewebehomogenats [= 80 µg]. **(A)** In tgASA(+/-)-Mäusen schien die Intensität der GalCer-Banden in der CPZ-behandelten Gruppe nach Abschluss der Diät reduziert, nach Abschluss der Erholungsphase war mit bloßem Auge kein Unterschied zu erkennen. **(B)** In tgASA(-/-)-Mäusen schien die Intensität der GalCer-Banden in der CPZ-behandelten gegenüber der Mock-

behandelten Gruppe dauerhaft reduziert. Chol = Cholesterol, GalCer = Galaktosylceramid, PC = Phosphatidylcholin, Std = Standard, Sulf = Sulfatid, PC = Phosphatidylcholin. Quelle: (A) KBR-4-123-699, (B) KBR-4-131-702.

Im Lipidextrakt aus dem Gehirn CPZ-behandelter tgASA(+/-)-Mäuse schien die Intensität der GalCer-Banden nach Abschluss der Diät reduziert, nach Abschluss der Erholungsphase war kein Unterschied zu erkennen. Im Lipidextrakt aus dem Gehirn tgASA(-/-)-Mäuse schien die Intensität der GalCer-Banden in der CPZ-behandelten gegenüber der Mock-behandelten Gruppe dauerhaft reduziert. Die unten stehende Abbildung 65 fasst die densitometrische Auswertung der TLC zusammen.

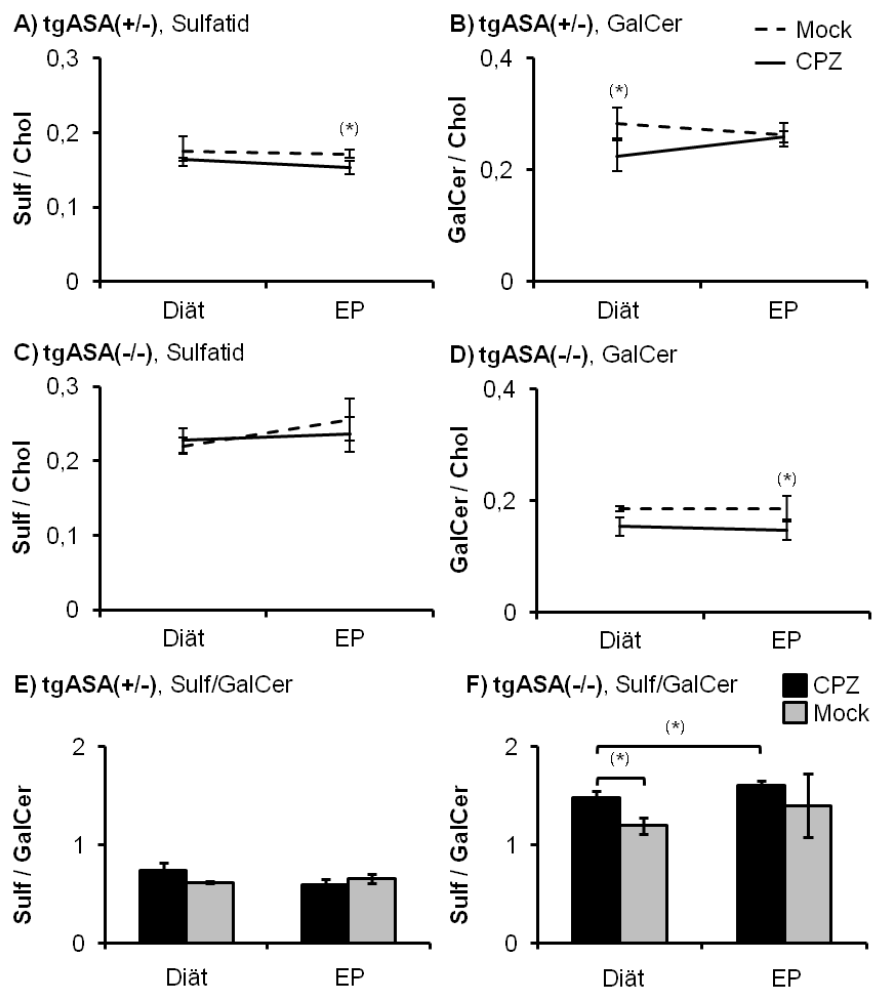


Abbildung 65: Einfluss von Genotyp und Cuprizon-Behandlung auf den relativen Gehalt von Sulfatid und Galaktosylceramid im Gehirn der CST-transgenen MLD-Maus. Densitometrische Auswertung (ImageJ) der TLCs von Lipidextrakt aus Gehirn. Insgesamt konnte im Zuge der CPZ-Behandlung keine statistisch signifikante Veränderung der Lipidzusammensetzung im Gehirn CST-transgener Mäuse gemessen werden. **(A)** Ein mit der Demyelinisierung einhergehender Verlust von Sulfatid war im Gehirn der tgASA(+/-)-Mäuse nach Abschluss der Diätphase nicht messbar. In Übereinstimmung mit dem visuellen Eindruck der TLC war **(B)** der GalCer-Gehalt nach Abschluss der Diätphase in CPZ- gegenüber Mock-behandelten Mäusen aber tendenziell erniedrigt. **(E)** Eine Veränderung des Verhältnisses von Sulfatid und GalCer war nicht nachzuweisen, eine dauerhafte Veränderung im Gehirn der CPZ-behandelten tgASA(+/-)-Maus kann ausgeschlossen werden. **(C)** Auch im Gehirn der tgASA(-/-)-Maus führte die CPZ-Behandlung zu keiner nachweisbaren Veränderung des Sulfatidgehalts, **(D)** der relative Gehalt an GalCer war nach Abschluss der Erholungsphase tendenziell erniedrigt. **(F)** Im Gegensatz zur tgASA(+/-)-Maus war das Verhältnis von Sulfatid zu GalCer im Gehirn der tgASA(-/-)-Maus nach Abschluss der Diätphase tendenziell erhöht. Die Anzahl der biologischen Replikate war pro Gruppe N = 3, außer in tgASA(+/-) Mock, tgASA(-/-) Mock und tgASA(-/-) CPZ. Für diese Gruppen war die Anzahl der biologischen Replikate N = 2.

Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. Mit einem in Klammern gesetzten Stern gekennzeichnet sind nicht signifikante Veränderungen im Konfidenzintervall $0,05 < p \leq 0,10$. EP = Erholungsphase, GalCer = Galaktosylceramid, Sulf = Sulfatid. Quelle: (A, B, E) KBR-4-123-699, (C, D, F) KBR-4-131-702.

Obwohl die densitometrische Auswertung der TLCs (Abbildung 65) mit dem visuellen Eindruck (Abbildung 64) korrelierte, konnten keine signifikanten Veränderungen im Lipidhaushalt des Gehirns CST-transgener Mäuse nachgewiesen werden. Die Unterschiede zwischen den biologischen Replikaten waren, wie im Zuge der Quantifizierung der Myelinproteine sehr groß. **Demyelinisierung, verbunden mit dem Verlust von Sulfatid und GalCer, konnte mittels Dünnschichtchromatographie im CST-transgenen MLD-Mausmodell nicht sicher nachgewiesen werden.**

Unter der Annahme, dass GalCer ein verlässlicher Marker für den Grad der Myelinisierung sei¹²¹, war die Remyelinisierung in tgASA(+/-)-Mäusen anscheinend vollständig. Dieser Eindruck wurde durch die Auswertung des **Quotienten von Sulfatid und GalCer** bestätigt, **der über den gesamten Behandlungszeitraum unverändert blieb** (Abbildung 65 E).

Obwohl das Fehlen statistisch signifikanter Unterschiede die Interpretation der Ergebnisse erschwerte, waren einige Parallelen zwischen konventionellen und CST-transgenen ASA(-/-)-Mäusen zu erkennen. Wie in konventionellen ASA(-/-)-Mäusen (Abbildung 62 A), stieg der Sulfatid-Gehalt im Gehirn CPZ-behandelter tgASA(-/-)-Mäuse (Abbildung 65 C) in der Erholungsphase weniger stark an (+4 %) als in Mock-behandelten Mäusen (+15 %). Diese Beobachtung kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass das akkumulierende Sulfatid in diesem Zeitraum hauptsächlich von Oligodendrozyten gebildet wurde. Außerdem war der Gehalt von GalCer (Abbildung 65 D) im Gehirn CPZ-behandelter tgASA(-/-)-Mäuse nach Abschluss der Erholungsphase tendenziell erniedrigt ($p = 0,08$). Möglicherweise war der Remyelinisierungsprozess beeinträchtigt bzw. die Synthese von GalCer durch die CPZ-induzierte Sulfatidspeicherung gehemmt.

Dass im Gehirn der tgASA(-/-)-Maus mehr Sulfatid-haltiges Speichermaterial gebildet wurde als in der konventionellen ASA(-/-)-Maus, konnte nicht direkt nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur konventionellen ASA(-/-)-Maus war das Verhältnis von Sulfatid zu GalCer im Gehirn der CPZ-behandelten tgASA(-/-)-Maus jedoch schon nach einmaliger Behandlung tendenziell erhöht ($p = 0,06$) und stieg während der Erholungsphase weiter an ($p = 0,08$). Unter der Annahme, die Reduktion des GalCer-Gehalts im Gehirn ASA-defizienter Mäuse korreliert mit der Menge des akkumulierenden Sulfatids, könnte diese Beobachtung als indirekter Hinweis für die vermehrte Akkumulation von Speichermaterial in der tgASA(-/-)-Maus interpretiert werden.

4.7.2.1.3 Fazit

Die Arbeitshypothese zur Quantifizierung der Lipide mittels Dünnschichtchromatographie umfasste zwei Ansätze:

- **ASA-defiziente Mäuse besitzen die uneingeschränkte Fähigkeit zur Remyelinisierung:** Sulfatid aus dem Myelin wird im Lysosom der Mikrogliazellen gespeichert und neues Myelin wird gebildet. Der Sulfatidgehalt im Gehirn CPZ-behandelter ASA(-/-)-Mäuse ist gegenüber Mock-behandelten Mäusen erhöht.
- **ASA-defiziente Mäuse besitzen keine Fähigkeit zur Remyelinisierung:** Sulfatid aus dem Myelin wird im Lysosom der Mikrogliazellen gespeichert, aber es wird kein neues Myelin gebildet. Der Sulfatid-Gehalt im Gehirn CPZ-behandelter ASA(-/-)-Mäuse ist Mock-behandelten Mäusen gegenüber unverändert, der GalCer-Gehalt erniedrigt.

Dass ASA-defiziente Mäuse die uneingeschränkte Fähigkeit zur Remyelinisierung besitzen, konnte mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, denn eine Erhöhung des Sulfatidgehalts in CPZ- gegenüber Mock-behandelten Mäusen war weder in der konventionellen (Abbildung 62 C), noch CST-transgenen MLD-Maus (Abbildung 65 C) nachzuweisen. Wahrscheinlich ist die Fähigkeit zur Remyelinisierung eingeschränkt, denn der GalCer-Gehalt war in ASA-defizienten Mäusen nach CPZ-Behandlung erniedrigt (Abbildung 62 D, Abbildung 65 D). Ob und in welchem Maße Remyelinisierung stattgefunden hatte, konnte über den GalCer-Gehalt nicht quantifiziert werden. Es ist nicht klar, ob die Akkumulation von Sulfatid-haltigem Speichermaterial einen hemmenden Effekt auf die Expression von GalCer hat und ob die Zusammensetzung des wiederhergestellten Myelins möglicherweise verändert ist.

Insgesamt hat sich gezeigt, dass die Dünnschichtchromatographie nicht dazu geeignet war De- und Remyelinisierung bzw. die Menge des gebildeten Speichermaterials genauer zu quantifizieren.

4.7.2.2 Massenspektrometrische Analyse

Die dünnschichtchromatographische Quantifizierung von Sulfatid und GalCer war, wie im vorangehenden Kapitel gezeigt, kein geeignetes Mittel zur Quantifizierung von CPZ-induzierter De- und Remyelinisierung, bzw. gebildetem Speichermaterial. Da das Verhältnis kurz- und langkettige Sulfatide zueinander einer altersabhängigen Regulation unterliegt, die mit der Reifung des Myelin korreliert (Abbildung 59), sollte überprüft werden, ob De- und Remyelinisierung im CPZ-Modell über die Quantifizierung der unterschiedlichen Sulfatid-Spezies abgebildet und quantifiziert werden können.

Das Verhältnis von C18:0- zu C24:1-Sulfatid im Lipidextrakt aus Gehirn wurde massenspektrometrisch bestimmt. Die Ergebnisse der Analysen aller behandelten Tiergruppen sind in der untenstehenden Abbildung 66 zusammengefasst.

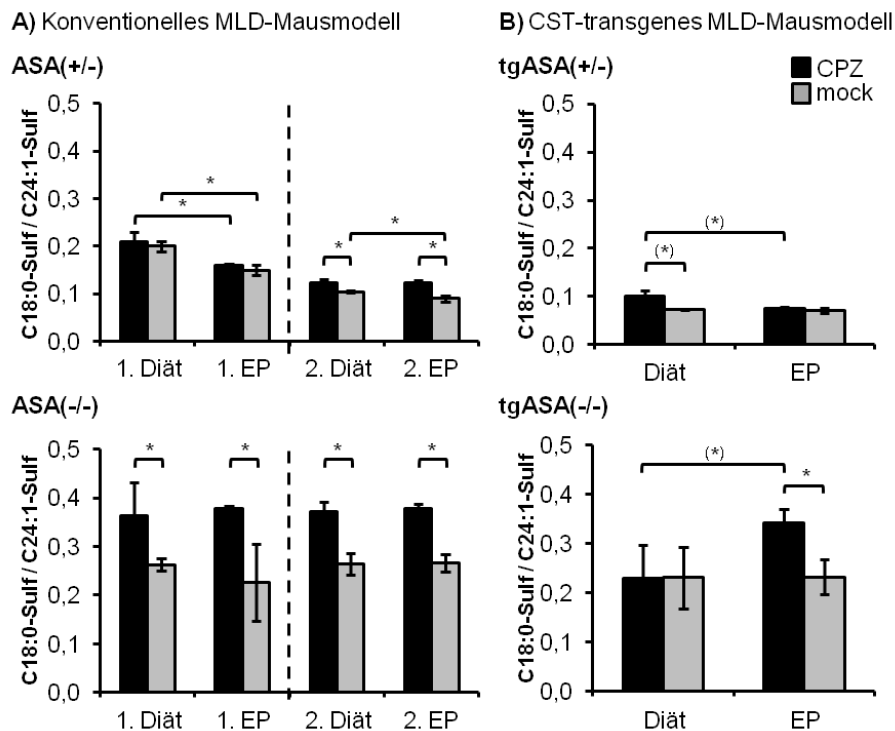


Abbildung 66: Einfluss von Genotyp und Cuprizon-Behandlung auf das Verhältnis von C18:0- zu C24:1-Sulfatid im Gehirn der Maus. (A) Im Gehirn der ASA(+/-)-Maus war eine mit steigendem Alter kontinuierliche Abnahme der C18/C24-Ratio zu beobachten. Während im ersten Behandlungszyklus kein Unterschied zwischen CPZ- und Mock-behandelten Mäusen nachweisbar war, führte die wiederholte Behandlung zu einer dauerhaften Erhöhung der Ratio in CPZ- gegenüber Mock-behandelten Mäusen. Im Gehirn der ASA(-/-)-Maus führte die Behandlung mit CPZ zu einer signifikanten Erhöhung der C18/C24-Ratio, die sich im Zuge der weiteren Behandlungsphasen nicht veränderte. Es war keine altersabhängige Veränderung des Sulfatid-Quotienten zu beobachten. (B) Im Gehirn der tgASA(+/-)-Maus war die C18/C24-Ratio nach Abschluss der Diätphase tendenziell erhöht ($p = 0,06$) und nahm im Zuge der Erholungsphase wieder ab ($p = 0,07$). Im Gegensatz zur konventionellen ASA(-/-)-Maus war im Gehirn CST-transgener ASA(-/-)-Mäuse erst nach Abschluss der Erholungsphase eine Erhöhung der C18/C24-Ratio detektierbar. Die Anzahl der biologischen Replikate war pro Gruppe $N = 3$, außer in tgASA(+/-) Mock, tgASA(-/-) Mock und tgASA(-/-) CPZ. Für diese Gruppen war die Anzahl der biologischen Replikate $N = 2$. Für ASA(+/-), 2. Diät, CPZ war $N = 4$. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. . Mit einem in Klammern gesetzten Stern gekennzeichnet sind nicht signifikante Veränderungen im Konfidenzintervall $0,05 < p \leq 0,10$. EP = Erholungsphase, Sulf = Sulfatid. Quelle: (A) KBR-3-185-495 & KBR-4-161-724; KBR-3-255-558 & KBR-4-145-714; (B) KBR-4-119-697; KBR-4-128-701.

4.7.2.2.1 Konventionelle MLD-Maus ASA(-/-)

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Voruntersuchungen zur altersbedingten Veränderung der Lipidzusammensetzung des Gehirns (Abbildung 58) konnte im Behandlungszeitraum zwischen 13. und 31. Lebenswoche im Gehirn der Mock-behandelten ASA(+/-)-Maus eine altersabhängige Abnahme des Verhältnisses von C18:0- zu C24:1-Sulfatid gemessen werden (Abbildung 66 A). Wie bereits beschrieben, resultiert diese Abnahme aus der Reifung des Gehirns, die mit der Reduktion kurzkettiger Sulfatide verbunden ist, während der Anteil langkettiger Sulfatide konstant bleibt.¹²²

Im ersten Behandlungszyklus hatte CPZ keinen Einfluss auf das Verhältnis von C18:0- zu C24:1-Sulfatid (Abbildung 66 A). Nach Wiederholung war das Verhältnis in CPZ-behandelten Mäusen sowohl nach Abschluss der Diät-, als auch Erholungsphase signifikant erhöht.

Die Erhöhung des Verhältnisses von C18:0- zu C24:1-Sulfatid kann theoretisch aus einem Anstieg der Konzentration von C18:0-, oder einer Abnahme der Konzentration von C24:1-Sulfatid resultieren. Um den CPZ-induzierten Effekt dahingehend genauer zu verstehen, wurden die einzelnen Signalintensitäten im Massenspektrum ausgewertet. Das Ergebnis der Auswertung ist in Abbildung 67 dargestellt.

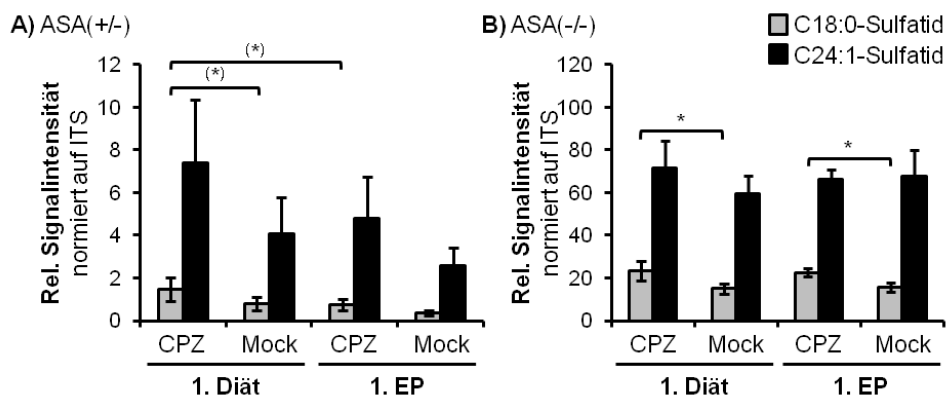


Abbildung 67: Cuprizon-induzierte Erhöhung der Konzentration von C18:0-Sulfatid im Gehirn der Maus. Normierung der absoluten Signalintensitäten auf den internen Standard (C12:0-Sulfatid). ITS in (A) 10fach höher konzentriert als in (B), daher Skalierung unterschiedlich. **(A)** Die Behandlung mit CPZ führte im Gehirn der ASA(+/-)-Maus zu einer tendenziellen Erhöhung der Konzentration von C18:0-Sulfatid, wahrscheinlich verbunden mit dem größeren Anteil unreifen Myelins. Nach Abschluss der Erholungsphase, wenn das Myelin ausgereift ist, war kein Unterschied zwischen CPZ- und Mock-behandelten Mäusen nachweisbar. Die Konzentration von C24:1-Sulfatid war konstant. **(B)** Die Behandlung mit CPZ führte im Gehirn der ASA(-/-)-Maus zu einer anhaltenden Erhöhung der Konzentration von C18:0-Sulfatid. Die Konzentration von C24:1-Sulfatid war konstant. Die Anzahl der biologischen Replikate war pro Gruppe N = 3. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. Mit einem in Klammern gesetzten Stern gekennzeichnet sind nicht signifikante Veränderungen im Konfidenzintervall $0,05 < p \leq 0,10$. EP = Erholungsphase, ITS = interner Standard. Quelle: (A) KBR-3-185-495; (B) KBR-3-255-558.

Die Analyse der Signalintensitäten (Abbildung 67) zeigte, dass Demyelinisierung nicht über den Verlust von C24:1-Sulfatid nachgewiesen werden konnte, das Marker des „reifen Myelins“ ist¹²³. Die CPZ-induzierte Erhöhung des Verhältnisses von C18:0- zu C24:1-Sulfatid resultierte sowohl in ASA(+/-)- (Abbildung 67 A), als auch ASA(-/-)-Mäusen (Abbildung 67 B) aus dem **Anstieg der Konzentration von C18:0-Sulfatid**.

Die spezifischen Funktion von C18:0-Sulfatid ist noch unbekannt, so dass über die molekularbiologischen Prozesse hinter dem CPZ-induzierten Anstieg der Konzentration von C18:0-Sulfatid nur spekuliert werden kann: Auf Basis der Arbeit von Moyano *et al.*¹²⁴, die den Einfluss des Alters auf den Anteil kurz- und langkettiger Sulfatide in den Lipid-Rafts des Gehirns untersucht haben, kann vermutet werden, dass langkettige Sulfatide mit den Lipid-Rafts des „reifen Myelins“ assoziiert sind. Kurz-kettige Sulfatide sind wahrscheinlich mit Lipid-Rafts

anderer Membranen oder des „unreifen Myelins“ assoziiert. Steigt die Konzentration von C18:0-Sulfatid im Gehirn, könnte dies auf die Produktion von „unreifem Myelin“ im Zuge der Remyelinisierung hinweisen.

4.7.2.2.1.1 Kontrollgruppe ASA(+/-)

Im Gehirn der ASA(+/-)-Maus war die CPZ-induzierte Erhöhung der Konzentration von C18:0-Sulfatid im ersten Behandlungszyklus nur als Tendenz zu detektieren (Abbildung 67 A) und nach Abschluss der Erholungsphase kein Unterschied zwischen CPZ- und Mock-behandelten Mäusen mehr festzustellen. **Die Remyelinisierung und Reifung des Myelins war anscheinend vollständig.** Im zweiten Behandlungszyklus blieb die Konzentration von C18:0-Sulfatid nach Abschluss der Erholungsphase signifikant erhöht (Daten nicht gezeigt: KBR-4-161-724). Remyelinisierung hatte anscheinend eingesetzt, aber die „Reifung“ des Myelins war zum Ende der Erholungsphase noch nicht abgeschlossen.

4.7.2.2.1.2 Konventionelle MLD-Maus ASA(-/-)

Im Zuge der CPZ-Behandlung konnte im Gehirn der ASA(-/-)-Maus keine altersbedingte Abnahme des Verhältnisses von C18:0- zu C24:1-Sulfatid (Abbildung 66 B) beobachtet werden. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der Voruntersuchungen (Abbildung 58). Der detaillierte Vergleich der dort gezeigten Daten mit den Ergebnissen des hier beschriebenen Experiments ergab jedoch, dass sich **die Zusammensetzung der Sulfatide im Gehirn der ASA(-/-)-Maus zwischen siebter und 13. Lebenswoche grundlegend änderte** (Daten nicht gezeigt: KBR-4-170-728, KBR-3-255-558): **Die Konzentration von C24:1-Sulfatid verdoppelte sich, so dass das Verhältnis von C18:0- zu C24:1-Sulfatid in diesem Zeitraum von $0,634 \pm 0,025$ auf $0,262 \pm 0,013$ abnahm.** Diese Beobachtung stützt die Hypothese, die primäre Myelinisierung der ZNS sei in ASA(-/-)-Mäusen zu Beginn der CPZ-Behandlung noch nicht abgeschlossen.

Die Behandlung mit CPZ führt im Gehirn der ASA(-/-)-Maus zu einer signifikanten Erhöhung der Konzentration von C18:0-Sulfatid (Abbildung 67 B) und dementsprechend zu einer Erhöhung des Verhältnisses von C18:0- zu C24:1-Sulfatid (Abbildung 66 B). **Remyelinisierung setzte also ein.** Im Gegensatz zur ASA(+/-)-Maus (Abbildung 67 A) nahm die Konzentration von C18:0-Sulfatid aufgrund der fehlenden Fähigkeit zum Abbau während der Erholungsphase aber nicht ab, sondern blieb konstant. **Ob reifes Myelin gebildet wurde, konnte daher anhand des Massenspektrums nicht bestimmt werden.**

Bei Wiederholung der CPZ-Behandlung stieg die Konzentration von C18:0-Sulfatid nicht weiter an (Daten nicht gezeigt: KBR-4-145-714), so dass das Verhältnis von C18:0- zu

C24:1-Sulfatid in CPZ-behandelten Mäusen konstant blieb. **Im zweiten Behandlungszyklus wurde kein neues C18:0-Sulfatid gebildet. Remyelinisierung hatte nicht oder in nicht nachweisbarem Umfang stattgefunden.**

4.7.2.2.2 CST-transgenes MLD-Mausmodell

4.7.2.2.2.1 Kontrollgruppe tgASA(+/-)

Dass der Lipidhaushalt der tgASA(+/-)-Maus im Vergleich zur konventionellen ASA(+/-)-Maus verändert ist, wurde bereits berichtet¹²⁵, ist aber nie Gegenstand genauerer Untersuchungen gewesen. Die massenspektrometrische Analyse der Sulfatide im Zuge dieser Arbeit lieferte neue Hinweise auf einen Einfluss des CST-Transgens auf den Lipidstoffwechsel der tgASA(+/-)-Maus: Anders als im Gehirn der ASA(+/-)-Maus, war in den sechs Wochen zwischen Abschluss der Diät- und der Erholungsphase im Gehirn der Mock-behandelten tgASA(+/-)-Maus keine altersbedingte Reduktion des Verhältnisses von C18:0- zu C24:1-Sulfatid nachzuweisen (Abbildung 66 C). **Im Vergleich zur konventionellen ASA(+/-)-Maus war die Konzentration von C24:1-Sulfatid im Gehirn der tgASA(+/-)-Maus erhöht** (Daten nicht gezeigt: KBR-3-185-495, KBR-4-119-697). Ob und welchen Einfluss diese Veränderung des Lipidhaushalts in der tgASA(+/-)-Maus auf den Myelinhaushalt im Gehirn hat, bleibt zu erforschen.

Die Behandlung mit CPZ führte im Gehirn der tgASA(+/-)-Maus zu einer nicht signifikanten ($p = 0,06$) Erhöhung des C18:0-/C24:1-Sulfatid-Quotienten. Da die dünnschichtchromatographische Analyse des Lipidextrakts zum selben Zeitpunkt gezeigt hatte, dass der Gehalt von GalCer tendenziell erniedrigt war (Abbildung 64), kann vermutet werden, dass Demyelinisierung stattgefunden hatte und der Remyelinisierungsprozess einsetzte. Während der Erholungsphase schritt die Remyelinisierung fort und die Konzentration von C18:0-Sulfatid nahm bei gleichbleibender Konzentration von C24:1-Sulfatid ab (Daten nicht gezeigt: KBR-4-199-697), so dass nach Abschluss der Erholungsphase kein Unterschied zwischen CPZ- und Mock-behandelten tgASA(+/-)-Mäusen mehr detektiert werden konnte. **Obwohl der Lipidstoffwechsel in der tgASA(+/-)-Maus gegenüber der konventionellen ASA(+/-)-Maus verändert zu sein scheint, war der Remyelinisierungsprozess im Zuge der CPZ-Behandlung nicht beeinträchtigt.** Die erhöhte Sulfatidsynthese scheint keinen hemmenden Effekt auf den Remyelinisierungsprozess zu haben.

4.7.2.2.2.2 CST-transgene MLD-Maus tgASA(-/-)

Anders als in der tgASA(+/-)-Maus war das Verhältnis von C18:0- zu C24:1-Sulfatid im Gehirn der tgASA(-/-)-Maus ($0,231 \pm 0,063$) gegenüber der konventionellen ASA(-/-)-Maus

($0,262 \pm 0,013$) unverändert (Abbildung 66 A & B). **Das CST-Transgen erhöht die Expression aller Sulfatidspezies in der tgASA(-/-)-Maus gleichermaßen und hat keinen Einfluss auf das Verhältnis der einzelnen Sulfatidspezies zueinander.**

Überraschenderweise war die Reaktion auf die Behandlung mit CPZ in CST-transgenen und konventionellen ASA(-/-)-Mäusen nicht identisch, denn eine Erhöhung des C18:0/C24:1-Quotienten war in tgASA(-/-)-Mäusen erst nach Abschluss der Erholungsphase zu beobachten. Die Analyse der Signalintensitäten zeigte eine entsprechende Zunahme von C18:0-Sulfatid zwischen Abschluss der Diät- und der Erholungsphase bei gleichbleibender Signalintensität von C24:1-Sulfatid (Daten nicht gezeigt: KBR-4-128-701). Es ist nicht auszuschließen, dass eine Veränderung des C18:0/C24:1-Quotienten schon nach Abschluss der Diät-Phase vorlag, aber aufgrund der großen Standardabweichungen und der geringen Gruppengröße ($N = 2$) nicht nachgewiesen werden konnte. Andererseits ist auch denkbar, dass der Remyelinisierungsprozess in tgASA(-/-)-Mäusen gegenüber ASA(-/-)-Mäusen tatsächlich verlangsamt abläuft, denn Sulfatid hat einen hemmenden Effekt auf die Differenzierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen^{126,127}. Da die Quantifizierung der Myelinproteine kaum verwertbare Daten ergeben hat, kann keine der Hypothesen bestätigt oder widerlegt werden.

Nach Abschluss der Erholungsphase war der C18:0/C24:1-Quotient sowie die Konzentrationen der untersuchten Sulfatidspezies im Gehirn CPZ-behandelter tgASA(-/-)- ($0,342 \pm 0,028$) und ASA(-/-)-Mäuse ($0,379 \pm 0,004$) nicht signifikant unterschiedlich. Wie auch die AZB-Färbung vermuten lassen hatte (Abbildung 48 A & C, Abbildung 50 C & D), **konnte kein Hinweis darauf erbracht werden, dass im Zuge der CPZ-Behandlung im Gehirn der tgASA(-/-)-Maus mehr Sulfatid akkumulierte als im konventionellen Mausmodell.** Möglicherweise war ein Unterschied vorhanden¹²⁸, lag aber unterhalb der Nachweisgrenze der angewendeten Methode.

