

**Unterschiede von neuronalen und oligodendrozytären
Vorläuferzellen beim Stickstoffmonoxid-induzierten Zelltod
und der Bindung von humanen Antikörpern**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Ahmet Ayar

aus Ahlen

Gießen 2014

Aus dem medizinischen Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie,
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH

Standort: Gießen

Leiter: Prof. Dr. med. M. Kaps

1. Gutachter: PD Dr. med. M. Berghoff

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. R. Geyer

Tag der Disputation: 27.03.2015

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....I-II

1.	EINLEITUNG.....	1
1.1	Multiple Sklerose.....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Ätiologie und Pathogenese.....	1
1.1.3	Symptomatik und Verlauf.....	3
1.1.4	Diagnose.....	7
1.1.5	Therapie.....	8
1.2	Der Zelltod.....	14
1.2.1	Nekrose.....	14
1.2.2	Apoptose.....	15
a)	Initiationsphase.....	16
l)	Extrinsischer Weg.....	16
ll)	Intrinsischer Weg.....	16
b)	Effektorphase.....	17
1.3	Stickstoffmonoxid (NO).....	20
1.4	Die Signaltransduktion der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK).....	22
1.4.1	Der p38 MAPK-Signalweg.....	23
1.4.2	Der ERK MAPK-Signalweg.....	25
1.5	Die Ziele der Arbeit.....	26
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	27
2.1	Zellkultur.....	27
2.1.1	Zelllinien und Kultivierung.....	27
2.1.1.1	C17.2.....	27
2.1.1.2	OLN93.....	27
2.1.1.3	SH-SY5Y.....	28
2.1.1.4	Raji.....	28
2.1.2	Passage von C17.2, OLN93, SH-SY5Y und Raji Zellen.....	29
2.1.3	Behandlung von Zellen mit Substanzen.....	30
2.1.3.1	Zelltod-Induktion mit SNP und rrTNF- α	30
2.1.3.2	Behandlung von Zellen mit MS-Basistherapeutika.....	30
2.1.3.3	Behandlung von Zellen mit Patientenseren.....	30
2.1.4	Einfrieren und Auftauen von Zelllinien.....	31
2.2	Bestimmung des Zelltodes.....	31
2.2.1	Trypanblau-Färbung und Zellzählung.....	31
2.2.2	WST-1 Assay (Cell Proliferation Reagent).....	33
2.2.3	Zytotoxizitätsassay (LDH Assay).....	34
2.2.4	Lichtmikroskopie.....	35
2.3	Proteinbiochemische und immunologische Methoden.....	36
2.3.1	Herstellung von Zelllysaten.....	36
2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	36
2.3.3	Westernblot.....	37
2.3.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	37
2.3.3.2	Proteintransfer und Immundetektion.....	38

2.4	Durchflusszytometrie.....	39
2.4.1	Nachweis extrazellulärer Antikörperbindung.....	40
2.5	Immunzytochemie.....	41
2.5.1	Hoechst-Färbung.....	41
2.5.2	Visuelle Darstellung der Antikörperbindung an den Zellen.....	41
2.6	Nitrit Assay.....	42
3.	ERGEBNISSE.....	43
3.1	Untersuchungen zum NO-induzierten Zelltod.....	43
3.1.1	NO-induzierter Zelltod bei unterschiedlicher Anzahl von OLN93 Zellen.....	44
3.2	Zelltod-Induktion mit rekombinantem TNF-α der Ratte.....	45
3.3	Aktivierung des p38 MAPK-Stresssignalwegs durch NO.....	46
3.4	Auswirkungen der Basistherapeutika.....	47
3.4.1	Konzentrationsreihe Interferon (IFN)- β 1b.....	48
3.4.2	Konzentrationsreihe Glatirameracetat (GA).....	48
3.4.3	Auswirkungen der Basistherapeutika unter dem NO-induzierten Zelltod.....	49
3.4.4	Auswirkungen von GA und rekombinantem TNF- α der Ratte bei den OLN93 Zellen.....	51
3.5	Auswirkungen der RRMS- und SPMS-Patientenseren auf C17.2 und OLN93 Zellen.....	52
3.6	NO-Bestimmung in den RRMS- und SPMS-Patientenseren.....	53
3.6.1	Verdünnungsreihe zur NO-Bestimmung in den RRMS- und SPMS- Patientenseren.....	54
3.7	Antikörperbindung der RRMS- und SPMS-Patientenseren.....	54
3.7.1	FACS-Analyse.....	54
3.7.2	Immunzytochemische Darstellung der Antikörperbindung.....	56
4.	DISKUSSION.....	58
4.1	Rolle von NO bei der Multiplen Sklerose.....	58
4.1.1	Einfluss der Basistherapeutika beim NO-induzierten Zelltod.....	60
4.2	Rolle des TNF-α bei der Pathogenese von MS.....	61
4.3	Unterschiede in der Antikörperbindung.....	62
4.4	Schlussfolgerungen und Aussichten.....	63
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	64
6.	ABSTRACT.....	65
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	66
8.	LITERATURVERZEICHNIS.....	68
9.	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....	76
10.	DANKSAGUNG.....	77
11.	LEBENS LAUF.....	78

1. EINLEITUNG

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), deren Ursache noch nicht vollständig geklärt ist. Sie zählt zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen im jungen Erwachsenenalter, die sowohl schubförmig als auch chronisch-progredient verlaufen kann (Unterpunkt 1.1.3 und Abb. 4). Bei der MS kommt es in der weißen Substanz von Gehirn und Rückenmark zu multiplen entzündlichen Entmarkungsherden, die nach heutigem Wissensstand durch den Angriff körpereigener Immunzellen verursacht werden und Ursache der auftretenden Myelin- und Axondegeneration sind. Da diese Herde im gesamten ZNS auftreten können, kann somit die Multiple Sklerose unterschiedliche zentral-neurologische Symptome verursachen. Mit den heutigen Therapeutika ist die MS zwar nicht heilbar, doch kann der Verlauf günstig beeinflusst werden.

1.1.1 Epidemiologie

In Deutschland beträgt die Prävalenz der MS 83-127/100.000 ^[1]. Die Inzidenz liegt bei etwa 4/100.000 ^[1]. In den meisten Fällen manifestiert sich die MS zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, wobei Frauen etwa doppelt so häufig betroffen sind wie Männer (Gynäkotropie) ^[2]. In der äquatorialen Zone ist die Häufigkeit der MS seltener als in den nördlichen oder südlichen Breiten ^[3]. Kinder und Jugendliche, die aus MS-reichen Breiten in MS-arme Breiten übersiedeln, übernehmen das Erkrankungsrisiko des Zielortes, während Erwachsene das ihres Herkunftsortes behalten. Dieser Befund weist auf die Beteiligung von Umweltfaktoren im Kinder- und Jugendlichenalter an der späteren Entstehung der Erkrankung hin ^[4]. Des Weiteren ist das Erkrankungsrisiko abhängig von der ethnischen Zugehörigkeit ^[5]. So sind zum Beispiel hellhäutige Menschen häufiger betroffen als dunkelhäutige und einige ethnische Gruppierungen, wie z. B. die Eskimos ^[3].

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Bislang ist die Ätiologie der MS unbekannt. Es wird vermutet, dass sich die MS in genetisch prädisponierten Menschen nach einem Kontakt zu einem oder mehreren bisher unbekannten Umweltfaktoren manifestieren kann ^[6] ^[7]. Eine Reihe von genetischen Polymorphismen konnte identifiziert werden, die bei Erkrankten häufiger als in der Gesamtbevölkerung auftreten und womöglich zu einer Prädisposition für die MS beitragen. So beträgt das

Lebenszeitrisko in der Normalbevölkerung 0,2%, wohingegen das Erkrankungsrisiko bei eineiigen Zwillingen von MS-Patienten etwa 35%, bei Geschwistern etwa 4%, bei Verwandten ersten Grades etwa 3%, zweiten Grades etwa 1% und dritten Grades etwa 0,9% beträgt ^{[8][9]}. Durch Studien an Zwillingen ^[10], an Adoptivkindern ^[11] und an Halbgeschwistern ^[12] konnte eine weitere Untermauerung des genetischen Einflusses und gleichzeitig dessen Abgrenzung zu Umwelteinflüssen durch ein ähnliches Lebensumfeld innerhalb der Familie erbracht werden. Dass auch Umweltfaktoren mitursächlich für die Krankheitsentstehung sind, ergeben sich zum einen aus der auffälligen geographischen Verteilung der Prävalenz (Unterpunkt 1.1.1) und zum anderen aus Migrationsstudien. Eine stattgefundene Exposition gegenüber einem Umweltfaktor im Kindesalter bzw. bis zum 15. Lebensjahr ist offenbar maßgebend für das Risiko der Krankheitsentwicklung, das unabhängig vom späteren Wohnort ist ^[3].

Die Multiple Sklerose stellt eine chronisch-entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die mit einer Degeneration einhergeht, dar. Inflammation, Demyelinisierung, axonale Degeneration, Oligodendrozytenverlust, Remyelinisierung und reaktive Gliose (Astrozytose) finden sich in Läsionen ^[6]. Häufig betroffene Stellen sind die Sehnerven, der Hirnstamm, das Rückenmark und die periventrikuläre weiße Substanz. Bei der MS handelt es sich vermutlich um eine durch autoreaktive T-Helfer1 (Th1)-Zellen vermittelte Entzündungsreaktion mit einer Dominanz von Makrophagen, die zu einer Destruktion der Myelinscheiden der Oligodendrozyten führt ^[13]. Diese Erkenntnis wurde aus dem Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) gewonnen. Dazu zählen die CD (*cluster of differentiation*)8- und CD4-positive T-Lymphozyten, Plasma- und B-Zellen, Antikörper, Mastzellen, das Komplementsystem, eine starke Aktivierung der Makrophagen und Mikroglia, Zytokine wie IL (Interleukin)-1, IL-2, IL-12, IL-23, IFN (Interferon)- γ und TNF (Tumor Nekrose Faktor)- α , Sauerstoff- und Stickstoff-Radikale sowie aktivierte Endothelzellen ^{[14][15]}.

Bei der MS werden zunächst autoreaktive T-Zellen in der Peripherie auf unbekannte Weise aktiviert. Eine Möglichkeit dieser Aktivierung lässt sich durch molekulares Mimikry erklären ^[16]. Hierbei reagiert das Immunsystem aufgrund der Ähnlichkeit antigener Determinanten von Infektionserregern und Zellen des Wirtsorganismus mit der Bildung von Auto-Antikörpern bzw. auto-aggressiven T-Lymphozyten ^[17]. Die aktivierten T-Zellen wandern anschließend durch die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS ein und lösen dort eine Entzündungsreaktion aus. Daraufhin werden im ZNS die Zellen wie Mikroglia und Astrozyten durch proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ , IL-23, TNF- α , Leukotriene und Chemokine aktiviert. Zusätzlich werden auch andere Immunzellen, insbesondere die Makrophagen, angelockt. Durch diese Entzündung kommt es zur Störung der Blut-Hirn-Schranke und zum Gewebsödem. Dieser

Prozess dauert einige Tage bis zwei Wochen ^{[15] [18]}. Die Remission der neurologischen Symptomatik beim schubförmigen Verlauf wird dadurch erklärt, dass nach Beendigung der Inflammation die Gewebsödeme verschwinden und eine Remyelinisierung der demyelinisierten Axone stattfindet ^[14]. Dabei ist die Remyelinisierung von der Verfügbarkeit der Oligodendrozyten und/oder ihrer Vorläuferzellen abhängig ^[19].

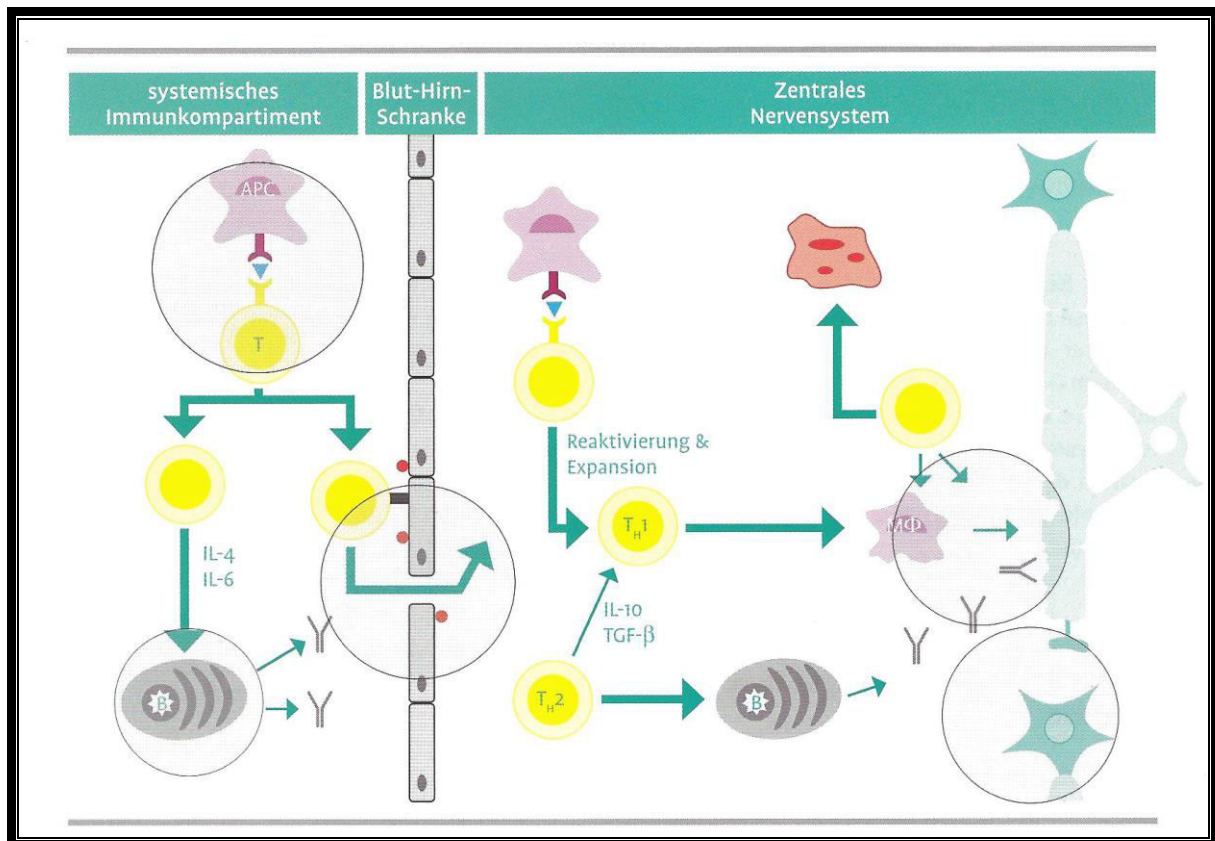


Abb. 1: Pathophysiologischer Vorgang bei Multipler Sklerose (Multiple-Sklerose-Werkstatt, Pasquale Calabrese et al., Seite 10)

1.1.3 Symptomatik und Verlauf

Da bei der MS die Läsionen disseminiert im ZNS auftreten können, kann somit bei dieser Krankheit eine Vielzahl an neurologischen Symptomen auftreten. Dennoch gibt es bei der MS initial einige Prädispositionsstellen, die typische Primärsymptome verursachen. Häufige Primärsymptome sind Störungen der Hirnnerven, vor allem des N. opticus (Retrobulbärneuritis), die sich als Sehunschärfe bemerkbar machen und mit Bulbusbewegungsschmerzen einhergehen ^[20] sowie Sensibilitätsstörungen. Weitere Symptome sind Paresen, autonome Störungen und Störungen der Mobilität. Auch das Lhermitte-Zeichen gilt als typisch für die MS und kann ein Hinweis auf Herde im Bereich

Halsrückenmarks sein ^[21]. Dabei kommt es bei passiver Inklinaton des Kopfes zu Parästhesien an den Beinen. Seltene Erstsymptome bei der MS sind epileptische Anfälle und Psychosen. Im Verlauf der Krankheit tritt bei vielen Patienten eine gesteigerte körperliche und psychische Ermüdbarkeit, das sogenannte Fatigue-Syndrom, auf. Nicht zu vernachlässigende Symptome sind kognitive und psychische Störungen. Insbesondere Affektstörungen sind häufig ^[22] und im späten Stadium kann auch eine subkortikale Demenz auftreten ^[23]. Mittels EDSS (*expanded disability status scale*) nach Kurtzke 1983 können die Beeinträchtigungen des Patienten quantifiziert werden ^[24]. Hierbei wird der Grad der Behinderung in einer Skala von 0 für keine Behinderung bis 10 für Tod durch MS angegeben (Abb. 2).