4.7.2.2.3 Fazit

Ziel der massenspektrometrischen Analyse war gewesen, De- und Remyelinisierung nachzuweisen und gegebenenfalls zu quantifizieren. Obwohl Demyelinisierung über den Verlust von C24:1-Sulfatid nicht nachzuweisen war, **konnte das Einsetzen der Remyelinisierung über die Erhöhung des Anteils von C18:0-Sulfatid in allen einfach behandelten Mäusen detektiert werden.**

Die „Reifung“ des Myelins war in konventionellen und CST-transgenen ASA(+/-)-Mäusen, wie von Isaac et al. postuliert¹²⁹, durch die Abnahme der Konzentration von C18:0-Sulfatid (Abbildung 67 A) und somit des Verhältnisses von C18:0- zu C24:1-Sulfatid (Abbildung 66 A) gekennzeichnet. Da Sulfatid in ASA-defizienten Mäusen nicht abgebaut werden kann, blieb die Konzentration von C18:0-Sulfatid nach Behandlung mit CPZ nach Abschluss der Erho-

lungsphase erhöht (Abbildung 67 B). Remyelinisierung hatte eingesetzt, aber es konnte nicht beurteilt werden, ob und in welchem Maße „Reifung“, verbunden mit der Abnahme von C18:0-Sulfatid, stattgefunden hatte.

Die Wiederholung der CPZ-Diät führte in ASA(+/-)-Mäusen zu einer anhaltenden Erhöhung der Konzentration von C18:0-Sulfatid. Remyelinisierung hatte eingesetzt, aber die „Reifung“ des Myelins war beeinträchtigt. In ASA(-/-)-Mäusen führte die Wiederholung der CPZ-Behandlung zu keiner nachweisbaren Erhöhung der Konzentration von C18:0-Sulfatid. **Remyelinisierung konnte in wiederholt behandelten ASA(-/-)-Mäusen nicht nachgewiesen werden.**

4.8 Immunologische Antwort auf Cuprizone-induzierte Demyelinisierung

Die angeborene Immunantwort ist wichtiger Bestandteil des Remyelinisierungsprozesses. Insbesondere die Aktivierung von Astrozyten, residenten Mikrogliazellen sowie peripheren Makrophagen unter Phagozytose der Myelintrümmer ist notwendig, damit Oligodendrozyten differenzieren und Läsionen remyelinisieren können.¹³⁰ Da Sulfatid auch immunmodulatorische Eigenschaften hat¹³¹, sollte im Zuge dieser Arbeit überprüft werden, ob die Immunantwort in ASA-defizienten Mäusen verändert ist und die Remyelinisierungseffizienz beeinflusst.

4.8.1 Astroglie

Bei Schädigung des ZNS durch Verletzung, Toxine oder Infektion könnten Astrozyten in einen reaktiven Zustand wechseln, der als Astroglie bezeichnet wird. Reaktive Astrozyten sekretieren eine Reihe von sowohl proinflammatorischen (IL-1 β , IL-6, TNF α)¹³², als auch antiinflammatorischen (IL-10, TGF- β)¹³³ Zytokinen und können negativen oder positiven Einfluss auf regenerative Prozesse im ZNS ausüben. Durch Narbenbildung verhindern Astrozyten außerdem die Ausbreitung von Gewebeschäden. Im CPZ-Modell ist die Rekrutierung der Mikrogliazellen und Makrophagen von einer vorangehenden Aktivierung der Astrozyten abhängig¹³⁴, die Astroglie hat also einen positiven Effekt auf den Remyelinisierungsprozess.

Die Entstehung einer Astroglie ist ein empfindlicher Marker für neuropathologische Veränderungen, der oft schon vor der Entwicklung eines neurologischen Symptomes detektierbar ist. Charakteristisch für den reaktiven Zustand der Astrozyten ist, neben Proliferation und Veränderung der Morphologie, die vermehrte Expression des Sauren Glialfaserproteins (GFAP). Die Immundetektion von GFAP und die Analyse der Zellmorphologie sind daher die gängigsten Mittel zur Detektion einer Astroglie.

In der ASA(-/-)-Maus ist mit steigendem Alter die Entwicklung einer endogenen Astrogliose zu beobachten, deren Auslöser und Konsequenzen aber nicht näher untersucht sind.¹³⁵ Da Astrozyten in der ASA(-/-)-Maus ebenfalls von Sulfatidspeicherung betroffen sind, kann eine direkte Verbindung zwischen Sulfatid-Akkumulation und Zell-Aktivierung nicht ausgeschlossen werden. Ob die CPZ-induzierte Aktivierung der Astrozyten in ASA-defizienten Mäusen einer Sulfatid-abhängigen Verstärkung unterliegt und ob diese Einfluss auf die Remyelinisierungseffizienz hat, soll in den folgenden Abschnitten beantwortet werden.

4.8.1.1 GFAP-Immunfluoreszenzfärbung

Die qualitative Untersuchung der CPZ-induzierten Astrogliose erfolgte mittels IF-Färbung von GFAP. Die Ergebnisse der IF-Färbungen aller behandelten Tiergruppen sind in den Abbildung 68 und 69 zusammengefasst.

4.8.1.1.1 Konventionelles MLD-Mausmodell

Eine Astrogliose ist durch die Vermehrung GFAP-positiver Zellen mit hypertropher Zellmorphologie definiert. Die IF-Färbung von GFAP zeigte entsprechend dieser Definition, dass die Behandlung mit CPZ, unabhängig vom Genotyp der Maus, zur Ausbildung einer Astrogliose in den Bereichen des Gehirns führte, in denen zuvor auch Demyelinisierung nachgewiesen worden war (Abbildung 68 A & E, Abbildung 69 A & C).

Die Astrogliose ist einer der frühesten Marker für Demyelinisierung im CPZ-Modell und korreliert in ihrer Intensität mit dem Grad der Demyelinisierung.¹³⁶ **Nach einem Intensitäts-Maximum zum Ende der Diätphase, wenn auch die Demyelinisierung maximal ist, bleibt die Astrogliose, im Gegensatz zur transienten Aktivierung der Mikrogliazellen, auch bei Fütterung mit Haltdiät über mehrere Wochen erhalten.**

Im Vergleich zwischen ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäusen fiel vor allem auf, dass die Astrogliose im Gehirn der ASA(+/-)-Maus nach Abschluss der Erholungsphase des ersten Behandlungszyklus nahezu abgeklungen war (Abbildung 68 B). Anders im CC der ASA(-/-)-Maus, denn dort verblieben eine Vielzahl von Astrozyten im aktivierten Zustand (Abbildung 68 F).

Unter Berücksichtigung der bereits gezeigten Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die Remyelinisierung im Gehirn der ASA(-/-)-Maus zu diesem Zeitpunkt nicht vollständig war. An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob die anhaltende Astrogliose Resultat oder Auslöser des Fehlschlagens der Remyelinisierung war. Es ist nicht auszuschließen, dass die CPZ-induzierte Demyelinisierung in der ASA(-/-)-Maus zur vermehrten Speicherung von Sulfatid in den Astrozyten¹³⁷ führte und so zur anhaltenden Aktivierung der Zellen beitrug. Die Frage nach der Ursache für die anhaltende Aktivierung der Astrozyten kann nicht beantwortet werden. Im CPZ-Modell ist Astrogliose notwendig, um den Remyelinisierungsprozess

einzuweisen. Durch Sekretion des Chemokins CXCL10 werden Mikrogliazellen in die Läsion rekrutiert, um Myelintrümmer abzubauen und so die Differenzierung von OVZ zu myelinisierenden Oligodendrozyten zu ermöglichen.¹³⁸ Auch die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins TNF α unterstützt die Proliferation der OVZ sowie die Remyelinisierung.¹³⁹ Die anhaltende Astroglie in der ASA(-/-)-Maus muss also nicht zwingend eine hemmende Wirkung auf den Remyelinisierungsprozess haben. **Ohne das genaue Wissen, welche Zytokine nach CPZ-Behandlung im Gehirn der ASA(-/-)-Maus exprimiert werden, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden, ob und wie die anhaltende Astroglie in ASA(-/-)-Mäusen die Remyelinisierung beeinflusst.**

Auch bei wiederholter Behandlung mit CPZ entwickelten ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäuse eine Astroglie (Abbildung 68 C & G), wobei diese in der ASA(+/-)-Maus (Abbildung 68 C) deutlich schwächer ausgeprägt war als im ersten Behandlungszyklus (Abbildung 68 A). Diese Beobachtung korrelierte mit den Daten von Wang *et al.*, die im Zuge der CPZ-Behandlung mit steigendem Alter eine Abnahme reaktiver Astrozyten im CC der Maus beobachtet hatten.¹⁴⁰ Dass in der ASA(-/-)-Maus keine altersbedingte Reduktion der CPZ-induzierten Astroglie zu beobachten war (Abbildung 68 G), könnte der über die Erholungsphase des ersten Behandlungszyklus hinaus anhaltenden Aktivierung der Astrozyten geschuldet sein.

Die in Kapitel 4.7.2.2 gezeigte Quantifizierung kurz- und langkettiger Sulfatide hatte ergeben, dass die Remyelinisierung im zweiten Behandlungszyklus in ASA(+/-)-Mäusen und ASA(-/-)-Mäusen nicht vollständig war (Abbildung 66 A). Zugleich blieb die Intensität der IF-Färbung von GFAP nach Abschluss der zweiten Erholungsphase, unabhängig vom Genotyp, in CPZ-behandelten Mäusen erhöht. **Dass ein Zusammenhang zwischen Astroglie und Myelinisierung besteht, scheint wahrscheinlich, auch wenn dessen Natur im Zuge dieser Arbeit nicht näher bestimmt werden konnte.**

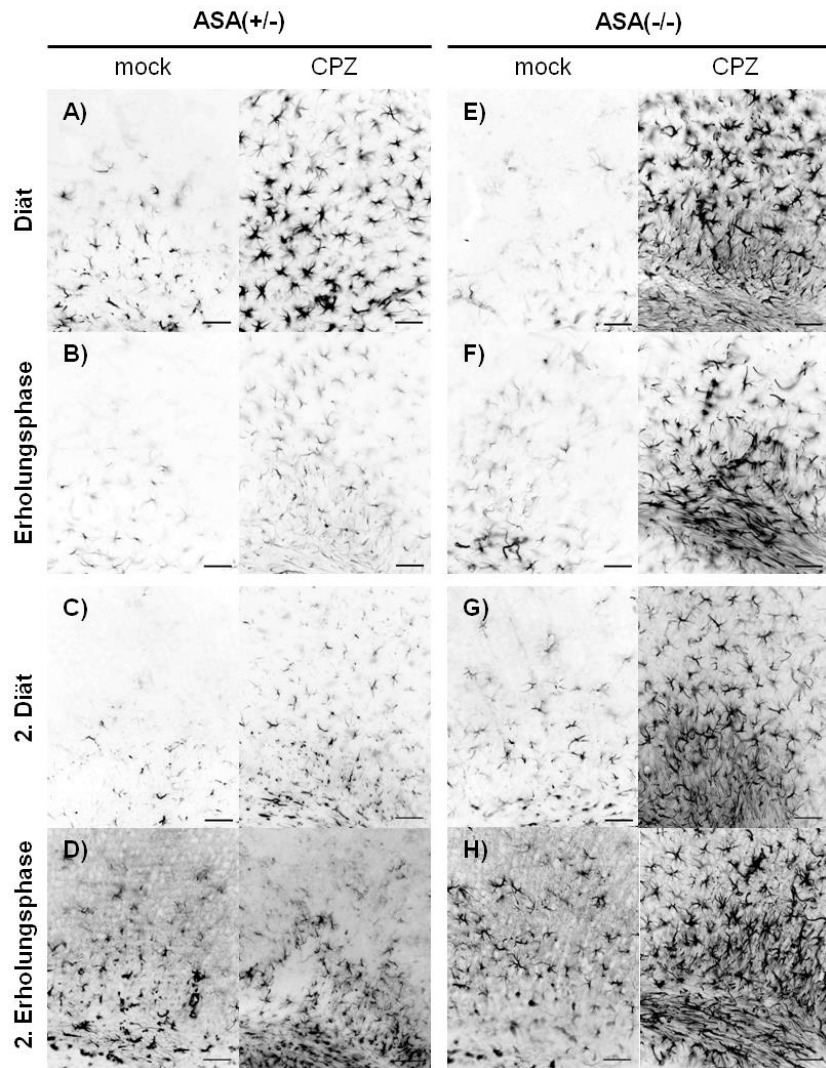


Abbildung 68: Cuprizin-induzierte Astrogliose im konventionellen MLD-Mausmodell. IF-Färbung von GFAP. Fluoreszenzaufnahme von CC und Kortex im roten Kanal (590 nm). Astrogliose ist definiert durch Zunahme der Anzahl GFAP-positiver Zellen sowie der Färbungsintensität der einzelnen Zellen. Unabhängig vom Genotyp (**A, E**) war die CPZ-induzierte Demyelinisierung begleitet durch Astrogliose. Nach Abschluss der Erholungsphase war in der ASA(+/-)-Maus keine Astrogliose mehr vorhanden (**B**), die Remyelinisierung vollständig. Im CC der ASA(-/-)-Maus hingegen blieb eine große Zahl stark gefärbter Astrozyten zurück (**F**), denn die Remyelinisierung war nicht vollständig. Die wiederholte Behandlung mit CPZ induzierte erneut Astrogliose in den demyelinisierten Bereichen des Gehirns (**C, G**). Im Vergleich mit dem ersten Behandlungszyklus (**A**) schien die Reaktion in der ASA(+/-)-Maus (**C**) jedoch deutlich schwächer. Nach Abschluss der zweiten Erholungsphase blieb die GFAP-Färbung sowohl in CPZ-behandelten ASA(+/-)- (**D**), als auch ASA(-/-)-Mäusen (**H**) gegenüber der Mock-behandelten Kontrolle verstärkt. Es war gezeigt worden, dass die Remyelinisierung im zweiten Behandlungszyklus in beiden Gruppen nicht vollständig war. Die Belichtungszeit war für alle Aufnahmen gleich. Die Bildbearbeitung erfolgte mit Adobe-Photoshop: Zur Verbesserung der Kontrastwahrnehmung wurden die Kanal-Aufnahmen in Schwarz-Weiß-Abbildungen konvertiert und dann invertiert. Bearbeitung für alle Bilder gleich. Die Maßstabebalken entsprechen 50 μm . Quelle: (A) KBR-2-224-304, KBR-2-199-282, (B) KBR-2-279-345, KBR-2-224-304, (C) KBR-4-246-550, KBR-3-207-515, (D) KBR-4-138-709, KBR-4-150-719, (E) KBR-3-69-414, KBR-2-270-339, (F) KBR-3-56-403, KBR-3-4-356, (G) KBR-3-246-550, KBR-3-268-570, (H) KBR-4-138-709, KBR-4-138-709.

4.8.1.1.2 CST-transgenes MLD-Mausmodell

Abbildung 69 zeigt die IF-Färbung von GFAP auf Gewebeschnitten CST-transgener Mäuse.

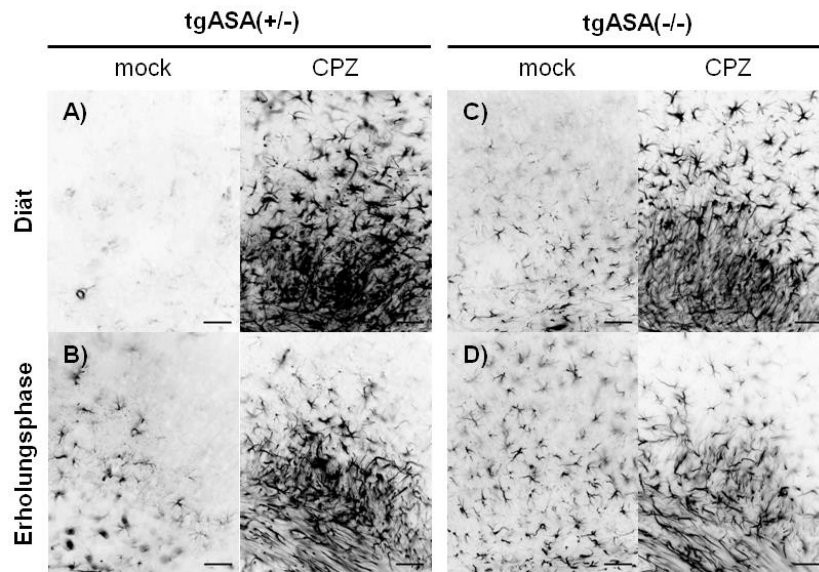


Abbildung 69: Cuprizon-induzierte Astrogliose im CST-transgenen MLD-Mausmodell. IF-Färbung von GFAP. Fluoreszenzaufnahme von CC und Kortex im roten Kanal (590 nm). **(A, C)** Die Behandlung mit CPZ führte in Bereichen der Demyelinisierung zu einer Vermehrung der GFAP-positiven Zellen bei steigender Färbungsintensität der einzelnen Zelle. **(B, D)** Nach Abschluss der Erholungsphase nahm die Intensität der Färbung ab, blieb aber im Vergleich zur Mock-behandelten Kontrolle deutlich erhöht. Die Belichtungszeit war für alle Aufnahmen gleich. Die Bildbearbeitung erfolgte mit Adobe-Photoshop: Zur Verbesserung der Kontrastwahrnehmung wurden die Kanal-Aufnahmen in Schwarz-Weiß-Abbildungen konvertiert und dann invertiert. Bearbeitung für alle Bilder gleich. Maßstabsbalken entsprechen 50 µm. Quelle: (A) KBR-2-168-265, KBR-2-237-317, (B) KBR-4-32-626, KBR-2-279-345, (C) KBR-3-246-550, KBR-3-134-463, (D) KBR-3-246-550, KBR-3-200-506.

Wie im konventionellen MLD-Mausmodell, induzierte die Behandlung mit CPZ Astrogliose in den von Demyelinisierung betroffenen Bereichen, darunter CC und Kortex (Abbildung 69 A & C). Sowohl in tgASA(+/-)-, als auch in tgASA(-/-)-Mäusen nahm die Intensität der GFAP-Färbung während der Erholungsphase ab, war nach Abschluss der Erholungsphase gegenüber den Mock-behandelten Kontrollen aber immer noch deutlich erhöht (Abbildung 69 B & D).

Was genau die Aktivierung der Astrozyten im Zuge der CPZ-Diät induziert, ist nicht erforscht. Wahrscheinlich führt die Apoptose der Oligodendrozyten zur Freisetzung von Zellbestandteilen, z. B. Sulfatid, in die extrazelluläre Matrix. Astrozyten und Mikrogliazellen binden diese Zellbestandteile über entsprechende Rezeptoren und reagieren mit Aktivierung.

Ginge man davon aus, dass die resultierende Speicherung von Sulfatid im Lysosom des Astrozyten Ursache für die anhaltende Astrogliose in der ASA(-/-)-Maus ist (Abbildung 68 F), stünden die Ergebnisse der GFAP-Färbung in CST-transgenem und konventionellem MLD-Mausmodell im Widerspruch, denn im Gehirn der tgASA(+/-)-Maus akkumulierte kein Speichermaterial (Abbildung 50 A & B), war die Astrogliose nach Abschluss der Erholungsphase aber nicht abgeheilt (Abbildung 69 B).

Jeon *et al.* haben gezeigt, dass die aktivierende Wirkung von extrazellulärem Sulfatid auf Astrozyten und Mikrogliazellen konzentrationsabhängig ist.¹⁴¹ **Wahrscheinlicher ist daher, dass nicht die Speicherung von Sulfatid im Lysosom, sondern die Konzentration des extrazellulär lokalisierten Sulfatids entscheidend für den Grad der Zellaktivierung ist.** Die Sulfatidkonzentration im Myelin ASA-defizienter Mäuse ist erhöht¹⁴², so dass bei CPZ-induzierter Apoptose der Oligodendrozyten im Gehirn ASA-defizienter Mäuse vermutlich mehr Sulfatid in die extrazelluläre Matrix übergeht als in ASA(+/-)-Mäusen und so zu einer verstärkten Aktivierung von Astrozyten und Mikrogliazellen führt.

Die massenspektrometrische Analyse der Sulfatide hatte ergeben, dass das Verhältnis von C18:0- zu C24:1-Sulfatid im Gehirn der tgASA(+/-)-Maus gegenüber der ASA(+/-)-Maus erhöht war (Abbildung 66 B). Diese Erhöhung resultierte aus der vermehrten Expression von C24:1-Sulfatid im Gehirn der tgASA(+/-)-Maus (Daten nicht gezeigt: KBR-3-185-495, KBR-4-119-697). Auch Ramakrishnan *et al.* hatten zeigen können, dass die Überexpression der CST in der tgASA(+/-)-Maus zu einer schwachen Erhöhung der Sulfatidkonzentration im Myelin führt.¹⁴³ **Es ist also nicht auszuschließen, dass die Konzentration von extrazellulärem Sulfatid während der Behandlung mit CPZ im Gehirn der tgASA(+/-)-Maus stärker anstieg als in der konventionellen ASA(+/-)-Maus und so zu einer verstärkten bzw. länger anhaltenden Aktivierung von Astrozyten und Mikrogliazellen führte.**

4.8.1.2 Quantifizierung von GFAP in „Western Blot“-Verfahren

Da die IF-Färbung von GFAP nur Informationen über einen Ausschnitt des Gehirns lieferte, die CPZ-induzierte Astroglieose sich aber über das gesamte Gehirn erstreckt, wurde die durchschnittliche Proteinexpression von GFAP im Gehirn mittels WB-Verfahren quantifiziert. Die hier angegebenen Proteinexpressionslevel sind Relativwerte bezogen auf die Expression von α -Tubulin und verstehen sich als Mittelwert der biologischen Replikate.

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden alle Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von bis zu 5 % ($p \leq 0,05$) bezeichnet. Als Tendenz sei hier eine Irrtumswahrscheinlichkeit bis zu 5 % über dem Signifikanzniveau ($0,05 < p \leq 0,10$) definiert.

Da GFAP das Hauptintermediärfilament des reifen Astrozyten ist, steigt die Proteinexpression von GFAP im Zuge der schnellen Synthese von Intermediärfilamenten nach Verletzung oder Infektion während der Astroglieose stark an.¹⁴⁴ Das theoretische Molekulargewicht von GFAP liegt bei 49,8 kDa (Abbildung 70). Insgesamt konnten im Gehirn der Maus sechs

Spleißvarianten identifiziert werden, deren Expressionslevel altersunabhängig in konstantem Verhältnis zueinander stehen.¹⁴⁵

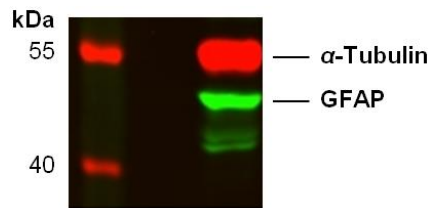


Abbildung 70: Immundetektion von GFAP im „Western-Blot“-Verfahren. Auftrennung im 7,5%igen Polyacrylamid-Gel. Detektion mittels IR-Scanner. Proteinstandard und α -Tubulin detektiert bei $\lambda = 680$ nm (rot dargestellt), GFAP bei $\lambda = 800$ nm (grün dargestellt). Quelle: KBR-3-233-535.

4.8.1.2.1 Konventionelles MLD-Mausmodell

4.8.1.2.1.1 Kontrollgruppe ASA(+/-)

Die Ergebnisse der Quantifizierung von GFAP im Gehirn der ASA(+/-)-Maus sind untenstehend in Abbildung 71 zusammengefasst und stimmen mit der zuvor gezeigten IF-Färbung von GFAP (Abbildung 68 A-D) überein.

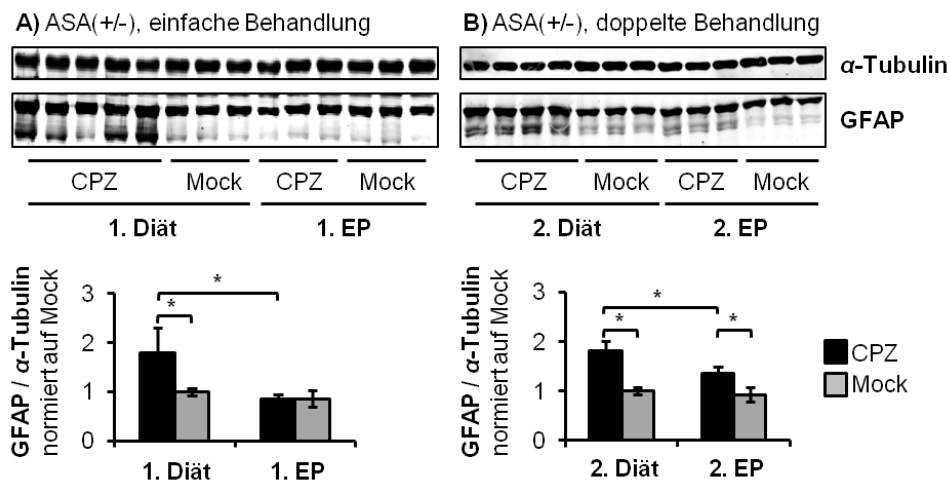


Abbildung 71: Relative Proteinexpression von GFAP im Gehirn der ASA(+/-)-Maus. Darstellung der Proteinbanden im WB, Auftrennung entsprechend Abbildung 70. Die densitometrische Auswertung zeigte, dass die CPZ-Behandlung sowohl im ersten (A), als auch zweiten Behandlungszyklus (B) eine deutliche Erhöhung der Proteinexpression von GFAP induzierte. Während im ersten Behandlungszyklus nach Abschluss der Erholungsphase kein Unterschied zwischen Mock- und CPZ-behandelten Mäusen mehr vorhanden war, blieb die relative Expression von GFAP in CPZ-behandelten Mäusen zum Ende des zweiten Behandlungszyklus erhöht. Die Remyelinisierung war im zweiten Behandlungszyklus weniger vollständig. Die Darstellungen wurden auf das relative Expressionslevel in Mock-behandelten Mäusen normiert. Die Anzahl der biologischen Replikate war pro Gruppe $N = 3$, außer in 1. Diät/CPZ ($N = 5$) und 2. Diät/CPZ ($N = 4$). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. Mit einem in Klammern gesetzten Stern gekennzeichnet sind nicht signifikante Veränderungen im Konfidenzintervall $0,05 < p \leq 0,10$. Quelle: KBR-3-261-563, KBR-4-159-723.

Im Zuge der CPZ-induzierten Astroglieose war sowohl im ersten, als auch zweiten Behandlungszyklus ein signifikanter Anstieg der Proteinexpression von GFAP (Abbildung 71 A & B) nachzuweisen. Während die Proteinexpression von GFAP im ersten Behandlungszyklus

nach Abschluss der Erholungsphase wieder auf Mock-Niveau sank (Abbildung 71 A), blieb sie nach Abschluss des zweiten Behandlungszyklus erhöht (Abbildung 71 B)..

4.8.1.2.1.2 Konventionelle MLD-Maus ASA(-/-)

Die Analyse der Proteinexpression von GFAP im Gehirn der ASA(-/-)-Maus ist untenstehend in Abbildung 72 dargestellt.

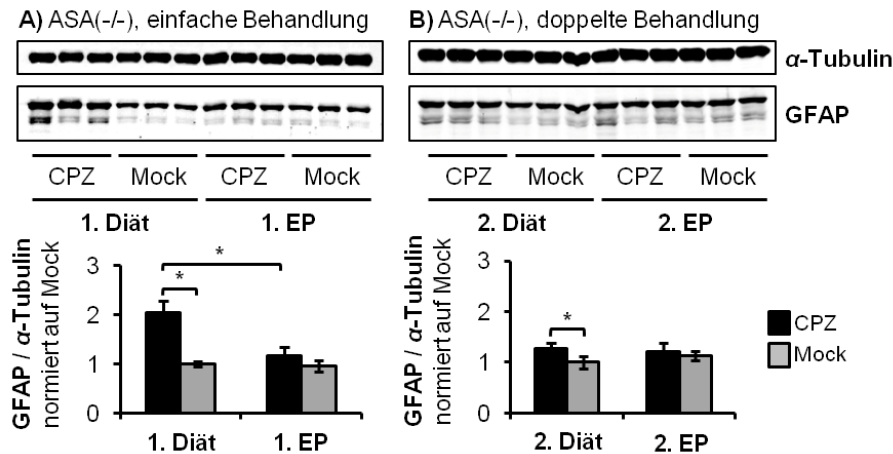


Abbildung 72: Relative Proteinexpression von GFAP im Gehirn der ASA(-/-)-Maus. Darstellung der Proteinbanden im WB, Auftrennung entsprechend Abbildung 70. **(A)** Die densitometrische Auswertung des WB zeigte eine CPZ-induzierte Verdopplung der relativen GFAP-Expression im ersten Behandlungszyklus. Während der Erholungsphase sank die relative Expression auf Mock-Niveau, so dass nach Abschluss der Erholungsphase kein Unterschied mehr festzustellen war. **(B)** In doppelt CPZ-behandelten Tieren war die relative Expression von GFAP im Vergleich zu Mock-behandelten Tieren nur um das etwa 1,3fache erhöht. Nach Abschluss der Erholungsphase war kein Unterschied zwischen CPZ- und Mock-behandelten Tieren mehr vorhanden. Es war aber auch, im Gegensatz zum ersten Behandlungszyklus, keine Abnahme der GFAP-Expression in CPZ-behandelten Tieren während der Erholungsphase nachweisbar. Die Darstellungen wurden auf das relative Expressionslevel in Mock-behandelten Tieren normiert. Die Anzahl der biologischen Replikate war N = 3. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher T-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. EP = Erholungsphase. Quelle: KBR-3-243-543, KBR-4-139-710.

Insgesamt war die Übereinstimmung von Proteinquantifizierung im WB-Verfahren und IF-Färbung von GFAP (Abbildung 68 E-H) auf den ersten Blick weniger gut als in der ASA(+/-)-Kontrollgruppe. **Entsprechend der in der IF-Färbung gezeigten Astroglie (Abbildung 68 E) war die Proteinexpression von GFAP im Gehirn CPZ-behandelter ASA(-/-)-Mäuse signifikant erhöht (Abbildung 72 A).** Obwohl die IF-Färbung hatte vermuten lassen, dass die Astroglie während der Erholungsphase nicht abheilte (Abbildung 68 F), fiel das Proteinexpressionslevel von GFAP wieder auf Mock-Niveau. Diese Diskrepanz beruht wahrscheinlich auf der unterschiedlichen Reichweite der Methoden. Die IF-Färbung stellt einen kleinen Ausschnitt des Gehirns dar, der gezielt ausgewählt worden ist, weil er im CPZ-Modell stark von Demyelinisierung betroffen ist. Er muss nicht repräsentativ für andere Hirnregionen sein. Die Konzentration aktivierend wirkender Zellbestandteile, die durch das Absterben der Oligodendrozyten freigesetzt werden, ist in diesem Bereich möglicherweise besonders hoch und führt zu einer lokal begrenzten, anhaltenden Aktivierung von Astrozyten

und Mikrogliazellen. Dieser lokale Effekt kann im WB-Verfahren, das die durchschnittliche GFAP-Expression in allen Regionen des Gehirns misst, nicht nachgewiesen werden.

Auch im zweiten Behandlungszyklus entwickelten ASA(-/-)-Mäuse bei Behandlung mit CPZ eine Astrogliose (Abbildung 68 G & Abbildung 72 B). Im Vergleich zum ersten Behandlungszyklus (Abbildung 72 A) war die Effektstärke jedoch deutlich geringer. Während die Proteinexpression von GFAP in der ersten Diätphase um 104 % anstieg, war im zweiten Behandlungszyklus ein Anstieg von nur 26 % nachweisbar. In der ASA(+/-)-Kontrollgruppe war eine entsprechende Tendenz nicht beobachtet worden (Abbildung 71).

Obwohl die IF-Färbung eine Vielzahl GFAP-positiver Zellen im CC der ASA(-/-)-Maus gezeigt hatte (Abbildung 68 H), war WB-Verfahren nach Abschluss der zweiten Erholungsphase im keine Astrogliose detektierbar. Dieser Widerspruch soll im folgenden Absatz erklärt werden.

4.8.1.2.1.3 Vergleichende Darstellung

Wie in der Einleitung dieses Kapitels beschrieben, ist die Entwicklung einer endogenen Astrogliose Teil des ASA(-/-)-Phänotyps. Um einzuschätzen, ob die endogene Astrogliose bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt werden muss, also im Behandlungszeitraum zwischen siebter und 31. Lebenswoche nachweisbar ist, wurde die Proteinexpression von GFAP in Mock-behandelten ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäusen im WB-Verfahren miteinander verglichen. Die densitometrische Auswertung des vergleichenden WB ist in der nachfolgenden Abbildung 73 dargestellt.

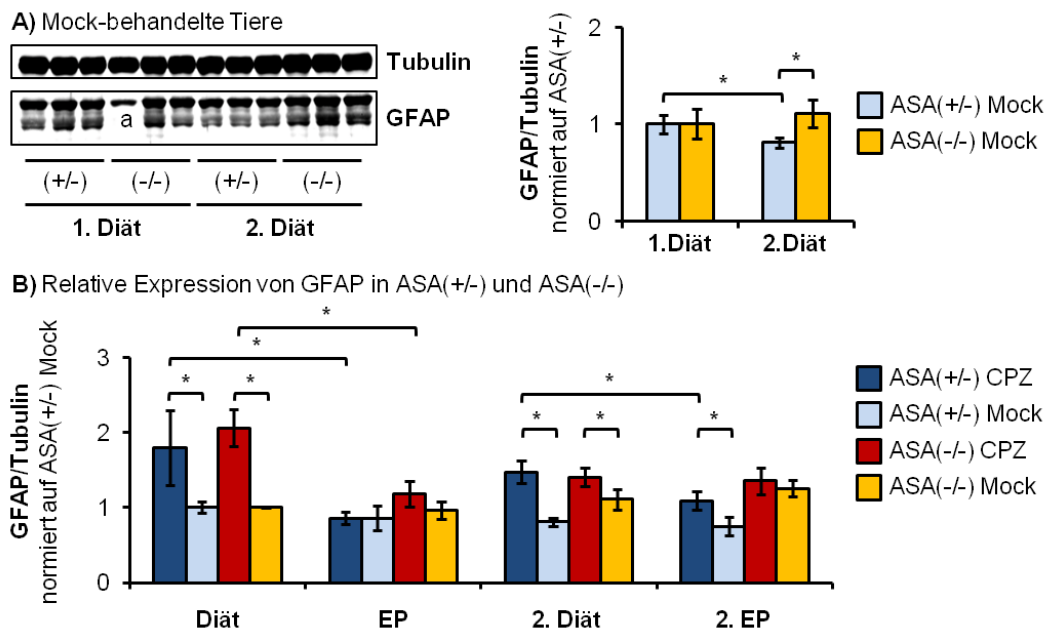


Abbildung 73: Vergleichende Darstellung des Einflusses von CPZ auf die relative Proteinexpression von GFAP im konventionellen MLD-Mausmodell. (A) Darstellung der Proteinbanden im WB, Auftrennung entsprechend Abbildung 70. Die densitometrische Auswertung des vergleichenden WB Mock-behandelter ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäuse zeigte, dass im Alter von 25 Wochen (= nach 2. Diät) eine signifikante Erhöhung des relativen Expressionslevels von GFAP in ASA(-/-)-Mäusen vorhanden war. Die Darstellung wurde auf das relative Expressionslevel in ASA(+/-) Mock-behandelten Mäusen normiert. Die mit ^a bezeichnete Probe war nicht in die

Auswertung mit einbezogen. Die Anzahl der biologischen Replikate war $N = 3$, ausgenommen ASA(-/-) Mock, 1. Diät ($N = 2$). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher T-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. **(B)** Durch den vergleichenden WB von Mock-behandelten ASA(+/-) und ASA(-/-)-Tieren konnten die Ergebnisse der Einzelexperimente (Abb. 64 und Abb. 63) in Relation zueinander gesetzt werden. Da es sich nicht um ein geschlossenes Experiment handelte, konnte keine statistische Aussage über den Unterschied zwischen ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Tieren getroffen werden. Die gezeigten Signifikanzen entstammen den entsprechenden Einzelexperimenten. EP = Erholungsphase. Quelle: (A) KBR-4-177-731, (B) KBR-3-261-563, KBR-4-159-723, KBR-3-243-543, KBR-4-139-710.

Tatsächlich war die Proteinexpression von GFAP in ASA(-/-)-Mäusen nach Abschluss der 25. Lebenswoche (= nach 2. Diät) signifikant höher als in gleichaltrigen ASA(+/-)-Mäusen. Die Ausbildung der endogenen Astroglieose hatte eingesetzt.

Die Auswertung der zweiten Behandlungsphase (Abbildung 72 B) wird also durch die aufgrund der endogenen Astroglieose erhöhte Proteinexpression von GFAP in Mock-behandelten ASA(-/-)-Mäusen verzerrt. **Die Abnahme der Effektstärke von CPZ in der ASA(-/-)-Maus ist ein Resultat der Normierung auf das Proteinexpressionslevel in Mock-behandelten ASA(-/-)-Mäusen.** Wie in der auf dem vergleichenden WB basierende Gesamtdarstellung der Einzelexperimente in Abbildung 73 zu sehen, ist die Astroglieose, gemessen an der Erhöhung der Proteinexpression von GFAP, nach einfacher und wiederholter CPZ-Behandlung in ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäusen ungefähr gleich stark.

In der IF-Färbung war zu sehen (Abbildung 68 H), dass die Astroglieose in ASA(-/-)-Mäusen, wie in ASA(+/-)-Mäusen (Abbildung 68 D, Abbildung 72 B), während der zweiten Erholungsphase nicht abheilte. Durch die im Zuge der endogene Astroglieose ansteigenden Proteinexpression von GFAP war im WB-Verfahren zum Ende der Erholungsphase jedoch kein Unterschied zwischen CPZ- und Mock-behandelten ASA(-/-)-Mäusen nachzuweisen.

4.8.1.2.2 CST-transgenes MLD-Mausmodell

Die Quantifizierung der Proteinexpression im WB-Verfahren (Abbildung 74) und die IF-Färbung von GFAP (Abbildung 69) korrelierten im Falle der CST-transgenen Mäuse nur teilweise. In Übereinstimmung mit der IF-Färbung (Abbildung 69 A & C) zeigte die densitometrische Auswertung des WB sowohl in tgASA(+/-)- (Abbildung 74 A), als auch in tgASA(-/-)-Mäusen (Abbildung 74 B) ein signifikant erhöhtes Proteinexpressionslevel von GFAP nach CPZ-Behandlung. Eine Astroglieose war induziert worden. Die IF-Färbung hatte vermuten lassen, die Astroglieose bliebe in beiden Tiergruppen nach Abschluss der Erholungsphase erhalten (Abbildung 69 B & D). Dieser Eindruck konnte im WB-Verfahren nicht bestätigt werden. **In keiner der Gruppen war nach Abschluss der Erholungsphase ein signifikanter Unterschied zwischen CPZ- und Mock-behandelten Mäusen nachzuweisen.** Es ist nicht auszuschließen, dass die Astroglieose lokal begrenzt noch aktiv war, aber über die Gesamtheit des Gehirns nicht detektiert werden konnte.

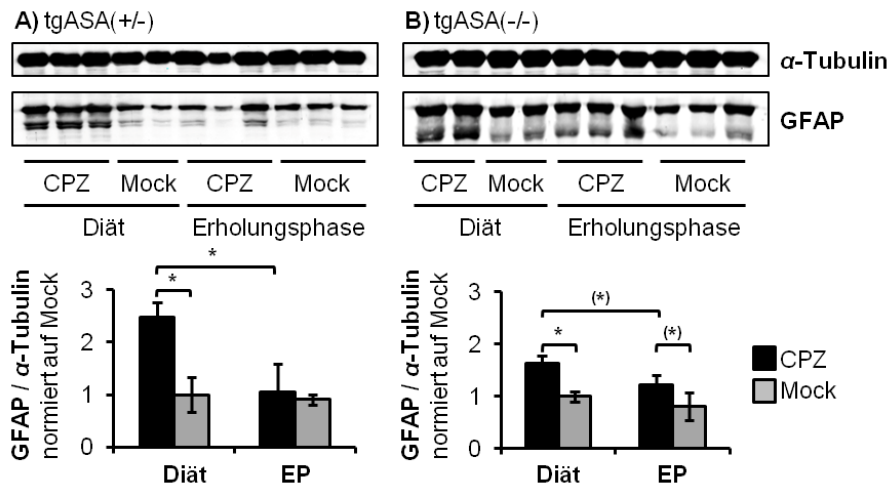


Abbildung 74: Relative Proteinexpression von GFAP im Gehirn der CST-transgenen MLD-Maus. Darstellung der Proteinbanden im WB: Tubulin 50 kDa, GFAP 55, 48 kDa. **(A)** Die densitometrische Auswertung des WB zeigte eine signifikante Erhöhung des relativen GFAP-Expressionslevels in CPZ-behandelten tgASA(+/-)-Mäusen. Während der Erholungsphase sank die relative Expression von GFAP auf Mock-Niveau. Nach Abschluss der Erholungsphase war kein Unterschied mehr nachweisbar. **(B)** In tgASA(-/-)-Mäusen war ebenfalls eine CPZ-induzierte Erhöhung des relativen GFAP-Expressionslevels zu beobachten. Nach Abschluss der Erholungsphase war kein signifikanter Unterschied zwischen CPZ- und Mock-behandelten Mäusen vorhanden. Die Darstellungen wurden auf das relative Expressionslevel in Mock-behandelten Mäusen normiert. Die Anzahl der biologischen Replikate war N = 3, außer in tgASA(+/-) Mock, tgASA(-/-) Mock und tgASA(-/-) CPZ. Für diese Gruppen war die Anzahl der biologischen Replikate N = 2. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. Mit einem in Klammern gesetzten Stern gekennzeichnet sind nicht signifikante Veränderungen im Konfidenzintervall $0,05 < p \leq 0,10$. EP = Erholungsphase. Quelle: KBR-4-109-692.

4.8.1.2.3 Fazit

Die Leitfrage dieses Kapitels war, ob die Immunantwort auf (CPZ-induzierte) Demyelinisierung in ASA-defizienten Mäusen verändert ist. Nach Analyse der Astrogliose lässt sich diese Frage nicht mit absoluter Sicherheit beantworten. Die **IF-Färbung von GFAP** vermittelte den Eindruck, extrazelluläres Sulfatid wirke in einem konzentrationsabhängigen Mechanismus aktivierend auf Astrozyten, denn in ASA(-/-)-, tgASA(-/-)- und tgASA(+/-)-Mäusen schien die CPZ-induzierte Astrogliose weniger gut abzuheilen als in ASA(+/-)-Mäusen. Die **Quantifizierung der Proteinexpression von GFAP** konnte diesen Eindruck nicht bestätigen. Sowohl in CPZ-behandelten ASA(-/-)-, als auch tgASA(+/-)-Mäusen fiel das Proteinexpressionslevel während der Erholungsphase auf Mock-Niveau. Nur in tgASA(-/-)-Mäusen, deren Myelin den höchsten Sulfatidgehalt aufweist¹⁴⁶, war eine Tendenz zur anhaltenden Erhöhung der GFAP-Proteinexpression vorhanden.

De- und Remyelinisierung sowie die Ausprägung von Astrogliose und Mikrogliose sind nicht in allen Hirnregionen gleich.¹⁴⁷ Möglicherweise war der in der IF-Färbung gezeigte Ausschnitt besonders stark von Astrogliose betroffen und deckte sich daher nicht mit den Ergebnissen der Proteinquantifizierung, die die durchschnittliche Proteinexpression im Gesamtgehirn abbildet.

4.8.2 Mikrogliose

Ob die Akkumulation von Sulfatid zu einer Veränderung der Immunantwort der ASA-defizienten Maus führt, konnte mittels Quantifizierung der CPZ-induzierten Astrogliose nicht zweifelsfrei belegt werden. Um weitere Informationen über die Art der induzierten Immunantwort zu erhalten, wurde die Aktivierung der Mikrogliazellen untersucht.

Als residente Immunzellen des ZNS reagieren neben Astrozyten auch Mikrogliazellen auf neuropathologische Veränderungen ihrer Umgebung mit Aktivierung. Neben der Veränderung der Morphologie und der vermehrte Expression einer Reihe von Makrophagen-spezifischen Proteinen (F4/80, Iba1), ist die Aktivierung vor allem durch die Sekretion von pro- und antiinflammatorisch wirksamen Zytokinen gekennzeichnet.

Im Zuge der CPZ-induzierten Demyelinisierung sind Rekrutierung und Aktivierung von Mikrogliazellen, die apoptotische Zellen und Myelintrümmer in den Läsionen phagozytieren, essentiell für eine effektive Remyelinisierung, da das im Myelin enthaltene Sulfatid einen inhibierenden Effekt auf die Reifung der OVZ hat.^{148,149} Solange Myelintrümmer im Gewebe vorhanden sind, kann keine Remyelinisierung stattfinden. Zugleich wirkt Sulfatid über die Bindung an L-Selektin auch als Aktivator von Mikrogliazellen.¹⁵⁰ Ob der erhöhte Sulfatidgehalt im Myelin ASA-defizienter Mäuse¹⁵¹ und die Akkumulation Sulfatid-haltigen Speichermaterials in den Mikroglia einen Effekt auf die CPZ-induzierte Mikrogliose hat, sollte über die IF-Färbung des Makrophagen-spezifischen Antikörpers F4/80¹⁵² beantwortet werden. Die Zusammenfassung der Ergebnisse ist in der nachfolgenden Abbildung 75 dargestellt.

Da die Zelldichte im medialen CC, wie in Abbildung 41 gezeigt, nach Behandlung mit CPZ sehr hoch war, waren Unterschiede in Färbungsintensität und Zellform in diesem Bereich nur schwer zu beurteilen. Abbildung 75 daher zeigt einen Ausschnitt des lateralen CC, der auch von Demyelinisierung betroffen war, in dem sich die Veränderungen von Färbungsintensität und Zellform aufgrund der geringeren Zelldichte aber besser beurteilen ließen.

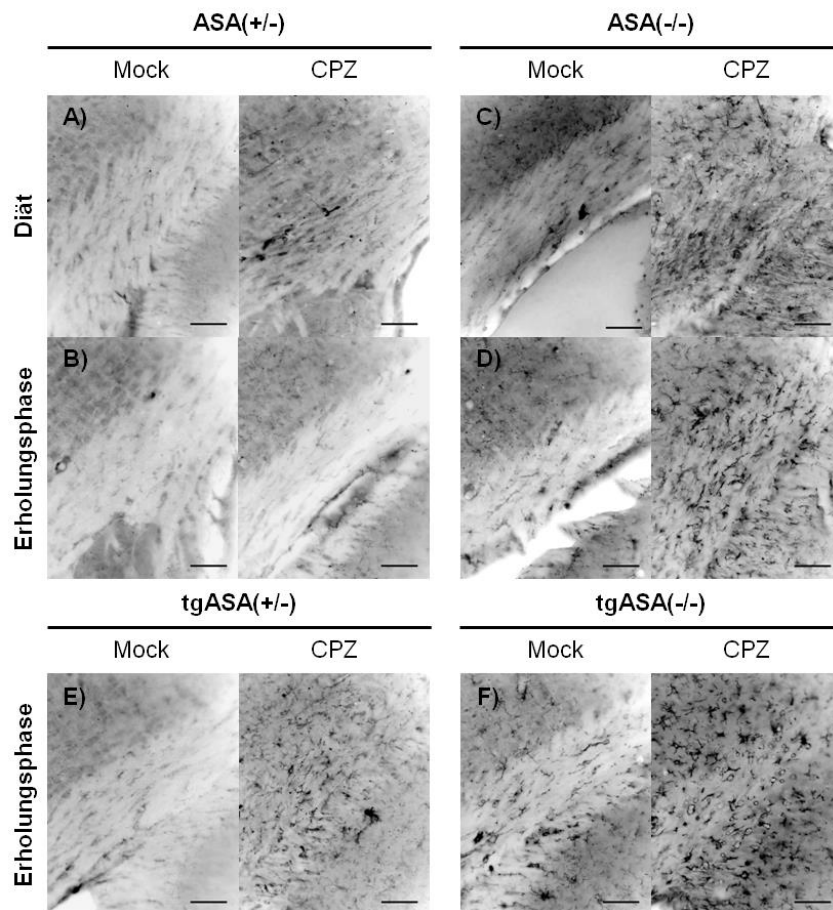


Abbildung 75: Einfluss des Genotyps auf die Cuprizin-induzierte Mikrogliose im Gehirn der Maus. IF-Färbung von F4/80. Fluoreszenzaufnahme des lateralen CC bei $\lambda = 590$ nm. **(A, B)** Im Gehirn Mock-, wie CPZ-behandelter ASA(+/-)-Mäuse war nahezu keine Färbung von F4/80 vorhanden. **(C, D)** Im Gehirn der ASA(-/-)-Maus induzierte die Fütterung mit CPZ eine deutliche Verstärkung der F4/80-Färbung, die auch nach Abschluss der Erholungsphase erhalten blieb. F4/80-positive Zellen im Gewebe um den CC herum hatten die Morphologie inaktiver Mikroglia mit kleinem Zellkörper und einer großen Zahl stark verästelter Ausläufer. F4/80-positive Zellen im CC hatten die amöboide Form aktivierter Mikrogliazellen mit vergrößertem Zellkörper und nur wenigen Zellausläufern. **(E)** Im Gegensatz zur konventionellen ASA(+/-)-Maus induzierte die Fütterung mit CPZ im Gehirn der tgASA(+/-)-Maus eine deutliche Zunahme der F4/80-Färbung, die nach Abschluss der Erholungsphase erhalten blieb. Die F4/80-positiven Zellen im CC hatten keine amöboide Form angenommen. **(F)** Im Gehirn der tgASA(-/-)-Maus befanden sich nach Abschluss der Erholungsphase eine große Zahl F4/80-positiver Zellen mit amöboider Morphologie im CC. Die Bildbearbeitung erfolgte mit Adobe-Photoshop: Zur Verbesserung der Kontrastwahrnehmung wurde die Kanal-Aufnahme in Schwarz-Weiß konvertiert und dann invertiert. Die Maßstabsbalken entsprechen 50 μ m. Quelle: KBR-4-35-629.

Im Zuge der CPZ-Behandlung infiltrieren Mikrogliazellen den CC rund zwei Wochen nach Beginn der Diätphase, um die durch Apoptose der Oligodendrozyten entstehenden Zell- bzw. Myelintrümmer abzubauen. Sobald die Demyelinisierung vollständig ist, etwa fünf Wochen nach Beginn der Diätphase, nimmt die Zahl der Mikrogliazellen schnell wieder ab. Im Vergleich ist die CPZ-induzierte Mikrogliose weit kurzlebiger als die Astrogliose, die auch noch mehrere Wochen nach Absetzen der CPZ-Diät im Gehirn nachweisbar ist.¹⁵³

Dass im Gehirn der **ASA(+/-)-Maus** nach Behandlung mit CPZ keine Zunahme der F4/80-Färbung zu sehen war (Abbildung 75 A & B), soll folglich nicht als Fehlen der Mikrogliose interpretiert werden, sondern zeigt, dass alle Zelltrümmer phagozytiert und die Aktivierung der Mikrogliazellen zu diesem Zeitpunkt schon vollständig abgeklungen war. Remyelinisie-

rung konnte ungehindert stattfinden, wie auch die Quantifizierung der Myelinproteine bestätigt hatte. Im Gegensatz dazu war im Gehirn der **ASA(-/-)-Maus** sowohl nach Abschluss der Diät- (Abbildung 75 C), als auch Erholungsphase (Abbildung 75 D) eine deutliche Zunahme der Zahl F4/80-positiver Zellen im CC und dem umliegenden Gewebe zu sehen. **Im Gewebe außerhalb des CC hatten die gefärbten Zellen die Morphologie inaktiver Mikrogliazellen**, definiert durch einen kleinen Zellkörper und eine große Zahl von Zellausläufern. **Im CC hatten F4/80-positive Zellen die amöboide Form aktivierter Mikrogliazellen**. Dass Mikrogliazellen mit aktiviertem Phänotyp nur im CC lokalisiert waren, deutet darauf hin, dass auch die aktivierenden Faktoren nur in diesem Bereich des Gewebes vorhanden waren.

Die IF-Färbung von F4/80 auf Gewebeschnitten der **tgASA(+/-)-Maus** (Abbildung 75 E) unterstützt die Vermutung, dass einer der aktivierenden Faktoren im CC Sulfatid sein muss. Anders als in der konventionellen ASA(+/-)-Maus war im Gehirn der tgASA(+/-)-Maus nach Abschluss der Erholungsphase eine deutliche Färbung von F4/80 vorhanden. Dieselbe Tendenz spiegelte auch die IF-Färbung von GFAP (Abbildung B, Abbildung 69 B) wider. **Vermutlich führt die erhöhte Sulfatidkonzentration im Myelin der tgASA(+/-)-Maus¹⁵⁴ bei Freisetzung des Sulfatids durch Apoptose der Oligodendrozyten zu einer verstärkten Aktivierung von Astrozyten und Mikrogliazellen im CPZ-Modell.**

Wie in konventionellen ASA(-/-)-Mäusen, war auch in CPZ-behandelten **tgASA(-/-)-Mäusen** nach Abschluss der Erholungsphase eine starke Färbung von F4/80 vorhanden (Abbildung 75 F). Im CC verblieb eine große Zahl F4/80-positiver, amöboid geformter Zellen.

Die nachfolgende Abbildung 76 zeigt die Kombination aus IF-Färbung von F4/80 und SSB-Färbung. SSB färbt aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften nicht nur die Myelinschicht der Axone, sondern auch Myelinbruchstücke und lipidhaltige Lysosomen.¹⁵⁵ Abbildung 76 A zeigt in der Durchlicht-Aufnahme durch SSB dunkel gefärbte, lipidhaltige Kompartimente im Bereich des lateralen CC. Abbildung 76 B zeigt die Fluoreszenzaufnahme desselben Bildausschnittes. Die Überlagerung von Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahme in Abbildung 76 C zeigt die Kolo-kalisierung von lipidhaltigen Kompartimenten und F4/80-positiven Zellen mit amöboider Form. **Offensichtlich besteht in ASA-defizienten Mäusen ein Zusammenhang zwischen der Phagozytose von Myelin, der Akkumulation von Speichermaterial und der Entwicklung eines amöboiden Mikroglia-Phänotyps.**

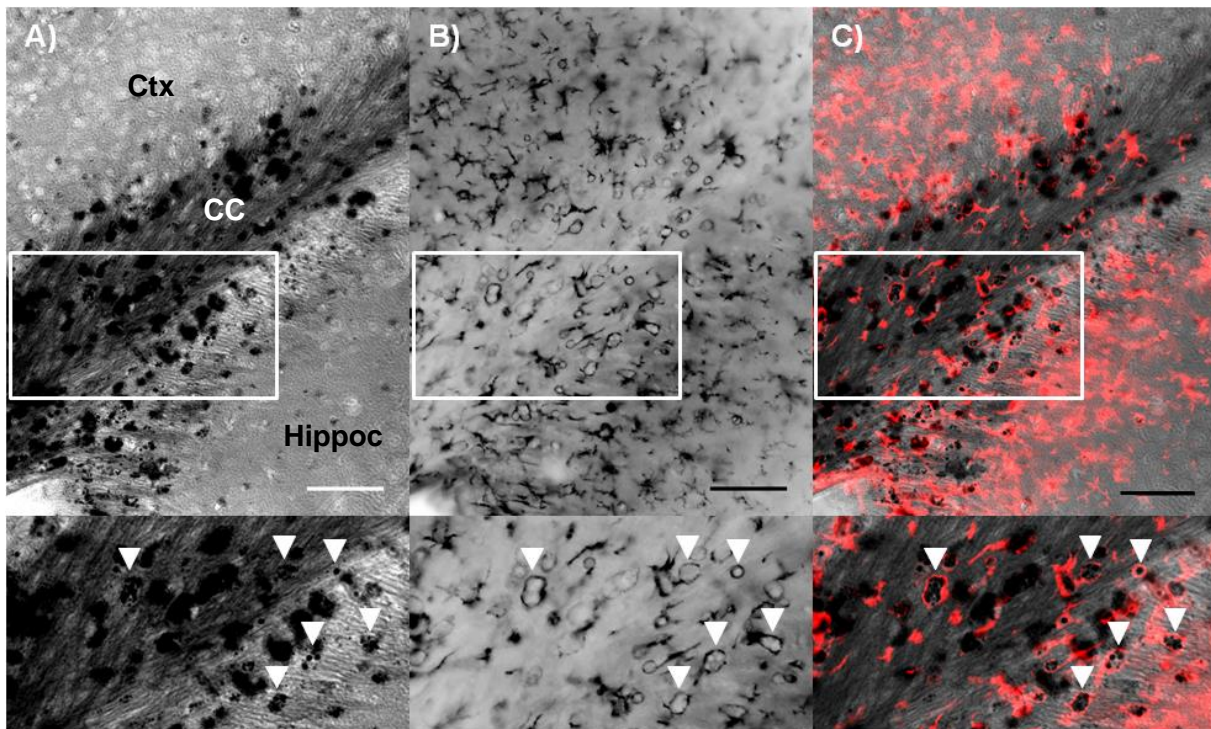


Abbildung 76: Mikrogliale Lokalisation der Cuprizon-induzierten Sulfatid-Speicherung in der tgASA(-/-)-Maus. (A) Durchlichtaufnahme der SSB-Färbung von Myelin und lipidhaltigem Speichermaterial. **(B)** IF-Färbung von F4/80. Fluoreszenzaufnahme bei $\lambda = 590$ nm. Die Bildbearbeitung erfolgte mit Adobe-Photoshop: Zur Verbesserung der Kontrastwahrnehmung wurde die Kanal-Aufnahme in Schwarz-Weiß konvertiert und dann invertiert. **(C)** Überlagerung von Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahme. In den unteren Bildausschnitten sind amöboide geformte Mikrogliazellen mit lipidhaltigem Speichermaterial durch ein weißes Dreieck gekennzeichnet. Die Maßstabsbalken entsprechen $50 \mu\text{m}$. CC = Corpus Callosum, Ctx = Kortex, Hippoc = Hippocampus. Quelle: KBR-4-35-629.

In welcher Abhängigkeit Akkumulation und Zellaktivierung zueinander stehen, ob die amöboide Form erst nach der Phagozytose von Myelin entsteht, oder Voraussetzung für die Phagozytose ist, kann der IF-Färbung nicht entnommen werden. Auch die Frage, inwiefern die Veränderung der Zellmorphologie die Aktivierung von Mikrogliazellen widerspiegelt und ob die Aktivierung re- oder degenerativer Natur ist, lässt sich durch die IF-Färbung von F4/80 nicht beantworten.

Zwar ist es die einfachste Methode den Aktivierungsstatus der Mikrogliazelle aus der Zellmorphologie abzuleiten, sie ist aber nicht sehr präzise. Zum einen existieren nicht nur die Stadien „ruhend“ und „aktiv“, sondern auch alle denkbaren Zwischenstufen. Zum anderen gibt die Zellform keinen direkten Aufschluss über die Expression von Zytokinen oder anderen modulatorisch wirksamen Faktoren. Je nach Stimulus kann die Mikrogliazelle trotz massiver Expression von $\text{TNF}\alpha$ die verzweigte Zellform beibehalten, oder trotz reduzierter Expression von IL-6 eine amöboide Form entwickeln.¹⁵⁶

Der verwendete F4/80-Antikörper war gut dazu geeignet, Mikrogliazellen von anderen Zelltypen des ZNS zu unterscheiden, konnte aber nicht zur Quantifizierung der Mikrogliose im WB-Verfahren verwendet werden, da er nicht spezifisch für aktivierte Mikrogliazellen ist. Zu

deren zweifelsfreien Identifizierung bzw. Quantifizierung eignen sich nur Marker aus der Gruppe der Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) Klasse II, wie CD80 und CD86,¹⁵⁷ sowie die Analyse der sekretierten Zytokine.

4.8.3 Zytokine

Astrozyten und Mikrogliazellen sind in der Lage pro- und antiinflammatorische Zytokine zu sekretieren. Unter dem Begriff der Zytokine wird eine Gruppe von Polypeptidhormonen zusammengefasst, die die Funktion der Immunzellen und das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von Stammzellen regulieren. Die erhöhte Expression von Zytokinen im Gehirn, hervorgerufen durch Neuroinflammation, ist in einer Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen wie Multipler Sklerose und Alzheimer nachgewiesen worden.¹⁵⁸

Dass im MLD-Mausmodell ein Zusammenhang zwischen der Menge des akkumulierenden Speichermaterials und dem Phänotyp besteht, ist durch die Erzeugung der CST-transgenen ASA(-/-)-Maus¹⁵⁹ bewiesen worden. Auch Stein *et al.* haben dies belegt, indem sie gezeigt haben, dass erst mit steigendem Alter, wenn sich eine große Menge Sulfatid-haltigen Speichermaterials im Gehirn ASA-defizienter Mäuse angesammelt hat, Neuroinflammation über die Expression proinflammatorischer Zytokine nachweisbar wird.¹⁶⁰

Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung ASA-defizienter Mäuse mit CPZ die Akkumulation von Speichermaterial beschleunigt wird (Abbildung 48 C & D), was mit einer anhaltenden Aktivierung von Astrozyten (Abbildung 68 E & F) und Mikrogliazellen (Abbildung 75 C) verbunden ist. Da bis hier nicht gezeigt werden konnte, ob die Zellaktivierung Resultat oder Ursache der reduzierten Remyelinisierungseffizienz in ASA-defizienten Mäusen war, wurde die Zytokinexpression untersucht. **Die Quantifizierung der Zytokine sollte zeigen, ob die induzierte Akkumulation von Speichermaterial mit der vermehrten Expression proinflammatorischer Zytokine verbunden war, die den Remyelinisierungsprozess hemmen.**

Die Zytokinexpression im Gehirn wurde mittels Immundetektion im Multiplex-Verfahren quantifiziert. Die hier angegebenen relativen Konzentrationen wurden auf den Gesamtproteingehalt der Probe normiert und verstehen sich als Mittelwert der biologischen Replikate. Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde ein zweiseitiger Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden alle Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von bis zu 5 % ($p \leq 0,05$) bezeichnet. Als Tendenz sei hier eine Irrtumswahrscheinlichkeit bis zu 5 % über dem Signifikanzniveau ($0,05 < p \leq 0,10$) definiert.

4.8.3.1 CPZ-Behandlung

Wie in Abbildung 77 am Beispiel von Interleukin 1 β gezeigt, lagen die gemessenen Zytokin-konzentrationen im unteren Bereich der Nachweisbarkeit. Die Konzentrationen von Interleukin (IL) 4 und IL-5 sowie des Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (GCSF) lagen im 23-Plex-Immunoassay unterhalb der Nachweisgrenze und konnten nicht detektiert werden.