Behinderungsskala zur MS

(EDSS = Expanded Disability Status Scale;
vereinfachte Darstellung nach
Kurtzke 1983)

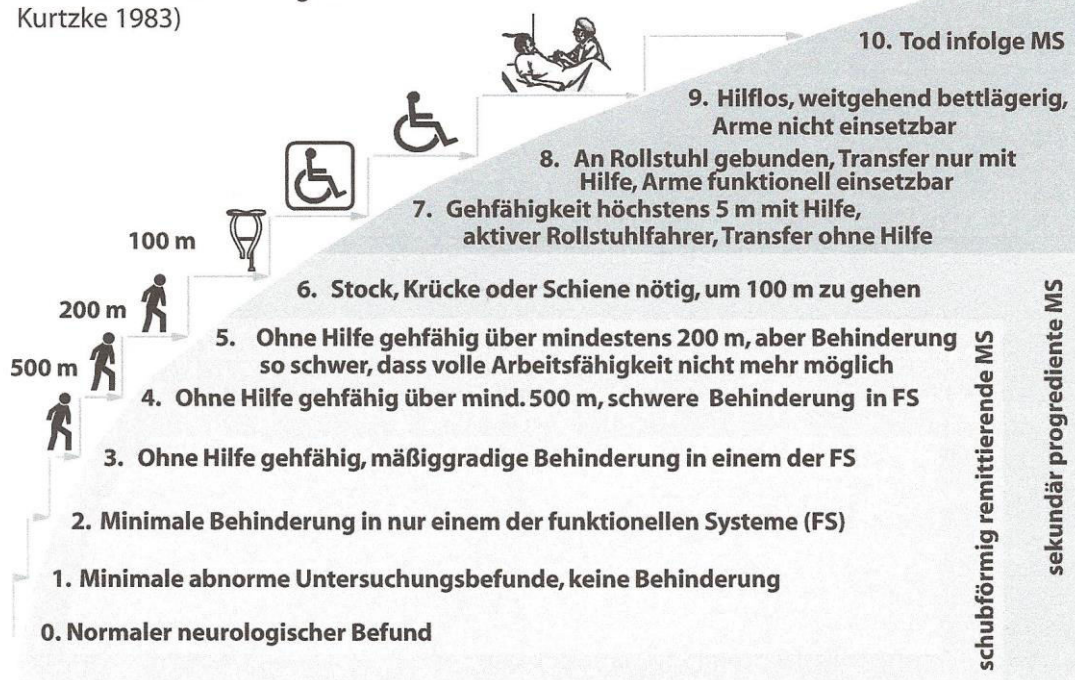


Abb. 2: Behinderungsskala zur MS (EDSS = expanded disability status scale; vereinfachte Darstellung nach Kurtzke 1983 ^[24], © 2010 W. Kohlhammer, Stuttgart)

Die MS manifestiert sich meist zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr. Der klinische Verlauf ist sehr variabel. Die Erkrankung manifestiert sich bei den meisten Patienten mit einem schubförmig remittierenden Verlauf (*relapsing remitting multiple sclerosis*, RRMS) ^[25]. Dabei ist ein Schub definiert als das Auftreten neuer oder das Wiederaufflammen bereits bekannter klinischer Symptome, die länger als 24 Stunden anhalten und denen eine entzündlich-entmarkende Schädigung des ZNS zugrunde liegt. Neu auftretende Symptome entwickeln

sich in einem Zeitraum von Stunden bis Tagen. Laut der festgelegten Definition müssen mindestens 30 Tage zwischen zwei klinischen Ereignissen liegen, um einen neuen Schub von einem vorausgegangenen abgrenzen zu können. Wenige Tage bis einige Wochen kann ein Schub dauern und je nachdem, ob sich die aufgetretenen Symptome komplett oder nur partiell zurückbilden, kommt es entweder zu einer kompletten oder inkompletten Remission. Wichtig ist auch eine Abgrenzung der echten Schübe von den sogenannten Pseudoschüben, die im Rahmen einer Temperaturerhöhung (Uhthoff-Phänomen) oder einer Infektion auftreten und zu einer passageren Verschlechterung der Symptome führen können.

Oft beginnt die Erkrankung zunächst mit einem klinisch isolierten Symptom (*clinically isolated syndrome*, CIS). Nach einer isolierten Optikusneuritis liegt das Risiko eine klinisch sichere MS zu entwickeln bei etwa 50% ^[26]. Nach Erstsymptomatik erleiden etwa 1/3 der Patienten bei Beginn der Erkrankung im frühen Erwachsenenalter einen zweiten Schub innerhalb eines Jahres, die Hälfte innerhalb von zwei und etwa 2/3 der Patienten innerhalb von drei Jahren.

Nach ca. 10 bis 15 Jahren ist diese schubförmig verlaufende Form der MS bei etwa der Hälfte der Fälle in eine sekundär progressive Variante der MS übergegangen ^[25] (*secondary progressive multiple sclerosis*, SPMS), die durch eine langsame Zunahme neurologischer Störung gekennzeichnet ist. Schubförmige Verschlechterung können jedoch weiterhin auf dem fortschreitenden Verlauf der Erkrankung aufliegen. Bei etwa 10-15% der Patienten verläuft die Erkrankung nicht mit Schüben, sondern mit einer schleichenden Progression der neurologischen Defizite ohne Rückbildung. Sie wird dann als primär progrediente MS (*primary progressive multiple sclerosis*, PPMS) bezeichnet und hat eine schlechtere Prognose als die anderen Formen. Die PPMS kommt bei älteren Patienten häufiger vor als bei jüngeren.

Da die MS sehr variabel ist, ist die genaue Prognose des Krankheitsverlaufs schwierig. Trotzdem gibt es einige klinische Faktoren, die den Krankheitsverlauf beeinflussen können (Abb. 3). Zum Beispiel sind eine hohe Entzündungsaktivität mit mehreren Schüben in der Frühphase der Erkrankung ^[120], ein polysymptomatischer Beginn mit anhaltenden Störungen ^[121] und pathologische somatosensibel evozierte Potentiale (SSEP) sowie motorisch evozierte Potentiale (MEP) in der Frühphase der Erkrankung ^[122] signifikant häufiger mit einem prognostisch ungünstigen Verlauf assoziiert.

Prognostisch eher günstige Faktoren	Prognostisch eher ungünstige Faktoren
monosymptomatischer Beginn	polysymptomatischer Beginn
nur sensible Symptome	früh motorische und zerebelläre Symptome
kurze Dauer der Schübe	lang dauernde Schübe
gute Rückbildung der Schübe	schlechte Rückbildung der Schübe
erhaltene Gehfähigkeit	initial zahlreiche Läsionen in der MRT
Erkrankungsbeginn < 35. Lebensjahr	früh pathologische SEP und MEP

Abb. 3: Faktoren, die den Krankheitsverlauf beeinflussen können (DGN / KKNMS Leitlinie zur Diagnose und Therapie der MS - Online Version Stand: 12.04.2012, Seite 7)

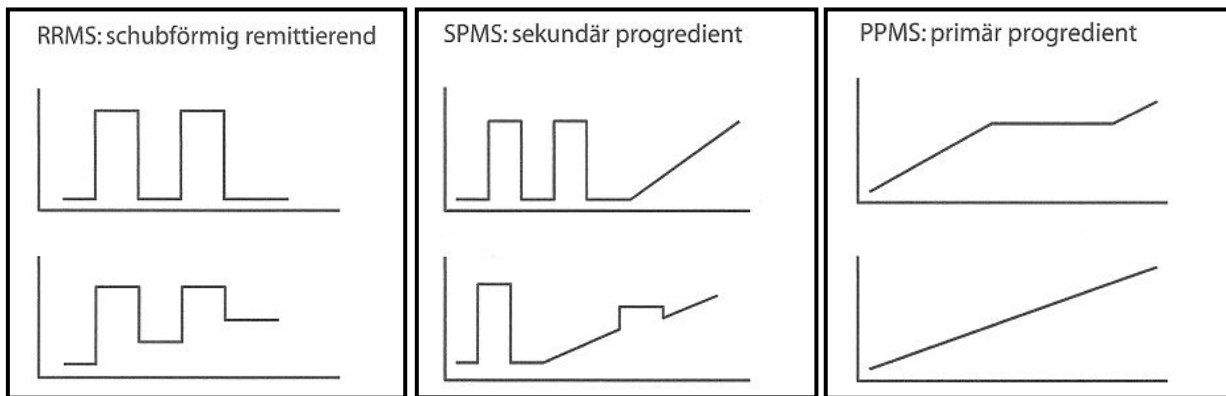


Abb. 4: Verschiedene klinische Verlaufsformen der Multiplen Sklerose ((© 2010 W. Kohlhammer, Stuttgart), Erläuterungen: Auf der x-Achse befindet sich dabei jeweils die Zeit und auf der y-Achse die Erkrankungsaktivität der MS-Verlaufsformen)

1.1.4 Diagnose

Die Diagnose der MS wird mithilfe der Anamnese, des klinischen Befundes, der paraklinischen Untersuchungen wie Magnetresonanztomographie (MRT), der evozierten Potentiale und des Befundes im Liquor cerebrospinalis gestellt. Entscheidend hierfür sind dabei die räumlichen und zeitlichen Disseminationen der Befunde und der Ausschluss der Symptomatik durch andere Ursachen. Die in 2010 überarbeitete Fassung der McDonald-Kriterien (Abb. 5) dient heute als Grundlage für die Diagnosestellung ^{[27] [28]}.

Anzahl der Schübe	Anzahl der klinischen Läsionen	Weitere Anforderungen zur Diagnose MS
2 und mehr	2 und mehr	keine
2 und mehr	1	Fehlend: räumliche Dissemination, MR-tomographisch erfüllt wenn: 1 oder mehr T2-Läsionen in mindestens zwei der MS-typischen Regionen (periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell, spinal) ODER Abwarten auf neuen Schub mit neuer Läsionslokalisation
1	2 und mehr	Fehlend: zeitliche Dissemination; MR-tomographisch erfüllt bei: Gleichzeitigem Nachweis von asymptomatischen Gadolinium-aufnehmenden und nicht-aufnehmenden Läsionen, ODER Nachweis einer neuen T2- oder Gadolinium-aufnehmenden Läsion im Kontroll-MRT zeitunabhängig, ODER Abwarten auf neuen Schub
1	1	Fehlend: räumliche und zeitliche Dissemination, MR-tomographische Anforderungen siehe oben
Neurologische Progression mit Verdacht auf primär-chronisch progrediente MS		Mindestens 1 Jahr Progression plus 2 der folgenden 3 Kriterien: 1. 1 oder mehrere T2-Läsionen in den MS-typischen Regionen periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell 2. 2 oder mehrere spinale Läsionen 3. Nachweis einer intrathekalen IgG-Synthese

Abb. 5: Diagnosekriterien der Multiplen Sklerose ([http://de.wikipedia.org/wiki/Diagnosekriterien der Multiplen Sklerose](http://de.wikipedia.org/wiki/Diagnosekriterien_der_Multiplen_Sklerose))

1.1.5 Therapie

Da die MS bisher nicht heilbar ist, besteht das Ziel in der Freiheit von klinischer und paraklinischer Krankheitsaktivität. Dabei lassen sich die therapeutischen Möglichkeiten in die Schubtherapie, die immunmodulierende Langzeittherapie und die Behandlung symptomatischer Beschwerden unterteilen.

Als Goldstandard der Schubtherapie, die bei funktioneller Beeinträchtigung des Patienten angezeigt ist, hat sich die intravenöse Gabe von 1 g Methylprednisolon pro Tag über drei bis fünf Tage bewährt. Hochdosierte intravenöse Gabe von Methylprednisolon kann während eines Schubes die Rückbildung von Symptomen beschleunigen, weil Methylprednisolon entzündungshemmend wirkt und außerdem die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke vermindert, so dass weniger Leukozyten sie überqueren und so in die Entzündungsherde im ZNS einwandern können. Beim Fortbestehen von Schubsymptomen für mindestens zwei Wochen nach der ersten Schubtherapie kann eine zweite Pulstherapie mit erhöhter Dosierung 2 g Methylprednisolon pro Tag bis zu fünf Tage stattfinden. Auch eine Plasmapherese kann bei unbefriedigender Wirkung der zweiten Schubtherapie zur Beendigung eines akuten Schubes in Erwägung gezogen werden. Dabei wird sie nur bei funktionell stark beeinträchtigenden Schüben angewendet, da als mögliche Komplikationen schwerwiegende Störungen des Herz-Kreislauf-Systems und Infektionen auftreten können ^[29] ^[30]. Etwa 40% der Patienten profitieren von der Plasmapherese ^[31].

Das Ziel einer Langzeittherapie besteht darin, dass keine Schübe und Behinderungsprogredienz auftreten bzw. die Verschlechterung bereits bestehender Defizite verzögert wird. Eine prophylaktische Therapie wird in der Regel individuell entschieden. Die Basistherapie zur Prophylaxe der MS beinhaltet Interferon- β 1a/b (IFN- β 1a/b) und Glatirameracetat (GA). Seit wenigen Monaten können auch die oralen Medikamente Teriflunomid und Dimethylfumarat verwendet werden. Bis Ende 2013 kamen vor allem IFN- β 1a/b und GA zur Schubprophylaxe zum Einsatz.

IFN- β führt sowohl zu einer verminderten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und verminderten Antigenpräsentation als auch zur Verkürzung der Lebensdauer von T-Zellen ^[32]. Auch hat es einen Einfluss auf die Blut-Hirn-Schranke, indem diese weniger durchlässig wird und somit die Migration von T-Zellen in die Entzündungsherde im ZNS reduziert ^[33]. Die beiden Formen des IFN- β unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer Glykosylierung (glykosyliertes IFN- β 1a und nicht glykosyliertes IFN- β 1b). Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählen lokale Hautreaktionen an der Einstichstelle, grippeähnliche Symptome, Erhöhung von Leberfunktionsparametern sowie Depression und Blutbildveränderungen wie Leukopenie. Wegen der Leukopenie sollten in regelmäßigen

Abständen Blutbildkontrollen durchgeführt werden. Wegen seiner ausgeprägten antiinflammatorischen Wirkung eignet sich IFN- β zur Prophylaxe bei RRMS und SPMS, bei der PPMS besteht keine ausreichende Wirksamkeit ^[34].

Glatirameracetat (GA) ist ein heteroeogenes Gemisch synthetischer Polypeptide, welches aus wenigen Aminosäuren (Glutamat, Lysin, Alanin und Tyrosin („GLAT“)) besteht und eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem basischen Myelinprotein (MBP) hat. Dabei binden sich die Immunzellen, die bei MS normalerweise die Myelinschicht angreifen würden, an dieses Polypeptid und werden somit entschärft ^[35]. GA vermag auch eine Verschiebung des Verhältnisses von Th1- zu Th2-Immunzellen (T-Helferzellen). Dabei passieren die aktivierten Th2-Immunzellen die Blut-Hirn-Schranke und sorgen für eine Freisetzung von antientzündlich wirkenden Zytokinen wie IL-4, IL-6 und IL-10 sowie auch gleichzeitig für eine Hemmung der Synthese entzündungsfördernder Zytokine wie IL-12, die zur Unterdrückung der pathologischen Inflamationsprozesse in den Läsionen im ZNS führen ^[36]. GA hat im Gegensatz zu den IFN- β keinen direkten Einfluss auf die Bluthirnschranke. Die verstärkte Einlagerung von Kontrastmittel aktiver Läsionen im MRT nimmt somit wesentlich langsamer ab als unter Therapie mit IFN- β ^[37]. Des Weiteren ist GA an der Bildung von neurotrophen Faktoren wie z. B. BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) beteiligt, welches eine positive Wirkung auf das geschädigte Hirngewebe entfaltet. Es hemmt den Axonverlust und baut die zerstörte Myelinschicht wieder auf ^{[38] [39]}. Die Indikation von GA bei der MS gleicht der von IFN- β . Bei den MS-Kranken wird aber GA insgesamt besser vertragen als IFN- β , lediglich können als unerwünschte Nebenwirkungen lokalen Hautreaktionen wie Rötung, Brennen, Juckreiz, Thoraxschmerzen und eine Lymphadenopathie auftreten. Eine der seltenen Nebenwirkungen ist die sofortige Postinjektionsreaktion (SPIR). Dabei kommt es direkt nach der Injektion zu Luftnot, Herzrasen und Herzstolpern (Palpitationen) sowie Gesichtsrötung (Flush), die nicht bedrohlich sind und nach einer kurzen Zeit (ca. 5-15 min) selbständig sistieren.

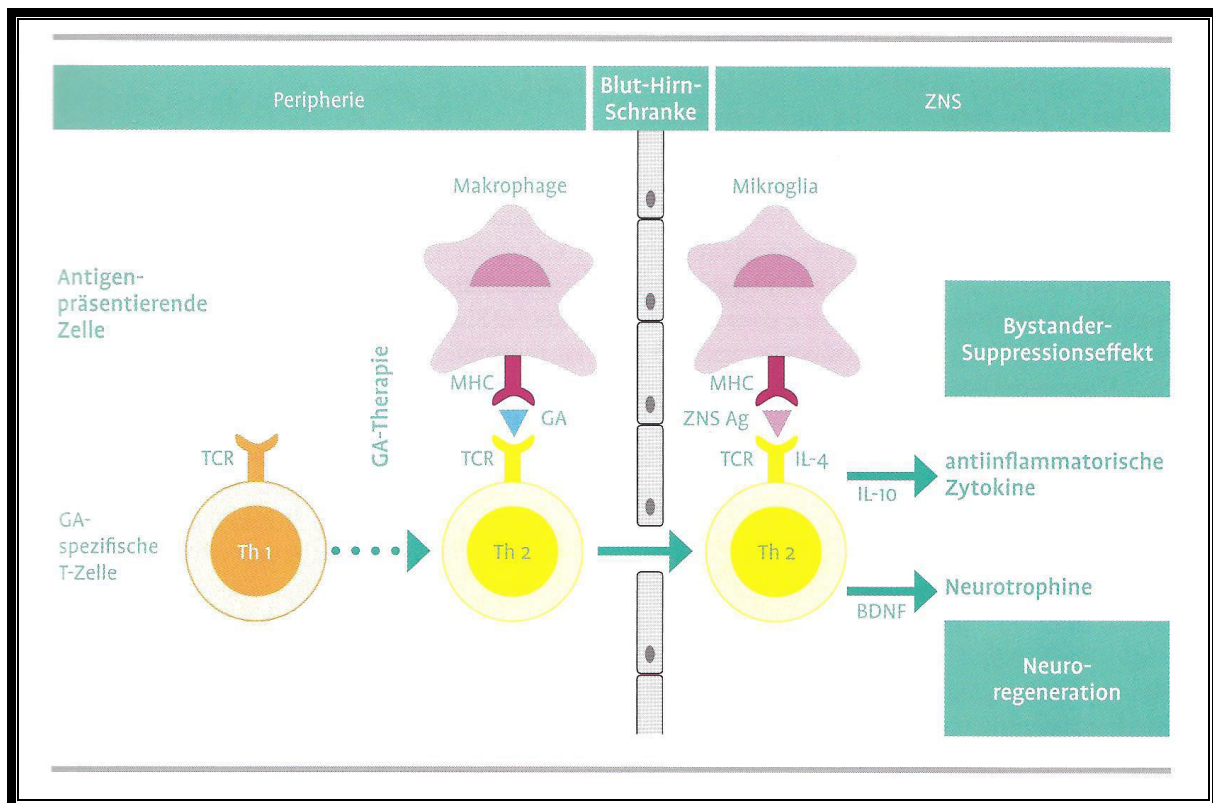


Abb. 6: Wirkmechanismus von Glatirameracetat. In der Peripherie außerhalb des ZNS stimuliert GA zunächst eine Population von Th1-ähnlichen Zellen. Während der Behandlung ändern die GA-stimulierten T-Zellen ihre Eigenschaften und werden mehr Th2-ähnliche Zellen (punktierter Pfeil). Diese aktivierten GA-spezifischen T-Zellen wandern ins ZNS ein, wo sie ZNS-Antigene wie das basische Myelinprotein, welches an MHC-Klasse II gebunden auf der Zelloberfläche der Mikrogliazellen präsentiert werden, erkennen und daraufhin antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 sowie Neurotrophine wie BDNF freisetzen. (Multiple-Sklerose-Werkstatt, Pasquale Calabrese et al., Seite 13)

Wenn es unter der Basistherapie zu einem Fortschreiten der neurologischen Defizite kommt, wird die Eskalationstherapie statt der Basistherapie empfohlen. In der Eskalationstherapie eingesetzte Wirkstoffe sind als erste Wahl Fingolimod sowie Natalizumab und als zweite Wahl Mitoxantron sowie selten auch Cyclophosphamid (Abb. 7).

Das in der ersten Wahl der Eskalationstherapie eingesetzte Medikament Fingolimod wird nach oraler Einnahme durch das Enzym Sphingosin-Kinase-2 zu FTY720-Phosphat (FTY720-P) umgebaut, das dann an die auf Zelloberflächen vorhandenen Sphingosin-1-phosphat-Rezeptoren (S1P1-R) binden kann. Ein wesentlicher Wirkmechanismus von FTY720-P ist vor allem die Bindung an den S1P1-Rezeptor auf T- und B-Lymphozyten. Durch diese Bindung wird dieser Rezeptor internalisiert und abgebaut. Hierdurch wird die S1P1-abhängige Auswanderung der Lymphozyten aus den Lymphknoten ins Blut verhindert, so dass eine verminderte Einwanderung entzündungsfördernder Zellen ins Gehirn stattfindet. Eine unerwünschte Nebenwirkung von Fingolimod ist die Senkung der Anzahl von weißen Blutkörperchen, so dass eine höhere Anfälligkeit für Infektionen besteht. Zudem kann nach der ersten Einnahme von Fingolimod eine relevante Bradykardie entstehen. Diese Wirkung

bildet sich normalerweise nach einigen Stunden zurück und tritt bei kontinuierlicher Einnahme des Arzneistoffs nicht erneut auf.

Ein weiteres Medikament in der ersten Wahl der Eskalationstherapie ist Natalizumab. Hierbei handelt sich um einen humanisierten monoklonalen Antikörper, der an α 4-Integrin aktivierter T-Zellen bindet. Dadurch wird die Bindung der T-Zellen an die Oberflächenproteine des Gefäßendothels wie VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) verhindert und somit die Migration in das Gehirn erschwert. Natalizumab wird bei hochaktiver, schubförmig verlaufender MS eingesetzt. Die Wirksamkeit bei der SPMS ist bisher noch nicht in kontrollierten Studien nachgewiesen. Insgesamt ist Natalizumab gut verträglich. Als seltene aber umso schwerwiegende Komplikation kann es zum Auftreten einer progressiven multifokalen Leukencephalopathie (PML) kommen. Die Ursache für die PML ist eine opportunistische Virusinfektion des Gehirns bei immunsupprimierten Patienten, die durch das JC-Virus ausgelöst wird und oft tödlich verläuft oder bleibende Schäden verursacht ^[40].

Das Anthracenderivat Mitoxantron wird in der zweiten Wahl der Eskalationstherapie eingesetzt. Es wirkt zytostatisch, indem es sich an der DNA durch Wasserstoffbrückenbildung anlagert (Interkalation) und somit für Quervernetzungen und Strangbrüche bei der DNA sorgt. Darüber hinaus hemmt Mitoxantron die Topoisomerase II, welche für die Entspiralisierung und Reparatur beschädigter DNA verantwortlich ist. Mitoxantron entfaltet seine Wirkung über eine Aktivitätshemmung von B- und T-Zellen und der Makrophagenfunktion, so dass die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und die makrophagenvermittelte Demyelinisierung der Axone inhibiert werden. Vorwiegend wird Mitoxantron bei RR- und SPMS eingesetzt. Eine der gravierenden Nebenwirkungen von Mitoxantron ist die kardiotoxische Wirkung. Hierbei können zum einen reversible Herzrhythmusstörungen auftreten und zum anderen eine schwerwiegende toxische Kardiomyopathie entstehen. Aus diesem Grund sollte Mitoxantron unter strenger Indikation und engmaschigem Monitoring der kardialen Funktionen eingesetzt werden.

Indikation	CIS ¹	RRMS ¹		SPMS ¹	
Eskalations- therapie			1. Wahl – Fingolimod ⁴ – Natalizumab ⁴	2. Wahl – Mitoxantron (– Cyclophosphamid) ⁵	
Basistherapie	– Glatirameracetat – Interferon-β 1a i.m. – Interferon-β 1a s.c. – Interferon-β 1b s.c.	– Glatirameracetat – Interferon-β 1a i.m. – Interferon-β 1a s.c. – Interferon-β 1b s.c. (– Azathioprin) ² (– IVIg) ³			– Interferon-β 1a s.c. – Interferon-β 1b s.c. – Mitoxantron (– Cyclophosphamid) ⁵
Schub- therapie	2. Wahl – Plasmaseparation				
	1. Wahl – Methylprednisolonpuls				

¹ = Substanzen in alphabetischer Reihenfolge. Die hier gewählte Darstellung impliziert KEINE Überlegenheit einer Substanz gegenüber einer anderen innerhalb einer Indikationsgruppe (dargestellt innerhalb eines Kastens).

² = Zugelassen, wenn IFN-β nicht möglich ist oder unter Azathioprin-Therapie ein stabiler Verlauf erreicht wird.

³ = Einsatz nur postpartal im Einzelfall gerechtfertigt, insbesondere vor dem Hintergrund fehlender Behandlungsalternativen.

⁴ = Fingolimod und Natalizumab haben neben der Zulassung zur Eskalationstherapie auch eine Zulassung zur Behandlung Therapie-naiver Patienten bei mindestens 2 behindernden Schüben mit Krankheitsprogression binnen der letzten 12 Monate und mindestens einer Gd+-Läsion bzw. einer signifikanten Zunahme der T2-Läsionen in der MRT.

⁵ = Zugelassen für bedrohlich verlaufende Autoimmunkrankheiten, somit lediglich nur für fulminante Fälle als Ausweichtherapie vorzusehen, idealerweise nur an ausgewiesenen MS-Zentren.

Abb. 7: Aktuelle Stufentherapie bei der Multiplen Sklerose (DGN / KKNMS Leitlinie zur Diagnose und Therapie der MS - Online Version Stand: 12.04.2012, Seite 11)

Neben den bisher genannten Therapien, die auf eine Reduktion der Schubhäufigkeit und eine allgemeine Verlangsamung der Krankheitsprogredienz abzielen, gibt es symptomatische Therapien, die den Alltag der Patienten erleichtern sollen. Einen Überblick über die wichtigsten medikamentösen symptomatischen Therapien gibt die Abbildung 8.

Orale Antispastika		
Medikamente	Dosierung ^a	Nebenwirkungen
Baclofen (z. B. Lioresal®)	5–120 mg/Tag	Müdigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhöe, Psychose und Verwirrtheit, Ataxie, Depression des Atem- und kardiovaskulären Systems, Kopfschmerz (besonders bei Niereninsuffizienz)
Tizanidin (z. B. Sirdalud®)	2–24 mg/Tag	Arterielle Hypotonie (besonders bei gleichzeitiger antihypertensiver Therapie), Mundtrockenheit, Übelkeit, Magen-Darm-Beschwerden
Gabapentin (Neurontin®)	300–2400 mg/Tag (bis 3600 mg/Tag)	Schwindel, Müdigkeit, Schwäche
^a Initial- und Höchstdosis. Die jeweilige Höchstdosis bestimmt sich aus der individuellen Symptombesserung und aus den Nebenwirkungen		
Wirkstoffe zur Behandlung chronischer Dys- und Parästhesien		
Wirkstoffe	Dosierung	Wichtigste Nebenwirkung (siehe auch Fachinfos)
Amitriptylin (z. B. Saroten ret.® u. a.)	25–150 mg/Tag	Wie alle Anticholinergika: Mundtrockenheit, Tachykardie, Restharnbildung, Obstipation, Sedierung, ggf. Verschlechterung der Kognition
Carbamazepin ret (Tegretal ret.®, Sirtal ret.® u. a.)	1200–2400 mg/Tag	Vigilanz- und Koordinationsstörungen, Hyponatriämie, Hautallergien, Blutbildveränderungen, Anstieg der Leberenzyme (γ-GT)
Gabapentin (Neurontin® u. a.)	800–2400 mg/Tag (bis 3600 mg/Tag)	Müdigkeit, in hoher Dosis Senkung des Muskeltonus
Lamotrigin (Lamictal®)	25–200(400) mg/Tag	Hautreaktion (Rash), Müdigkeit
Morphin i. v.	9–30 mg/Tag	Somnolenz, Übelkeit, Erbrechen, Obstipation, Atemdepression

Wirkstoffe zur Behandlung von Blasenfunktionsstörungen		
Wirkstoff	Dosierung	Wichtigste Nebenwirkungen (weitere Details siehe Fachinfos)
<i>Oxybutynin</i> (Dridase® u. a.)	5–15 mg/Tag	Wie alle Anticholinergika, insbesondere ggf. Anstieg des RH, ggf. Verschlechterung der Kognition
<i>Flavoxat</i> (Spasuret®)	600 mg/Tag	Wie alle Anticholinergika, insbesondere ggf. Anstieg des RH, ggf. Verschlechterung der Kognition
<i>Tolterodin</i> (Detrusitol®)	2–4 mg/Tag	Wie alle Anticholinergika, insbesondere ggf. Anstieg des RH, ggf. Verschlechterung der Kognition
<i>Tropiumchlorid</i> (Spasmex®)	30–45 mg/Tag	Wie alle Anticholinergika, insbesondere ggf. Anstieg des RH, ggf. Verschlechterung der Kognition
<i>Propiverin</i> (Mictionorm® u. a.)	30–45 mg/Tag	Wie alle Anticholinergika, insbesondere ggf. Anstieg des RH, ggf. Verschlechterung der Kognition
<i>Phenoxylbenzamin</i> (Dibenzylan®)	max. 60 mg/Tag	Schwindel, orthostatische Hypotonie, Reflextachykardie, Kopfschmerzen, Müdigkeit
<i>Desmopressin</i> (Minirin® Nasenspray u. a.)	10–20 µg als Einmalgabe	Hyponatriämie und Gewichtszunahme durch Wasserretention, insbesondere bei Dosissteigerung (Missbrauch!)
Wirkstoffe zur medikamentösen Behandlung von Depressionen		
Wirkstoffe	Dosierung ^a	Wichtigste Nebenwirkungen (siehe auch Fachinfos)
<i>Imipramin</i> , <i>Amitryptilin</i> , <i>Desipramin</i>	50–150 mg 25–200 mg	Herzrhythmusstörungen, Schwindel, Harnverhalt, Mundtrockenheit
<i>Fluoxetin</i>	20–60 mg	Fluoxetin: Unruhe, Übelkeit, Schlafstörungen
<i>Sertralin</i>	50–200 mg	Sertralin: Übelkeit, Diarrhoe, Mundtrockenheit, Schwindel, Tremor, Sexualstörungen
MAO-Hemmer: <i>Moclobemid</i>	150–600 mg	Unruhe, Schwindel, RR-Anstieg
^a Initialdosis und Höchstdosis		
Wirkstoffe zur Behandlung der Fatigue		
Wirkstoff	Dosierung	Wichtigste Nebenwirkungen (siehe auch Fachinfo)
<i>Amantadin</i>	100–200 mg/Tag	Unruhe, Schlafstörungen, Augendruckerhöhung; Harnretention bei Protatahyperplasie, Livedo reticularis, Ödeme
<i>Aminopyridine</i>	10–30 mg/Tag	Epileptische Anfälle, Übelkeit, Parästhesien
<i>Pemolin</i>	75 mg/Tag	Unruhe, Schlafstörungen (Einschlafstörungen), Appetitlosigkeit, Abhängigkeit, selten Leberschäden
<i>Modafinil</i>	200–400 mg/Tag	Kopfschmerz, Schwindel, Nervosität, Herzjagen, Leberwertveränderungen

Abb. 8: Überblick über wichtige symptomatische Therapien bei der MS (Symptomatische Therapie der Multiplen Sklerose, Der Nervenarzt Band 75, Suppl 1, 2004, T. Henze, K.V. Toyka, S. 1-35)

1.2 Der Zelltod

Der Untergang von Zellen wird im Allgemeinen auch als Zelltod bezeichnet. Er kann auf zwei unterschiedliche Arten erfolgen, die im Folgenden ausführlicher beschrieben werden.

1.2.1 Nekrose

Unter einer Nekrose (gr. *nékrosis* „Absterben“) wird der pathologische Untergang einzelner oder mehrerer Zellen verstanden. Charakteristisch bei der Nekrose ist eine Veränderung der zellulären Umgebung, die dann zu einer Nekrose führt. Zu diesen ausschlaggebenden äußeren Einflüssen zählen:

- Thermische Einflüsse wie die extreme Hitze oder die Kälte
- Chemische Faktoren wie Sauerstoffmangel oder toxische Substanzen
- Infektionen mit lytischen Viren
- Aktivierung des Komplementsystems
- Summation verschiedener Noxen

Im Anfangsstadium der Nekrose wird eine Volumenzunahme der Zelle beobachtet. Die Plasmamembran der Zelle kann ihre selektive Wirkung gegenüber den äußeren Einflüssen nicht mehr wahrnehmen, so dass die Aufrechterhaltung des osmotischen Gradienten nicht mehr gewährleistet ist. Dies führt zu einem Flüssigkeitseinstrom und somit zu einer Volumenzunahme des Zytoplasmas und des Zellkernes und letztendlich zur Auflösung der Zellkern- und Zellmembran (die Zelle „platzt“). Durch die Freisetzung lysosomaler Enzyme außerhalb der Zelle wird zum einen dieser Prozess beschleunigt und zum anderen greifen die lysosomalen Enzyme auch die anderen Zellen im unmittelbaren Gewebe an, was zu einem nekrotischen Zelluntergang mehrerer Zellen bzw. des Gewebes führt.

Bei der Nekrose wird Koagulations- von der Kolliquationsnekrose unterschieden. Die Koagulationsnekrose, auch Gerinnungsnekrose genannt, entsteht in Geweben mit hohem Protein- und geringem Lipidanteil durch Ischämie, Säure-, Salz- oder Hitzeeinwirkung. Die Entstehung der Kolliquationsnekrose (Verflüssigungsnekrose) findet dagegen in Geweben mit hohem Lipid- und geringem Proteingehalt durch Ischämie oder in Geweben mit hohem Proteingehalt durch Laugeneinwirkung oder im Pankreas durch Autolyse nach Freisetzung der Verdauungsenzyme, insbesondere der Lipase statt.