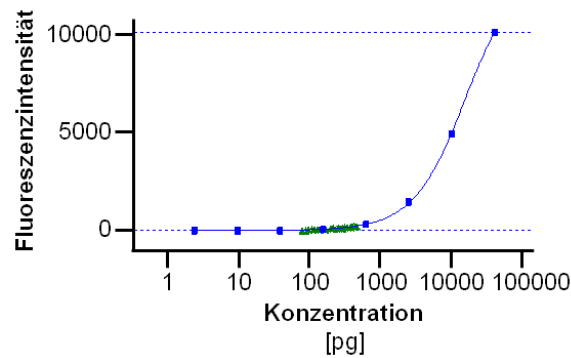


Abbildung 77: Logistische Regressionsanalyse der BioPlex-Messung von Interleukin 1 β . Die Konzentrationen der gemessenen Proben (grün) lagen an der unteren Grenze des durch die Standardreihe (blau) definierten Messbereichs. 23-Plex-Immunoassay von BioRad. Quelle: KBR-4-128-732.

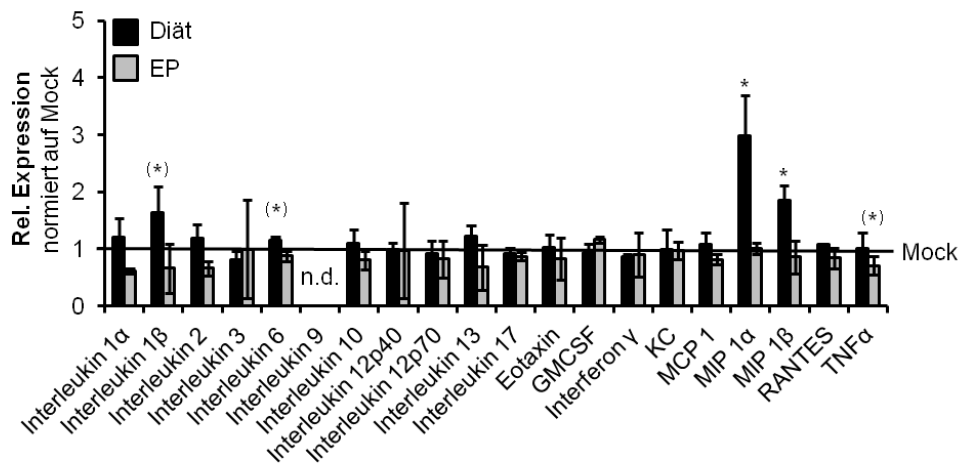
4.8.3.1.1 Konventionelles MLD-Mausmodell

Da nicht nachgewiesen werden konnte, dass die Wiederholung der CPZ-Behandlung zu einer Vermehrung des Speichermaterials in ASA-defizienten Mäusen führte (Abbildung 48 C & D, Abbildung 49 C & D), wurde die Zytokinexpression im Gehirn einfach behandelte Mäuse untersucht. Die nachfolgende Abbildung 78 fasst die Ergebnisse des 23-Plex-Immunoassays zusammen. Zur vereinfachten Darstellung wurden die Zytokinlevel in CPZ-behandelten Mäusen als Vielfaches der Expression in Mock-behandelten Mäusen dargestellt.

4.8.3.1.1.1 Kontrollgruppe ASA(+/-)

Überraschenderweise waren nach CPZ-Behandlung signifikante Veränderungen des Zytokinprofils ausschließlich in ASA(+/-)-Mäusen nachzuweisen (Abbildung 78 A). Die Expressionslevel der Makrophagen-inflammatorischen Proteine (MIP) 1 α und MIP 1 β waren nach Abschluss der Diätphase erhöht. Die MIP sind chemotaktisch wirksame Zytokine, die von aktivierten Makrophagen exprimiert werden, um weitere proinflammatorisch wirksame Zellen zum Ort der Entzündung zu rekrutieren. Die MIP beeinflussen ein weites Spektrum von Zellfunktionen, darunter auch die Phagozytose.¹⁶¹ Die vermehrte Expression dieser Zytokine kann also mit der Rekrutierung von Mikrogliazellen und Phagozytose von Zell- und Myelintrümmern während der Diät-Phase erklärt werden. Von allen weiteren Analyten waren nur die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β ($p = 0,09$) und IL-6 ($p = 0,07$) tendenziell erhöht.

A) ASA(+/-), einfache Behandlung



B) ASA(-/-), einfache Behandlung

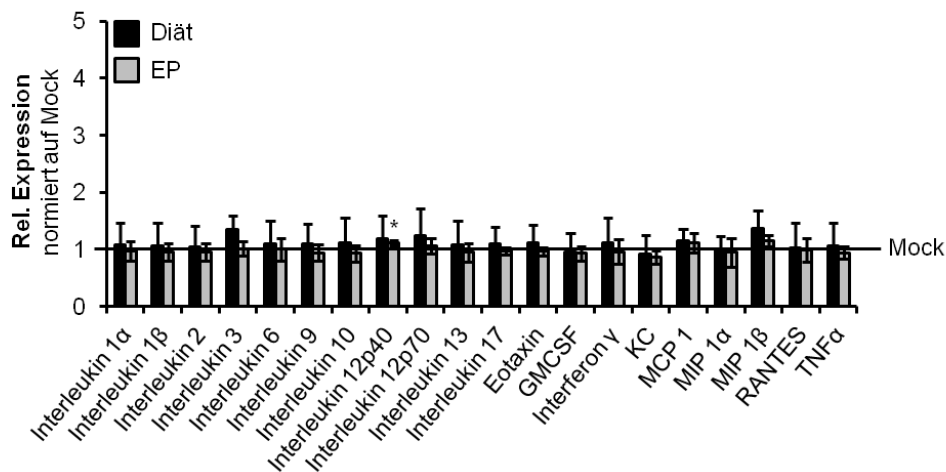


Abbildung 78: Einfluss von Cuprizon auf die Zytokinexpression im Gehirn der MLD-Maus. Darstellung der relativen Zytokinexpression im Gehirn CPZ-behandelter Mäuse, normiert auf die Zytokinlevel Mock-behandelte Mäuse. **(A)** In ASA(+/-)-Mäusen führte die einfache Behandlung mit CPZ zur signifikanten Erhöhung der Expressionslevel von MIP 1α und MIP 1β. Die proinflammatorischen Zytokine IL 1β und IL 6 waren tendenziell erhöht. Nach Abschluss der Erholungsphase war kein Unterschied zwischen CPZ- und Mock-behandelten Mäusen vorhanden, der auf einen inflammatorischen Prozess im Gehirn hinweist. **(B)** In ASA(-/-)-Mäusen war nach Behandlung mit CPZ keine signifikante Veränderung des Zytokinprofils zu beobachten. Nach Abschluss der Erholungsphase war die Expression von IL12p40 in CPZ-behandelten Mäusen geringfügig, aber signifikant erhöht. 23-Plex-Assay von BioRad. Die Zytokinkonzentration wurde auf den Gesamtproteingehalt der Probe normiert [pg/mg], bevor der Mittelwert der biologischen Replikate gebildet wurde. Die Anzahl der biologischen Replikate war N = 3. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Gegenüber der Mock-behandelten Gruppe signifikant unterschiedliche Ergebnisse ($p \leq 0,05$) sind mit einem Stern gekennzeichnet. Ein in Klammern gesetzter Stern kennzeichnet nicht signifikante Unterschiede im Konfidenzintervall $0,05 < p \leq 0,10$. EP = Erholungsphase, GMCSF = Granulozyten- und Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor, KC = Keratinozyten Chemoattraktant, MCP = Monozyten-chemotaktisches Protein, MIP = Makrophagen-inflammatorisches Protein, n. d. = nicht detektierbar, RANTES = Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted, TNF = Tumornekrosefaktor. Quelle: KBR-3-275-577.

Ein akut inflammatorischer Prozess, der mit der vermehrten Expression von IL-1, IL-6, IFN γ und TNF α verbunden gewesen wäre¹⁶², konnte nicht nachgewiesen werden.

Während der Erholungsphase sanken die Expressionslevel der Zytokine in ASA(+/-)-Mäusen wieder auf Mock-Niveau. Wie auch auf für Astrogliose (Abbildung 68 A & B, Abbildung 71 A) und Mikrogliose (Abbildung 75 A & B) gezeigt, klang die Immunantwort in ASA(+/-)-Mäusen während der Erholungsphase vollständig ab.

4.8.3.1.1.2 Konventionelle MLD-Maus ASA(-/-)

In ASA(-/-)-Mäusen waren nach Behandlung mit CPZ keine Veränderungen des Zytokinprofils zu beobachten, die auf Neuroinflammation hinweisen (Abbildung 78 B).

Bedenkt man das Ausmaß der CPZ-induzierten Sulfatidspeicherung (Abbildung 48 C & D), der Astrogliose (Abbildung 68 E & F) und Mikrogliose (Abbildung 75 C & D), ist dieses Ergebnis unerwartet. Die Beobachtung von Eskes *et al.*¹⁶³ scheint bestätigt, nach der die Zytokinexpression nicht anhand der Morphologie der Mikrogliazellen vorhergesagt werden kann.

Die Arbeit von Stein *et al.* lässt vermuten, dass die Menge des gespeicherten Sulfatids in direktem Zusammenhang mit dem Entstehen von Neuroinflammation steht.¹⁶⁴ Im konventionellen MLD-Mausmodell ist die vermehrte Expression von MIP 1 α erst mit dem Erreichen des 24. Lebensmonats nachweisbar. Im CST-transgenen MLD-Mausmodell, in dem etwa doppelt so viel Speichermaterial entsteht¹⁶⁵, ist die Erhöhung von MIP 1 α im Alter von zehn Monaten nachweisbar¹⁶⁶. Vergleicht man die AZB-Färbung der CPZ-behandelten (Abbildung 47 A) und der 24 Monate alten ASA(-/-)-Maus (Abbildung 47 B), wird deutlich, dass im Zuge der CPZ-Behandlung deutlich weniger Speichermaterial entsteht. **Vermutlich war die Menge des CPZ-induzierten Speichermaterials im Gehirn der ASA(-/-)-Maus zu gering, um Neuroinflammation auszulösen.**

Der Vergleich der absoluten Zytokinkonzentrationen im Gehirn der Mock-behandelten ASA(+/-)- und der ASA(-/-)-Maus zeigte, dass ein Großteil der Zytokine im Gehirn der ASA(-/-)-Maus signifikant höher konzentriert war als in der ASA(+/-)-Maus (Daten nicht gezeigt: KBR-3-275-577). Über die Ursache und Bedeutung dieser Beobachtung kann an diesem Punkt nur spekuliert werden, da der Einfluss der Probenvorbereitung auf die absoluten Messwerte nicht genauer untersucht werden konnte. Möglicherweise resultiert die Erhöhung des Zytokin-Basislevels in der ASA(-/-)-Maus aus der Akkumulation von Speichermaterial während der Embryogenese und der frühen postnatalen Entwicklung: Aktivierte, amöboid geformte Mikrogliazellen infiltrieren das Gehirn in zwei Wellen während der embryonalen Entwicklung (E10-E19) sowie den ersten Tagen nach der Geburt.¹⁶⁷ Zum

einen exprimieren sie Zytokine, wie IL-1 β , die im Zuge der Entwicklung des ZNS regulative Funktion haben.¹⁶⁸ Zum anderen phagozytieren sie Zellen, die im Zuge der Neurogenese dem programmierten Zelltod erliegen.¹⁶⁹ Vermutlich akkumulieren in dieser Zeit bereits geringe Mengen von Sulfatid aus phagozytierten Astrozyten und Neuronen¹⁷⁰ in den Mikrogliazellen der ASA(-/-)-Maus.

Im Normalfall wechselt die Mikrogliazelle nach dem Einwandern in das Gehirn im Laufe der Zeit vom aktivierten in den inaktiven Zustand.¹⁷¹ Möglicherweise ist dieser Prozess in der ASA(-/-)-Maus durch die Akkumulation von Sulfatid gestört und führt zur Erhöhung der basalen Zytokinexpression. Ist die basale Zytokinexpression erhöht, erschwert dies den Nachweis CPZ-induzierte Effekte, wie der Vergleich zwischen ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäusen zeigte. In beiden Gruppen stieg die Konzentration von MIP 1 β bei Behandlung mit CPZ ähnlich stark an (ASA(+/-): +11,6 \pm 5,5 pg/mg, ASA(-/-): +18,9 \pm 51,2 pg/mg, KBR-3-275-577). Da die CPZ-induzierte Erhöhung der Konzentration in Relation zum Basislevel in Mock-behandelten ASA(-/-)-Mäusen jedoch kleiner als in der ASA(+/-)-Maus war und die Standardabweichung zudem groß, konnte keine signifikante Veränderung nachgewiesen werden.

Der Multiplex-Immunoassay von BioRAD ist ursprünglich für die Quantifizierung von Zytokinen in Serum optimiert worden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die großen Standardabweichungen aus der Verwendung von Gewebehomogenat anstelle von Serum resultieren. Wahrscheinlich kann der Informationsgehalt des Assays durch Optimierung der Probenvorbereitung und der damit verbundenen Abnahme der Standardabweichungen erhöht werden. Praktische Lösungsansätze für eine Optimierung des Immunoassays sollen in Kapitel 5 diskutiert werden.

4.8.3.1.2 CST-transgenes MLD-Mausmodell

Die Zytokinexpression in CST-transgenen Mäusen wurde mittels 8-Plex-Immunoassay von BioRad untersucht und beschränkte sich auf die Analyte IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, GM-CSF, IFN γ und TNF α . Die Auswertung ist in Abbildung 79 dargestellt.

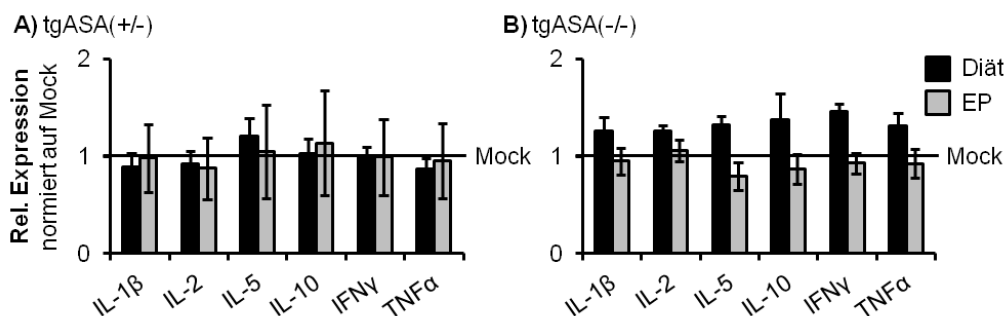


Abbildung 79: Einfluss von Cuprizin auf die Zytokinexpression im Gehirn der CST-transgenen MLD-Maus. Darstellung der relativen Zytokinexpression in CPZ-behandelter Mäusen, normiert auf die Zytokinlevel Mock-behandelter Mäuse. Weder in (A) tgASA(+/-)- noch in (B) ASA(-/-)-Mäusen konnte ein Effekt von CPZ auf die Zytokinexpression gemessen werden. 8-Plex-Assay von BioRad. Die Konzentration der Analyte Interleukin 4

und GM-CSF lag unterhalb der Nachweisgrenze. Die Zytokinkonzentration wurde auf den Gesamtproteingehalt der Probe normiert [pg/mg], bevor der Mittelwert der biologischen Replikate gebildet wurde. Die Anzahl der biologischen Replikate war $N = 3$, außer in tgASA(+/-) Mock, tgASA(-/-) Mock und tgASA(-/-) CPZ. Für diese Gruppen war die Anzahl der biologischen Replikate $N = 2$. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Gegenüber der Mock-behandelten Gruppe signifikant unterschiedliche Ergebnisse ($p \leq 0,05$) sind mit einem Stern gekennzeichnet. Ein in Klammern gesetzter Stern kennzeichnet nicht signifikante Unterschiede im Konfidenzintervall $0,05 < p \leq 0,10$. EP = Erholungsphase, GM-CSF = Granulozyten- und Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor, TNF = Tumornekrosefaktor. Quelle: KBR-4-128-732.

Insgesamt war der Informationsgehalt über CPZ-induzierte Veränderungen der Zytokinexpression durch die Beschränkung auf acht Analyte gering, da Zytokine, die mit Rekrutierung und Proliferation von Mikrogliazellen verbunden sind (MIP 1 α , MIP 1 β , MCP 1), nicht detektiert wurden. Die Analyte IL-4 und GM-CSF lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Die Zytokinexpression in tgASA(-/-)-Mäusen schien nach CPZ-Behandlung erhöht, es konnte aber weder in tgASA(+/-)-, noch in tgASA(-/-)-Mäusen eine signifikante Veränderung nachweisen werden.

Die Menge an CPZ-induziertem Speichermaterial im Gehirn der tgASA(-/-)-Maus scheint nicht auszureichen, um Neuroinflammation auszulösen.

4.8.3.2 Einfluss des CST-Transgens auf die Immunantwort

Dass die Überexpression der CST, die mit einer gesteigerten Sulfatid-Synthese verbunden ist, in der ASA(-/-)-Maus zu einer Verstärkung des Phänotyps führt, ist seit 2007 bekannt.¹⁷² Die biochemischen Prozesse, die hinter dieser Beobachtung stehen, sind bis heute jedoch noch nicht aufgeklärt. Seitdem Stein *et al.* gezeigt haben, dass die Behandlung der tgASA(-/-)-Maus mit Simvastatin, einem antiinflammatorisch wirksamen HMG-CoA-Reduktasehemmer, zu einer Verbesserung des Phänotyps führt, ist belegt, dass Neuroinflammation eine Triebfeder der Demyelinisierung im CST-transgenen MLD-Mausmodell ist.¹⁷³

Der Begriff der Neuroinflammation ist erst seit Mitte der 90er Jahre gebräuchlich und beschreibt einen chronischen Zustand des ZNS, indem sich Zyklen von Verletzung und Reaktion, durch die immunologische Antwort der Mikroglia und Astrozyten angetrieben, stetig wiederholen.¹⁷⁴ Durch die fortwährende Steigerung der Immunantwort wird der Krankheitsverlauf vorangetrieben.

Ob ein akut entzündlicher Prozess im Gehirn abheilt oder in chronische Neuroinflammation übergeht, hängt eng mit dem Aktivierungszustand von Mikrogliazellen und rekrutierten Makrophagen zusammen. Die Reaktion der aktivierten Mikrogliazelle bzw. Makrophage ist nicht pauschal proinflammatorisch, sondern bewegt sich zwischen klassischer und alternativer Aktivierung bzw. M1- und M2-Phänotyp. Die M1/M2-Einteilung beschreibt zwei entgegengesetzt wirksame Zellpopulationen, wobei Makrophagen des M1-Typs die Zellproliferation inhibieren und dadurch Gewebeschaden provozieren, M2-Makrophagen die Zellproliferation

und die Gewebereparatur fördern. Der Aktivierungsstatus bestimmt über die Art der induzierten Immunantwort. M1-Zellen induzieren, in Reaktion auf die Stimulation mit IFN γ , LPS oder GM-CSF, die Bildung von Typ 1 T-Helferzellen (T_{H1}-Zellen), die proinflammatorische Zytokine sekretieren und wiederum aktivierend auf Makrophagen wirken.¹⁷⁵ M2-Makrophagen werden unter anderem durch IL-4, IL-10 oder Glukokortikoide stimuliert und induzieren die Bildung von Typ 2 T-Helferzellen (T_{H2}-Zellen). T_{H2}-Zellen inhibieren die M1-Aktivierung der Makrophagen.¹⁷⁶

Die Einteilung in M1- und M2-Makrophagen schließt nicht aus, dass beide Aktivierungstypen nebeneinander existieren. Vielmehr bestimmt das Gleichgewicht zwischen den Zellpopulationen über die Art der Immunantwort und die resultierende Symptomatik. Damit ein inflammatorischer Prozess erfolgreich abheilen kann, muss die proinflammatorische Immunantwort der Mikrogliazellen vom M1-Typ abnehmen. Nur dann kann die M2-Immunantwort aktiviert werden und der Heilungsprozess fortschreiten.¹⁷⁷

Es ist gezeigt worden, dass der Verlauf chronisch-neuroinflammatorischer Erkrankungen, wie zum Beispiel Multiple Sklerose (MS), vom dominierenden Aktivierungstyp der Mikrogliazellen abhängt. Auch wenn der ursprüngliche Induktor der Neuroinflammation in MS unbekannt ist, konnten T_{H1}- und T_{H17}-Zellen als wichtige Triebkraft identifiziert werden. Der zur Behandlung von MS zugelassene Wirkstoff Glatirameracetat (Copaxone®, Teva Pharma) wirkt Schub-reduzierend, indem er einen Wechsel von T_{H1}- zu T_{H2}-Immunantwort induziert.¹⁷⁸ T-Zellen sind im Normalfall nicht im Gehirn nachzuweisen, aber in der Lage im Zuge neuroinflammatorischer Prozesse ins Gehirn einzuströmen und dort aktiv zu werden. Auch in der tgASA(-/-)-Maus konnte die Infiltration des Gehirns durch T-Zellen nachgewiesen werden.¹⁷⁹ Welchem Aktivierungstyp diese infiltrierenden T-Zellen sowie die residenten Mikrogliazellen zuzuordnen sind, sollte anhand der Zytokinprofile Mock-behandelter Mäuse bestimmt werden. Möglicherweise ist die Art der Immunantwort ein Grund für den divergenten Phänotyp konventioneller und CST-transgener ASA(-/-)-Mäuse und auch für die im CPZ-Modell subjektiv gesteigerte Aktivierung von Astrozyten und Mikrogliazellen in CST-transgenen gegenüber konventionellen MLD-Mäusen.

Die nachfolgende Abbildung 80 zeigt die relative Expression ausgewählter Zytokine in CST-transgenen MLD-Mäusen, dargestellt als Vielfaches der Expression in konventionellen MLD-Mäusen. Die Auswahl der Zytokine orientiert sich an den Analyten des 8-Plex-Immunoassays von BioRad und beschränkt sich auf Zytokine, die spezifisch für die unterschiedlichen Aktivierungsstadien bzw. Arten von Immunantwort sind. T-Helferzellen vom T_{H1}-Typ sezernieren die proinflammatorischen Zytokine IL-2 und IFN γ , die die Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Lymphozyten induzieren. T-Helferzellen vom T_{H2}-Typ

sezernieren die B-Zell-aktivierenden Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10. IL-10 wirkt antiinflammatorisch und hemmt die Proliferation von T_{H1}-Zellen.¹⁸⁰

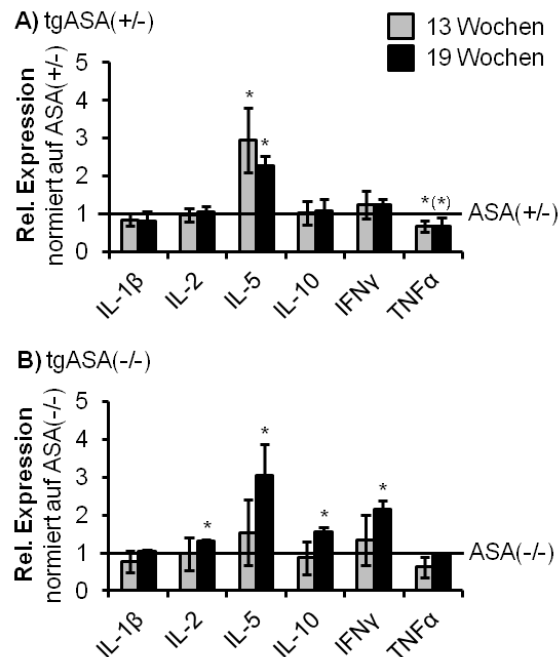


Abbildung 80: Einfluss des CST-Transgens auf den Aktivierungsstatus von Mikrogliazellen und T-Zellen im Gehirn der Maus. Darstellung normiert auf Zytokinexpression in konventionellen Mäusen mit entsprechendem Genotyp. Die proinflammatorischen Zytokine IL-2, IFN γ und TNF α werden von T-Helfer-Zellen des T_{H1}-Typs exprimiert. Die Expression von IL-4, IL-5 und IL-10 zeichnet T-Helfer-Zellen des T_{H2}-Typs aus. **(A)** Im Vergleich zur ASA(+/-)-Maus war die Konzentration von IL-5 im Gehirn der tgASA(+/-)-Maus erhöht. Entsprechend der antiinflammatorischen Wirkung von IL-5 war die Expression von TNF α in tgASA(+/-)- gegenüber ASA(+/-)-Mäusen erniedrigt. **(B)** Im Alter von 13 Wochen war kein signifikanter Unterschied zwischen konventionellen und CST-transgenen ASA(-/-)-Mäusen vorhanden. Mit steigender Sulfatid-Akkumulation war im Alter von 19 Wochen eine signifikante Erhöhung von IL-2, IL-5, IL-10 und IFN γ im Gehirn der tgASA(-/-)-Maus nachzuweisen. 8-Plex-Assay von BioRad. Die Zytokinkonzentration wurde auf den Proteingehalt der Probe normiert [pg/mg], bevor der Mittelwert der biologischen Replikate gebildet wurde. Die Anzahl der biologischen Replikate war N = 3, außer in tgASA(+/-) Mock, tgASA(-/-) Mock und tgASA(-/-) CPZ. Für diese Gruppen war die Anzahl der biologischen Replikate N = 2. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein Student'scher t-Test unter Annahme der Homoskedastizität durchgeführt. Signifikant ($p \leq 0,05$) waren alle mit einem Stern gekennzeichneten Unterschiede. EP = Erholungsphase, IFN γ = Interferon γ , IL = Interleukin, TNF α = Tumornekrosefaktor α . Quelle: (A) KBR-4-212-748 (B) KBR-4-128-732.

Im Vergleich zu konventionellen ASA(+/-)-Mäusen war die Expression von IL-5 in tgASA(+/-)-Mäusen signifikant erhöht (Abbildung 80 A). Quelle der vermehrten IL-5-Expression können entweder T_{H2}-Zellen oder Mikrogliazellen und Astrozyten¹⁸¹ sein. Es ist nicht untersucht worden, ob T-Zellen das Gehirn der tgASA(+/-)-Maus infiltrieren. Da im gesunden Organismus der Einstrom von T-Zellen in das ZNS durch die Blut-Hirn-Schranke streng kontrolliert ist, ist es aber unwahrscheinlich. Nur wenn das ZNS von Inflammation betroffen ist, können im Blut zirkulierende Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen die Blut-Hirn-Schranke in großer Zahl überwinden.¹⁸² Da die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IFN γ und TNF α im Gehirn der tgASA(+/-)-Maus gegenüber der konventionellen ASA(+/-)-Maus nicht erhöht war (Abbildung 80 A), kann eine akute Entzündung, verbunden mit der Akkumulation von T-Zellen, ausgeschlossen werden. Wahrscheinlicher ist, dass Mikroglia und Astro-

zyten die Quelle der vermehrten IL-5-Expression in tgASA(+/-)-Mäusen sind. IL-5 wird in Reaktion auf proinflammatorische Stimuli exprimiert¹⁸³ und induziert Proliferation und Aktivierung¹⁸⁴ von Mikrogliazellen. Ob auch Sulfatid die Expression von IL-5 in Mikrogliazellen bzw. Astrozyten anregen kann, ist unbekannt. Möglicherweise trägt die endogene Stimulation von Mikrogliazellen durch IL-5 dazu bei, dass CPZ-induzierte Astrogliose (Abbildung 69 A) und Mikrogliose (Abbildung 75 E) im Gehirn der tgASA(+/-)-Maus stärker ausgeprägt schienen, als in konventionellen ASA(+/-)-Mäusen (Abbildung 68 B, Abbildung 75 B).

Insgesamt erbrachte der Vergleich der Zytokinprofile von ASA(+/-)- und tgASA(+/-)-Mäusen keinen Hinweis darauf, dass die Überexpression der CST und die damit verbundene erhöhte Syntheserate von Sulfatid eine proinflammatorische Aktivierung der Mikrogliazellen, verbunden mit der Ausbildung einer T_{H1}-Immunantwort, bewirkt.

Um zu überprüfen, ob die Überexpression der CST bei Speicherung von Sulfatid zu einer Aktivierung der Immunantwort führt, wurde die Zytokinexpression im Gehirn der tgASA(-/-)-Maus mit der konventionellen ASA(-/-)-Maus verglichen (Abbildung 80 B). Im Alter von 13 Wochen war kein Unterschied festzustellen. Erst im Alter von 19 Wochen war die Expression von IL2, IL-5, IL-10 und IFN γ in tgASA(-/-)-Mäusen signifikant erhöht. **Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Immunantwort in tgASA(-/-)-Mäusen sich mit steigendem Alter, also mit steigender Sulfatidspeicherung, zunehmend von der Immunantwort in konventionellen ASA(-/-)-Mäusen unterscheidet.** Eine klare Unterscheidung, welcher Typ von Immunantwort aktiviert wird, konnte aus dem Vergleich der Zytokinprofile nicht abgeleitet werden. Sowohl die Expression von IFN γ , das die M1-Aktivierung von Mikrogliazellen induziert¹⁸⁵, als auch die Expression von IL-10, das die M2-Aktivierung von Mikrogliazellen induziert¹⁸⁶, war erhöht. **Möglicherweise verschiebt sich das Zytokinprofil erst mit steigendem Alter in Richtung eines Aktivierungstyps, wenn auch Neuroinflammation und Demyelinisierung nachweisbar werden.**

5. Diskussion

1.9 Genetischer Hintergrund der Gründertiere

Die Funktion eines Gens kann über die Analyse des Phänotyps eines entsprechenden Mausmodells (Knockout, Transgen) untersucht werden. Dabei ist zu beachten, dass die Ausprägung des Phänotyps durch den genetischen Hintergrund des Versuchstieres beeinflusst wird.¹⁸⁷ Der genetische Hintergrund umfasst die Gesamtheit aller Gene, ausgenommen das manipulierte Gen. Als Beleg für den Zusammenhang zwischen Phänotyp und genetischem Hintergrund sei die Arbeit von Threadgill *et al.* angeführt, die gezeigt hat, dass der Knockout des Epidermal Growth Factor Receptor in CF-1 Mäusen zu einem embryonal letalen Phänotyp, in CD-1 Mäusen erst drei Wochen nach der Geburt zum Tod führt.¹⁸⁸

Für die Durchführung des hier gezeigten Tierexperiments wurden drei unabhängig voneinander gezüchtete Mauslinien miteinander gekreuzt. Der genetische Hintergrund jeder Mauslinie war gemischt. **Im zeitlich beschränkten Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, den genetischen Hintergrund der Gründertiere durch Rückkreuzung mit C57BL/6-Wildtyp-Mäusen zu vereinheitlichen, bevor mit der Zucht der Versuchstiere begonnen wurde.** In Abbildung 81 ist schematisch dargestellt, wie sich der genetische Hintergrund der Versuchstiere als Resultat aus dem gemischten genetischen Hintergrund der Gründertiere mit der Anzahl der Verpaarungen verändern kann. Mäuse mit gleichem Genotyp können sich im genetischen Hintergrund unterscheiden (Abbildung 81 B & D).