1.2.2 Apoptose

Im Gegensatz zur Nekrose handelt es sich bei der Apoptose (gr. *apopiptein* „Abfallen“) um einen sogenannten programmierten Zelltod. Diese Art von Zelltod ist physiologisch sinnvoll und deshalb streng reguliert, so dass die betreffende Zelle selektiv und ohne Schädigung des Nachbargewebes zugrunde geht. Die typischen Merkmale der Apoptose sind:

- Lösen der betroffenen Zelle aus den Gewebsverband
- Schrumpfung der betroffenen Zelle
- Kondensation des Chromatins und Kernfragmentierung (Pyknose) ^[41]
- Aufspaltung des genetischen Materials
- Erhöhte Endonuklease-Aktivität
- Eine intakte Zellmembran im Anfangsstadium
- Bläschen“ („blebbing“) in der Zellmembran im späteren Stadium
- Abschnürung membranumgrenzter Vesikel („apoptotic bodies“), die Zellmembranbestandteile und DNA-Fragmente enthalten

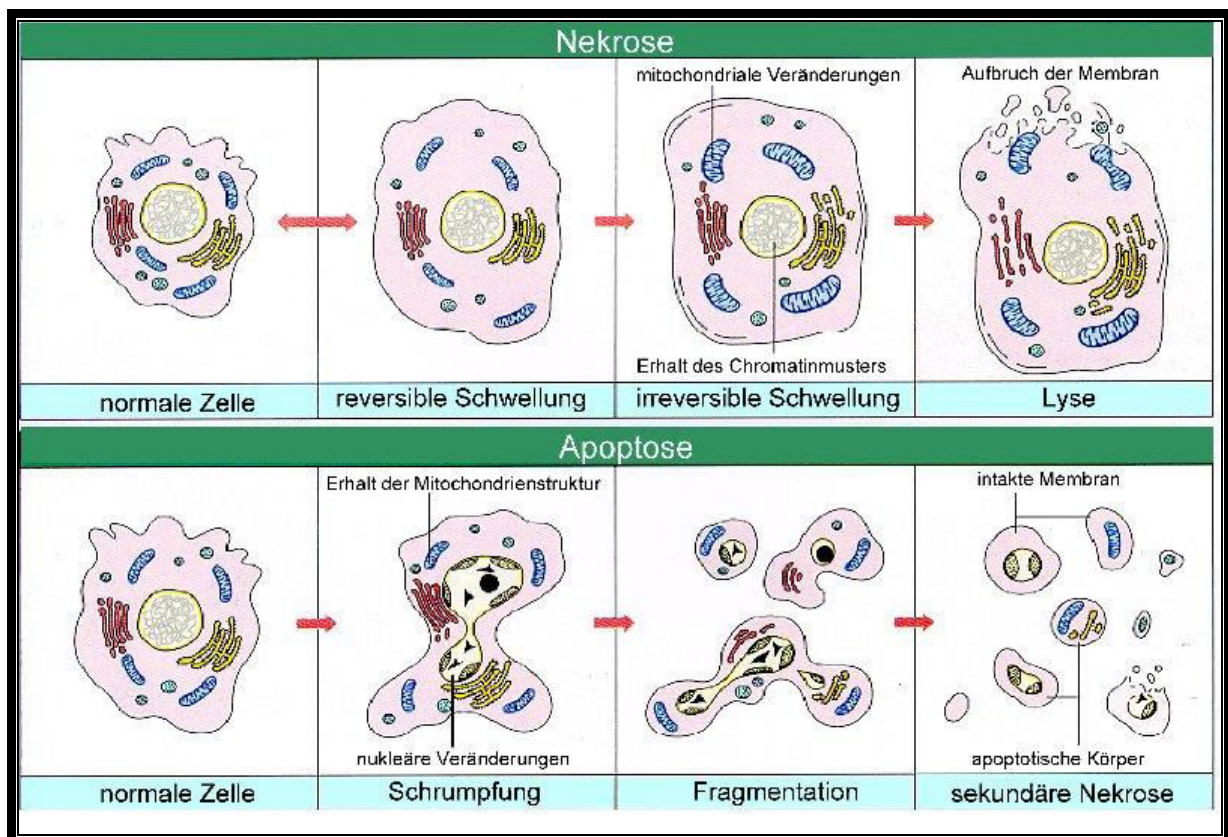


Abb. 9: Schematische Darstellung von Nekrose und Apoptose (Boehringer Mannheim Apoptosis Guide; Trauth und Keesey, 1995)

Essentiell ist die Apoptose während der Embryonalentwicklung, aber auch im adulten Organismus ist die Apoptose unerlässlich. Während der Embryonalentwicklung spielt die Apoptose eine wichtige Rolle bei der Degeneration der Interdigitalhäute, bei Lichtdurchlässigkeit der Augenlinse und bei der richtigen Verschaltung von Hirnstrukturen sowie einzelner Nervenzellen ^[42]. Im adulten Organismus ist die Apoptose wichtig bei Selektion und Abbau unnötiger oder potentiell schädlicher Zellen des Immunsystems, bei Eliminierung entarteter Zellen und bei der Selektion von Keimzellen.

Der Vorgang der Apoptose lässt sich in Initiations- und Effektorphase unterteilen.

a) Initiationsphase

Bei der Initiationsphase unterscheidet man den extrinsischen von dem intrinsischen Weg.

I) Extrinsischer Weg

Eingeleitet wird der extrinsische Weg durch Ligandenbindung an einem Rezeptor der Tumor Nekrose Faktor (TNF)-Rezeptorfamilie (z. B. TNF- α - oder Fas-Rezeptor (CD95)). Diese Rezeptoren besitzen in ihrem zytoplasmatischen Teil eine Todesdomäne (*death domain*, DD). Durch die Bindung des Liganden am Rezeptor wird die Trimerisierung des Rezeptors induziert. Dabei kommt es an den Todesdomänen zu einer Konformationsänderung, an die nun das Adaptermolekül TRADD (*TNF-R1 associated death domain protein*) mit eigener Todesdomäne durch homotypische Interaktionen binden kann. Anschließend bindet an die DD des TRADD das Protein FADD (*Fas-associated protein with death domain*), welches neben der DD auch eine Todeseffektordomäne (*death effector domain*, DED) besitzt. Hierüber kann sich die Procaspase-8 mit ihrer DED an diesen Komplex binden und autokatalytisch aktivieren. Dadurch wird die sogenannte Caspase-Kaskade durch die aktive Caspase-8 in Gang gesetzt ^{[43][44]}.

II) Intrinsischer Weg

Bei DNA-Schädigungen wird das Tumorsuppressor- und das Zellzyklus-Kontrollprotein p53 aktiviert, welches die Zellteilung unterdrücken und die Apoptose induzieren kann ^[45]. p53 stimuliert die Expression proapoptotisch wirkender Mitglieder der Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*)-Familie wie z. B. Bax (*Bcl-2-associated X protein*), die dann zur Freisetzung proapoptotischer

Faktoren wie Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum führt ^[46]. Durch die Bindung von Cytochrom c und dATP an Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) wird eine Konformationsänderung des Proteins verursacht, wodurch die Proteinbindedomäne CARD (*caspase-associated recruitment domain*) von Apaf-1 zugänglich wird, so dass nun sich an die CARD von Apaf-1 die Procaspase-9 binden kann. Die Bildung dieses Heterodimers ist eine Voraussetzung für die autolytische Aktivierung der Caspase-9 ^[47]. Dieser Komplex wird Apoptosom genannt und stellt die aktive Form der Caspase-9 dar. Analog zu Caspase-8 initiiert aktive Caspase-9 die Caspase-Kaskade.

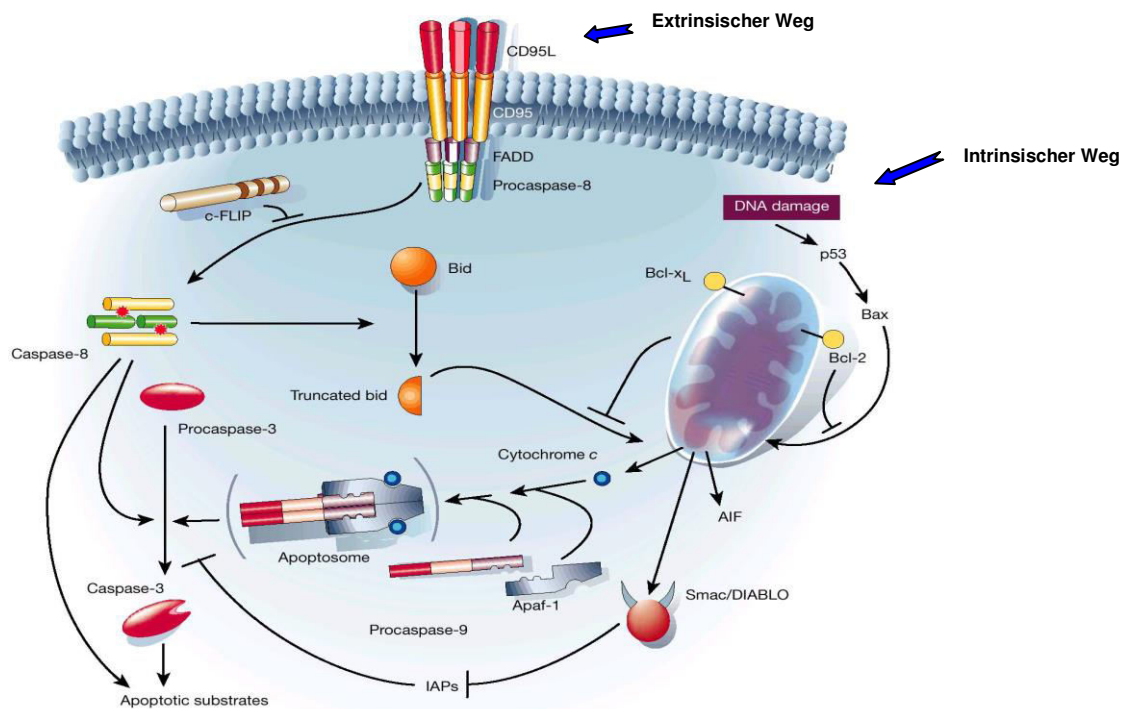


Abb. 10: Regulation der extrinsischen und intrinsischen Apoptose. Detaillierte Erläuterungen siehe Text (Hengartner, 2000, Nature 407, 770-776)

b) Effektorphase

Die Effektor-Caspasen-3, -6 und -7, die von den Initiator-Caspasen durch Spaltung aktiviert werden ^[42], führen zum apoptotischen Tod der Zelle. Caspasen sind Cystein Asparat spezifische Proteasen, die die Proteine an den Aspartatresten proteolytisch spalten. In fast jeder Zelle liegen die Caspasen als inaktive Proenzyme vor und können durch limitierte Proteolyse an den Aspartatresten aktiviert werden. Einerseits sind die Effektor-Caspasen selbst aktiv am Abbau von Lamin und Actin beteiligt und andererseits werden sekundäre Zielproteine aktiviert, die an der Regulation des Zelltodes beteiligt sind. Dazu gehören z. B. die DNasen, die die genomische DNA an den internukleosomalen gekennzeichneten Regionen

(*linker region*) spalten und dadurch Fragmente mit einer Größe von 180–185 bp produzieren^[48]. In einer Agarose-Gelelektrophorese können diese charakteristischen Längenmuster dargestellt werden, die nach der Auftrennung ein charakteristisches strickleiterähnliches Bandenmuster (*DNA-ladder*) ergeben. Eine sensitivere Methode zur Darstellung dieser DNA-Fragmente stellt die TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*)-Methode dar. Die terminale Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) ist in der Lage die an den 3' Enden der gespalteten Fragmente mit markierten Nukleotiden (dUTP) zu versehen, so dass diese in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden können^[49].

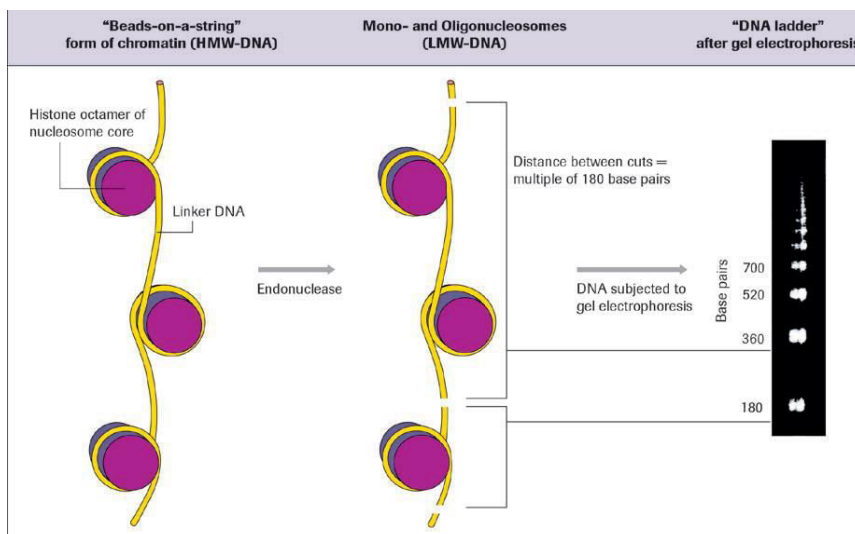


Abb. 11:

Spaltung der genomischen DNA an den internukleosomalen gekennzeichneten Regionen (*linker region*) und Darstellung der charakteristischen Fragmente in einer Agarose-Gelelektrophorese (Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation, 4th edition 2008, Roche, Seite 54)

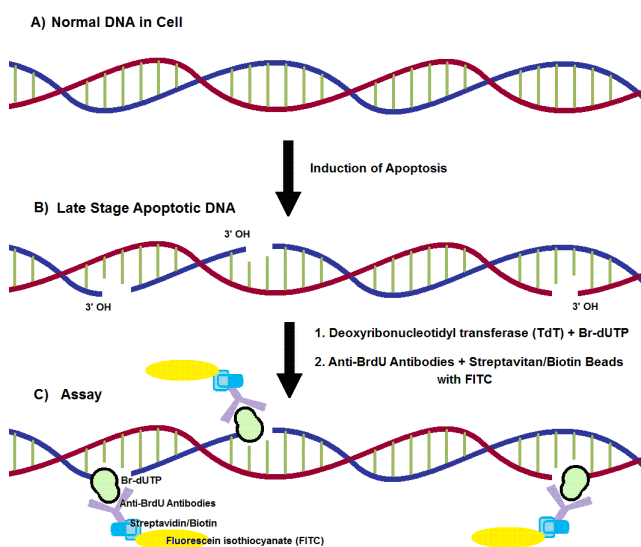


Abb. 12: Die TUNEL-Methode

- (A) Normale DNA in einer Zelle
- (B) Charakteristische DNA-Fragmentierung an den 3' Enden der apoptotischen Zelle
- (C) Die terminale Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) knüpft an den 3' Enden der gespalteten Fragmente markierte Nukleotide (dUTP), so dass diese in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden können

(http://www.cisreg.ca/medg421/wiki/index.php/TUNEL_Assay)

Des Weiteren werden auch DNA-Reparaturenzyme wie PARP (Poly(ADP-ribose)polymerase) während der Apoptose durch Caspasen gespalten und verlieren damit die Fähigkeit, sich an die DNA zu binden und zu reparieren. Letztlich schnürt sich die Zelle nach und nach in kleinen Vesikeln ab, die wiederum durch Phagozyten aufgenommen werden. Die Zellmembran bleibt im Gegensatz zur Nekrose hierbei intakt (Abb. 9).

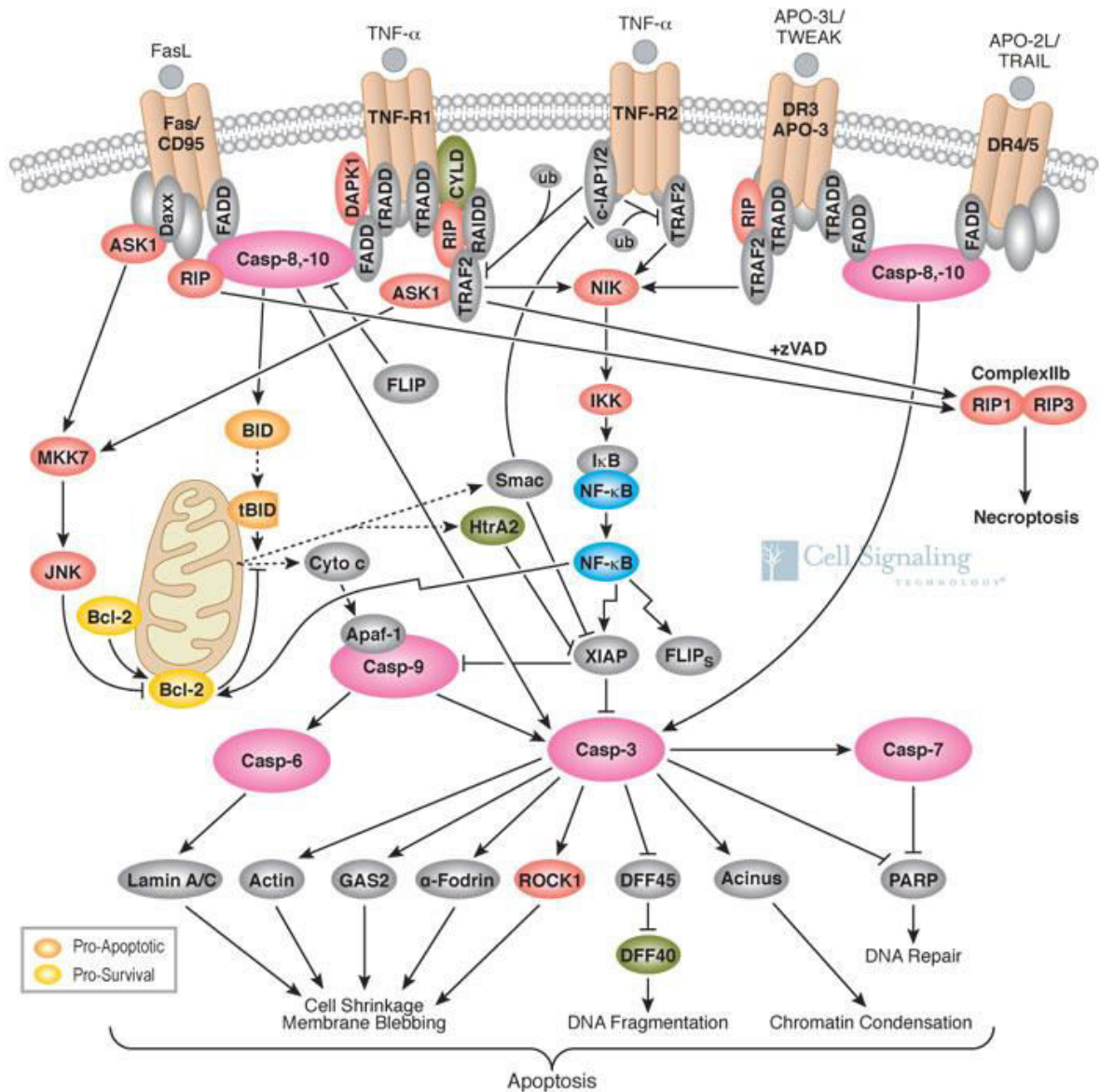


Abb. 13: Regulation der Effektorphase der Apoptose. Detaillierte Erläuterungen siehe Text (http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Death_Receptor.html#reviews)

1.3 Stickstoffmonoxid (NO)

Das Radikal Stickstoffmonoxid (NO) wird enzymatisch durch die sogenannten Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) oder durch den Zerfall von Nitrit und nitrosierten Proteinen gebildet. In Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und NADPH katalysieren die Enzyme NOS die Oxidation von L-Arginin zu NO und L-Citrullin ^[50].

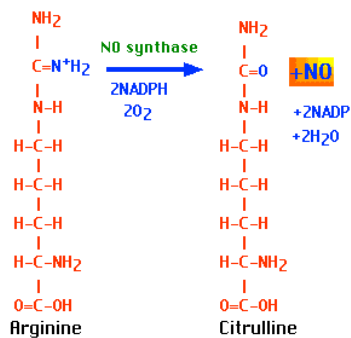


Abb. 14: Reaktionsgleichung der NO-Synthasen
(<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/Biology/Pages/N/NO.html>)

Zellkulturuntersuchungen ergaben, dass es bisher nur drei NOS-Isoformen gibt, von denen die endotheliale NOS (eNOS) ^[51] sowie die neuronale NOS (nNOS) ^[52] konstitutiv exprimiert werden. Diese beiden Enzyme synthetisieren NO nur in niedrigen Konzentrationen (pM). Die dritte NOS-Isoform, die induzierbar ist (iNOS), kann hohe Konzentrationen von NO (µM) über einen Zeitraum von wenigen Stunden bis hin zu mehreren Tagen synthetisieren ^[53]. Einer von den Induktoren der iNOS ist z. B. das proinflammatorische Zytokin TNF-α ^[54].

Das Radikal Stickstoffmonoxid (NO) zeichnet sich durch seine vielfältigen Funktionen in verschiedenen Geweben und Zellen aus. Es ist ein anorganisches Gas, welches bis zu 2 mM gut in Wasser löslich ist. In biologischen Systemen kommt es daher in gelöster Form vor, da die Konzentration im µM-Bereich liegt. In ungeladener Form kann NO als lipophiles Molekül frei durch Zellen diffundieren, wobei auch die Zellmembran keine Barriere darstellt. NO besitzt eine sehr kurze Halbwertszeit von mehreren Sekunden und reagiert hauptsächlich mit ungepaarten Elektronen wie mit Metallionen oder molekularem Sauerstoff. Zwei Moleküle NO können aber auch unter aeroben Bedingungen mit einem Molekül Sauerstoff zu den Oxidationsprodukten Nitrit (salpetrige Säure, HNO₂) und Nitrat (Salpetersäure, HNO₃) reagieren. Diese Reaktion läuft über so genannte Reaktive-Stickstoff-Spezies (RNS) ab, wie z. B. NO₂[•] (Stickstoffdioxidradikal) und ONOO⁻ (Peroxinitrit), die reaktiver als NO selber und ebenfalls Signalmoleküle sind.

NO übt seine vielfältigen biologischen Effekte sowohl direkt als auch indirekt über Reaktive-Stickstoff-Spezies (RNS) aus ^[55]. Dabei laufen die direkten Effekte, die relativ schnell sind, bei geringen NO-Konzentrationen ab. Beispiele hierfür sind zum einen die Aktivierung der

löslichen Guanylatcyclase (sGC) ^[56] und zum anderen die reversible Hemmung der Cytochrom c-Oxidase der mitochondrialen Atmungskette ^[57].

Die indirekten Effekte werden von RNS vermittelt, die vermehrt bei hohen Konzentrationen von NO entstehen. Es konnte gezeigt werden, dass die Desaminierung der N-nitrosierten DNA-Basen durch RNS, wie Peroxinitrit, zu Strangbrüchen und DNA-Mutationen und somit zu einer erhöhten p53 Expression führt ^[58]. Zudem sind die RNS auch an der unselektiven und irreversiblen Hemmung der verschiedenen mitochondrialen Komponenten beteiligt ^[59]. Des Weiteren induziert RNS die Permeabilisierung der mitochondrialen Membran (*mitochondrial permeability transition*, MPT), was unter anderem zur Freisetzung von Cytochrom c und zum Verlust der ATP-Produktion führt und somit in apoptotischem oder nekrotischem Zelltod endet ^[60].

Außerdem konnte gezeigt werden, dass NO in hohen Konzentrationen in den neuronalen Progenitorzellen (*neural progenitor cells*, NPC) zu einer Aktivierung von p38 MAP-Kinase führt. Die Aktivierung von p38 MAP-Kinase führt wiederum zur Freisetzung von Cytochrom c, was dann in einer Apoptose über den intrinsischen Weg endet ^[61].

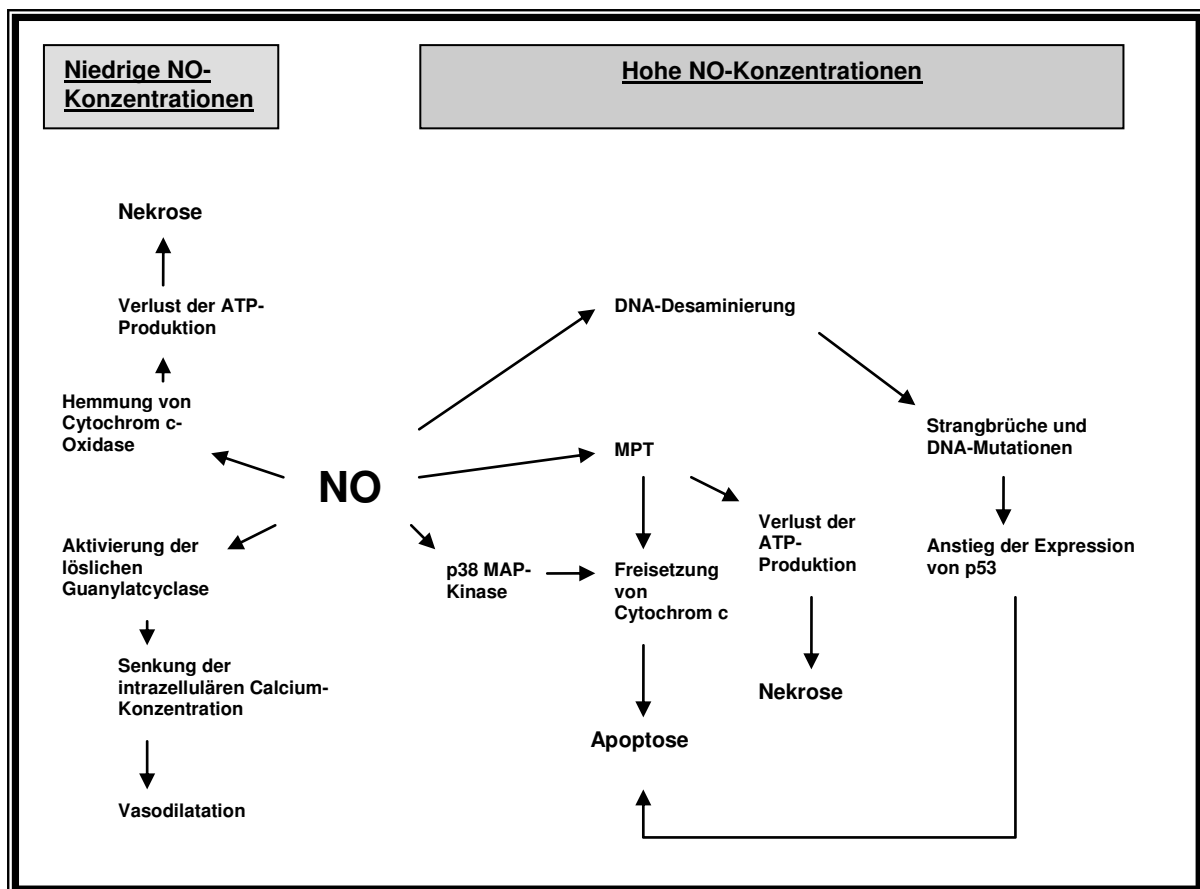


Abb. 15: Unterschiedliche Wirkmechanismen von NO bei niedrigen und hohen Konzentrationen (detaillierte Information siehe Text)

1.4 Die Signaltransduktion der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK)

Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) gehören zu der Familie der Serin/Threonin-Kinasen. Sie werden durch diverse Stimuli aktiviert und regulieren verschiedene zelluläre Prozesse wie Genexpression, Zellproliferation und -stoffwechsel, Migration, Differenzierung oder Apoptose. Die klassischen MAPKs sind die Extrazellulär-Signal regulierten Kinasen (ERKs) 1 und 2 sowie die cJun-NH₂-terminalen Kinasen (JNKs) 1, 2 und 3 wie auch p38 mit seinen Isoformen α , β , γ und δ ^[62]. Allen gemeinsam ist die Aktivierung durch Phosphorylierung an einem Threonin- und Tyrosinrest. Eine Vielzahl von Stimuli ist als Aktivatoren bekannt. Während ERK1 und ERK2 bevorzugt durch mitogene Stimuli und Wachstumsfaktoren aktiviert werden, reagieren die JNKs und p38 hauptsächlich auf zellulären Stress wie osmotischer Schock, UV-Strahlung oder entzündliche Zytokine ^[63].

Jede der MAPK-Kaskade ist aus einem Baustein von drei aufeinander folgenden Proteinkinasen aufgebaut: die MAPK, die MAPK-Kinase (MAPKK oder MKK) und die MKK-Kinase (MAPKKK oder MKKK). Die letzteren sind Serin/Threonin-Kinasen und werden durch Phosphorylierung oder Interaktion mit einem kleinen GTP-bindenden Protein der Ras/Rho Superfamilie aktiviert ^[64] ^[65]. Die aktivierten MKKKs aktivieren ihrerseits durch Phosphorylierung die dualspezifischen MKKs, welche daraufhin MAPKs phosphorylieren und somit aktivieren. Für eine Konformationsänderung und damit Aktivierung der MAPKs ist eine zweifache Phosphorylierung durch eine MKK notwendig, welche die Substratbindung und die enzymatische Aktivität erhöht. Die aktivierten MAPK, die ihre Substrate an Serin- und Threonin-Resten phosphorylieren, können sowohl in den Zellkern migrieren als auch im Zytosol ihr Signal weiterleiten. Hierdurch üben sie ihre vielfältigen Funktionen durch Phosphorylierung von Substraten aus, zu denen Phospholipasen, Transkriptionsfaktoren, Zytoskelettproteine oder andere Proteinkinasen zählen. Es konnte auch gezeigt werden, dass MAPK die Aktivierung und Expression von dualspezifischen Phosphatasen (DUSP) induzieren, welche die MAPK durch Dephosphorylierung inaktivieren können ^[66]. Die Intensität und Dauer der Aktivierung von MAPK-Kaskade können somit über diesen negativen Rückkopplungsmechanismus kontrolliert werden. Unter dem Aspekt, dass die MAPKs ihre Substrate untereinander auch teilen können, kann es somit zur Verschaltung ihrer Signalwege kommen ^[67].

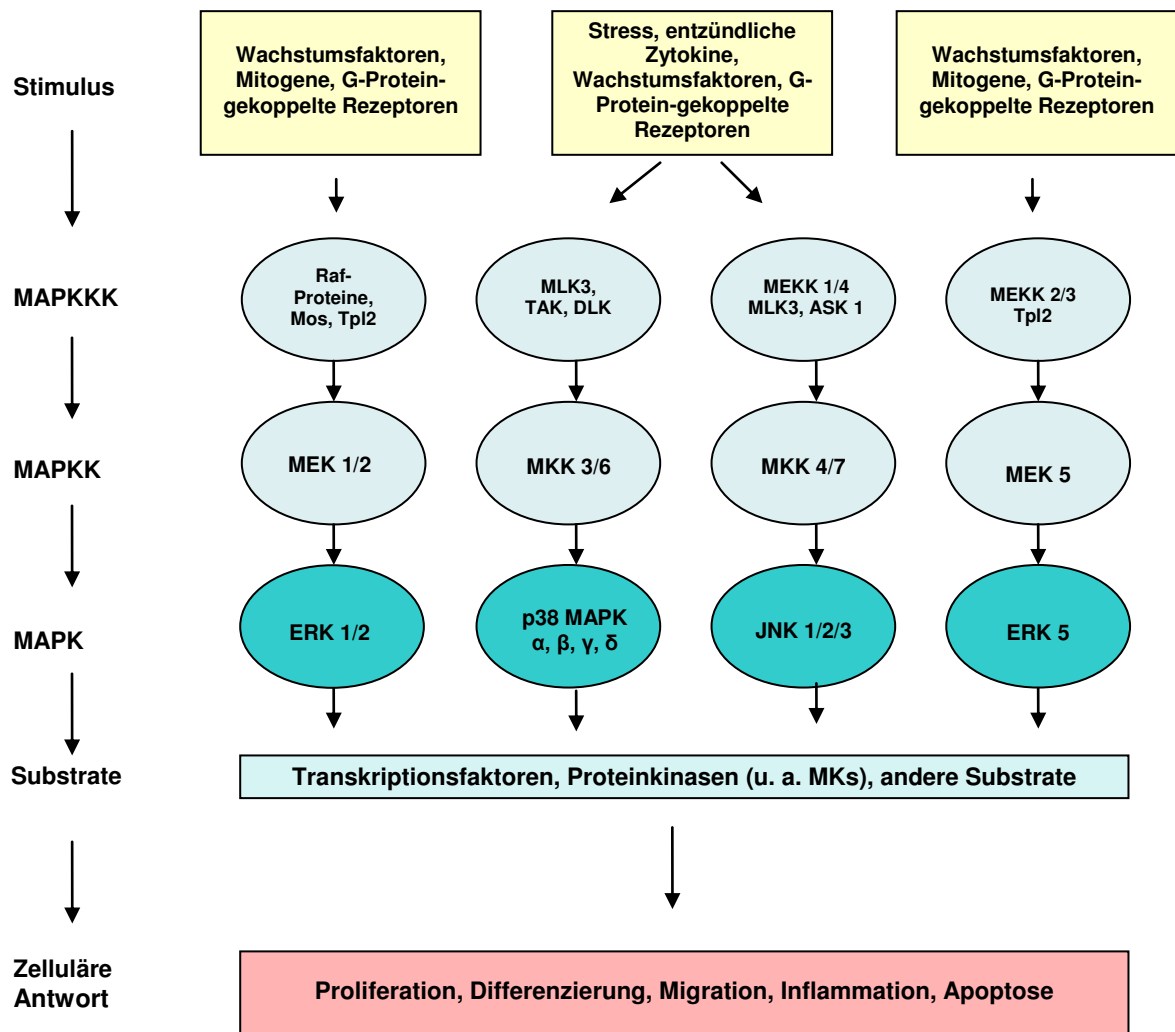


Abb. 16: Überblick über die Signalkaskaden der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs). Detaillierte Erläuterungen siehe Text. (modifiziert nach Cell Signaling Technology, MAPK_Cascades.esp - created January 2002 - revised January 2007)

1.4.1 Der p38 MAPK-Signalweg

Zu der Familie der p38 MAPK gehören die vier Isoformen p38α/MAPK14, p38β/MAPK11, p38γ/MAPK12 und p38δ/MAPK13, die alle durch zellulären Stress aktiviert werden. Während p38γ vermehrt in Muskelgewebe und p38δ hauptsächlich in Lunge und Niere vorhanden ist, kommen p38α und p38β ubiquitär in allen Geweben vor ^{[68] [69]}. Die Substrate von p38 MAPK befinden sich sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus. Zu den im Zytoplasma befindlichen Substraten von p38 MAPK zählen vornehmlich Enzyme, wie die cyclische Phospholipase A (cPLA) ^[70], aber auch andere Kinasen, wie die MAP kinase-interacting kinase (MNK) 1/2 ^[71] und die eukaryotische Elongationsfaktor 2 Kinase (eEF2K) ^[72].

Auch die Tau-Proteine, welche keine enzymatische Funktion haben, können Substrate von p38 sein ^[73]. Zu den im Nukleus gehörenden Substraten von p38 stellen die Transkriptionsfaktoren die größte Gruppe dar. Hierzu gehören z. B. MEF2C (*myocyte-specific enhancer factor 2C*) ^[74], p53, CHOP (*cAMP response element-binding protein homologous protein*) ^[75] oder ATF (*activating transcription factor*) 2, der ein Teil des AP (*activator protein*)-1 Transkriptionskomplexes ist ^[76]. Neben Transkriptionsfaktoren kann p38 auch im Nukleus befindliche Kinasen aktivieren wie die mitogen- und stressaktivierten Proteinkinase (MSK) 1 und 2 ^[77] oder die Mitogen-aktivierten Proteinkinase-aktivierten Proteinkinasen (MAPKAPK oder MK) 2 und 3 ^{[78] [79]}.

Da auch jede dieser Kinasen ihrerseits eigene Substrate besitzt, ist somit p38 indirekt an weiteren zellulären Prozessen beteiligt.