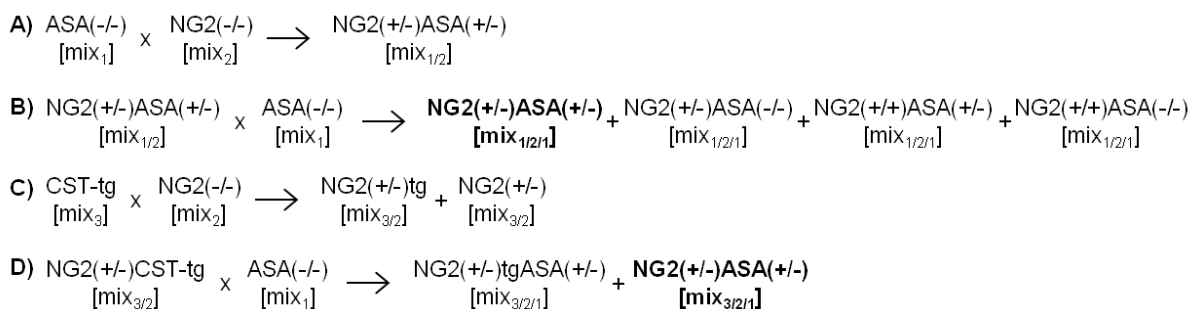


Abbildung 81: Zuchtbedingte Veränderung des genetischen Hintergrunds. Die schematische Darstellung zeigt mögliche Verpaarungen von (A, C) Gründertieren der drei Mauslinien ASA-Knockout, NG2-EYFP-Knockin und CST-transgen und (B, D) die mögliche Verpaarungen der Nachkommen. Der genetische Hintergrund aller Mauslinien war gemischt, aber voneinander unterschiedlichen (mix₁, mix₂, mix₃). Das Schema verdeutlicht, wie sich der genetische Hintergrund im Laufe der Zucht verändert (mix_{1/2}, mix_{3/2}, mix_{1/1/2}, mix_{3/2/1}). Die fett gedruckten Tiere (C, D) haben trotz gleichen Genotyps einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund. Quelle: Eigene Darstellung.

Da nur eine geringe Zahl von Gründertieren zur Verfügung stand, erstreckte sich die Dauer der Zucht über einen Gesamtzeitraum von vier Jahren und es war nicht möglich alle Mäuse gleichzeitig mit CPZ zu behandeln. Die CPZ-Behandlung erfolgte, sobald eine Maus mit entsprechendem Genotyp geboren wurde. Das Gewebe wurde nach Abschluss der Behand-

lung präpariert und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert. Der zeitliche Abstand zwischen der Präparation der biologischen Replikate betrug maximal ein Jahr. **Aufgrund dieser Vorgehensweise ist es wahrscheinlich, dass der genetische Hintergrund der biologischen Replikate nicht homogen war.**

1.9.1 CST-Transgen

Die CST-transgene MLD-Maus wurde durch Injektion eines entsprechenden DNA-Konstrukts in den Pronukleus einer befruchteten Eizelle generiert.¹⁸⁹ Der Einbau des Konstrukts erfolgt bei dieser Methode in unbekannter Häufigkeit an beliebigen Stellen im Genom (Integrationsloкус). Diese Methode zur Generierung eines Mausmodells ist simpel, birgt aber auch Nachteile, denn der Phänotyp einer transgenen Maus hängt maßgeblich von der Expressionsstärke des Transgens ab. Die Expressionsstärke korreliert mit der Ablesbarkeit des Konstrukts in der DNA und wird durch Integrationsloкус, Anzahl der eingebauten DNA-Konstrukte und epigenetischen Modifikationen, wie Methylierung, bestimmt. Die Expressionsstärke verändert sich daher im Zuge der Alterung¹⁹⁰ und der Vererbung¹⁹¹. Vor allem bei Verpaarung von Mäusen mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund induzieren Mauslinien-spezifische Modulator-Gene die Veränderung des Methylierungsmusters und der Expressionsstärke: Verpaarungen mit DBA/2-Mäusen werden häufig mit der Demethylierung, Verpaarungen mit C57BL/6-Mäusen eher mit der *de novo* Methylierung eines Transgens in Verbindung gebracht.¹⁹²

Die Herstellung und Kultivierung transgener Pflanzen ist gängige Praxis, so dass die Stabilität von Transgenen und deren Expressionsstärke in Pflanzen auch über lange Generationsfolgen besser untersucht und dokumentiert sind als im Tiermodell. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Anzahl der integrierten Transgen-Konstrukte und die Expressionsstärke in Rapspflanzen schon in der vierten Folgegeneration verändert sind.¹⁹³ Ohne dieses Ergebnis direkt auf das Mausmodell übertragen zu wollen, soll die Möglichkeit der Reduktion integrierter Konstrukte in der DNA durch Rekombination während der Meiose in Betracht gezogen werden. Solch eine Reduktion der integrierten Konstrukte könnte in der hier durchgeführten Genotypisierung-PCR nicht nachgewiesen werden, würde die Expressionsstärke des Transgens aber verändern.

Es ist nicht auszuschließen, dass epigenetische Modifikationen oder die Reduktion der integrierten CST-DNA-Konstrukte in den hier verwendeten transgenen Mäusen zu einer Veränderung der Expressionsstärke der CST führten und Einfluss auf die Ergebnisse der CPZ-Behandlung hatten.

1.10 CPZ stört durch Komplexierung von Kupfer den Energiehaushalt des myelinisierenden Oligodendrozyten.

Der Beginn der CPZ-Behandlung in der siebten Lebenswoche der Maus (P35) fällt in den Zeitraum der primären Myelinisierung (Myelinogenese)¹⁹⁴ des Gehirns. Die Myelinogenese ist ein dynamischer Vorgang, der mit dem Ablauf des Axonwachstums korreliert. Sie beginnt mit dem Tag der Geburt am Hirnstamm und setzt sich von dort einerseits entlang des Rückenmarks, andererseits über das Zwischenhirn ins Vorderhirn fort. Der Zustand vollständiger Myelinisierung wird in jeder Hirnregion zu einem anderen Zeitpunkt erreicht. **Einige Bereiche, wie der CC, erreichen erst in der zweiten Hälfte des ersten Lebensjahres ihren „reifen“ Zustand.**

In der Maus beginnt die Myelinisierung des CC in Genu und Splenium und breitet sich von dort auf alle weiteren Bereiche aus.¹⁹⁵ Die ersten MBP-positiven Oligodendrozyten sind neun bis zehn, die ersten myelinisierten Axone elf Tage nach der Geburt nachzuweisen.¹⁹⁶ Zwischen dem 14. und 45. Tag nach der Geburt nimmt ihre Zahl rasch zu, danach setzt sich die Myelinisierung langsamer fortschreitend bis in den 8. Lebensmonat (P240) fort.¹⁹⁷

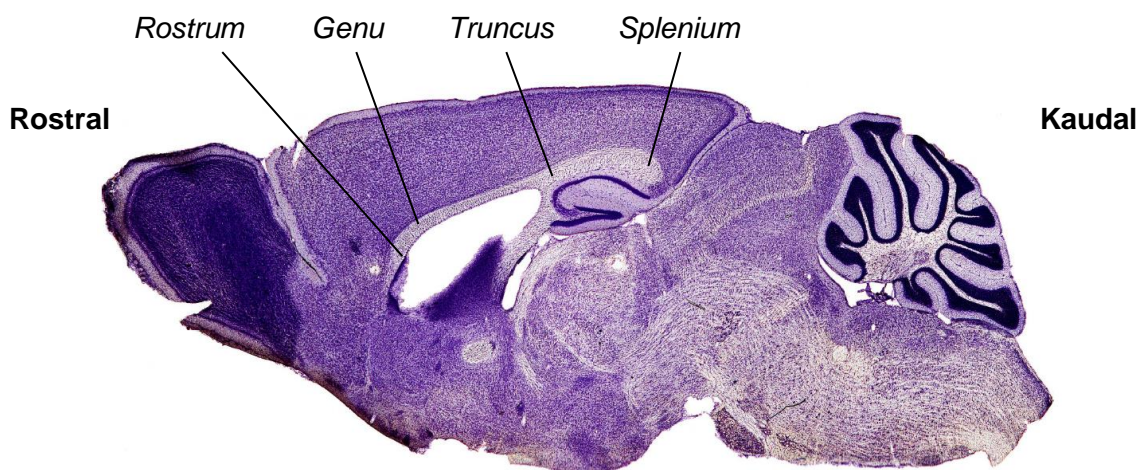


Abbildung 82: Die Zonen des Corpus callosum. Sagittaler Schnitt durch Riech-, Groß- und Kleinhirn. Kernfärbung mit Hämatoxylin. Der CC unterteilt sich, von rostralem zu kaudalem Ende, in Rostrum, Genu, Truncus und Splenium. Quelle: G. Paxinos, K. B. Franklin: *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press, 2001, 2. Auflage, pp. 180.

Im CPZ-Modell ist der CC aufgrund der gut reproduzierbaren, nahezu vollständigen Demyelinisierung die am besten untersuchte Region des Großhirns. Warum der CC bei Behandlung mit CPZ so stark von Demyelinisierung betroffen ist, ist nicht erforscht.

Unter den zahlreichen Theorien zum Wirkmechanismus von CPZ, wie Bildung zelltoxischer Abbauprodukte und freier Radikale¹⁹⁸, scheint die Komplexierung von Kupfer¹⁹⁹ die schlüssigste Begründung zu sein: Kupfer ist ein wichtiges Spurenelement und unter anderem im aktiven Zentrum der Cytochrom-C-Oxidase enthalten, die Bestandteil der mitochondrialen

Atmungskette ist. Die Fütterung mit CPZ führt durch die Komplexierung von Kupfer zu einer Abnahme der Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität im Gehirn.²⁰⁰

Der Energiebedarf myelinisierender Oligodendrozyten ist während der Myelinogenese, wenn ein einzelner Oligodendrozyt bis zu 5000 μm^2 Myelinmembran pro Tag synthetisiert²⁰¹, enorm hoch. Es ist wahrscheinlich, dass die CPZ-induzierte Störung der Atmungskette in diesen hoch aktiven Zellen starken Einfluss auf Funktionalität und Überleben hat. Möglicherweise ist die CPZ-induzierte Demyelinisierung im CC besonders effizient, weil dessen Myelinisierung zum Beginn der CPZ-Behandlung (P35) noch nicht abgeschlossen ist. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass es in älteren Tieren der Erhöhung von Behandlungsdauer und -dosis bedarf, um ein vergleichbares Ergebnis zu erzielen.²⁰² **Es scheint eine enge Verbindung zwischen Reifestatus des Oligodendrozyten und der Effizienz der CPZ-induzierten Demyelinisierung zu bestehen.**

1.11 Aufgrund der verzögerten Myelinogenese ist die CPZ-induzierte Demyelinisierung im Gehirn der ASA(-/-)-Maus stärker ausgeprägt, als in der ASA(+/-)-Maus.

Das Fortschreiten der Myelinogenese kann über die Expression Myelin-spezifischer Proteine und Lipide verfolgt werden. Als verlässliche Marker gelten darunter MBP und GalCer.²⁰³ Mit dem Beginn der Myelinisierung im Zeitraum zwischen P5 und P20 steigt die Genexpression von MBP (Abbildung 83 A) und UDP-Galaktose:Ceramid Galaktosyltransferase (CGT), dem Enzym, das die Synthese von GalCer katalysiert, im Gehirn der Wildtyp-Maus rapide an. Die Konzentration von MBP (Abbildung 83 A) und GalCer (Abbildung 83 B) im Gewebe nimmt zu. Mit der Vervollständigung der Myelinisierung fällt die Genexpression auf ein geringeres Basis-Level ab (Abbildung 83 A). Da die Halbwertszeit beider Myelinbestandteile hoch ist, steigt die Konzentration von MBP und GalCer auch bei geringer Genexpression über den Zeitraum der Myelinogenese hinaus weiter an.²⁰⁴

Im Gehirn der ASA(-/-)-Maus ist das Expressionsmuster der Myelin-Proteine während der Myelinogenese im Vergleich zum Wildtyp verändert.²⁰⁵ Die Genexpression von MBP erreicht das Maximum etwa eine Woche später als im Gehirn der Wildtyp-Maus. Yaghootfam *et al.* schlussfolgerten, die Myelinogenese in ASA(-/-)-Mäusen verlaufe verzögert ab.

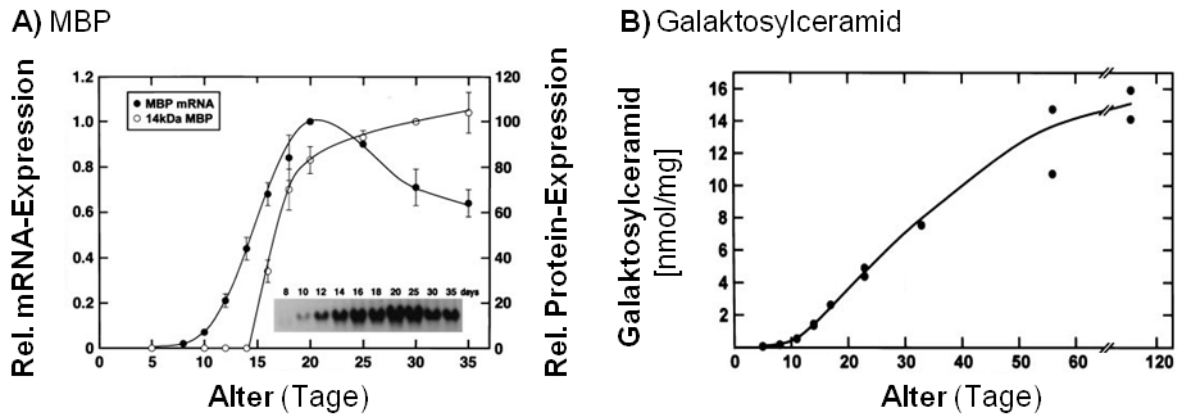


Abbildung 83: Expression von MBP und Galaktosylceramid während der primären Myelinisierung des Gehirns der Maus. Quelle: E. D. Muse, H. Jurevics, A. D. Toews, G. K. Matsushima, P. Morell: Parameters related to lipid metabolism as markers of myelination in mouse brain, *Journal of Neurochemistry* 76 (2001), pp. 77-86.

Sowohl die vergleichende Quantifizierung der Myelinproteine (Kapitel 4.5), als auch der Myelinlipide (Kapitel 4.7.2) hatte im Zuge dieser Arbeit darauf hingewiesen, dass die Myelinisierung in ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäusen zu Beginn der CPZ-Behandlung nichtgleich weit fortgeschritten war. Korreliert die Effizienz der CPZ-induzierten Demyelinisierung mit dem Reifestatus des Myelins, sollte dementsprechend die CPZ-induzierte Demyelinisierung in ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Mäusen unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Tatsächlich bestätigten sowohl Myelinfärbung (Kapitel 4.3), als auch die Quantifizierung der Myelinproteine (Kapitel 4.5), dass **das Ausmaß CPZ-induzierter Demyelinisierung im Gehirn der ASA(-/-)-Maus größer war als in der ASA(+/-)-Maus**. Vor allem im CC war der Unterschied zwischen ASA(+/-)- und ASA(-/-)-Maus groß. In Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten²⁰⁶ war der rostrale Teil des CC in der ASA(+/-)-Maus weniger von Demyelinisierung betroffen. Im Gehirn der ASA(-/-)-Maus erstreckte sich die Demyelinisierung hingegen gleichermaßen über den rostralen wie kaudalen Teil des CC.

1.12 Die Reifung der prä-Oligodendrozyten ist in der ASA(-/-)-Maus gehemmt und verhindert die effiziente Remyelinisierung im CPZ-Modell.

Tabelle 13: Einfluss von CPZ auf die Expression der Myelinproteine im konventionellen MLD-Mausmodell.

	A) ASA(+/-)				B) ASA(-/-)			
	Diät	EP	2. Diät	2. EP	Diät	EP	2. Diät	2. EP
MBP	-	-	↓	-	↓	↓	(↓)	↓
PLP	(↓)	-	-	-	↓	-	↓	↓
CNPase	-	-	↓	-	↓	-	↓	-
Olig2	↑	-	-	(↑)	-	-	-	-

Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse. ↓/↑ signifikante Erniedrigung / Erhöhung gegenüber Mock-behandelter Kontrollgruppe ($p \leq 0,05$), (↓) Tendenz zur Erniedrigung gegenüber Mock-behandelter Kontrolle ($0,05 < p \leq 0,10$). EP = Erholungsphase.

Die Auswirkungen der CPZ-Diät auf die Proteinexpressionslevel der Myelinproteine sind in Tabelle 13 zusammengefasst dargestellt. ASA-heterozygote und -defiziente Mäuse reagieren in Übereinstimmung mit den zuvor erläuterten histologischen Beobachtungen auch auf Ebene der Proteine unterschiedlich auf die Behandlung mit CPZ. Welche Information die Expressionslevel der ausgewählten Proteine dabei im Einzelnen liefern, soll im Folgenden diskutiert werden.

Der Remyelinisierungsprozess unterteilt sich in drei Phasen: 1.) Rekrutierung der OVZ. 2.) Differenzierung der OVZ. 3.) Reifung und Myelinisierung. Der Defekt jeder einzelnen dieser Phasen kann zum Versagen der Remyelinisierung führen. **Es konnte kein Beweis erbracht werden, dass die Zahl der OVZ in ASA-defizienten Mäusen generell erniedrigt, oder die Rekrutierung zum Ort der Demyelinisierung beeinträchtigt ist (Kapitel 4.6.1). So ist zu vermuten, dass die Ursache für die reduzierte Remyelinisierungseffizienz in ASA-defizienten Tieren in der Phase der Differenzierung oder Myelinisierung zu finden ist.**

1.12.1 Differenzierung

Die Differenzierung der OVZ beginnt mit dem Kontakt zwischen OVZ und unmyelinisiertem Axon und ist gekennzeichnet durch die einsetzende Expression von CNPase. CNPase ist, im Gegensatz zu MBP und PLP, ein Myelinprotein, das nicht in den kompaktierten Bereichen des Myelins zu finden, sondern durch die C-terminale Bindung an Tubulin eng mit dem Zytoskelett in den nicht kompaktierten Bereichen assoziiert ist. Die Expression der CNPase beginnt vor MBP und PLP und ist darum ein empfindlicher Marker für das Einsetzen des Myelinisierungsprozesses, weniger für die Quantifizierung gebildeten Myelins.²⁰⁷ Übertragen auf die CPZ-Behandlung kann der Verlust von CNPase als Maß für das Fehlen von mit dem Axon in Kontakt stehenden Oligodendrozyten interpretiert werden. **Da in allen behandelten Gruppen nach Abschluss der Erholungsphase keine anhaltende Reduktion von CNPase nachgewiesen werden konnte, kann geschlussfolgert werden, dass der erste Schritt der Differenzierung, die Kontaktaufnahme des OVZ mit dem unmyelinisiertem Axon, im konventionellen und CST-transgenen MLD-Mausmodell ungehindert abläuft.** Der Defekt, der zur reduzierten Remyelinisierungseffizienz in ASA-defizienten Mäusen führt, ist in einem der darauf folgenden Prozesse zu suchen.

1.12.2 Reifung und Myelinisierung

Die Regulation des Myelinisierungsprozesses ist komplex und unterliegt dem Einfluss einer ganzen Reihe von Transkriptionsfaktoren wie Olig1, Olig2, Sox10, Nkx2.2, Achaete-scute Homolog 1 (ASCL1), Ying Yang 1 (YY1), Transcription Factor 4 (TCF4).²⁰⁸ Abbildung 84 zeigt eine Übersicht über die entwicklungsabhängige Reihenfolge, in der wichtigsten Trans-

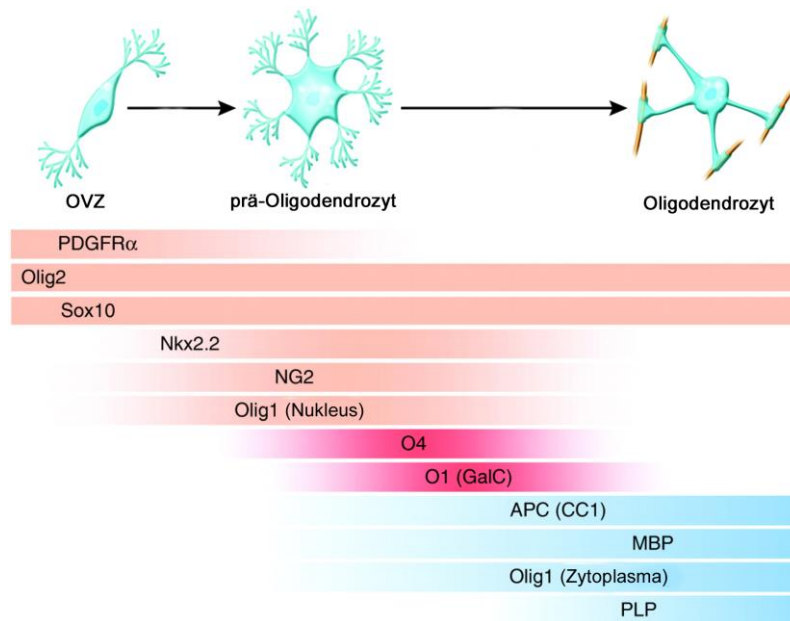


Abbildung 84: Marker der Oligodendrozytenreifung. Entwicklung von OVZ über prä-Oligodendrozyt zu myelinisierendem Oligodendrozyten. Dargestellt ist nicht die Abfolge der Expression, sondern die Reihenfolge in der die Marker mittels Antikörper-basierender Methoden detektiert werden können. Die orange dargestellten Marker PDGF α -Rezeptor, Nkx2.2, NG2 und Olig1 (nukleär) sind charakteristisch für OVZ. O4 (Sulfatid) und O1 (GalCer) werden in prä-Oligodendrozyten exprimiert. Die blau dargestellten Marker APC, MBP, Olig1 (zytoplasmatisch) und PLP sind Marker des reifen, myelinisierenden Oligodendrozyten. Quelle: J. C. Silbereis, E. J. Huang, S. A. Back, D. H. Rowitch: Towards improved animal models of neonatal white matter injury associated with cerebral palsy, *Disease Models and Mechanisms* 3 (2010), pp. 678-688.

kriptionsfaktoren und Proteine im Oligodendrozyten mittels entsprechender Antikörper detektiert werden können. Auch Lipide sind geeignete Marker für den Reifungszustand der Oligodendrozyten, wie Abbildung 84 zeigt. Ihre Expression ist nicht zwingend mit der Synthese von Myelin verbunden: Sulfatid wirkt in der späten Vorläuferzelle bzw. dem frühen Oligodendrozyten als Signaltransduktor und ist maßgeblich an der Regulation der Zelldifferenzierung beteiligt.²⁰⁹ Mit der Reifung des Oligodendrozyten und der Myelinsynthese übernimmt Sulfatid zunehmend strukturgebende Funktion.²¹⁰ Möglicherweise geht dieser funktionelle Wandel der Sulfatide auch mit einer Veränderung ihrer chemischen Natur einher, denn mit der Reifung des ZNS sinkt der Anteil von C18:0-Sulfatid, während der Anteil von C24:1-Sulfatid steigt.²¹¹ Was genau diese Veränderung bewirkt und ob die unterschiedlichen Sulfatide spezifische Funktionen besitzen, ist bis heute nicht erforscht. Da aber auch im Zuge der CPZ-induzierten Demyelinisierung ein Anstieg der Konzentration von C18:0-Sulfatid im Gehirn der Maus zu beobachten war (Kapitel 4.7.2.2), kann vermutet werden, dass C18:0-Sulfatid mit dem frühen Oligodendrozyten assoziiert ist und C24:1-Sulfatid erst mit der Myelinsynthese vermehrt exprimiert wird. Da die Konzentration von C18:0-Sulfatid in ASA(-/-)-Mäusen nach Behandlung mit CPZ erhöht war, müssen OVZ zu prä-Oligodendrozyten differenziert sein. Diese Beobachtung korreliert mit der gezeigten Analyse der Myelinproteine (Kapitel 4.5), die auf ein Stillstehen der Zelldifferenzierung im prä-myelinisierenden Stadium hingewiesen hatte.

Anscheinend ist die Regulation der Zelldifferenzierung und Reifung von OVZ und Oligodendrozyten in ASA-defizienten Mäusen verändert. Olig2 und Sox10 kommt bei dabei eine tragende Rolle zu. Durch direkte Interaktion miteinander und den entsprechenden Genabschnitten steuern Olig2 und Sox10 die Expression der Myelinproteine^{212,213}, wobei der induktive Effekt von Olig2 auf die Expression dieser Proteine Dosis-abhängig ist. Im Tiermodell führt die Überexpression von Olig2 zur vermehrten Expression von Sox10 und einer Beschleunigung der primäre Myelinisierung des ZNS.²¹⁴ Umgekehrt ist die Olig2-Knockout-Maus aufgrund des Fehlens von Oligodendrozyten nicht überlebensfähig.²¹⁵ Die vermehrte Expression von Olig2 in Läsionen Toxin-induzierter Demyelinisierung kennzeichnet eine Subpopulation von OVZ, die zur Remyelinisierung dieser Läsion bestimmt ist.²¹⁶ **Dass in ASA-defizienten im Gegensatz zu ASA-heterozygoten Mäusen nach CPZ-Behandlung kein Anstieg der Olig2-Expression nachgewiesen werden kann (Kapitel 4.5.4), steht im Einklang mit der Beobachtung, dass die Remyelinisierungseffizienz in ASA-defizienten Mäusen reduziert ist.**

1.13 Die Veränderung der Lipid-Rafts in der ASA(-/-)-Maus führt zur Verlangsamung des Myelinogenese.

Inwiefern sich Myelinogenese und Remyelinisierungsprozess unterscheiden, ist nicht bekannt. Da es distinkte Prozesse mit unterschiedlichen Anforderungen an den Oligodendrozyten sind, ist es wahrscheinlich, dass unterschiedliche Signalwege an der Regulation beteiligt sind.²¹⁷ **Trotzdem scheinen sowohl Myelinogenese, als auch Remyelinisierung in ASA-defizienten Mäusen beeinträchtigt zu sein.**

Lipid-Rafts sind kleine Subdomänen der Plasmamembran, die sich durch eine hohe Konzentration von Cholesterol und Glykosphingolipiden auszeichnen. Aufgrund ihrer Zusammensetzung bilden sie eine flüssig-kristalline Phase und sind relativ inert gegenüber der Extraktion mit nichtionischen Detergenzien. Obwohl die Rafts sehr klein sind, können sie einen großen Anteil der Plasmamembran ausmachen. Ihre spezielle Zusammensetzung ermöglicht die gerichtete Wechselwirkung mit Lipiden und Proteinen.

Im einfachsten Modell der Raft-vermittelten Signaltransduktion stellen die Rafts eine Art Plattform in der Plasmamembran dar, die Rezeptoren, Enzyme und Substrate für die Signalweiterleitung enthält. Die Signaltransduktion wird durch das Binden eines aktivierenden Faktors induziert. Differenziertere Modelle beschreiben die Trennung komplementärer Komponenten der Signalkette in Raft- und Nicht-Raft-Domänen. Erst durch Binden des Aktivators kommt es zur Assoziation mit dem Lipid-Raft und zur Signalweiterleitung.²¹⁸

Eine Reihe von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen ist dafür bekannt, in Lipid-Rafts lokalisiert zu sein, darunter auch der PDGF α -Rezeptor. Der PDGF α R ist, wie im Einleitungsteil beschrieben, auch auf der Zelloberfläche der OVZ lokalisiert. Bei physiologischen Konzentrationen von PDGF α ist der Rezeptor nicht in der Lage, die Proliferation des Oligodendrozyten auf direktem Wege zu stimulieren. Vielmehr aktiviert er das mit dem Lipid-Raft assoziierte Integrin α V β 3. Collognato *et al.* haben einen entsprechenden Mechanismus zur Steuerung der Entwicklung des Oligodendrozyten postuliert, der in Abbildung 85 dargestellt ist.²¹⁹

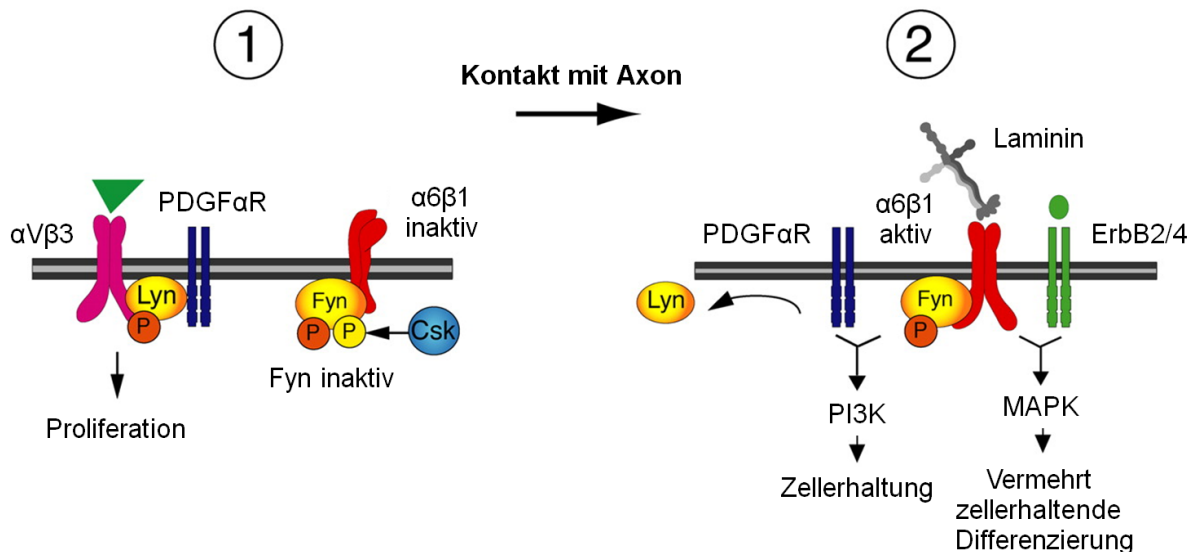


Abbildung 85: Modell zur Integrin-vermittelten Regulation der Oligodendrozyten-Reifung. In OVZ ist die Tyrosinkinase Lyn mit dem Komplex von PDGF α R und Integrin α V β 3 an der Aktivierung des Proliferations-Signalweges beteiligt. Bei Bindung von Laminin 2, das vom Axon exprimiert wird, kommt es zur Aktivierung des Komplexes von Integrin α 6 β 1 und Tyrosinkinase Fyn. Lyn dissoziiert aus dem PDGF α R- α V β 3-Komplex. Der aktive Fyn- α 6 β 1-Komplex kann, in Abhängigkeit von der Aktivierung des PDGF α - oder ErbB2/4-Rezeptors, den PI3K- oder MAPK-Signalweg aktivieren, die auf Zellerhaltung und Differenzierung ausgelegt sind. Csk = COOH-terminale Src-Kinase, ErbB2/4 = Epidermal growth factor-Rezeptor, MAPK = Mitogen-aktivierte Protein-Kinase, PDGF α R = PDGF α -Rezeptor, PI3K = Phosphoinositid-3-Kinase. Quelle: H. Collognato, S. Ramachandrapa, I. M. Olsen, C. French-Constant: Integrins direct Src family kinases to regulate distinct phases of oligodendrocyte development, *The Journal of Cell Biology* 167 (2004), 2, pp. 365-375.

Die Aktivierung des Komplexes aus PDGF α R und Integrin α V β 3 führt zur Phosphorylierung der mit dem Komplex assoziierten Tyrosinkinase Lyn, die den Signalweg für die Proliferation der Zelle aktiviert. Die ebenfalls mit dem Lipid-Raft assoziierte Tyrosinkinase Fyn, die einen Komplex mit Integrin α 6 β 1 bildet, ist zu diesem Zeitpunkt durch Phosphorylierung inaktiviert. Kommt die OVZ mit einem unmyelinisierten Axon in Berührung, schaltet sich der Signalweg zur Zellerhaltung und Differenzierung ein. Ausschlaggebend hierfür ist die Bindung von Laminin 2 an Integrin α 6 β 1. Diese Bindung hat mehrere Veränderungen zur Folge: Die Tyrosinkinase Lyn dissoziiert aus dem Komplex mit PDGF α R und Integrin α V β 3, so dass der PDGF α R einen neuen Komplex mit Integrin α 6 β 1 und der Tyrosinkinase Fyn bilden kann. Außerdem induziert die Bindung von Laminin 2 die Reduktion der COOH-terminalen Src-Kinase (Csk), so dass die Phosphorylierung der Tyrosinkinase Fyn ab- und ihre Aktivität

zunimmt. Der aktive Komplex von Fyn und Integrin $\alpha6\beta1$ kann dann, in Abhängigkeit von der Aktivierung des PDGF α - oder ErbB2/4-Rezeptors, den PI3K- oder MAPK-Signalweg aktivieren. Beide Signalwege sind auf das Überleben der Zelle und die Differenzierung des Oligodendrozyten ausgerichtet.

Es ist schon lange bekannt, dass die Lipidzusammensetzung der Rafts ausschlaggebend für ihre Funktionalität ist. Auch Sulfatid kommt dabei eine tragende Rolle zu, wie Baron *et al.* erst 2014 gezeigt haben.²²⁰ Im Zusammenspiel mit Laminin 2 reguliert Sulfatid die Differenzierung des Oligodendrozyten, indem es das Verschmelzen von Lipid-Rafts, und so die laterale Wechselwirkung von PDGF α R und Integrin $\alpha6\beta1$ vermittelt. Baron *et al.* postulieren weiter, dass der Komplex aus Laminin, Integrin $\alpha6\beta1$ und Sulfatid den zeitlichen Ablauf der Oligodendrozytenreifung reguliert. Beobachtungen von Hirahara *et al.* unterstützen diese Hypothese.²²¹ In der CST-Knockout-Maus, die kein Sulfatid exprimiert, beobachten sie sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* eine Beschleunigung der Oligodendrozytenreifung, verbunden mit einer erhöhten Anzahl reifer Oligodendrozyten im Gehirn der CST-Knockout-Maus. **Sulfatid wirkt so als ein negativer Regulator der Oligodendrozytenreifung.** Die erhöhte Anzahl reifer Oligodendrozyten im Gehirn der CST-Knockout-Maus resultiert auch aus dem Unterbinden der Interaktion des PDGF α R mit Integrin $\alpha6\beta1$ in Abwesenheit von Sulfatid, so dass der PDGF α R fortlaufend die proliferativ wirkende Signalkaskade aktivieren kann und mehr Vorläuferzellen gebildet werden.²²²

Die Akkumulation von Sulfatid im MLD-Mausmodell findet nicht nur im Lysosom statt, sondern führt auch zu Veränderungen der Plasmamembran. Während der Sulfatidgehalt im Gehirn 24 Monate alter ASA(-/-)-Mäuse gegenüber dem Wildtyp insgesamt um 35 % erhöht ist, kann in den Lipid-Rafts ein Anstieg um 85 % beobachtet werden.²²³ Die massenspektrometrische Analyse der Lipid-Raft-Fraktion des Gehirns zeigt, neben einem insgesamt erhöhten Sulfatidgehalt, dass während der Myelinogenese der relative Anteil von C18:0-Sulfatid in den Rafts im Vergleich zur Wildtyp-Maus erniedrigt ist.²²⁴ Sich auf diese Daten stützend, haben Pituch *et al.* als erste die Auswirkung des veränderten Sulfatidgehalts auf die Signaltransduktion mittels Lipid-Rafts untersucht.²²⁵ Sie zeigen *in vitro*, dass die Bildung von Oligodendrozyten aus neuronalen Vorläuferzellen ASA-defizienter Mäuse reduziert ist, da der PDGF α R in Vesikel verpackt und aus der Zelle transportiert wird und nicht in den Lipid-Rafts lokalisiert ist. Die Lokalisierung in den Rafts ist aber ausschlaggebend für die effiziente Phosphorylierung des PDGF α R.²²⁶ In Folge dessen kommt es zu einer verminderten Aktivierung des PI3K-Signalweges. Die Behandlung der Zellen mit aktiver ASA korrigiert den Phä-

notypen unter Wiederherstellung der korrekten Zusammensetzung der Lipid-Rafts (Erhöhung des Anteils von C18:0-Sulfatid) und Relokalisierung des PDGF α R.

In wie fern dieser *in vitro* beobachtete Effekt auch *in vivo* Relevanz hat, ist noch nicht weiter erforscht. Der Phänotyp der PDGF α R-Knockout-Maus ist embryonal letal.²²⁷ Ein schwerwiegender Mangel an PDGF α R in der ASA(-/-)-Maus ist also unwahrscheinlich. **Wahrscheinlich ist der Effekt der Fehllokalisierung in der ASA(-/-)-Maus mit der Reduktion des Rezeptors in der PDGF α R(+/-)-Maus zu vergleichen. Diese Maus zeigt im Falle von CPZ-induzierter Demyelinisierung interessanterweise eine Reduktion von OVZ-Proliferation und Reifung.**²²⁸

Sowohl die absolute Menge von Sulfatid in den Lipid-Rafts²²⁹, als auch die Kettenlänge der enthaltenen Sulfatide^{230,231} haben Einfluss auf die Differenzierung der OVZ. Da beide Parameter in der ASA(-/-)-Maus verändert sind, ist es an dieser Stelle nicht möglich zu entscheiden, was genau zum Scheitern der Remyelinisierung in der ASA(-/-)-Maus führt. Es scheint allerdings wahrscheinlich, dass die veränderte Zusammensetzung der Lipid-Rafts in den OVZ dafür verantwortlich ist.

Die Untersuchung der CST-transgenen Maus im CPZ-Modell, die aufgrund der erhöhten Sulfatidsyntheserate genauere Informationen über den Zusammenhang von Sulfatidmenge und Remyelinisierungseffizienz geben sollte, gestaltete sich aufgrund der großen Varianz der biologischen Replikate schwierig (Kapitel 4.5).

Die Expression des CST-Transgens erfolgt unter Kontrolle des PLP-Promotors (PLP-P). Obwohl die Expression von PLP als Strukturkomponente des Myelins erst während der Myelinogenese maximal ist, kann die Aktivität des PLP-P, verbunden mit der Expression von DM20, der leichteren Spleißvariante von PLP, schon im Embryo nachgewiesen werden.²³²

Die Aktivität des PLP-P bzw. die Expression von DM20 beschränkt sich auf eine Subpopulation von NG2-positiven Vorläuferzellen, die dazu bestimmt ist, während der Myelinogenese zu Oligodendrozyten zu differenzieren. Zellen ohne nachweisbare PLP-P-Aktivität differenzieren nicht, sondern bilden die NG2-positive Population adulter Vorläuferzellen im Gehirn.²³³

Aufgrund der frühen PLP-P-Aktivität in den zur Myelinisierung bestimmten OVZ ist davon auszugehen, dass der Sulfatidgehalt der Membran an der Myelinogenese beteiligter Zellen in der CST-transgenen ASA(-/-)-Maus gegenüber dem konventionellen MLD-Mausmodell erhöht ist. Im Hinblick auf die vorangehend beschriebene Hemmung des OVZ-Differenzierung durch den erhöhten Sulfatidgehalt der Lipid-Rafts in der ASA(-/-)-Maus, wäre zu erwarten gewesen, dass zumindest die Myelinogenese in CST-transgenen ASA(-/-)-Mäusen noch langsamer abläuft, als in konventionellen ASA(-/-)-Mäusen. Inwiefern sich

diese Hypothese auf die Remyelinisierung übertragen lässt, ist unklar, da nicht bekannt ist, welche Population von Vorläuferzellen (PLP-P-positiv/PLP-P-negativ) letztendlich am Remyelinisierungsprozess beteiligt ist.

Die starken Schwankungen der Ergebnisse lassen vermuten, dass die Beantwortung dieser Frage nicht trivial ist, sondern beide Vorläufertypen am Remyelinisierungsprozess beteiligt sind und individuelle Faktoren zum Tragen kommen. **Dass die Remyelinisierung in tgASA(-/-)-Mäusen beeinträchtigt ist, kann aber bestätigt werden: Die Konzentration von GalCer war, wie in konventionellen ASA(-/-)-Mäusen, nach Abschluss der Erholungsphase in CPZ-behandelten Mäusen erniedrigt (Kapitel 4.7.2.1.2) und die C18/C24-Ratio erhöht (Kapitel 4.7.2.2.2). Eine vermehrte Expression von Olig2 im Zuge der Remyelinisierung konnte nicht nachgewiesen werden (Kapitel 4.5.4.2).**

1.14 Die Remyelinisierungseffizienz ist im zweiten Behandlungszyklus reduziert.

Sowohl in ASA-heterozygoten, als auch –defizienten Mäusen führte die Wiederholung der CPZ-Behandlung zu einer Verstärkung des demyelinisierenden Effektes sowie einer Verlangsamung der Remyelinisierung. Auch wenn die Effizienz der Remyelinisierung in ASA-heterozygoten Mäusen nach Abschluss der Erholungsphase auf Ebene der Myelinproteine (Kapitel 4.5) nicht nachweisbar beeinträchtigt war, deutet das Fehlen der vermehrten Expression von Olig2 (Kapitel 4.5.4.1), die Erhöhung des Verhältnisses von C18:0- zu C24:1-Sulfatid (Kapitel 4.7.2.2.1) und des Verhältnisses von Sulfatid zu GalCer (Kapitel 4.7.2.1.1) darauf hin, dass die Reifung der Oligodendrozyten beeinträchtigt war. Dieser Beobachtung können unterschiedliche Ursachen zu Grunde liegen.

Unabhängig von der Gesamtdauer der CPZ-Diät setzt der Remyelinisierungsprozess in der fünften Woche nach Behandlungsbeginn ein, wenn die Demyelinisierung des Corpus callosum maximal ist.²³⁴ Wird die CPZ-Behandlung nach sechs Wochen beendet, kann die Remyelinisierung ungehindert ablaufen und ist nach Abschluss der Erholungsphase vollständig. Bleibt der demyelinisierende Stimulus – CPZ – über den gängigen Zeitraum von sechs Wochen hinaus erhalten, tritt auch nach Beenden der CPZ-Behandlung keine oder nur unvollständige Remyelinisierung ein. Dieser Zustand wird als chronische Demyelinisierung bezeichnet. Das Scheitern der Remyelinisierung ist dabei nicht in einem Mangel an OVZ begründet, die auch noch nach Verdopplung der Behandlungsdauer im CC zu finden sind.²³⁵ Vielmehr ist die Differenzierung der OVZ beeinträchtigt. Der prä-Oligodendrozyt verharrt nach Kontaktaufnahme mit dem unmyelinisierten Axon in einem inaktiven Zustand.²³⁶

Wodurch das Fortschreiten der Remyelinisierung im chronischen CPZ-Modell gehemmt wird, ist unklar. Es ist aber zu vermuten, dass die Mikroumgebung in der Läsion aufgrund der

vermehrten Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen durch Astrozyten und Mikrogliazellen einen hemmenden Einfluss auf die Differenzierung der OVZ hat. Möglicherweise führt auch die Wiederholung der CPZ-Behandlung zu Veränderungen der Mikroumgebung, die die Reifung der Oligodendrozyten hemmt.

Auch das steigende Alter der Versuchstiere kann Ursache für den verstärkten Effekt der zweiten CPZ-Behandlung sein. Es ist gezeigt worden, dass die Fähigkeit der OVZ zur Differenzierung in alternden Tieren reduziert ist. Diese Reduktion beruht möglicherweise auf der vermehrten Expression des repressiv wirkenden Transkriptionsfaktors Nkx2.2,²³⁷ oder epigenetischen Veränderungen, die zu Störungen der Expression der Myelin-Gene führen²³⁸.

In ASA-defizienten Mäusen ist, neben einem grundsätzlich bestehenden Defekt der Oligodendrozytenreifung, die altersabhängige Entwicklung des Phänotyps zu berücksichtigen. Die Manifestation der endogene Astroglieose zu Beginn des zweiten Behandlungszyklus könnte durch Expression von Wachstumsfaktoren und Zytokinen ebenfalls einen zunehmend hemmenden Effekt auf die Zellreifung und Remyelinisierung haben.

1.15 Die CPZ-induzierte Sulfatid-Speicherung in ASA-defizienten Mäusen führt nicht zu Neuroinflammation.

Der Vergleich mit Literatur zur Zytokinexpression im CPZ-Modell lässt nur wenige Rückschlüsse auf die hier gezeigten Ergebnisse zu, wie das folgende Beispiel von Biancotti *et al.* zeigen soll, die im Zuge der CPZ-Behandlung über einen signifikanten Anstieg der mRNA-Level von TNF α , IL-1 β und RANTES berichten.²³⁹

Im Unterschied zu den meisten Publikationen, die mit CPZ-induzierter Demyelinisierung arbeiten, verwendeten Biancotti *et al.* für ihre Experimente weibliche Mäuse. Es ist aber bekannt, dass weibliche Hormone eine neuroprotektive Wirkung haben können. So wird bei weiblichen Patienten mit Multipler Sklerose während der Schwangerschaft ein Absinken des Schubrisikos beobachtet.²⁴⁰ Behandelt man männliche Mäuse während der CPZ-Diät mit Östrogen und Progesteron, ist eine Reduktion von De- und eine Verstärkung der Remyelinisierung zu beobachten.²⁴¹ Der Effekt beruht auf der verstärkten Expression des Wachstumsfaktors Insuline like growth factor (IGF) 1. Da IGF-1 auch durch TNF α reguliert wird, ist ein Einfluss der Hormone auf andere Zytokine nicht auszuschließen.²⁴²

Die Quantifizierung von Zytokinen auf mRNA-Level ist eine gängige Methode, aber nur bedingt mit der Quantifizierung auf Proteinebene zu vergleichen. Gute Übereinstimmung ist nur für IFN γ vorhanden, mäßige Übereinstimmung für MIP-1 α , TNF α , MCP-1, RANTES und wenige andere. Für einen Großteil aber, darunter auch IL-1 β , ist keine Korrelation zwischen Genexpression und Proteinlevel nachzuweisen.²⁴³ Diese Diskrepanz beruht auf der posttranskriptionellen und posttranslationalen Regulation der Zytokinexpression.

Auf posttranskriptioneller Ebene kann die Translation der Zytokin-mRNA über die Wechselwirkung mit RNA-bindenden Proteinen sowie mikroRNAs gehemmt werden, so dass mRNA-Level und Protein-Level eines Zytokins nicht korrelieren.²⁴⁴ Für eine Reihe von Zytokinen, darunter IL-1 β und IL-6 ist außerdem eine Regulation auf posttranslationaler Ebene vorhanden. Die Transkription dieser Zytokine führt zur Bildung einer inaktiven Vorstufe (pro-IL-1 β , pro-IL-6), die in der Zelle verbleibt und nicht sekretiert wird. Zur Sekretion bedarf es eines zusätzlichen Stimulus, der die Bildung des Inflammasoms aktiviert, in dem die Vorstufen in die aktive Form überführt werden, bevor sie sekretiert werden können.²⁴⁵

Wie für die Ergebnisse von Biancotti *et al.* lassen sich für nahezu jede Quelle Faktoren finden, die eine direkte Vergleichbarkeit mit den hier gezeigten Daten ausschließen. Nicht einmal die Daten von Stein *et al.*, die aus demselben Labor stammen, sind dazu geeignet, da Mäuse mit anderem genetischen Hintergrund (129/Ola) verwendet wurden.²⁴⁶ Es ist bekannt, dass De- und Remyelinisierung²⁴⁷, aber auch die Immunantwort im allgemeinen²⁴⁸, erheblich von der Mauslinie, bzw. deren MHC-Haplotyp, abhängen.

Die CPZ-Behandlung führte weder in konventionellen, noch in CST-transgenen ASA(-/-)-Mäusen zur Ausbildung von Neuroinflammation. Ob Neuroinflammation im MLD-Mausmodell hemmend auf die Remyelinisierungseffizienz wirkt, kann anhand der gezeigten Daten nicht beantwortet werden.

1.15.1 Die Art der Immunantwort entscheidet über den Phänotyp im MLD-Mausmodell.

Die Annahme, dass ein Zusammenhang zwischen Menge von Speichermaterial und dem Auftreten von Demyelinisierung und Neuroinflammation besteht, resultiert unter anderem aus der Verstärkung des Phänotyps der ASA(-/-)-Maus durch Überexpression von Sulfatid in der CST-transgenen ASA(-/-)-Maus. Wie die vermehrte Menge von Speichermaterial zur Demyelinisierung beiträgt, ist allerdings nicht aufgeklärt. Neuroinflammation kann grundsätzlich Auslöser oder Konsequenz von Demyelinisierung sein. Im Falle von Multipler Sklerose und Guillain-Barré-Syndrom ist die Bildung autoreaktiver Antikörper Triebkraft der Demyelinisierung.²⁴⁹ Wenn durch Fehlfunktion von Zellorganellen, wie Peroxisomen oder Lysosomen, eine Veränderung des Myelin-Lipid-Stoffwechsels zum Zelluntergang des Oligodendrozyten führt und dabei freigesetzte Myelinlipide oder deren Derivate als Aktivator auf Immunzellen wirken, kann Neuroinflammation eine Konsequenz von Demyelinisierung sein.²⁵⁰

Entscheidend für den neurodegenerativen Charakter von Inflammation sind der vorherrschende Aktivierungszustand der Mikrogliazellen und die induzierte Immunantwort.

Der Vergleich der Zytokinprofile konventioneller und CST-transgener ASA(-/-)-Mäuse (Kapitel 4.8.3.2) zeigt eine mit steigendem Alter zwar erhöhte Expression von IL-2, IL-5, IL-10 und

IFN γ in der tgASA(-/-)-Maus, aber kein Ungleichgewicht zwischen M1- und M2-Aktivierungszustand der Mikrogliazellen. Wahrscheinlich verschiebt sich die Zytokinexpression erst mit steigendem Alter, also steigender Menge von Speichermaterial, in Richtung eines Aktivierungstyps. Aufgrund der belegten positiven Wirkung von Simvastatin auf den Phänotyp der tgASA(-/-)-Maus²⁵¹ ist zu vermuten, dass es sich dabei um eine Verschiebung zum M1-Phänotyp handelt, denn Simvastatin wirkt gezielt der Aktivierung von T_{H1}-Zellen entgegen.²⁵² Über den Auslöser für diese Verschiebung kann nur spekuliert werden, denn die Regulation des Aktivierungszustandes von Mikrogliazellen im Zuge neurodegenerativer Erkrankungen ist sehr komplex und kann auch durch exogene Faktoren stark beeinflusst werden.²⁵³ So gelangen Mikrogliazellen durch die Phagozytose apoptotischer Zellen in eine Art voraktivierten Zustand, der sie empfänglicher macht für die Induktion des voll aktiven Zustandes, zum Beispiel durch systemische Infektionen. Neben den aktivierend wirkenden existieren auch Faktoren, die der Mikrogliaaktivierung entgegen wirken. Dazu zählen die Ligand-Rezeptor-Paare CD200/CD200-Rezeptor, Fraktalkin/Fraktalkin-Rezeptor und SIRP α /CD47. Auch das Wegfallen eines hemmend wirkenden Faktors kann zum Umschalten der Mikrogliazelle in den voll aktivierten Zustand führen. Im Zuge der Alzheimer-Erkrankung zeichnen sich pathologisch betroffene Bereiche des Gehirns durch eine reduzierte Expression von CD200 und CD200R aus.²⁵⁴

Der genaue Zusammenhang von Sulfatidspeicherung, Sulfatidmenge, Aktivierung der Mikrogliazellen und Demyelinisierung wird noch genauer untersucht werden müssen, bis eine fundierte Erklärung für die divergenten Phänotypen des konventionellen und CST-transgenen MLD-Mausmodells gegeben werden kann.

1.15.2 Methode Multiplex-ELISA: Durch Modifikation von Probe und Probenvorbereitung kann die Aussagekraft der Messung erhöht werden.

Dass die Ergebnisse der Zytokinmessungen aufgrund der fehlenden statistischen Signifikanz nur beschränkte Aussagekraft besitzen, wurde bereits erläutert. Im Folgenden sollen die Gründe dafür diskutiert, sowie Lösungsansätze präsentiert werden.

Die endogene Erhöhung der Zytokinexpression in konventionellen, wie CST-transgenen ASA(-/-)-Tieren ist erst mit Akkumulation einer großen Menge von Speichermaterial, weit nach Abschluss des ersten Lebensjahres messbar.²⁵⁵ Wie in Abbildung 48 gezeigt, ist das Ausmaß der Sulfatidspeicherung nach Abschluss der CPZ-Behandlung (Abbildung 48 A) aber deutlich geringer, als bei nachweisbarer Erhöhung der Zytokinexpression im Alter von 24 Monaten (Abbildung 48 B). Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Expression der Zytokine sich im pikomolaren Konzentrationsbereich bewegt und zugleich streng lokal

begrenzt ist, stellt sich die Frage, ob der CPZ-induzierte Effekt über die Gesamtheit des Gehirns messbar sein kann.

Biancotti *et al.* beschränkten sich in ihrer Untersuchung zur Zytokinexpression im CPZ-Modell auf Kortex, Hippocampus, Striatum und Corpus callosum,²⁵⁶ während im Zuge dieser Arbeit Homogenat aus Gesamtgehirn verwendet wurde. Für auf dieser Arbeit basierende, noch folgende Projekte ist die Beschränkung auf ausgewählte Hirnregionen, in denen CPZ nachweislich Demyelinisierung induziert, sicherlich sinnvoll und wird die Detektion CPZ-induzierter Effekte erleichtern.

Auch die Vorbereitung der Probe selbst kann nach Auswertung der Ergebnisse und entsprechender Literatur weiter optimiert werden. Die im Zuge dieser Arbeit zur Zytokinquantifizierung verwendete zytosolische Fraktion des Gewebehomogenats wurde durch Zentrifugation von den unlöslichen Zellbestandteilen des Gewebehomogenats abgetrennt. Da keine Detergenzien verwendet wurden, sind Mikrovesikel, die Zytokine enthalten können²⁵⁷, unter den gewählten Bedingungen zu einem Großteil im Pellet lokalisiert und entziehen sich der Quantifizierung.²⁵⁸ Es ist gezeigt worden, dass der Einsatz milder, nichtionischer Detergenzien sich gut eignet, die Zytokinextraktion aus Gewebe zu verbessern, ohne die Funktionalität der Messung per ELISA zu beeinträchtigen.²⁵⁹

In Kombination mit einer reduzierten Endverdünnung der Probe könnte die Reproduzierbarkeit und der Informationsgehalt der Messung verbessert werden.

6. Fazit und Ausblick

Die zuvor präsentierten Ergebnisse zeigen, dass die Akkumulation von Sulfatid in den Lipid-Rafts der ASA(-/-)-Maus wahrscheinlich zu einer Störung der Oligodendrozytendifferenzierung führt. Der Myelinisierungsprozess ist sowohl während der primären Myelinisierung des ZNS, als auch im Zuge der Remyelinisierung verlangsamt. Die durch Wiederholung der CPZ-Behandlung induzierte Aufsummierung des Myelinisierungsdefizits zeigt, dass die Remyelinisierungseffizienz bei anhaltender Demyelinisierung nicht zur Selbstheilung ausreicht. Da nicht nachgewiesen werden konnte, dass Zahl oder Migration der OVZ durch Akkumulation von Sulfatid beeinträchtigt sind, sondern mit hoher Wahrscheinlichkeit die Differenzierung des Oligodendrozyten nach der Kontaktaufnahme mit dem unmyelinisierten Axon gehemmt ist, kann die exogene Induktion der Differenzierung ein potentieller Ansatz zur Behandlung der fortschreitenden Demyelinisierung in MLD-Patienten sein.

Die Regulation von Oligodendrozytendifferenzierung und Myelinisierungsprozess sind zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit immer noch Gegenstand der Forschung. Die Anzahl entsprechender Therapieansätze ist beschränkt. Beispielsweise befindet sich, zehn Jahre nach der Identifikation von Leucine-rich Repeat and Immunoglobulin-like Domain-contacting Protein 1 (LINGO-1) als negativer Regulator der Myelinisierung²⁶⁰, nur ein entsprechender Antikörper zur Behandlung von Multipler Sklerose in Phase II der klinischen Erprobung.²⁶¹

Der im Zuge dieser Arbeit etablierte Ansatz zur CPZ-induzierten Demyelinisierung in der ASA(-/-)-Maus eignet sich gut für entsprechende Untersuchungen. Durch die Induktion der Demyelinisierung im Jungtier verkürzt sich die Vorbereitungsphase für den Tierversuch enorm, da zuvor nur alte tgASA(-/-)-Mäuse (>1,5 Jahre) zur Untersuchung von De- und Remyelinisierung verwendet werden konnten. Zugleich ist es nicht mehr notwendig CST-transgene Mäuse zu verwenden, was die Effizienz der Tierzucht steigert. Denkbar wäre ein Versuchsansatz, in dem die Diät-Phase von sechs auf fünf Wochen verkürzt wird (= Demyelinisierung maximal) und die Effizienz der Remyelinisierungsphase mit und ohne Unterstützung des Anti-LINGO-1 Antikörpers untersucht wird. Die Mittel zur Quantifizierung der Remyelinisierungseffizienz sind in dieser Arbeit bereits etabliert worden.

Die Fragen, was letztendlich der Unterschied zwischen konventionellem und CST-transgenen MLD-Mausmodell ist, der zur Demyelinisierung führt und ob auftretende Neuroinflammation der Auslöser, oder umgekehrt ein Resultat ist, bleiben unbeantwortet. Zur Klärung wird es unumgänglich sein, die Experimente zur CPZ-induzierten Demyelinisierung mit CST-transgenen Mäusen unter Erhöhung der Anzahl der biologischen Replikate zu wieder-

holen. Die Erweiterung des Experimentes um weitere Behandlungszyklen scheint sinnvoll, um den Einfluss von akkumulierendem Speicher material besser zu verstehen. Auch die *in vitro* Analyse der Lipid-Rafts und ihrer Funktionalität muss weitergeführt werden, um die Ursachen des Myelinisierungsdefektes zu identifizieren und zu quantifizieren.

7. Literaturverzeichnis

-
- ¹ Online Journal of Ophthalmology: <http://www.onjoph.com/patinfo/funktion/zahlen.html>; Stand 04.02.2016.
- ² Network Glia: <http://www.networkglia.eu/oligodendrozyten>; Stand 04.02.2016.
- ³ R. J. M. Franklin, C. ffrench-Constant: Remyelination in the CNS: from biology to therapy, *Nature Review Neuroscience* 9 (2008), pp. 839-855.
- ⁴ C. ffrench-Constant, M. Raff: Proliferating bipotential glial progenitor cells in adult rat optic nerve, *Nature* 319 (1986), pp. 499-502.
- ⁵ S. Belachew, R. Chittajallu, A. A. Aguirre, X. Yuan, M. Kirby, S. Anderson, V. Gallo: Postnatal NG2 proteoglycan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons, *The Journal of Cell Biology* 161 (2003), 1, pp. 169-186.
- ⁶ E. H. Kolodny, S. Sathe: *The Molecular and Genetic Basis of Neurologic and Psychiatric Disease*. Philadelphia; H. N. Rosenberg, 2008, 4. Ausgabe, pp. 230-237.
- ⁷ V. Gieselmann: Metachromatic Leukodystrophy: Recent Research Developments, *Journal of Child Neurology* 18 (2003), pp. 591-594.
- ⁸ B. Hess, P. Saftig, D. Hartmann, R. Coenen, R. Lüllmann-Rauch, H. H. Goebel, M. Evers, K. von Figura, R. D'Hooge, G. Nagels, P. De Deyn, C. Peters, V. Gieselmann: Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice: Relationship to human metachromatic leukodystrophy, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93 (1996), pp. 14821-14826.
- ⁹ D. Wittke, D. Hartmann, V. Gieselmann, R. Lüllmann-Rauch: Lysosomal sulfatide storage in the brain of arylsulfatase A-deficient mice: cellular alterations and topographic distribution, *Acta Neuropathologica* 108 (2004), pp. 261-271.
- ¹⁰ Y. Kishimoto, W. E. Davies, N. S. Radin: Turnover of the fatty acids of rat brain gangliosides, glycerophosphatides, cerebroside and sulfatides as a function of age, *Journal of Lipid Research* 6 (1965), pp. 525-531.
- ¹¹ H. Ramakrishnan, K. H. Hedayati, R. Lüllmann-Rauch, C. Wessig, S. N. Fewou, H. Maier, H. H. Goebel, V. Gieselmann, M. Eckhardt: Increasing sulfatide synthesis in myelin-forming cells of arylsulfatase A-deficient mice causes demyelination and neurological symptoms reminiscent of human metachromatic leukodystrophy, *The Journal of Neuroscience* 27 (2007), 35, pp. 9482-9490.
- ¹² D. Kidd, J. Nelson, F. Jones, H. Dusoir, I. Wallace, S. McKinstry, V. Patterson: Long-term stabilization after bone marrow transplantation in juvenile metachromatic leukodystrophy, *Archives of Neurology* 55 (1998), pp. 98-99.
- ¹³ A. Biffi, A. Capotondo, S. Fasano, U. del Carro, S. Marchesini, H. Azuma, M. C. Malaguti, S. Amadio, R. Brambilla, M. Grompe, C. Bordignon, A. Quattrini, L. Naldini: Gene therapy of metachromatic leukodystrophy reverses neurological damage and deficits in mice, *The Journal of Clinical Investigation* 116 (2006), 11, pp. 3070-3082.
- ¹⁴ E. D. Gaier, B. A. Eipper, R. E. Mains: Copper signaling in the mammalian nervous system: synaptic effects, *Journal of Neuroscience Research* 91 (2013), pp. 2-19.
- ¹⁵ H. Behrens, M. Ganzer, T. Hiepe: *Lehrbuch der Schafkrankheiten*. Berlin: Blackwell Wissenschafts-Verlag GmbH, 2001, 4. Auflage, p. 122.
- ¹⁶ W. W. Carlton: Response of mice to the chelating agents sodium diethyldithiocarbamate, α -biscyclohexanone oxaldihydrazone, *Toxicology And Applied Pharmacology* 8 (1966), pp. 512-521.
- ¹⁷ E. Jacobsen, F. J. Langmyhr, A. R. Selmer-Olsen: On the use of bis-cyclohexanone-oxaldihydrazone and bis-acetaldehyde-oxaldihydrazone in the analysis of copper, *Analytica Chimica Acta* 24 (1961), pp. 579-588.
- ¹⁸ L. Messori, A. Casini, C. Gabbiani, L. Sorace, M. Muniz-Miranda, P. Zatta: Unraveling the chemical nature of copper cuprizone, *Dalton Transactions* (2007), pp. 2112-2114.