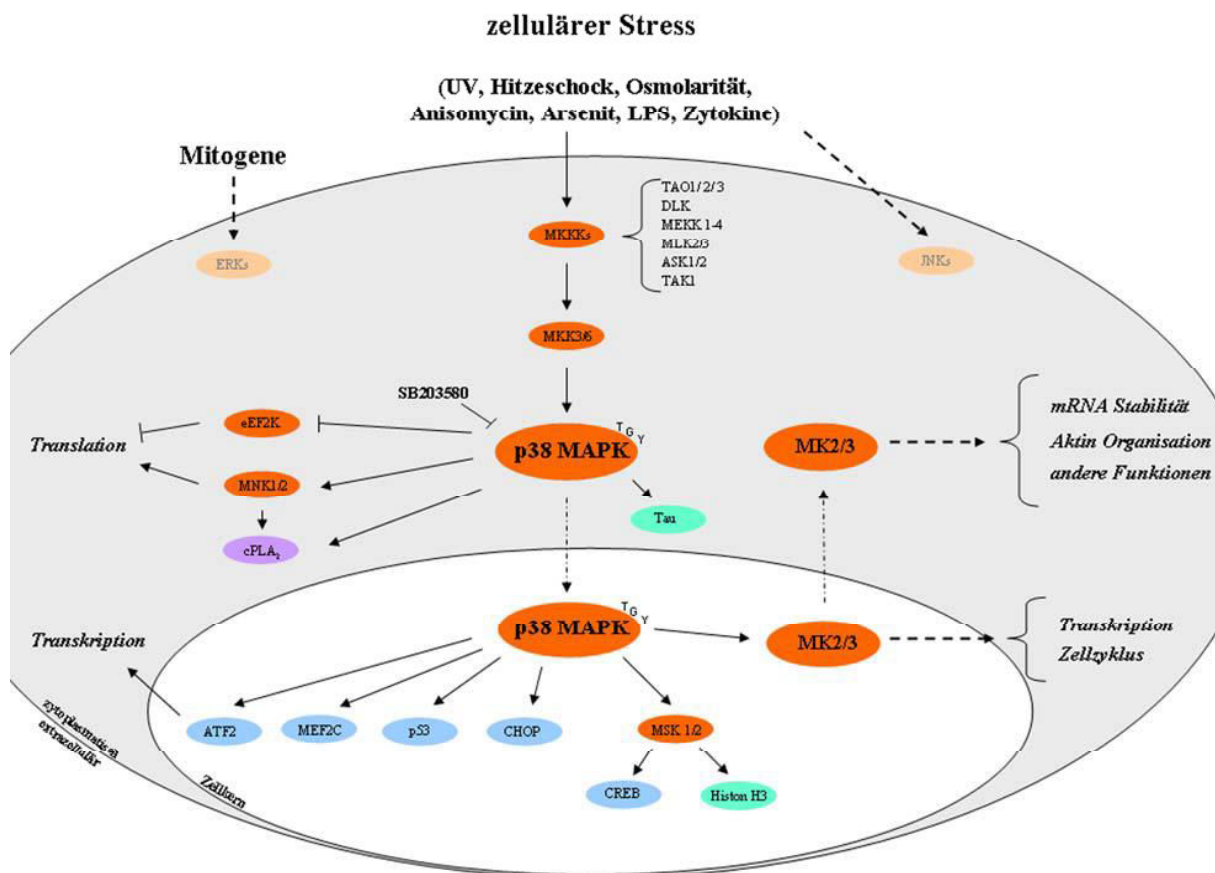


Abb. 17: Übersicht des p38 MAPK-Signalweges. Zellulärer Stress, wie bakterielle Endotoxine (Lipopolysaccharide), Hitzeschock, UV-Strahlung oder inflammatorische Zytokine, führt über eine Aktivierung von MKKKs und den für den p38-Signalweg spezifischen MKK3/6 zur doppelten Phosphorylierung und damit Aktivierung von p38 MAPK. Nach Aktivierung kann p38 MAPK sowohl zytoplasmatische Substrate als auch nach Einwanderung in den Zellkern nukleäre Substrate phosphorylieren. (Dissertation: T. Thomas, 2009, Funktion der MAPKAP-Kinase 2 bei der Neurodegeneration und neuronalen Depolarisation, Seite 6)

1.4.2 Der ERK MAPK-Signalweg

Die Aktivierung der membranständigen Rezeptoren durch die Liganden, wie Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, führt zur Rezeptorendimerisierung mit anschließender Trans- und Autophosphorylierung ^[80] ^[81]. So entstehen Anheftungsstellen für Signaltransduktionsproteine und Adaptoren wie GRB2 (*growth-factor-receptor-bound-protein 2*). Durch die Bindung von GRB2 an dem Rezeptor kommt es indirekt zu einer Translokation von Ras Guaninnukleotid austauschfaktor SOS (*son of sevenless*), das mit GRB2 assoziiert ist, an die Plasmamembran ^[82], wo es transient für eine GTP-Beladung von Ras und damit für seine Aktivität sorgt ^[81] ^[83]. Aktiviert fungiert Ras als Adaptor, der die Serin/Threonin-Kinase Raf mit hoher Affinität bindet ^[84] ^[85] und zu einer Aktivierung von Raf führt. Bekannt sind bisher drei Isoformen von Raf (A-Raf, B-Raf und C-Raf) ^[86]. Alle Isoformen von Raf phosphorylieren und aktivieren anschließend die dualspezifischen MAPK-Kinasen MEK1/2 (*MAPK/ERK kinase*) ^[87] ^[88], die wiederum durch duple Phosphorylierung die ERK1/2 aktivieren. Die aktivierten ERK1/2 migrieren in den Zellkern und beginnen mit der DNA-Transkription, welche zu Zellwachstum, Zellproliferation und Differenzierung führen kann.

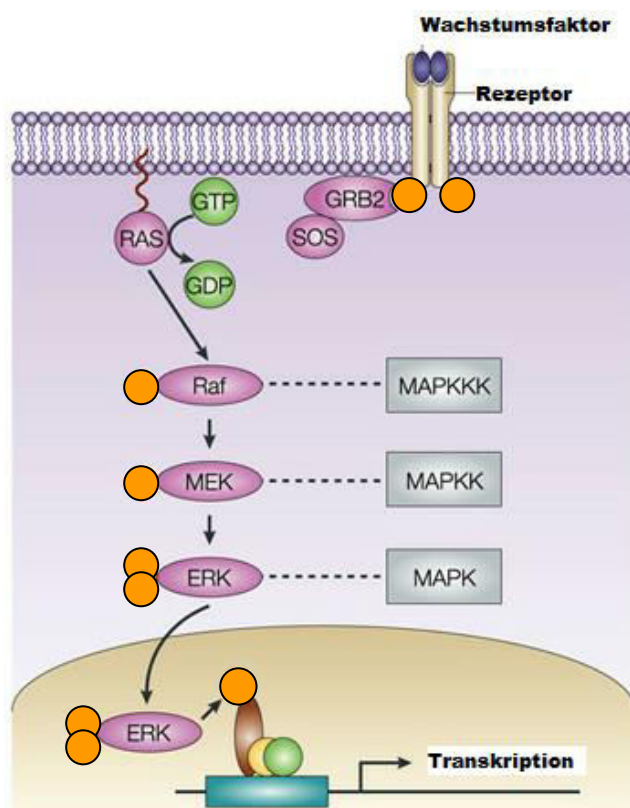


Abb. 18: Übersicht des ERK-Signalweges. Nähere Erläuterungen siehe Text (modifiziert nach Nature Reviews, Molecular Cell Biology)

1.5 Die Ziele der Arbeit

Multiple Sklerose ist die häufigste chronisch verlaufende Erkrankung des Zentralnervensystems, der sowohl entzündliche als auch demyelinisierende Pathomechanismen zugrunde liegen. Verantwortlich für diese Zerstörung sind zelluläre und humorale Faktoren sowie die Freisetzung von NO.

Ziele dieser Arbeit waren

1. die Charakterisierung NO-induzierter Apoptose bei den neuronalen Vorläuferzellen (C17.2) und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OLN93),
2. die Charakterisierung NO-induzierter Apoptose bei obigen Zellen nach Behandlung mit älteren Basistherapeutika und
3. die Untersuchung einer möglichen NO-induzierten Apoptose durch Behandlung von Patientenseren.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien und Kultivierung

Die im Folgenden verwendeten Zelllinien wurden alle bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im CO₂ Inkubator (Sanyo) kultiviert und bei Bedarf unter sterilen Bedingungen in der Zellkulturbank (ClassII Type A/B3, Integra Biosciences), meist zweimal die Woche, gesplittet. Folgende Zellkulturmedien wurden verwendet:

C17.2- und OLN93-Zellkulturmedium

DMEM *high glucose* mit GlutaMAX I + Na-Pyruvat
+ 10% FBS (*fetal bovine serum*, HyClone)
+ 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)

SH-SY5Y- und Raji-Zellkulturmedium

RPML mit GlutaMAX I + Na-Pyruvat
+ 10% FBS
+ 1% Penicillin/Streptomycin

2.1.1.1 C17.2

Die murine neurale Stammzelllinie C17.2 wurde ursprünglich aus dem externen Stratum granulosum des Kleinhirns vier Tage alter Mäuse isoliert und mit dem c-myc Onkogen durch retrovirale Transfektion immortalisiert ^{[89] [90]}. Des Weiteren wurden die Stammzellen mit dem lacZ-Gen transfiziert, das für das gramnegative Bakterium *Escherichia coli* β -Galactosidase kodiert, um eine bessere Identifizierung zu ermöglichen. Obwohl die C17.2 Zellen in vitro immortalisiert sind, zeigen diese Zellen einen Proliferationsstopp bei Zell-Zell-Kontakt. Sie sind nicht tumorigen und antworten auf differenzierende Reize.

2.1.1.2 OLN93

Die permanente Zelllinie OLN93 wurde aus spontan transformierten Zellen aus primären Rattengehirn abgeleitet ^[91]. In dem für OLN93 bestimmten Wachstumsmedium haben diese Zellen eine Verdoppelungszeit von 16-18 Stunden. In ihrer antigenen Eigenschaften ähneln

die OLN93 Zellen den primären Oligodendrozyten in Kultur ^[92]. Unter anderem exprimieren diese Zellen Galactocerebrosid und Myelin-spezifische Proteine wie basisches Myelinprotein (MBP), Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG), Proteolipidprotein (PLP) und Wolfgram Protein (WP), stellen aber nicht die astrozytären Eigenschaften, wie die Expression von Vimentin oder sauren Gliafaserproteinen (GFAP), dar. In ihren morphologischen Merkmalen gleichen sie den bipolaren Oligodendrozyten-2A-Vorläuferzellen. Bei niedriger Dichte oder auf Poly-L-Lysin-beschichtete Kulturschalen unter niedrigen Serumbedingungen zeigen diese Zellen eine vermehrt verzweigte Zellmorphologie. Vergleiche mit zerebralen Zellen von embryonalen Ratten in Kultur und primären Oligodendrozyten zeigten, dass OLN93 Zellen in ihrer Morphologie und Antigenität 5 bis 10 Tage alten (postnatale Zeit) kultivierten Rattenhirn-Oligodendrozyten ähneln.

2.1.1.3 SH-SY5Y

Die Zelllinie SH-SY5Y ist eine humane Neuroblastom-Zelllinie, die ursprünglich dreimal aus SK-N-SH geklont wurde. Erste Berichte hierüber wurden zum ersten Mal im Jahre 1978 veröffentlicht ^[93]. Ein Neuroblasten-ähnlicher Subklon von SK-N-SH, benannt SH-SY, wurde zuerst als SH-SY5 und dann als SH-SY5Y subkloniert. Das Klonen ist im Wesentlichen eine künstliche Selektion mit Ausbau von einzelnen oder einer kleinen Gruppe von Zellen, die einen bestimmten Phänotyp von Interesse exprimieren. Diese Zelllinie ist genetisch weiblich (zwei X-Chromosomen, aber kein Y), da die ursprüngliche Linie durch eine Knochenmarkbiopsie von einem 4 Jahre alten Mädchen mit metastasiertem Neuroblastom gewonnen wurde.

2.1.1.4 Raji (B-Zelle des humanen Burkitt-Lymphoms)

Die Etablierung der Raji-Zelllinie wurde erstmals 1964 publiziert ^[94]. Sie wurde aus einem Burkitt-Lymphom eines 11-jährigen nigerianischen Jungen angelegt. Durch elektronenmikroskopische Analyse konnten keine Viruspartikel identifiziert werden. Die molekularbiologische Analyse ergab, dass in der Raji-Zelllinie latente Epstein-Barr-Virus (EBV)-Genome vorliegen, welche zwei Deletionen an unterschiedlichen Stellen im Genom enthalten. Eine dieser Deletionen betrifft ein für die lytische Replikation essentielles Gen. Selbst eine Behandlung mit Phorbol-12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA), die bei anderen Zelllinien, die latentes EBV enthalten, die Abgabe infektiöser EBV bewirkt, führt bei der Raji-Zelllinie weder zu einer Erhöhung der Replikationsrate der EBV-DNA noch zur Herstellung infektiöser EBV ^[95]. Die Raji-Zelllinie entspricht somit einer etablierten

menschlichen B-Zelllinie, die Teile eines viralen Genoms enthält und keine infektiösen Viruspartikel abgibt.

2.1.2 Passage von C17.2, OLN93, SH-SY5Y und Raji Zellen

Eine Passagierung der Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von 90-100%. Die adhärenenten Zellen wie C17.2, OLN93 und SH-SY5Y mussten zur Kultivierung mit einer Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Kulturf flasche gelöst werden. Hierzu wurden 3 ml der Trypsin/EDTA-Lösung nach Abnahme des verbrauchten Nährmediums und Waschen mit kaltem PBS auf die adhärenenten Zellen gegeben und bei 37 °C im Brutschrank für ca. 1-2 min inkubiert. Trypsin vermag durch Spaltung der Adhäsionsproteine zwischen den Zellen und zwischen Zellen und Flaschenwand die Zellen von ihrer Adhärenz zu lösen. Ethylendiamintetraacetat (EDTA) hindert durch Bildung von Chelatkomplexen mit dem zweiwertigen Ion Calcium die Adhäsion der Zellen. Durch Zugabe von 10 ml frischem Medium sowie leichtes Hin- und Herschwenken wurden die Zellen von der Kulturf laschenoberfläche gelöst und in eine 15 ml Zentrifugenröhrchen (Thermo Scientific) überführt. Nach Zentrifugation bei 1.200 rpm für 2 min wurden die pelletierten Zellen in 1 ml frischem Nährmedium aufgenommen und durchmischt. Hiervon wurde 50 bis 100 µl in eine mit 12 ml frischem Nährmedium gefüllte Schale überführt. Somit wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:10 bis 1:20 passagiert.

Bei den nicht adhärenenten Raji Zellen wurden die Zellen aus der Kulturschale in ebenfalls 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 1.200 rpm für 2 min zentrifugiert. Danach wurden die pelletierten Zellen auch in 1 ml frischem Nährmedium aufgenommen, durchmischt und davon anschließend 50 bis 100 µl in eine mit 12 ml frischem Nährmedium gefüllte Schale überführt.

2.1.3 Behandlung von Zellen mit Substanzen

2.1.3.1 Zelltod-Induktion mit SNP und rrTNF- α

Natrium-Nitroprussid (*sodium nitroprusside*, SNP) ist ein NO-Donor und wird häufig bei Untersuchungen zum NO-vermittelten Zelltod von Zellen eingesetzt. Zur Induktion des Zelltodes in Neuronen und Oligodendrozyten wurden die Zellen in einer 24er Multiwellplatte (Greiner) in 500 μ l des entsprechenden Mediums kultiviert und nach 24 Stunden die Substanzen SNP (Alexis) und/oder rekombinantes TNF- α der Ratte (*recombinant rat TNF- α* , rrTNF- α (CellSystems)) in den Konzentrationen 250 bzw. 500 μ M für SNP und 20, 50, 100 und 200 ng/ml für rrTNF- α gegeben. Anschließend wurde der Zelltod mittels WST-1 Assays quantifiziert.

2.1.3.2 Behandlung von Zellen mit MS-Basistherapeutika

Die Zelllinien C17.2 und OLN93 wurden mit den MS-Basistherapeutika Glatirameracetat (GA, Copaxone®) in der Konzentration 40 μ g/ml und Interferon- β 1b (IFN- β 1b, Betaferon®) in der Konzentration 100 U/ml sowohl ohne Vorinkubation, also bei gleichzeitiger Gabe von SNP und MS-Basistherapeutika, als auch mit Vorinkubation behandelt. Hierzu wurden ca. 1 Stunde vor Gabe von SNP die Zelllinien mit den MS-Basistherapeutika im Brutschrank inkubiert. Die Konzentration von SNP betrug bei der Zelllinie C17.2 250 μ M und bei der Zelllinie OLN93 500 μ M.

2.1.3.3 Behandlung von Zellen mit Patientenseren

Nach Auspelletieren der Zelllinien OLN93 und C17.2 in einer 24er Multiwellplatte in 500 μ l des entsprechenden Mediums wurde die eine Hälfte der beiden Zelllinien nach 24 Stunden mit 50 μ l des Serums der RRMS (*relapse remitting multiple sclerosis*)-Patienten und die andere Hälfte mit 50 μ l SPMS (*secondary progressive multiple sclerosis*)-Patienten behandelt.

	MS-Patienten (Gesamt) (n=24)	RRMS- Patienten (n=12)	SPMS- Patienten (n=12)	Signifikanz
Mittleres Alter (Spannweite)	47 (32 - 72)	46 (32 - 70)	47 (33 - 72)	n. s.
Geschlecht (weiblich/männlich)	(15/9)	(8/4)	(7/5)	n. s.
EDSS-Wert (Median) (Spannweite)	4 (1 - 7)	2,5 (1 - 4)	6 (4 - 7)	**p=0,005
Mittlere Dauer der Erkrankung (Spannweite in Jahren)	11,5 (4 - 24)	8 (4 - 12)	15 (6 - 24)	*p=0,024
Immuntherapie	14	7	7	n. s.
– mit Rebif®	8	4	4	
– mit Betaferon®	6	3	3	

Abb. 19: Darstellung der klinischen Merkmale der MS-Patienten

2.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Eine erfolgreiche Kryokonservierung von Zellen ist von einer möglichst langsamen Abkühlung und von der Gegenwart einer der Kristallisierung vorbeugenden Substanz, wie zum Beispiel DMSO (Dimethylsulfoxid, Roth), abhängig. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen sedimentiert, in 500 µl Kulturmedium mit auf 20% erhöhtem FBS-Gehalt und 10% DMSO-Anteil aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Nach langsamem Abkühlen auf -80 °C über Nacht mittels einer speziellen Einfrierbox (Nalgene) wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen wurden die gelagerten Zellen durch Schwenken bei 37 °C in einem Wasserbad (Mettler) revitalisiert und sofort in 10 ml frischen Zellkulturmedium gegeben. Nach Zentrifugation (Sigma) bei 1.200 rpm für 3 min und Abnahme des Überstandes wurde das im Einfriermedium enthaltene DMSO entfernt. Anschließend konnten die Zelllinien kultiviert werden (Unterpunkt 2.1.1).

2.2 Bestimmung des Zelltodes

2.2.1 Trypanblau-Färbung und Zellzählung

Die Bestimmung der Lebend-Zellzahl wurde unter anderem mit Hilfe des Trypanblau-Ausschlusstestes durchgeführt. Der Farbstoff Trypanblau (Merck) lagert sich an

zytoplasmatische Proteinstrukturen und kann nur bei defekter Plasmamembran ins Zytoplasma gelangen. Lebende Zellen mit intakter Membran werden im Gegensatz zu absterbenden oder toten Zellen nicht blau angefärbt. Ein Aliquot der zu zählenden Zellsuspension wurde nach Vorverdünnung mit dem gleichen Volumen einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung vermischt und in einer Neubauer-Zählkammer (0,0025 cm² Fläche und 0,1 mm Kammerhöhe, Brand) unter dem Mikroskop (Krüss) ausgezählt. Die Zellzahl pro ml ergibt sich aus der mittleren Anzahl der lebenden Zellen der vier Großquadrate (hier eingekreist) multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor und mit dem konstanten Faktor 10⁴ (Volumenfaktor der Zählkammer). Dabei wurden die Zellen in den 16 Kleinquadraten eines Großquadrates links oben beginnend schleifenförmig nach unten durchgezählt. Es werden dabei nur Zellen mitgezählt, die sich innerhalb des Großquadrates befanden bzw. die obere oder linke Begrenzungslinie berührten (hier als schwarze Punkte dargestellt). Die Zellen jedoch die außerhalb des Großquadrates bzw. die untere oder rechte Begrenzungslinie berührten wurden nicht mitgezählt (weiße Punkte).

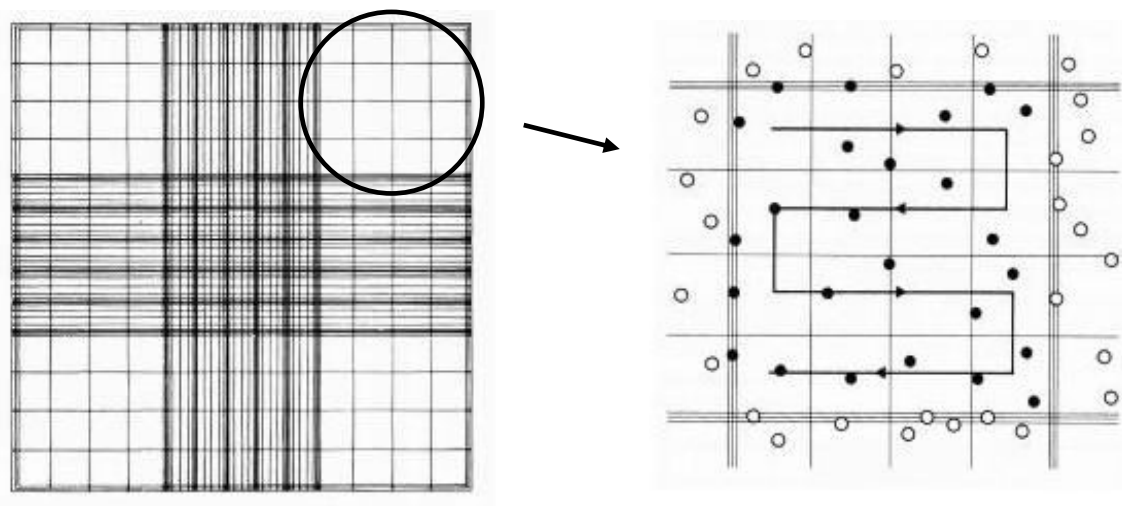


Abb. 20: Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer (Lindl, Zell- und Gewebekultur (4.Auflage), Spektrum Akademischer Verlag)

$\frac{\Sigma \text{ der Zellzahl der 4 Quadrate}}{4} \times V_f \times 10^4 = \text{mittlere Zellzahl/ml}$

V_f = Verdünnungsfaktor

Abb. 21: Zellzahlbestimmungsformel

2.2.2 WST-1 Assay (Cell Proliferation Reagent)

Der WST-1 (*water-soluble tetrazolium salt-1*) Assay (Roche) ist eine leicht rötliche Lösung, in der sich WST-1 und ein Elektron-Kopplungsreagenz, der in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung verdünnt ist, befinden. Mit dem WST-1 Assay kann die spektrophotometrische Quantifizierung der Lebendzellzahl in Zellkulturen bestimmt werden. Das Prinzip des Assays beruht auf der Umsetzung eines wasserlöslichen Tetrazolium-Salzes zum farbigen Produkt Formazan durch die mitochondrialen Dehydrogenasen. Zu den in einer 24er Multiwellplatte wachsenden Zellkulturen mit einem Volumen von 500 µl wurden 24 Stunden nach Behandlung mit verschiedenen Substanzen 50 µl WST-1 Reagenz (entspricht einem Zehntel des Kultivierungsvolumens) gegeben und die Reaktion 90 min bei 37 °C im Inkubator durchgeführt. Danach wurde nach Farbentwicklung jeweils 100 µl von jedem Well in eine 96er Multiwellplatte (Greiner) übertragen und die Absorption bei 450 nm im ELISA-Reader (Thermo Scientific) gemessen, die dann Auskunft über die Menge der stoffwechselaktiven Zellen gab.

Die Kontrollwerte für die Versuche waren wie folgt:

- Hintergrund: Kulturmedium und WST-1 Assay im Verhältnis 10:1 in der Abwesenheit von Zellen bei den gleichen Inkubationsbedingungen
- Low-Control (=unbehandelte Zellen): 100 µl des Mediums der unstimulierten Zellen und WST-1 Assay im Verhältnis 10:1 bei den gleichen Inkubationsbedingungen

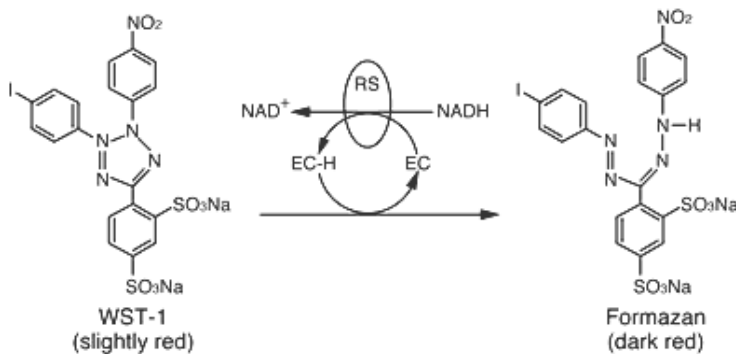


Abb. 22: Die Spaltung des Tetrazolium-Salzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) zu Formazan. (EC = electron coupling reagent, RS = mitochondrial succinate-tetrazolium-reductase system), (Roche Diagnostics, Cell Proliferation Reagent WST-1, version october 2007, Seite 3)

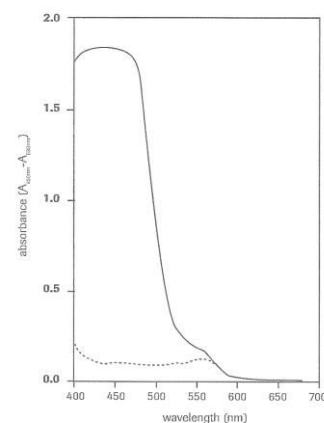


Abb. 23: Absorptionsspektren vom WST-1 Assay (....) und vom Reaktionsprodukt Formazan (---) nach der Spaltung durch mitochondriale Dehydrogenasen. Der WST-1 Assay wurde in einer Zellsuspension mit 10% FBS-haltigem Kulturmedium RPMI 1640 in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt (Roche Diagnostics, Cell Proliferation Reagent WST-1, version october 2007, Seite 3)

2.2.3 Zytotoxizitätsassay (LDH Assay)

Der Zelltod wurde durch eine weitere Methode quantifiziert. Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein stabiles zytoplasmatisches Enzym, das in allen Zellen vorkommt und die Umwandlung von Laktat zu Pyruvat bzw. den umgekehrten Weg katalysiert. Da durch die Nekrose oder die Spätaoptose die Zellmembran zerstört wird, tritt das zytoplasmatische Enzym LDH extrazellulär über und kann deshalb im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Mit dem Einsatz der Zytotoxizität Detection Kit (Roche) kann die Aktivität der LDH leicht in Kulturüberständen gemessen werden. Die Aktivität wird in einem enzymatischen Test bestimmt: Dabei werden im ersten Schritt NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert, die durch die LDH-katalysierte Umwandlung von Laktat zu Pyruvat entsteht und im zweiten Schritt H/H^+ von der Diaphorase aus NADH/H^+ an das Tetrazoliumsalz übertragen, das dann zu Formazan reduziert wird und eine Farbumwandlung erfährt (Abb. 24).

Eine Erhöhung der Menge an toten oder zerstörten Zellen führt zu einem Anstieg der LDH-Aktivität im Kulturüberstand. Dieser Anstieg der Aktivität im Überstand korreliert direkt mit der Menge an gebildetem Formazan während eines begrenzten Zeitraums (ca. 10 bis 15 min). Daher ist die Intensität des Farbumschlages in der Assay proportional zu der Anzahl der lysierten Zellen. Der gebildete Formazanfarbstoff ist wasserlöslich und zeigt ein Absorptionsmaximum bei etwa 500 nm, während das Tetrazoliumsalz keine signifikante Absorption bei diesen Wellenlängen zeigt (Abb. 25).

Bei den Versuchsreihen wurde jeweils 100 μl Überstand aus den Wells gewonnen und in eine 96er Multiwellplatte (Greiner) übertragen. Zu den Überständen wurden 100 μl der LDH-Lösung, bestehend aus zwei unterschiedlichen Lösungen A und B (Verhältnis Lösung A zu Lösung B 1:45, Inhalte der Lösung A: Diaphorase und NAD^+ und der Lösung B: Tetrazoliumsalz und Natriumlaktat), vorsichtig hinzugegeben und 15 min lang bei Dunkelheit und RT inkubiert. Danach wurde mittels ELISA-Reader die Absorption bei 500 nm ermittelt. Die Kontrollwerte für die Versuche waren wie folgt:

- Hintergrund: Nur 200 μl LDH-Lösung
- Low-Control (=spontane LDH-Freisetzung): 100 μl des Mediums der unstimulierten Zellen und 100 μl LDH-Lösung
- High-Control (=maximale LDH-Freisetzung): 100 μl des Mediums mit 1%igem Triton X-100 über 24 h behandelten Zellen und 100 μl LDH-Lösung (Diese Konzentration von Triton X-100 hat keinen Einfluss auf die LDH-Aktivität)

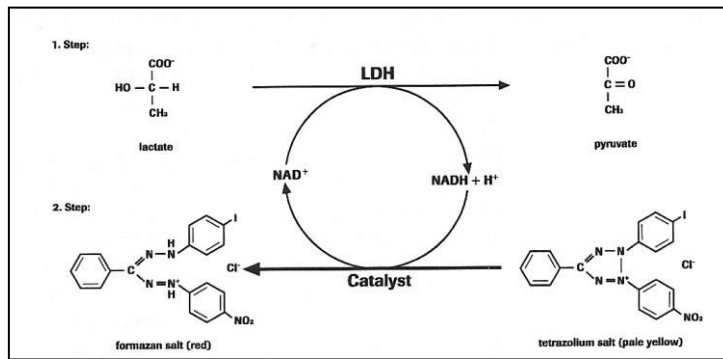


Abb. 24: In einem ersten Schritt reduziert LDH NAD^+ zu NADH/H^+ durch Oxidation von Laktat zu Pyruvat. In der zweiten enzymatischen Reaktion werden 2 H von NADH/H^+ auf das gelbe Tertazoliumsals INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolium chloride) durch das Enzym Diaphorase übertragen (Roche Diagnostics, Cytotoxicity Detection Kit, version february 2011, Seite 16)

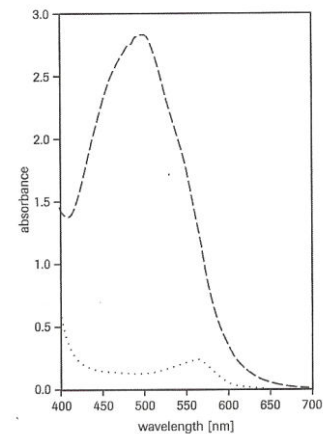


Abb. 25: Das Absorptionsspektrum des Reaktionsgemisches vom Cytotoxicity Detection Kit. Dem Gemisch wurde das Zellkulturmedium RPMI 1640 mit 1% BSA (*bovine serum albumin*) hinzugefügt und die Absorptionsspektren wurden bei Abwesenheit (.....) und Präsenz (----) von LDH gemessen (Roche Diagnostics, Cytotoxicity Detection Kit, version february 2011, Seite 16)

2.2.4 Lichtmikroskopie

Nach Auspelletieren der OLN93 und C17.2 Zellen in einer 24er Multiwellplatte in 500 μl des entsprechenden Mediums wurden die Zellen zunächst für 24 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden diese mit SNP in den Konzentrationen 250, 500 und 2.000 μM für einen Tag behandelt und anschließend auf dem Objektträger des Lichtmikroskopes (Nikon Eclipse Ti-U) gelegt und fotografiert.

Des Weiteren wurden in einer anderen Versuchsdurchführung (Unterpunkt 2.5.2) die OLN93 und C17.2 Zellen nach Antikörperbindung mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Bei dieser Mikroskopie wird der physikalische Effekt der Fluoreszenz benutzt. Dabei werden die fluoreszierenden Stoffe mit Licht einer Wellenlänge angeregt, die dann wenige Nanosekunden später Licht einer anderen Wellenlänge abstrahlen. Spezielle Filter stellen sicher, dass nur das abgestrahlte Licht beobachtet wird.

2.3 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

2.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit sterilem PBS (PBS-Puffer: pH 7,3-7,4, 1l destilliertes Wasser (dH₂O, Braun), 8,18 g NaCl, 1,77 g Dinatrium-Hydrogen-Phosphat-Dihydrat (Na₂HPO₄ · 2H₂O), 0,20 g KCl, 0,24 g Kalium-Di-Hydrogen-Phosphat (KH₂PO₄), (Invitrogen)) von der Zellkulturflasche (75 cm² Fläche, Greiner) mittels eines Zellschabers oder durch Trypsinierung (0,05%iges Trypsin, Invitrogen, verdünnt in PBS) gelöst und bei 1.200 rpm zentrifugiert. Die Extraktion der Proteine erfolgte durch Resuspendieren in Proteinlysispuffer (CellLytic M, Sigma), der Proteaseinhibitoren (*protease inhibitor cocktail complete mini EDTA-free*, Roche) sowie Phosphataseinhibitoren (*phosphatase inhibitor cocktail I und II*, Sigma) enthielt. Nach der Inkubation von 10 min auf Eis wurden die Lysate bei 4 °C für 10 min mit einer Umdrehung von 14.000 rpm (Mikro 120, Hettich) abzentrifugiert und anschließend der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Konzentrationen dieser hergestellten Proteinlösungen wurden mit Hilfe eines Bradford Assays (Roth) bestimmt.

2.3.2 Bestimmung von Proteinkonzentration nach Bradford

Proteinkonzentrationen in Lösung wurden nach der Methode von Bradford bestimmt. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Absorptionsverschiebung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue von 465 nm nach 595 nm durch Bindung an Seitengruppen von Proteinen in saurer Lösung. Der entstehende blaue Farbkomplex kann bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch mit dem Spektrophotometer (BioRad) quantifiziert werden. Dabei korreliert die Absorption des Farbstoffes direkt mit der Menge an reagierenden Seitengruppen in Proteinen.

Die Proteinlösungen wurden 1:10 bzw. 1:20 mit destilliertem Wasser (Braun) verdünnt, so dass ein Gesamtvolumen von mindestens 30 µl gegeben war. Parallel hierzu wurde jedes Mal eine Standardreihe von BSA (*bovine serum albumin*, Merck) mit den Konzentrationen 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml und 0,6 mg/ml angesetzt. Zu 1 ml Farbreagenz wurden 20 µl Probe bzw. Standard gegeben und nach Mischen für mindestens 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann die Absorption bei 595 nm bestimmt. 1 ml Farbreagenz mit 20 µl dH₂O diente als Referenz. Dank der mitgeführten Standardreihe konnte die Proteinkonzentration der gemessenen Lösung über eine Ausgleichsgerade errechnet werden.