-
- ¹⁹ F. Benetti, M. Ventura, B. Salmini, S. Ceola, D. Carbonera, S. Mammi, A. Zitolo, P. D'Angelo, E. Urso, M. Maffia, B. Salvato, E. Spisni: Cuprizone neurotoxicity, copper deficiency and neurodegeneration, *NeuroToxicology* 31 (2010), pp. 509-517.
- ²⁰ D. Strausak, J. F. Mercer, H. H. Dieter, W. Stremmel, G. Mulhaupt: Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases, *Brain Research Bulletin* 55 (2001), 2, pp. 175-185.
- ²¹ K. Karram, S. Goebbels, M. Schwab, K. Jennissen, G. Seifert, C. Steinhäuser, K. A. Nave, J. Trotter: NG2-expressing cells in the nervous system revealed by the NG2-EYFP-knockin mouse, *Genesis* 46 (2008), pp. 743-757.
- ²² M. Thallmair, J. Ray, W. B. Stallcup, F. H. Gage: Functional and morphological effects of NG2 proteoglycan deletion on hippocampal neurogenesis, *Experimental Neurology* 202 (2006), pp. 167-178.
- ²³ B. Hess, P. Saftig, D. Hartmann, R. Coenen, R. Lüllmann-Rauch, H. H. Goebel, M. Evers, K. von Figura, R. D'Hooge, G. Nagels, P. De Deyn, C. Peters, V. Gieselmann: Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice: Relationship to human metachromatic leukodystrophy, *a. a. O.*, pp. 14821-14826.
- ²⁴ H. Ramakrishnan, K. H. Hedayati, R. Lüllmann-Rauch, C. Wessig, S. N. Fewou, H. Maier, H. H. Goebel, V. Gieselmann, M. Eckhardt: Increasing sulfatide synthesis in myelin-forming cells of arylsulfatase A-deficient mice causes demyelination and neurological symptoms reminiscent of human metachromatic leukodystrophy, *a. a. O.*, pp. 9482-9490.
- ²⁵ P. Chomczynski, N. Sacchi: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Analytical Biochemistry* 162 (1987), 1, pp. 156-159.
- ²⁶ Ebenda.
- ²⁷ J. E. Scott, J. Dorling: Differential staining of acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) by alcian blue in salt solutions, *Histochemie* 5 (1965), pp. 221-233.
- ²⁸ D. L. Stilwell: A Sudan Black B myelin stain for peripheral nerves, *Stain Technology* 32 (1956), 1, pp. 19-23
- ²⁹ B. Clancy, L. J. Cauller, Reduction of background autofluorescence in brain sections following immersion in sodium borohydride, *Journal of Neuroscience Methods* 83 (1998), pp. 97-102.
- ³⁰ S. A. Schnell, W. A. Staines, M. W. Wessendorf: Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue, *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 47 (1999), 6, pp. 719-730.
- ³¹ A. D. Marmorstein, L. Y. Marmorstein, H. Sakaguchi, J. G. Hollyfield: Spectral profiling of autofluorescence associated with lipofuscin, Bruch's membrane, and sub-RPE deposits in normal and AMD eyes, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 43 (2002), 7, pp. 2435-2441.
- ³² M. A. Williams, R. H. McCluer: The use of Sep-Pak C18 cartridges during the isolation of gangliosides, *The Journal of Neurochemistry* 35 (1980), 1, pp. 266-269.
- ³³ M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Stuttgart, New York: Thieme, 2005, 7. Auflage, pp. 303.
- ³⁴ M. M. Bradford: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72 (1976), 1-2, pp. 248-254.
- ³⁵ U. K. Laemmli: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970), pp. 680-685.
- ³⁶ C. M. Taylor, T. Coetzee, S. E. Pfeiffer: Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol microdomains of the myelin membrane, *The Journal of Neurochemistry* 81 (2002), 5, pp. 993-1004.
- ³⁷ W. N. Burnette: "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radio iodinated protein A, *Analytical Biochemistry* 112 (1981), 2, pp. 195-203.

-
- ³⁸ M. Kipp, T. Clarner, J. Dang, S. Copray, C. Beyer: The cuprizone animal model: new insights into an old story, *Acta Neuropathologica* 118 (2009), pp. 723-736.
- ³⁹ J. Hedderich, L. Sachs: *Angewandte Statistik, Methodensammlung mit R*. Heidelberg: Springer Spektrum, 2016, 15. Auflage, p. 288.
- ⁴⁰ Ebenda.
- ⁴¹ F. Matthes, S. Stroobants, D. Gerlach, C. Wohlenberg, C. Wessig, J. Fogh, V. Gieselmann, M. Eckhardt, R. D'Hooge, U. Matzner: Efficacy of enzyme replacement therapy in an aggravated mouse model of metachromatic leukodystrophy declines with age, *Human Molecular Genetics* 21 (2012), 11, pp. 2599-2609.
- ⁴² C. R. Plata-Salamán: Cytokines and feeding suppression: an integrative view from neurologic to molecular levels, *Nutrition* 11 (1995), pp. 674-677.
- ⁴³ N. Franco-Pons, M. Torrente, M. T. Colomina, E. Vilella: Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination, *Toxicology Letters* 169 (2007), pp. 205-213.
- ⁴⁴ Charles River, C57BL/6 Mice Model Information Sheet: http://www.criver.com/files/pdfs/rms/c57bl6/rm_rm_d_c57bl6n_mouse.aspx, Stand: 12.05.2016.
- ⁴⁵ T. Skripuletz, J. H. Bussmann, V. Gudi, P. N. Koutsoudaki, R. Pul, D. Moharreggh-Khiabani, M. Lindner, M. Stangel: Cerebellar cortical demyelination in the murine cuprizone model, *Brain Pathology* 20 (2010), pp. 301-312.
- ⁴⁶ A. J. Steelman, J. P. Thompson, J. Li: Demyelination and remyelination in anatomically distinct regions of the corpus callosum following cuprizone intoxication, *Neuroscience Research* 72 (2012), 1, pp. 32-42.
- ⁴⁷ K. A. Irvine, W. F. Blakemore: Age increases axon loss associated with primary demyelination in cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice, *Journal of Neuroimmunology* 175 (2006), pp. 69-76.
- ⁴⁸ A. J. Steelman, J. P. Thompson, J. Li: Demyelination and remyelination in anatomically distinct regions of the corpus callosum following cuprizone intoxication, *a. a. O.*, pp. 32-42.
- ⁴⁹ P. Morell, C. V. Barrett, J. L. Mason, A. D. Toews, J. D. Hostettler, G. W. Knapp, G. K. Matsushima: Gene expression in brain during cuprizone-induced demyelination and remyelination, *Molecular and Cellular Neuroscience* 12 (1998), pp. 220-227.
- ⁵⁰ V. Gudi, S. Gingele, T. Skripuletz, M. Stangel: Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned, *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8 (2014), Article 73. (Keine Seitenangabe vorhanden, da nur elektronische Veröffentlichung. Vollständiger Artikel unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3952085/pdf/fncel-08-00073.pdf>, Stand 07.07.2016)
- ⁵¹ Ebenda.
- ⁵² Ebenda.
- ⁵³ Ebenda.
- ⁵⁴ R. H. Woodruff, M. Fruttiger, W. D. Richardson, R. J. Franklin: Platelet-derived growth factor regulates oligodendrocyte progenitor numbers in adult CNS and their response following CNS demyelination, *Molecular and Cellular Neuroscience* 25 (2004), 2, pp. 252-262.
- ⁵⁵ V. Gudi, D. Moharreggh-Khiabani, T. Skripuletz, P. N. Koutsoudaki, A. Kotsiari, J. Skuljec, C. Trebst, M. Stangel: Regional differences between gray and white matter in cuprizone induced demyelination, *Brain Research* 1283 (2009), pp. 127-138.
- ⁵⁶ S. A. Schnell, W. A. Staines, M. W. Wessendorf: Reduction of Lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue, *a. a. O.*, pp. 719-730.
- ⁵⁷ M. Kipp, T. Clarner, J. Dang, S. Copray, C. Beyer: The cuprizone animal model: insights into an old story, *Acta Neuropathologica* 118 (2009), pp. 723-736.

- ⁵⁸ T. Skripuletz, M. Lindner, A. Kotsiari, N. Garde, J. Fokuhl, F. Linsmeier, C. Trebst, M. Stangel: Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent, *The American Journal of Pathology* 172 (2008), 4, pp. 1053-1061.
- ⁵⁹ P. N. Koutsoudaki, T. Skripuletz, V. Gudi, D. Moharreggh-Khiabani, H. Hildebrandt, C. Trebst, M. Stangel: Demyelination of the hippocampus is prominent in the cuprizone model, *Neuroscience Letters* 451 (2009), 1, pp. 83-88.
- ⁶⁰ F. de Ferra, H. Engh, L. Hudson, J. Kamholz, C. Puckett, S. Molineaux, R. A. Lazzarini: Alternative splicing accounts for the four forms of myelin basic protein, *Cell* 43 (1985), pp. 721-727.
- ⁶¹ C. Readhead, L. Hood: The dysmyelinating mouse mutations shiverer (*shi*) and myelin deficient (*sh^{imld}*), *Behaviour Genetics* 20 (1990), 2, pp. 213-234.
- ⁶² A. Yaghootfam, V. Gieselmann, M. Eckhardt: Delay of myelin formation in arylsulphatase A-deficient mice, *European Journal of Neuroscience* 21 (2005), pp. 711-720.
- ⁶³ <https://www.licor.com/bio/PDF/IRquant.pdf>, Stand: 01.06.2016
- ⁶⁴ E. Muse, H. Jurevics, A. Toews, G. K. Matsushima, P. Morell: Parameters related to lipid metabolism as markers of myelination in mouse brain, *Journal of Neurochemistry* 76 (2001), pp. 77-86.
- ⁶⁵ E. Fifkova, M. Morales: Aging and the neurocytoskeleton, *Experimental Gerontology* 27 (1992), 27, pp. 125-136.
- ⁶⁶ J. M. Greer, M. B. Lees: Myelin proteolipid protein – the first 50 years, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34 (2002), pp. 211-215.
- ⁶⁷ O. Spörkel, T. Uschkureit, H. Büssow, W. Stoffel: Oligodendrocytes expressing exclusively the DM20 isoform of the proteolipid protein gene: myelination and development, *GLIA* 37 (2002), 1, pp. 19-30.
- ⁶⁸ M. Klugmann, M. H. Schwab, A. Pühlhofer A. Schneider, F. Zimmermann, I. R. Griffiths, K. A. Nave: Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein, *Neuron* 18 (1997), pp. 59-70.
- ⁶⁹ K. A. Nave, H. B. Werner: Myelination of the nervous system: mechanisms and functions, *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30 (2014), pp. 503-533.
- ⁷⁰ M. Lindner, S. Heine, K. Haastert, N. Garde, J. Fokuhl, F. Linsmeier, C. Grothe, W. Baumgärtner, M. Stangel: Sequential myelin protein expression during remyelination reveals fast and efficient repair after central nervous system demyelination, *Neuropathology and Applied Neurobiology* 34 (2008), pp. 105-114.
- ⁷¹ V. Gudi, S. Gingele, T. Skripuletz, M. Stangel: Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CSN: lessons learned, *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8 (2014), Article 73, pp. 1-24
- ⁷² K. A. Nave, H. B. Werner: Myelination of the nervous system: mechanisms and functions, *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30 (2014), pp. 503-533.
- ⁷³ B. K. Hartman, H. C. Agrawal, D. Agrawal, S. Kalmbach: Development and maturation of central nervous system myelin: comparison of immunohistochemical localization of Proteolipid protein and basic protein in myelin and oligodendrocytes, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 79 (1982), pp. 4217-4220.
- ⁷⁴ D. Barazany, P. J. Basser, Y. Assaf: In vivo measurement of axon diameter distribution in the corpus Callosum of rat brain, *BRAIN* 132 (2009), pp. 1210-1220.
- ⁷⁵ M. Xie, J. E. Tobin, M. D. Budde, C. I. Chen, K. Trinkaus, A. H. Cross, D. P. McDaniel, S. K. Song, R. C. Armstrong: Rostro-caudal analysis of corpus callosum demyelination and axon damage across disease stages refines diffusion tensor imaging correlations with pathological features, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 69 (2010), 7, pp. 704-716.
- ⁷⁶ A. Yaghootfam, V. Gieselmann, M. Eckhardt: Delay of myelin formation in arylsulphatase A-deficient mice, a. a. O., pp. 711-720.

- ⁷⁷ W. Baron, H. Ozgen, B. Klunder, J. C. de Jonge, A. Nomden, A. Plat, E. Trifilieff, H. de Vries, D. Hoekstra: The major myelin-resident protein PLP is transported to myelin membranes via transcytotic mechanism: involvement of sulfatide, *Molecular and Cellular Biology* 35 (2015), 1, pp. 288-302.
- ⁷⁸ H. Jurevics, C. Largent, J. Hostettler, D. W. Sammond, G. K. Matsushima, A. Kleindienst, A. D. Toews, P. Morell: Alterations in metabolism and gene expression in brain regions during cuprizone-induced demyelination and remyelination, *Journal of Neurochemistry* 82 (2002), pp. 126-136.
- ⁷⁹ H. Ramakrishnan, K. H. Hedayati, R. Lüllmann-Rauch, C. Wessig, S. N. Fewou, H. Maier, H. H. Goebel, V. Gieselmann, M. Eckhardt: Increasing sulfatide synthesis in myelin-forming cells of arylsulfatase A-deficient mice causes demyelination and neurological symptoms reminiscent of human metachromatic leukodystrophy, *a. a. O.*, pp. 9482-9490.
- ⁸⁰ A. Yaghoofam, V. Gieselmann, M. Eckhardt: Delay of myelin formation in arylsulphatase A-deficient mice, *a. a. O.*, pp. 711-720.
- ⁸¹ V. Gieselmann, S. Franken, D. Klein, J. E. Månsson, R. Sandhoff, R. Lüllmann Rauch, D. Hartmann, V. P. M. Saravanan, P. P. De Deyn, R. D'Hooge, A. M. Van Der Linden, N. Schaeren-Wiemers: Metachromatic leukodystrophy: consequences of sulphatide accumulation, *Acta Paediatrica Supplements* 443 (2003), pp. 74-79.
- ⁸² H. Ramakrishnan, K. H. Hedayati, R. Lüllmann-Rauch, C. Wessig, S. N. Fewou, H. Maier, H. H. Goebel, V. Gieselmann, M. Eckhardt: Increasing sulfatide synthesis in myelin-forming cells of arylsulfatase A-deficient mice causes demyelination and neurological symptoms reminiscent of human metachromatic leukodystrophy, *a. a. O.*, pp. 9482-9490.
- ⁸³ Y. L. Baburina, O. V. Krestinina, T. S. Azarashvili: 2',3'-Cyclic nucleotide phosphodiesterase (CNPase) as a target in neurodegenerative diseases, *Neurochemical Journal* 7 (2003), 1, pp. 1-15.
- ⁸⁴ M. Gravel, J. Peterson, V. W. Yong, V. Kottis, B. Trapp, P. E. Braun: Overexpression of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in transgenic mice alters oligodendrocyte development and produces aberrant myelin, *Molecular and Cellular Neuroscience* 7 (1996), pp. 453-466.
- ⁸⁵ Ebenda.
- ⁸⁶ M. Gravel, J. Peterson, V. W. Yong, B. Trapp, P. E. Braun: Overexpression of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in transgenic mice alters oligodendrocyte development and produces aberrant myelination, *a. a. O.*, pp. 453-466.
- ⁸⁷ A. Yaghoofam, V. Gieselmann, M. Eckhardt: Delay of myelin formation in arylsulphatase A-deficient mice, *a. a. O.*, pp. 711-720.
- ⁸⁸ Q. Zhiao, S. Wang, D. J. Anderson: Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors, *Neuron* 25 (2000) pp. 331-343.
- ⁸⁹ B. Emery: Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination, *GLIA* 330 (2010), pp. 779-782.
- ⁹⁰ S. P. J. Fancy, C. Zhao, R. J. M. Franklin: Increased expression of Nkx2.2 and Olig2 identifies reactive oligodendrocyte progenitor cells responding to demyelination in the adult CNS, *Molecular and Cellular Neuroscience* 27 (2004), pp. 247-254.
- ⁹¹ Ebenda.
- ⁹² Ebenda.
- ⁹³ S. Shen, A. Liu, J. Li, C. Wolubah, P. Casaccia-Bonnel: Epigenetic memory loss in aging oligodendrocytes in the corpus callosum, *Neurobiology of Aging* 29 (2008), 3, pp. 452-463.
- ⁹⁴ M. Küspert, A. Hammer, M. R. Bösl, M. Wegner: Olig2 regulates Sox10 expression in oligodendrocyte precursors through an evolutionary conserved distal enhancer, *Nucleic Acids Research* 39 (2011), 4, pp. 1280-1293.

- ⁹⁵ C. C. Stolt, S. Rehberg, M. Ader, P. Lommes, D. Riethmacher, M. Schachner, U. Bartsch, M. Wegner: Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10, *GENES & DEVELOPMENT* 16 (2002), pp. 165-170.
- ⁹⁶ Z. Liu, X. Hu, J. Cai, B. Liu, X. Peng, M. Wegner, M. Qiu: Induction of oligodendrocyte differentiation by Olig2 and Sox10: Evidence for reciprocal interactions and dosage-dependent mechanisms, *Developmental Biology* 302 (2007), 2, pp. 683-693.
- ⁹⁷ V. Gudi, S. Gingele, T. Skripuletz, M. Stangel: Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned, *a. a. O.* (Keine Seitenangabe vorhanden, da nur elektronische Veröffentlichung. Vollständiger Artikel unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3952085/pdf/fncel-08-00073.pdf>, Stand 07.07.2016)
- ⁹⁸ T. Skripuletz, D. Hackstette, K. Bauer, V. Gudi, R. Pul, E. Voss, K. Berger, M. Kipp, W. Baumgärtner, M. Stangel: Astrocytes regulate myelin clearance through recruitment of microglia during cuprizone-induced demyelination, *Brain* 136 (2013), pp. 147-167.
- ⁹⁹ M. R. Kotter, W. W. Li, C. Zhao, R. J. M. Franklin: Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation, *The Journal of Neuroscience* 26 (2006), 1, pp. 328-332.
- ¹⁰⁰ R. J. M. Franklin, C. French-Constant: Remyelination in the CNS: from biology to therapy, *a. a. O.*, pp. 839-855.
- ¹⁰¹ A. Yaghootfam, V. Gieselmann, M. Eckhardt: Delay of myelin formation in arylsulphatase A-deficient mice, *a. a. O.*, pp. 711-720.
- ¹⁰² K. Karram, S. Goebbels, M. Schwab, K. Jennissen, G. Seifert, C. Steinhäuser, K. A. Nave, J. Trotter: NG2-Expressing cells in the nervous system revealed by the NG2-EYFP-Knockin mouse, *a. a. O.*, pp. 743-757.
- ¹⁰³ A. Yaghootfam, V. Gieselmann, M. Eckhardt: Delay of myelin formation in arylsulphatase A-deficient mice, *a. a. O.*, pp. 711-720.
- ¹⁰⁴ A. Niehaus, J. Stegmüller, M. Diers-Fenger, J. Trotter: Cell-surface glycoprotein of oligodendrocyte progenitors involved in migration, *The Journal of Neuroscience* 13 (1999), 12, pp. 4948-4961.
- ¹⁰⁵ B. Hess, P. Saftig, D. Hartmann, R. Coenen, R. Lüllmann-Rauch, H. H. Goebel, M. Evers, K. von Figura, R. D'Hooge, G. Nagels, P. De Deyn, C. Peters, V. Gieselmann: Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice: Relationship to human metachromatic leukodystrophy, *a. a. O.*, pp. 14821-14826.
- ¹⁰⁶ D. Wittke, D. Hartmann, V. Gieselmann, R. Lüllmann-Rauch: Lysosomal sulfatide storage in the brain of arylsulfatase A-deficient mice: cellular alterations and topographic distribution, *a. a. O.*, pp. 261-271.
- ¹⁰⁷ H. Ramakrishnan, K. H. Hedayati, R. Lüllmann-Rauch, C. Wessig, S. N. Fewou, H. Maier, H. H. Goebel, V. Gieselmann, M. Eckhardt: Increasing sulfatide synthesis in myelin-forming cells of arylsulfatase A-deficient mice causes demyelination and neurological symptoms reminiscent of human metachromatic leukodystrophy, *a. a. O.*, pp. 9482-9490.
- ¹⁰⁸ Ebenda.
- ¹⁰⁹ F. F. Hsu, J. Turk: Studies on sulfatides by quadrupole ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization: Structural characterization and the fragmentation processes that include an unusual internal galactose residue loss and the classical charge-remote fragmentation, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 15 (2004), pp. 536-546.
- ¹¹⁰ P. D. Whitfield, P. C. Sharp, D. W. Johnson, P. Nelson, P. J. Meikle: Characterization of urinary sulfatides in metachromatic leukodystrophy using electrospray ionization-tandem mass spectrometry, *Molecular Genetics and Metabolism* 73 (2001), pp. 30-37.

- ¹¹¹ G. Isaac, Z. Pernber, V. Gieselmann, E. Hansson, J. Bergquist, J. E. Månsson: Sulfatide with short fatty acid dominates in astrocytes and neurons, *The Federation of European Biochemical Societies Journal* 273 (2006), pp. 1782-1790.
- ¹¹² Ebenda.
- ¹¹³ A. L. Moyano, G. Li, A. Lopez-Rosas, J. E. Månsson, R. B. van Breemen, M. I. Givogri: Distribution of C16:0, C18:0, C24:1 sulfatides in central nervous system lipid rafts by quantitative ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Analytical Biochemistry* 467 (2014), pp. 31-39.
- ¹¹⁴ C. Ginkel, D. Hartmann, K. vom Dorp, A. Zlomuzica, H. Farwanah, M. Eckhardt, R. Sandhoff, J. Degen, M. Rabionet, E. Dere, P. Dörmann, K. Sandhoff, K. Willecke: Ablation of neuronal ceramide synthase 1 in mice decreases ganglioside levels and expression of myelin-associated glycoprotein in oligodendrocytes, *The Journal of Biological Chemistry* 287 (2012), 50, pp. 41888-41902.
- ¹¹⁵ M. Eckhardt: The role and metabolism of sulfatide in the nervous system, *Molecular Neurobiology* 37 (2008), pp. 93-103.
- ¹¹⁶ M. Eckhardt, K. K. Hedayati, Julika Pitsch, R. Lüllmann.-Rauch, Heiz Beck, S. N. Fewou, V. Gieselmann: Sulfatide storage in neurons causes hyperexcitability and axonal degeneration in a mouse model of Metachromatic Leukodystrophy, *The Journal of Neuroscience* 27 (2007), 34, pp. 9009-9021.
- ¹¹⁷ G. K. Matsushima, P. Morell: The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system, *Brain Pathology* 11 (2001), pp. 107-116.
- ¹¹⁸ E. Muse, H. Jurevics, A. Toews, G. K. Matsushima, P. Morell: Parameters related to lipid metabolism as markers of myelination in mouse brain, *a. a. O.*, pp. 77-86.
- ¹¹⁹ M. Eckhardt, K. K. Hedayati, Julika Pitsch, R. Lüllmann.-Rauch, Heiz Beck, S. N. Fewou, V. Gieselmann: Sulfatide storage in neurons causes hyperexcitability and axonal degeneration in a mouse model of Metachromatic Leukodystrophy, *a. a. O.*, pp. 9009-9021.
- ¹²⁰ V. Gieselmann, S. Franken, D. Klein, J. E. Månsson, R. Sandhoff, R. Lüllmann Rauch, D. Hartmann, V. P. M. Saravanan, P. P. DeDeyn, R. D'Hooge, A. M. Van der Linden, N. Schaeren-Wiemers: Metachromatic leukodystrophy: consequences of sulfatide accumulation, *Acta Paediatrica Supplement* 443 (2003), pp. 74-79.
- ¹²¹ E. Muse, H. Jurevics, A. Toews, G. K. Matsushima, P. Morell: Parameters related to lipid metabolism as markers of myelination in mouse brain, *a. a. O.*, pp. 77-86.
- ¹²² G. Isaac, Z. Pernber, V. Gieselmann, E. Hansson, J. Bergquist, J. E. Månsson: Sulfatide with short fatty acid dominates in astrocytes and neurons, *a. a. O.*, pp. 1782-1790.
- ¹²³ E. Muse, H. Jurevics, A. Toews, G. K. Matsushima, P. Morell: Parameters related to lipid metabolism as markers of myelination in mouse brain, *a. a. O.*, pp. 77-86.
- ¹²⁴ A. L. Moyano, G. Li, A. Lopez-Rosas, J. E. Månsson, R. B. van Breemen, M. I. Givogri: Distribution of C16:0, C18:0, C24:1 sulfatides in central nervous system lipid rafts by quantitative ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry, *a. a. O.*, pp. 31-39.
- ¹²⁵ H. Ramakrishnan, K. H. Hedayati, R. Lüllmann-Rauch, C. Wessig, S. N. Fewou, H. Maier, H. H. Goebel, V. Gieselmann, M. Eckhardt: Increasing sulfatide synthesis in myelin-forming cells of arylsulfatase A-deficient mice causes demyelination and neurological symptoms reminiscent of human metachromatic leukodystrophy, *a. a. O.*, pp.9482-9490.
- ¹²⁶ H. Kajigaya, K. F. Tanaka, A. Hayashi, A. Suzuki, T. Ishibashi, K. Ikenaka, H. Baba: Increased number of oligodendrocyte lineage cells in the optic nerves of cerebroside sulfotransferase knockout mice, *Proceedings of the Japan Academy, Ser. B, Physical and Biological Sciences* 87 (2011), pp. 415-424.
- ¹²⁷ Y. Hirahara, R. Bansal, K. Honke, K. Ikenaka, Y. Wada: Sulfatide is a negative regulator of oligodendrocyte differentiation: development in sulfatid-null mice, *GLIA* 45 (2004), pp. 269-277.

- ¹²⁸ H. Ramakrishnan, K. H. Hedayati, R. Lüllmann-Rauch, C. Wessig, S. N. Fewou, H. Maier, H. H. Goebel, V. Gieselmann, M. Eckhardt: Increasing sulfatide synthesis in myelin-forming cells of arylsulfatase A-deficient mice causes demyelination and neurological symptoms reminiscent of human metachromatic leukodystrophy, *a. a. O.*, pp. 9482-9490.
- ¹²⁹ G. Isaac, Z. Pernber, V. Gieselmann, E. Hansson, J. Bergquist, J. E. Månsson: Sulfatide with short fatty acid dominates in astrocytes and neurons, *a.a.O.*, pp. 1782-1790.
- ¹³⁰ H. Neumann, M. R. Kotter, R. J. M. Franklin: Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration, *Brain* 132 (2009), pp. 288-295.
- ¹³¹ S. B. Jeon, H. J. Yoon, S. H. Park, I. H. Kim, E. J. Park: Sulfatide, a major lipid component of myelin sheath, activates inflammatory responses as an endogenous stimulator in brain-resident immune cells, *The Journal of Immunology* 181 (2008), pp. 8077-8087.
- ¹³² S. van Neerven, A. Nemes, P. Imholz, T. Regen, B. Denecke, S. Johann, C. Beyer, U. K. Hanisch, J. Mey: Inflammatory cytokine release of astrocytes *in vitro* is reduced by all-trans retinoic acid, *Journal of Neuroimmunology* 229 (2010), 1-2, pp. 169-179.
- ¹³³ T. Skripuletz, D. Hackstette, K. Bauer, V. Gudi, R. Pul, E. Voss, K. Berger, M. Kipp, W. Baumgärtner, M. Stangel: Astrocytes regulate myelin clearance through recruitment of microglia during cuprizone-induced demyelination, *a. a. O.*, pp. 147-167.
- ¹³⁴ Ebenda.
- ¹³⁵ B. Hess, P. Saftig, D. Hartmann, R. Coenen, R. Lüllmann-Rauch, H. H. Goebel, M. Evers, K. von Figura, R. D'Hooge, G. Nagels, P. De Deyn, C. Peters, V. Gieselmann: Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice: Relationship to human metachromatic leukodystrophy, *a. a. O.*, pp. 14821-14826.
- ¹³⁶ V. Gudi, S. Gingele, T. Skripuletz, M. Stangel: Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned, *a. a. O.* (Keine Seitenangabe vorhanden, da nur elektronische Veröffentlichung. Vollständiger Artikel unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3952085/pdf/fncel-08-00073.pdf>, Stand 07.07.2016)
- ¹³⁷ D. Wittke, D. Hartmann, V. Gieselmann, R. Lüllmann-Rauch: Lysosomal sulfatide storage in the brain of arylsulfatase A-deficient mice: cellular alterations and topographic distribution, *a. a. O.*, pp. 261-271.
- ¹³⁸ T. Skripuletz, D. Hackstette, K. Bauer, V. Gudi, R. Pul, E. Voss, K. Berger, M. Kipp, W. Baumgärtner, M. Stangel: Astrocytes regulate myelin clearance through recruitment of microglia during cuprizone-induced demyelination, *a. a. O.*, pp. 147-167.
- ¹³⁹ H. A. Arnett, J. Mason, M. Marino, K. Suzuki, G. K. Matsushima, J. P. Y. Ting: TNF α promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination, *Nature Neuroscience* 4 (2001), pp. 1116-1122.
- ¹⁴⁰ H. Wang, C. Li, H. Wang, F. Mei, Z. Liu, H. Y. Shen, L. Xiao: Cuprizone-induced demyelination in mice: age-related vulnerability and exploratory behavior deficit, *Neuroscience Bulletin* 29 (2013), 2, pp. 251-259.
- ¹⁴¹ S. B. Jeon, H. J. Yoon, S. H. Park, I. H. Kim, E. J. Park: Sulfatide, a major lipid component of myelin sheath, activates inflammatory responses as an endogenous stimulator in brain-resident immune cells, *a. a. O.*, pp. 8077-8087.
- ¹⁴² V. Gieselmann, S. Franken, D. Klein, J. E. Mansson, R. Sandhoff, R. Lüllmann Rauch, D. Hartmann, V. P. M. Saravanan, P. P. DeDeyn, R. D'Hooge, A. M. Van der Linden, N. Schaeren-Wiemers: Metachromatic leukodystrophy: consequences of sulfatide accumulation, *a. a. O.*, pp. 74-79.
- ¹⁴³ H. Ramakrishnan, K. H. Hedayati, R. Lüllmann-Rauch, C. Wessig, S. N. Fewou, H. Maier, H. H. Goebel, V. Gieselmann, M. Eckhardt: Increasing sulfatide synthesis in myelin-forming cells of arylsulfatase A-deficient mice causes demyelination and neurological symptoms reminiscent of human metachromatic leukodystrophy, *a. a. O.*, pp. 9482-9490.

-
- ¹⁴⁴ L. F. Eng, R. S. Ghirnikar, Y. L. Lee: Glial fibrillary acidic protein: GFAP – Thirty-one years (1969-2000), *Neurochemical Research* 25 (2000), pp. 1439-1451.
- ¹⁴⁵ W. Kamphuis, C. Mamber, M. Moeton, L. Kooijman, J. A. Sluijs, A. H. P. Jansen, M. Verveer, L. R. de Groot, V. D. Smith, S. Rangarajan, J. J. Rodriguez, M. Orre, E. M. Hol: GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer disease, *PLOS one* 7 (2012), 8, e42823.
- ¹⁴⁶ H. Ramakrishnan, K. H. Hedayati, R. Lüllmann-Rauch, C. Wessig, S. N. Fewou, H. Maier, H. H. Goebel, V. Gieselmann, M. Eckhardt: Increasing sulfatide synthesis in myelin-forming cells of arylsulfatase A-deficient mice causes demyelination and neurological symptoms reminiscent of human metachromatic leukodystrophy, *a. a. O.*, pp. 9482-9490.
- ¹⁴⁷ A. J. Steelman, J. P. Thompson, J. Li: Demyelination and remyelination in anatomically distinct regions of the corpus Callosum following cuprizone intoxication, *a. a. O.*, pp. 32-42.
- ¹⁴⁸ M. R. Kotter, W. W. Li, C. Zhao, R. J. M. Franklin: Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation, *a. a. O.*, pp. 328-332.
- ¹⁴⁹ Y. Hirahara, R. Bansal, K. Honke, K. Ikenaka, Y. Wada: Sulfatide is a negative regulator of oligodendrocyte differentiation: Development in sulfatide-null mice, *a. a. O.*, pp. 269-277.
- ¹⁵⁰ S. B. Jeon, H. J. Yoon, S. H. Park, I. H. Kim, E. J. Park: Sulfatide, a major lipid component of myelin sheath, activates inflammatory responses as an endogenous stimulator in brain-resident immune cells, *a. a. O.*, pp. 8077-8087.
- ¹⁵¹ V. Gieselmann, S. Franken, D. Klein, J. E. Mansson, R. Sandhoff, R. Lüllmann Rauch, D. Hartmann, V. P. M. Saravanan, P. P. DeDeyn, R. D'Hooge, A. M. Van der Linden, N. Schaeren-Wiemers: Metachromatic leukodystrophy: consequences of sulfatide accumulation, *a. a. O.*, pp. 74-79.
- ¹⁵² J. M. Austyn, S. Gordon: F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage, *European Journal of Immunology* 11 (1981), pp. 805-815.
- ¹⁵³ V. Gudi, S. Gingele, T. Skripuletz, M. Stangel: Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned, *a. a. O.* (Keine Seitenangabe vorhanden, da nur elektronische Veröffentlichung. Vollständiger Artikel unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3952085/pdf/fncel-08-00073.pdf>, Stand 07.07.2016)
- ¹⁵⁴ H. Ramakrishnan, K. H. Hedayati, R. Lüllmann-Rauch, C. Wessig, S. N. Fewou, H. Maier, H. H. Goebel, V. Gieselmann, M. Eckhardt: Increasing sulfatide synthesis in myelin-forming cells of arylsulfatase A-deficient mice causes demyelination and neurological symptoms reminiscent of human metachromatic leukodystrophy, *a. a. O.*, pp. 9482-9490.
- ¹⁵⁵ O. Gerrits, M. Brekelmans-Bartels, L. Mast, E. J. 's-Gravenmade, R. W. Horobin, G. Holstege: Staining myelin and myelin-like degradation products in the spinal cords of chronic experimental allergic encephalomyelitis (Cr-EAE) rats using Sudan Black B staining of glycol methacrylate-embedded material, *Journal of Neuroscience Methods* 45 (1992), pp. 99-105.
- ¹⁵⁶ C. Eskes, L. Juillerat-Jaenneret, G. Leuba, P. Honegger, F. Monnet-Tschudi: Involvement of microglia-neuron interactions in the tumor necrosis factor- α release, microglial activation, and neurodegeneration induced by trimethyltin, *Journal of Neuroscience Research* 71 (2003), pp. 583-590.
- ¹⁵⁷ H. Kettenmann, U. K. Hanisch, M. Noda, A. Verkhratsky: Physiology of microglia, *Physiological Reviews* 91 (2011), pp. 461-553.
- ¹⁵⁸ S. J. Hopkins, N. J. Rothwell: Cytokines and the nervous system I: expression and recognition, *Trends in Neurosciences* 18 (1995), 83-88.

-
- ¹⁵⁹ H. Ramakrishnan, K. H. Hedayati, R. Lüllmann-Rauch, C. Wessig, S. N. Fewou, H. Maier, H. H. Goebel, V. Gieselmann, M. Eckhardt: Increasing sulfatide synthesis in myelin-forming cells of arylsulfatase A-deficient mice causes demyelination and neurological symptoms reminiscent of human metachromatic leukodystrophy, *a. a. O.*, pp. 9482-9490.
- ¹⁶⁰ A. Stein, S. Strootbans, V. Gieselmann, R. d'Hooge, U. Matzner: Anti-inflammatory therapy with Simvastatin improves neuroinflammation and CNS function in a mouse model of metachromatic leukodystrophy, *Molecular Therapy* 23 (2015), 7, pp. 1160-1168.
- ¹⁶¹ M. Maurer, E. von Stebut: Macrophage inflammatory protein-1, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (2004), pp. 1882-1886.
- ¹⁶² A. Koj: Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines, *Biochimica et Biophysica Acta* 1317 (1996), pp. 84-94.
- ¹⁶³ C. Eskes, L. Juillerat-Jaenneret, G. Leuba, P. Honegger, F. Monnet-Tschudi: Involvement of microglia-neuron interactions in the tumor necrosis factor- α release, microglial activation, and neurodegeneration induced by trimethyltin, *a. a. O.*, pp. 583-590.
- ¹⁶⁴ A. Stein, S. Strootbans, V. Gieselmann, R. d'Hooge, U. Matzner: Anti-inflammatory therapy with Simvastatin improves neuroinflammation and CNS function in a mouse model of Metachromatic Leukodystrophy, *a. a. O.*, pp. 1160-1168.
- ¹⁶⁵ H. Ramakrishnan, K. H. Hedayati, R. Lüllmann-Rauch, C. Wessig, S. N. Fewou, H. Maier, H. H. Goebel, V. Gieselmann, M. Eckhardt: Increasing sulfatide synthesis in myelin-forming cells of arylsulfatase A-deficient mice causes demyelination and neurological symptoms reminiscent of human metachromatic leukodystrophy, *a. a. O.*, pp. 9482-9490.
- ¹⁶⁶ A. Stein, S. Strootbans, V. Gieselmann, R. d'Hooge, U. Matzner: Anti-inflammatory therapy with Simvastatin improves neuroinflammation and CNS function in a mouse model of Metachromatic Leukodystrophy, *a. a. O.*, pp. 1160-1168
- ¹⁶⁷ H. Kettenmann, U. K. Hanisch, M. Noda, A. Verkhratsky: Physiology of microglia, *a. a. O.*, pp. 461-553.
- ¹⁶⁸ K. M. Dziegielewska, J. E. Møller, A. M. Potter, J. Ek, M. A. Lane, N. R. Saunders: Acute-phase cytokines IL-1 β and TNF- α in brain development, *Cell Tissue Research* 299 (2009), pp. 335-345.
- ¹⁶⁹ B. E. Deverman, P. H. Patterson: Cytokines and CNS development, *Neuron* 64 (2009), 1, pp. 61-78.
- ¹⁷⁰ G. Isaac, Z. Pernber, V. Gieselmann, E. Hansson, J. Bergquist, J. E. Månsson: Sulfatide with short fatty acid dominates in astrocytes and neurons, *a. a. O.*, pp. 1782-1790.
- ¹⁷¹ H. Kettenmann, U. K. Hanisch, M. Noda, A. Verkhratsky: Physiology of microglia, *a. a. O.*, pp. 461-553.
- ¹⁷² H. Ramakrishnan, K. H. Hedayati, R. Lüllmann-Rauch, C. Wessig, S. N. Fewou, H. Maier, H. H. Goebel, V. Gieselmann, M. Eckhardt: Increasing sulfatide synthesis in myelin-forming cells of arylsulfatase A-deficient mice causes demyelination and neurological symptoms reminiscent of human metachromatic leukodystrophy, *a. a. O.*, pp. 9482-9490.
- ¹⁷³ A. Stein, S. Strootbans, V. Gieselmann, R. d'Hooge, U. Matzner: Anti-inflammatory therapy with Simvastatin improves neuroinflammation and CNS function in a mouse model of Metachromatic Leukodystrophy, *a. a. O.*, pp. 1160-1168.
- ¹⁷⁴ W. J. Streit, R. E. Mrak, W. S. T. Griffin: Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective, *Journal of Neuroinflammation* 1 (2004), 14.
- ¹⁷⁵ F. O. Martinez, S. Gordon: The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment, *F1000Prime Reports* 6 (2014), 13. (Keine Seitenangabe vorhanden da nur elektronische Version. Vollständiger Artikel unter <http://f1000.com/prime/reports/b/6/13>.)

-
- ¹⁷⁶ C. Mills, K. Kincaid, J. M. Alt, M. J. Heilmann, A. M. Hill: M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 paradigm, *The Journal of Immunology* 164 (2000), 12, pp. 6166-6173.
- ¹⁷⁷ J. D. Cherry, J. O. Olschowka, M. Kerry O'Banion: Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad and the inflamed, *Journal of Neuroinflammation* 11 (2014), 98.
- ¹⁷⁸ W. Schrempf, T. Ziemssen: Glatiramer acetate: Mechanisms of action in multiple sclerosis, *Autoimmunity Reviews* 6 (2007), pp. 469-475.
- ¹⁷⁹ A. Stein, S. Strootbans, V. Gieselmann, R. d'Hooge, U. Matzner: Anti-inflammatory therapy with Simvastatin improves neuroinflammation and CNS function in a mouse model of Metachromatic Leukodystrophy, *a. a. O.*, pp. 1160-1168.
- ¹⁸⁰ T. R. Mosmann, S. Sad: the expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more, *Immunology Today* 17 (1996), 3, pp. 138-146.
- ¹⁸¹ M. Sawada, A. Suzumura, Y. Itoh, T. Marunouchi: Production of interleukin-5 by mouse astrocytes and microglia in culture, *Neuroscience Letters* 155 (1993), 2, pp. 175-178.
- ¹⁸² B. Engelhardt: Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier, *The Journal of Neural Transmission* 113 (2006), pp. 477-485.
- ¹⁸³ M. Sawada, A. Suzumura, Y. Itoh, T. Marunouchi: Production of interleukin-5 by mouse astrocytes and microglia in culture, *a. a. O.*, 2, pp. 175-178.
- ¹⁸⁴ S. M Liva, J. de Vellis: IL-5 induces proliferation and activation of microglia via an unknown receptor, *Neurochemical Research* 26 (2001), 6, pp. 629-637.
- ¹⁸⁵ F. O. Martinez, S. Gordon: The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment, *a. a. O.* (Keine Seitenangabe vorhanden da nur elektronische Version, vollständiger Artikel unter <http://f1000.com/prime/reports/b/6/13>.)
- ¹⁸⁶ Ebenda.
- ¹⁸⁷ A. Yoshiki, K. Moriwaki: Mouse phenome research: Implications of genetic background, *ILAR Journal* 47 (2006), 2, pp. 94-102.
- ¹⁸⁸ D. W. Threadgill, A. A. Dlugosz, L. A. Hansen, T. Tennenbaum, U. Lichti, D. Yee, C. LaMantia, T. Mouton, K. Herrup, R. C. Harris, J. A. Barnard, S. H. Yuska, R. J. Coffey, T. Magnuson: Targeted disruption of mouse EGF receptor: Effect of genetic backgrounds on mutant phenotype, *Science* 269 (1995), pp. 230-234.
- ¹⁸⁹ H. Ramakrishnan, K. K. Hedayati, R. Lüllmann-Rauch, C. Wessig, S. N. Fewou H. Maier, H. H. Goebel, V. Gieselmann, M. Eckhardt: Increasing sulfatide synthesis in myelin-forming cells of Arylsulfatase A-deficient mice causes demyelination and neurological symptoms reminiscent of human Metachromatic Leukodystrophy, *a. a. O.*, pp. 9482-9490.
- ¹⁹⁰ G. Robertson, D. Garrick, M. Wilson, D. I. K. Martin, E. Whitelaw: Age-dependent silencing of globin transgenes in the mouse, *Nucleic Acid Research* 24 (1996), 2, pp. 1465-1471.
- ¹⁹¹ N. D. Allen, M. L. Norris, M. A. Surani: Epigenetic control of transgene expression and imprinting by genotype-specific modifiers, *Cell* 61 (1990), pp. 853-861.
- ¹⁹² P. A. Koetsier, L. Mangel, B. Schmitz, W. Doerfler: Stability of transgene methylation patterns in mice: position effects, strain specificity and cellular mosaicism, *Transgenic Research* 5 (1996), pp. 235-244.
- ¹⁹³ M. Melander, I. Kamnert, I. Hoppstadius, E. Liljeroth, T. Bryngelsson: Stability of transgene integration and expression in subsequent generations of doubled haploid oilseed rape transformed with chitinase and β -1,3-glucanase genes in a double-gene construct, *Plant Cell Reports* 25 (2006), pp. 942-952.
- ¹⁹⁴ E. Muse, H. Jurevics, A. Toews, G. K. Matsushima, P. Morell: Parameters related to lipid metabolism as markers of myelination in mouse brain, *a. a. O.*, pp. 77-86.

-
- ¹⁹⁵ R. R. Sturrock: Myelination of the mouse corpus callosum, *Neuropathology and Applied Neurobiology* 6 (1980), 6, pp. 415-420.
- ¹⁹⁶ D. R. Foran, A. C. Peterson: Myelin acquisition in the central nervous system of the mouse revealed by an MBP-Lac Z transgene, *The Journal of Neuroscience* 12 (1992), 12, pp. 4890-4897.
- ¹⁹⁷ R. R. Sturrock: Myelination of the mouse corpus callosum, *Neuropathology and Applied Neurobiology* 6 (1980), 6, pp. 415-420.
- ¹⁹⁸ L. Messori, A. Casini, C. Gabbiani, L. Sorace, M. Muniz-Miranda, P. Zatta: Unravelling the chemical nature of copper cuprizone, *Dalton Transactions* 21 (2007), pp. 2112-2114.
- ¹⁹⁹ F. Benetti, M. Ventura, B. Salmini, S. Ceola, D. Carbonera, S. Mammi, A. Zitolo, P. D'Angelo, E. Urso, M. Maffia, B. Salvato, E. Spisni: Cuprizone neurotoxicity, copper deficiency and neurodegeneration, *NeuroToxicology* 31 (2010), pp. 509-517.
- ²⁰⁰ G. Venturini: Enzymic activities and sodium, potassium and copper concentrations in mouse brain and liver after cuprizone treatment in vivo, *Journal of Neurochemistry* 21 (1973), 5, pp. 1147-1151.
- ²⁰¹ S. E. Pfeiffer, A. E. Warrington, R. Bansal: The oligodendrocyte and its many cellular processes, *Trends in Cell Biology* 3 (1993), pp. 191-197.
- ²⁰² G. K. Matsushima, P. Morell: The Neurotoxicant, Cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system, *a. a. O.*, pp. 107-116.
- ²⁰³ E. Muse, H. Jurevics, A. Toews, G. K. Matsushima, P. Morell: Parameters related to lipid metabolism as markers of myelination in mouse brain, *a. a. O.*, pp. 77-86.
- ²⁰⁴ Ebenda.
- ²⁰⁵ A. Yaghootfam, V. Gieselmann, M. Eckhardt: Delay of myelin formation in arylsulphatase A-deficient mice, *a. a. O.*, pp. 711-720.
- ²⁰⁶ M. F. Sidworthy, S. Genoud, U. Suter, N. Mantei, R. J. M. Franklin: Quantifying the early stages of remyelination following CPZ-induced demyelination, *Brain Pathology* 13 (2003), pp. 329-339.
- ²⁰⁷ Y. L. Baburina, O. V. Krestinina, T. S. Azarashvili: 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) as a target in neurodegenerative diseases, *a. a. O.*, pp. 1-15.
- ²⁰⁸ B. Emery: Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination, *Science* 330 (2010), pp. 779-782.
- ²⁰⁹ W. Baron, M. Bijlard, A. Nomden, J. C. de Jonge, C. E. Teunissen, D. Hoekstra: Sulfatide-mediated control of extracellular matrix-dependent oligodendrocyte maturation, *GLIA* 62 (2014), pp. 927-942.
- ²¹⁰ R. Chrast, G. Saher, K. A. Nave, M. H. G. Verheijen: Lipid metabolism in myelinating cells: lessons from human inherited disorders and mouse models, *Journal of Lipid Research* 52 (2011), 3, pp. 419-434.
- ²¹¹ G. Isaac, Z. Pernber, V. Gieselmann, E. Hansson, J. Bergquist, J. E. Månsson: Sulfatide with short fatty acid dominates in astrocytes and neurons, *a. a. O.*, pp. 1782-1790.
- ²¹² M. Küspert, A. Hammer, M. R. Bösl, M. Wegner: Olig2 regulates Sox10 expression in oligodendrocyte precursors through an evolutionary conserved distal enhancer, *Nucleic Acids Research* 39 (2011), 4, pp. 1280-1293.
- ²¹³ C. C. Stolt, S. Rehberg, M. Ader, P. Lommes, D. Riethmacher, M. Schachner, U. Bartsch, M. Wegner: Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10, *GENES & DEVELOPMENT* 16 (2002), pp. 165-170.
- ²¹⁴ Z. Liu, X. Hu, J. Cai, B. Liu, X. Peng, M. Wegner, M. Qiu: Induction of oligodendrocyte differentiation by Olig2 and Sox10: Evidence for reciprocal interactions and dosage-dependent mechanisms, *Developmental Biology* 302 (2007), 2, pp. 683-693.
- ²¹⁵ H. Takebayashi, Y. Nabeshima, S. Yoshida, O. Chisaka, K. Ikenaka, Y. Nabeshima: The basic helix-loop-helix factor olig2 is essential for the development of motoneuron and oligodendrocyte lineage, *Current Biology* 12 (2002), 13, pp. 1157-1163.

-
- ²¹⁶ S. P. J. Fancy, C. Zhao, R. J. M. Franklin: Increased expression of Nkx2.2 and Olig2 identifies reactive oligodendrocyte progenitor cells responding to demyelination in the adult CNS, *Molecular and Cellular Neuroscience* 27 (2004), pp. 247-254.
- ²¹⁷ R. J. M. Franklin, C. French-Constant: Remyelination in the CNS: from biology to therapy, *a. a. O.*, pp. 839-855.
- ²¹⁸ L. J. Pike: Lipid rafts: bringing order to chaos, *Journal of Lipid Research* 44 (2003), pp. 655-667.
- ²¹⁹ H. Collognato, S. Ramachandrapa, I. M. Olsen, C. French-Constant: Integrins direct Src family kinases to regulate distinct phases of oligodendrocyte development, *The Journal of Cell Biology* 167 (2004), 2, pp. 365-375.
- ²²⁰ W. Baron, M. Bijlard, A. Nomden, J. C. de Jonge, C. E. Teunissen, D. Hoekstra: Sulfatide-mediated control of extracellular matrix-dependent oligodendrocyte maturation, *a. a. O.*, pp. 927-942.
- ²²¹ Y. Hirahara, R. Bansal, K. Honke, K. Ikenaka, Y. Wada: Sulfatide is a negative regulator of oligodendrocyte differentiation: Development in Sulfatide-null mice, *a. a. O.*, pp. 269-277.
- ²²² W. Baron, M. Bijlard, A. Nomden, J. C. de Jonge, C. E. Teunissen, D. Hoekstra: Sulfatide-mediated control of extracellular matrix-dependent oligodendrocyte maturation, *a. a. O.*, pp. 927-942.
- ²²³ V. Gieselmann, S. Franken, D. Klein, J. E. Mansson, R. Sandhoff, R. Lüllmann Rauch, D. Hartmann, V. P. M. Saravanan, P. P. DeDeyn, R. D'Hooge, A. M. Van der Linden, N. Schaeren-Wiemers: Metachromatic leukodystrophy: consequences of sulfatide accumulation, *a. a. O.*, pp. 74-79.
- ²²⁴ A. L. Moyano, G. Li, A. Lopez-Rosas, J. E. Månsson, R. B. van Breemen, M. I. Givogri: Distribution of C16:0, C18:0, C24:1, and C24:0 sulfatides in central nervous system lipid rafts by quantitative ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry, *a. a. O.*, pp. 31-39.
- ²²⁵ K. C. Pituch, A. L. Moyano, A. Lopez-Rosas, F. M. Marottoli, G. Li, C. Hu, R. van Breemen, J. E. Månsson, M. L. Givogri: Dysfunction of the PDGFR α represses the production of oligodendrocytes from Arylsulfatase A deficient multipotential neural precursor cells, *a. a. O.*, pp. 7040-7053.
- ²²⁶ L. J. Pike: Lipid rafts: bringing order to chaos, *Journal of Lipid Research* 44 (2003), pp. 655-667.
- ²²⁷ P. Soriano: The PDGFR α receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites, *Development* 124 (1997), pp. 2691-2700.
- ²²⁸ J. C. Murtie, Y. X. Zhou, T. Q. Le, A. C. Vana, R. C. Armstrong: PDGF and FGF2 pathways regulate distinct oligodendrocyte lineage responses in experimental demyelination with spontaneous remyelination, *Neurobiology of Disease* 19 (2005), pp. 171-182.
- ²²⁹ Y. Hirahara, R. Bansal, K. Honke, K. Ikenaka, Y. Wada: Sulfatide is a negative regulator of oligodendrocyte differentiation: Development in Sulfatide-null mice, *a. a. O.*, pp. 269-277.
- ²³⁰ A. L. Moyano, G. Li, A. Lopez-Rosas, J. E. Månsson, R. B. van Breemen, M. I. Givogri: Distribution of C16:0, C18:0, C24:1, and C24:0 sulfatides in central nervous system lipid rafts by quantitative ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry, *a. a. O.*, pp. 31-39.
- ²³¹ K. C. Pituch, A. L. Moyano, A. Lopez-Rosas, F. M. Marottoli, G. Li, C. Hu, R. van Breemen, J. E. Månsson, M. L. Givogri: Dysfunction of the PDGFR α represses the production of oligodendrocytes from Arylsulfatase A deficient multipotential neural precursor cells, *a. a. O.*, pp. 7040-7053.
- ²³² B. S. Mallon, H. E. Shick, G. J. Kidd, W. B. Macklin: Proteolipid promoter activity distinguishes two populations of NG2-positive cells throughout neonatal cortical development, *The Journal of Neuroscience* 22 (2002), 3, pp. 876-885.
- ²³³ Ebenda.
- ²³⁴ V. Gudi, S. Gingele, T. Skripuletz, M. Stangel: Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned, *a. a. O.* (Keine Seitenangabe vorhanden, da nur elektronische Veröffentlichung).

Vollständiger Artikel unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3952085/pdf/fncel-08-00073.pdf>, Stand 07.07.2016)

²³⁵ M. Kipp, T. Clarner, J. Dang, S. Copray, C. Beyer: The cuprizone animal model: new insights into an old story, *Acta Neuropathologica* 118 (2009), pp. 723-736.

²³⁶ Ebenda.

²³⁷ J. R. Doucette, R. Jiao, A. J. Nazarali: Age-related and cuprizone-induced changes in myelin and transcription factor gene expression and in oligodendrocyte cell densities in the rostral corpus callosum of mice, *Cellular and Molecular Neurobiology* 30 (2010), pp. 607-629.

²³⁸ S. Shen, J. Sandoval, V. A. Swiss, J. Li, J. Dupree, R. J. Franklin, P. Casaccia-Bonnett: Age-dependent epigenetic control of differentiation inhibitors is critical for remyelination efficiency, *Nature Neuroscience* 11 (2008), pp. 1024-1034.

²³⁹ J. C. Biancotti, S. Kumar, J. de Vellis: Activation of inflammatory response by combination of growth factors in Cuprizone-induced demyelinated brain leads to myelin repair, *Neurochemical Research* 33 (2008), pp. 2615-2628.

²⁴⁰ N. L. Sicotte, S. M. Liva, R. Klutch, P. Pieffers, S. Bouvier, S. Odesa, T. C. Jackson Wu, R. R. Voskuhl: Treatment of Multiple Sclerosis with the pregnancy hormone estriol, *Annals of Neurology* 52 (2002), pp. 1-8.

²⁴¹ P. Acs, M. Kipp, A. Norkute, S. Johann, T. Clarner, A. Braun, Z. Berente, S. Komoly, C. Beyer: 17 β -Estradiol and Progesterone prevent Cuprizone provoked demyelination of corpus callosum in male mice, *GLIA* 57 (2009), pp. 807-814.

²⁴² A. Anwar, A. A. Zahid, K. J. Scheidegger, M. Brink, P. Delafontaine: Tumor Necrosis Factor- α regulates Insulin-like growth factor-1 and Insulin-like growth factor binding protein-3 expression in vascular smooth muscle, *Circulation* 105 (2002), pp. 1220-1225.

²⁴³ F. M. Shebl, L. A. Pinto, A. García-Piñeres, R. Lempicki, M. Williams, C. Harro, A. Hildesheim: Comparison of mRNA and protein measured of cytokines following vaccination with HPV-16 L1 virus like particles, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 19 (2010), 4, pp. 978-981.

²⁴⁴ V. Palanisamy, A. Jakymiw, E. A. Van Tubergen, N. J. D'Silva, K. L. Kirkwood: Control of cytokine mRNA Expression by RNA-binding proteins and microRNAs, *Journal of Dental Research* 91 (2012), 7, pp. 651-658.

²⁴⁵ G. Lopez-Castejon, N. M. Luheshi, V. Compan, S. High, R. C. Whitehead, S. Flitsch, A. Kirov, I. Prudovsky, E. Swanton, D. Brough: Deubiquitinases regulate the activity of Caspase-1 and Interleukin-1 β secretion via assembly of the inflammasome, *The Journal of Biological Chemistry* 288 (2013), pp. 2721-2733.

²⁴⁶ A. Stein, S. Strootbans, V. Gieselmann, R. d'Hooge, U. Matzner: Anti-inflammatory therapy with Simvastatin improves neuroinflammation and CNS function in a mouse model of Metachromatic Leukodystrophy, *a. a. O.*, pp. 1160-1168.

²⁴⁷ L.C. Taylor, W. Gilmore, G. K. Matushima: SJL mice exposed to Cuprizone intoxication reveal strain and gender pattern differences in demyelination, *Brain Pathology* 19 (2009), pp. 467-479.

²⁴⁸ T. Darville, C. W. Andrews, Jr., K. K. Lafoon, W. Shymasani, L. R. Kishen, R. G. Rank: Mouse strain-dependent variation in the course and outcome of chlamydial genital tract infection is associated with differences in host response, *Infection and Immunity* 65 (1997), 8, pp. 3065-3073.

²⁴⁹ G. Giovannoni, H. P. Hartung: The immunopathogenesis of multiple sclerosis and Guillan-Barre syndrome, *Current Opinion in Neurology* 9 (1996), 3, pp. 165-177.

²⁵⁰ B. Barrette, K. A. Nave, J. M. Edgar: Molecular triggers of neuroinflammation in mouse models of demyelinating diseases, *Biological Chemistry* 394 (2013), 12, pp. 1571-1581.

-
- ²⁵¹ A. Stein, S. Strootbans, V. Gieselmann, R. d'Hooge, U. Matzner: Anti-inflammatory therapy with Simvastatin improves neuroinflammation and CNS function in a mouse model of Metachromatic Leukodystrophy, *a. a. O.*, pp. 1160-1168.
- ²⁵² D. M. de Oliveira, E. M. de Oliveira, M. de F. Ferrari, P. Semedo, M. I. Hiyane, M. A. Cenedeze, A. Pacheco-Silva, N. O. Câmara, J. P. Peron: Simvastatin ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting Th1/Th17 response and cellular infiltration, *Inflammopharmacology* 23 (2015), 6, pp. 343-354.
- ²⁵³ C. Cunningham: Microglia and neurodegeneration: The role of systemic inflammation, *GLIA* 61 (2013), pp. 71-90.
- ²⁵⁴ D. G. Walker, J. E. Dalsing-Hernandez, N. A. Campbell, L. F. Leu: Decreased expression of CD200 and CD200 receptor in Alzheimer's disease: A potential mechanism leading to chronic inflammation, *Experimental Neurology* 215 (2009), 1, pp. 5-19.
- ²⁵⁵ A. Stein, S. Strootbans, V. Gieselmann, R. d'Hooge, U. Matzner: Anti-inflammatory therapy with Simvastatin improves neuroinflammation and CNS function in a mouse model of Metachromatic Leukodystrophy, *a. a. O.*, pp. 1160-1168.
- ²⁵⁶ J. C. Biancotti, S. Kumar, J. de Vellis: Activation of inflammatory response by combination of growth factors in Cuprizone-induced demyelinated brain leads to myelin repair, *Neurochemical Research* 33 (2008), pp. 2615-2628.
- ²⁵⁷ C. Eder: Mechanisms of Interleukin-1 β release, *Immunobiology* 214 (2009), pp. 543-553.
- ²⁵⁸ M. Jayachandran, V. M. Miller, J. A. Heit, W. G. Owen: Methodology for isolation, identification and characterization of microvesicles in peripheral blood, *Journal of Immunological Methods* 375 (2012), 1-2, pp. 207-214.
- ²⁵⁹ K. Z. Matalka, M. E. Tutunji, M. Abu-Baker, Y. Abu-Baker: Measurement of protein cytokines in tissue extracts by enzyme-linked immunoabsorbent assays: Application to lipopolysaccharide-induced differential milieu of cytokines, *Neuroendocrinology Letters* 3 (2005), pp. 231-236.
- ²⁶⁰ S. Mi, R. H. Miller, X. Lee, M. L. Scott, S. Shulag-Morskaya, Z. Shao, J. Chang, G. Thill, M. Levesque, M. Zhang, C. Hession, D. Sah, B. Trapp, Z. He, V. Jung, J. M. McCoy, R. B. Pepinsky: LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes, *Nature Neuroscience* 8 (2005), pp. 745-751.
- ²⁶¹ <http://clinicaltrials.gov>: Study to assess the efficacy, safety, tolerability, and pharmacokinetics of BIIB033 in participants with relapsing forms of multiple sclerosis when used concurrently with Avonex (SYNERGY), Studiennummer NCT01864148, Stand: 13.04.2016.

VII. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Bei der Verfassung der Dissertation wurden keine anderen als die im Text aufgeführten Hilfsmittel verwendet.

Ein Promotionsverfahren wurde zu keinem früheren Zeitpunkt an einer anderen Hochschule oder bei einem anderen Fachbereich beantragt.

Klaudia Brysch

Köln, 19.06.2017

VIII. Danksagung

„Im Anfang war das Wort [...].“

Johannes Kapitel 1, Vers 1

Und auch am Ende jahrelanger Laborarbeit steht wieder das Wort. Die richtigen Worte zu finden, kann einem keiner helfen, aber eine Reihe von Menschen hat mich auf dem Weg dorthin begleitet:

Ich danke Herrn PD Dr. Matthias Eckhardt und Herrn Prof. Dr. Gieselmann, die mir die Möglichkeit zur Promotion am IBMB geben haben. Danke Lihua, für deine Expertise und die Geduld, mit der du mich eingearbeitet hast. Dank meinem Arbeitskreis AG Eckhardt (Asisa, Raupe, Izzi, Lena, Ivonne, Silvia) für Inspiration und Motivation. Ich habe die Arbeitsatmosphäre im Institut immer sehr geschätzt.

Ein besonderen Dank möchte ich den Mitarbeitern aussprechen, die gerne vergessen werden: Ali, Norbert und Karola. Die immer Zeit haben, einem zu helfen, auch wenn die eigene Arbeit sich bis zur Decke stapelt.

Auch außerhalb des Instituts gibt es Menschen, die am Gelingen meiner Arbeit nicht unbeteiligt waren. Für ihre Unterstützung während der praktischen Phase danke ich vor allem Frau Dr. Sonja Hartwig und Herrn Dr. Stefan Leer vom Deutschen Diabetes-Zentrum DDZ in Düsseldorf sowie dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Steinhäuser, der mich während der frühen Phase meiner praktischen Arbeit durch das Bereitstellen von Mäusen zur Tierzucht, sowie bei der Etablierung grundlegender Methoden unterstützt hat.

Zuletzt sei der Dank meiner Familie und meinen Freunden gewidmet:
Ihr habt mich immer unterstützt und nie an mir gezweifelt.

Danke.