2.3.3 Westernblot

Als Westernblot wird die Übertragung (*blotting*) von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Trägermembran bezeichnet ^[96]. Diese Methode wurde ursprünglich im Jahre 1979 im Labor von George Stark an der Universität Stanford entwickelt ^[97]. Hierbei wird eine Kopie des Gels auf der Trägermembran hergestellt, dabei werden die Proteine auf der Trägermembran immobilisiert. Diese Bindung der Proteine auf der Membran erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoff-Brücken. Letztendlich können die gesuchten Proteine durch die Bindung mit ihrem spezifischen Antikörper erkannt und durch die Reaktion einer gekoppelten Substanz an den sekundären Antikörper, der seinerseits den spezifischen Antikörper erkennt, erfasst werden. An diesem sekundären Antikörper gekoppeltes Enzym ist die Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP), die die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form katalysiert, bei der dann eine Lumineszenz detektiert werden kann. Diese Lumineszenz wird dann im Dunkeln auf einen Röntgenfilm übertragen.

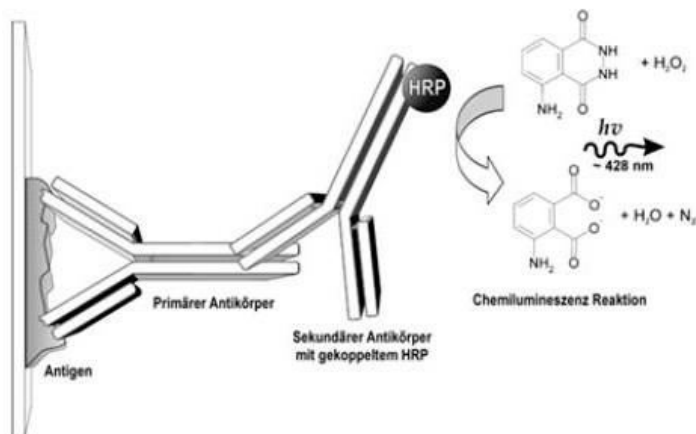


Abb. 26: Der Primärantikörper bindet an sein Antigen, welches auf einer Trägermembran fixiert ist. An diesen wiederum bindet der Sekundärantikörper, der mit HRP gekoppelt ist. HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid, dessen Chemilumineszenz dann detektiert werden kann (http://de.wikipedia.org/wiki/Western_Blot)

2.3.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Als Elektrophorese wird die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld bezeichnet. Dabei erfolgt die elektrophoretische Auftrennung der Proteine mittels eindimensionaler SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese in einem diskontinuierlichen System unter denaturierenden Bedingungen. Hierzu wurde ein vertikales Gelsystem (BioRad) benutzt. Die Gele hatten eine Schichtdicke von 1,5 mm. Die Zusammensetzung des 5%igen Sammelgels und der verwendeten 10%igen Trenngele können aus der Abbildung 27 entnommen werden. Nach der Fertigstellung der Gele wurden gleiche Mengen an Gesamtprotein mit 4 x SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 96 °C in einem

Thermoschüttler (Peglap) gekocht. Nach kurzer Zentrifugation wurden die so behandelten Proteinlösungen auf das SDS-Gel aufgetragen und bei 90 V in SDS-Laufpuffer gesammelt. Nach Übergang in das Trenngel wurde die Spannung auf 110 V erhöht und die Proteine solange getrennt bis die Lauffront das untere Ende des Trenngels erreichte. Bei jedem Gellauf wurde ein vorgefärbter Proteinmarker zur Bestimmung des Molekulargewichtes der nachgewiesenen Proteine mitlaufen gelassen.

Zutat	Volumen	Zutat	Volumen
Sammelgel (5%)		Trenngel (10%)	
dH ₂ O	1,05 ml	dH ₂ O	2 ml
30% Acryl-Bisacrylamid Mix (Roth)	0,25 ml	30% Acryl-Bisacrylamid Mix	1,65 ml
0,5 M Tris-Puffer (pH 6,8, Bio-Rad)	0,165 ml	1,5 M Tris-Puffer (pH 8,8)	1,25 ml
10% SDS (Roth)	0,015 ml	10% SDS	0,05 ml
TEMED (Roth)	0,0015 ml	TEMED	0,002 ml
10% Ammoniumpersulfat (Roth)	0,015 ml	10% Ammoniumpersulfat	0,05 ml
SDS-Laufpuffer			
Tris-HCl	250 mM		
Glycin	192 mM		
SDS	1 %		

Abb. 27: Zusammensetzung der verwendeten Sammel- und Trenngele bei der SDS-Gelelektrophorese

2.3.3.2 Proteintransfer und Immundetektion

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im sogenannten Semidry-Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Hierzu wurden zwei Whatman-Filterpapiere (GE Healthcare) und das Proteingel im Kathodenpuffer sowie drei weitere Whatman-Filterpapiere und die Nitrozellulose-Membran im Anodenpuffer äquilibriert. Anschließend wurde ein Blotsandwich in folgender Reihenfolge luftblasenfrei auf der Blotapparatur (Sigma) zusammengestellt: 3 x Whatmanfilter, Nitrozellulose, SDS-Gel, 2 x Whatmanfilter. Die Proteine wurden bei einer Stromstärke von etwa 45 mA pro Blot (0,8 mA/cm²) bei maximal 20 V für 90 min auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Zur Immundetektion wurde die Nitrozellulose-Membran nach kurzem Waschen mit PBS zur Absättigung der unbesetzten Proteinbindungsstellen mit Blocklösung (10%iges Milchpulver in PBS, Roth) für 60 min bei

Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden die primären Antikörper hinzugegeben und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Zum Nachweis des gebundenen Primärantikörpers (Anti-Phospho-p38 MAPK (Anti-pp38 MAPK, Cell Signaling Technology), Anti-p38 MAPK (Cell Signaling Technology) und Anti-Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (Anti-GAPDH, Millipore)) folgte am nächsten Tag nach dreimaligem Waschen mit PBST für je 5 min eine Inkubation für 60 min bei RT mit HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper (Donkey Anti-Mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology) bei Anti-GAPDH und Goat Anti-Rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology) bei Anti-pp38 MAPK und Anti-p38 MAPK) in Blocklösung. Anschließend wurde die Trägermembran wiederum dreimal gewaschen und mit einem Gemisch aus je 1 ml Luminol- und Wasserstoffperoxid-Lösung (Thermo Scientific) benetzt. Durch die ECL (*enhanced chemiluminescent*)-Verfahren können die Antikörperkomplexe auf einem Röntgenfilm (Agfa) sichtbar gemacht werden. Je nach Intensität der Chemilumineszenz unterschied sich die Inkubationszeit von 1 bis zu 5 min.

Zutat	Finale Konz.	Zutat	Finale Konz.
Anodenpuffer		Kathodenpuffer	
Tris-HCl, pH 10.4 (Roth)	300 mM	Tris-HCl, pH 9.4	25 mM
Methanol (J. T. Baker)	20%	ε-Aminocapronsäure	40 mM
		Methanol	20%
PBST			
Tween 20 (Merck) in PBS	0,1%		

Abb. 28: Zusammensetzung des Anoden- und Kathodenpuffers beim Westernblot

2.4 Durchflusszytometrie

Eine gängige Methode zur statistischen Analyse von Zellen in Suspension auf der Grundlage der Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften ist die Durchflusszytometrie ^[98]. In dieser vorliegenden Arbeit wurde ein FACS (*fluorescence-activated cell sorting*)-Gerät (Becton Dickinson) verwendet, das einzelne Zellen analysieren und aufgrund derer unterschiedlichen Eigenschaften sortieren kann. Dabei passiert jede Zelle separat beim Fluss durch eine dünne Messkammer einen Laserstrahl, wobei sie einen Teil des Lichtes streuen. Das gestreute Licht wird dank eines Detektors gemessen und zur Auswertung auf einen Computer übertragen. Neben den wichtigen Informationen wie der Morphologie (Größe und Granularität) von Zellen, können in der Durchflusszytometrie auch Fluoreszenzfarbstoffe gemessen werden. Damit können durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion mit fluoreszenzmarkiertem Antikörper sowohl Oberflächenmoleküle aber auch intrazelluläre Proteine der Zellen quantitativ erfasst werden. Die bei der Durchflusszytometrie verwendeten

Fluoreszenzfarbstoffe lassen sich zwar bei der gemeinsamen Wellenlänge anregen, verfügen aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff charakteristische Emissionsspektren, wodurch sie dann getrennt erfasst werden können. In dieser wissenschaftlichen Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zum Nachweis von Antikörper in den Seren der RRMS- und SPMS-Patienten, die sich an extrazelluläre Antigene der verwendeten Zelllinien binden, verwendet.

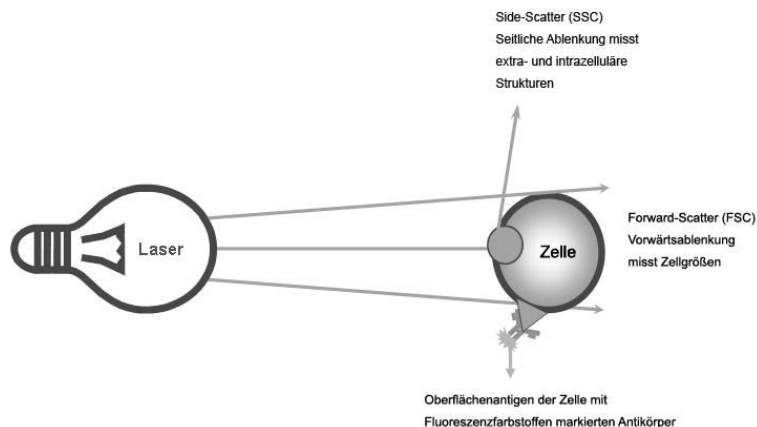


Abb. 29: Schematische Darstellung des Durchflusszytometers (http://www.blutspendedienstwest.de/ueber_uns/zentren_einrichtungen/stammzelle/informationen_fuer_kliniken_aerzte/durchflusszytometrie.php)

2.4.1 Nachweis extrazellulärer Antikörperbindung

In einer 96er Multiwellplatte mit rundem Boden wurden nach der Zellernte die Zellen auf die gewünschte Anzahl von Wells verteilt und dann die Multiwellplatte für 5 min bei 4 °C mit einer Umdrehung von 1.200 rpm in eine dazu geeignete Zentrifuge (Hettich) gelegt. Danach wurde der Überstand durch leichtes Abklopfen entfernt und die Zellen durch das vorsichtige Mischen mit dem Vortexer (Scientific Industries) vom Boden gelöst. Im Anschluss hiernach wurde in jedes Well mit Zellen 50 µl FACS-Puffer und 1 µl Serum der jeweiligen RRMS- und SPMS-Patienten gegeben und bei 4 °C 30 min lang inkubiert. Nach der Inkubation wurde erneut in jedes Well 50 µl FACS-Puffer gegeben, 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert, der Überstand durch leichtes Abklopfen entfernt und die Zellen durch vorsichtiges Vortexen vom Boden gelöst. Jetzt erhielten die Zellen einen Waschschriff, indem 100 µl FACS-Puffer pro Well gegeben und auf die gleiche Art wie oben beschrieben ein weiteres mal zentrifugiert, der Überstand abgekippt und die Zellen vom Boden gelöst wurden. Danach wurden die Zellen mit einem gegen die humanen Antikörper gerichteten Antikörper (Polyclonal Rabbit Anti-Human-IgG FITC (Fluoresceinisothiocyant), Dako), gelöst in 50 µl FACS-Puffer im

Verhältnis von 1:75 behandelt und erneut 30 min lang bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Anti-Human-IgG FITC erhielten die Zellen zwei weitere Waschschrte mit 100 µl FACS-Puffer und in Anschluss daran wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer gut resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt, in die bereits 100 ml FACS-Puffer vorgelegt worden ist. Diese FACS-Röhrchen wurden dann zur Messung benutzt.

2.5 Immunzytochemie

2.5.1 Hoechst-Färbung

Bei dem Farbstoff Hoechst 33342 (2-[4-ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperaziny]-2,5-bi-1H-benzimidazol trihydrochlorid trihydrat) handelt es sich um bis-Benzimide und um einen zellpermeablen DNA-Farbstoff, der durch UV-Licht angeregt wird und blaue Fluoreszenz bei 460-490 nm emittiert. Hoechst 33342 bindet bevorzugt an Adenin/Thymin-Regionen (AT-Regionen) der DNA. Dieser Farbstoff bindet sich in die kleinen Furchen und zeigt deutliche Fluoreszenz-Emissionsspektren, die abhängig vom Farbstoff zu Basenpaar Verhältnis ist. Hoechst 33342 wird für die Färbung der Kerne von lebenden oder fixierten Zellen und Geweben verwendet. Um die Zellen mit dem Hoechst-Farbstoff anzufärben, wurden die Zellen zuerst mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA, Merck) für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Dann wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 5 µl/ml Hoechstfarbstoff, gelöst in PBS, für ca. 15 bis 30 min angefärbt. Anschließend wurden die Zellen jeweils zweimal erst mit PBS, dann mit destilliertem Wasser gewaschen.

2.5.2 Visuelle Darstellung der Antikörperbindung an den Zellen

Zur visuellen Darstellung der Antikörperbindung an den Zelllinien C17.2 und OLN93, kultiviert in 24er Multiwellplatten, wurden diese zunächst einmal mit PBS gewaschen und dann mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA) für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurde PFA abpipetiert und die Zellen wurden diesmal zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei Raumtemperatur mit der Blocklösung (5%ige BSA-Lösung, Merck) gelöst in PBS inkubiert. So wurden die unspezifischen Bindungsstellen an den Zellen blockiert. Danach wurden die Zellen für 60 min bei 4 °C mit den Seren der RRMS- und der SPMS-Patienten verdünnt in einem Verhältnis von 1:50 in Blocklösung inkubiert. Die ungebundenen Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen diesmal mit fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper Anti-Human-IgG FITC, gelöst in PBS, für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation

erfolgte ein erneutes zweimaliges Waschen mit PBS. Schließlich wurden die so behandelten Zellen an dem fluoreszenzfähigen Lichtmikroskop (Nikon Eclipse Ti-U) analysiert. Alle die hier erwähnten Waschschrte wurden für je 3 min bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.6 Nitrit Assay

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein molekularer Vermittler von vielen physiologischen Prozessen. Im Zellkulturmedium entsteht aus NO schnell das stabile Produkt Nitrit (NO_2), welches dann spectrophotometrisch mit der Griess-Reaktion, einer etablierten Methode für die Analyse von Nitrit und Nitrat in flüssigen Medien, bestimmt werden kann ^{[99] [100]}. Das Prinzip des Assays wird in der unten stehenden Abbildung gezeigt. Die Sulfanilsäure erfährt eine Umwandlung zu einem Diazoniumsalz bei der Reaktion mit Nitrit in saurer Essigsäurelösung. Das Diazoniumsalz wird dann seinerseits bei Anwesenheit von 2-Naphtylamin zur Bildung eines Azofarbstoffes (rötlich) angeregt, der letztendlich spectrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 548 nm durch einen ELISA-Reader quantifiziert werden kann. Die Nachweisgrenze für diese Methode liegt bei 1,0 μM Nitrit und je nach Nitrit-Konzentration kann die rötliche Färbung mehr oder weniger intensiv sein. Da die Reaktion dieser Methode sehr empfindlich ist, zerstören größere Mengen an Nitrit den Azofarbstoff zu braunen Produkten.

In der Versuchsreihe wurde dem Kulturmedium 100 μl entnommen, in eine Kristallkuvette (Hellma) überführt und mit 100 μl Griess-Reagenz (H_2O ($\leq 75\%$), Essigsäure (30%), Sulfanilsäure ($>0,5\%$), 2-Naphtylamin ($>0,15\%$), Sigma) gemischt. Anschließend wurde das Gemisch (Kulturmedium und Griess-Reagenz) für 10 min bei RT inkubiert und dann die Absorption bei 540 nm an einem ELISA-Reader bestimmt. Hierbei erfolgte die Quantifizierung mit Hilfe einer Eichkurve mit Natriumnitrit im Konzentrationsbereich 0 bis 6.400 μM , das im dH_2O aufgenommen wurde. Außerdem wurde die Eigenabsorption des Kulturmediums vom gemessenen Wert subtrahiert.

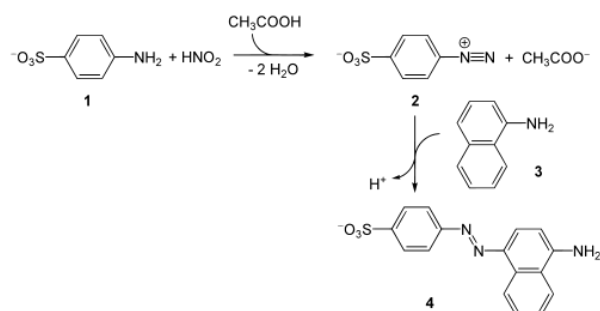


Abb. 30: Reaktionsschema des Griess-Reagenz mit Nitrit. Dabei bildet sich zuerst aus der Sulfanilsäure (1) ein Diazoniumsalz (2), das dann mit 2-Naphtylamin (3) weiter zu einem Azofarbstoff (4) reagiert. Dieser Farbstoff färbt dann die Lösung rot (<http://de.wikipedia.org>)

3. ERGEBNISSE

3.1 Untersuchungen zum NO-induzierten Zelltod

Die Multiple Sklerose ist eine entzündliche, demyelinisierende sowie degenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems. Die Mechanismen, die zu dieser Art von Schäden führen, sind nicht vollständig geklärt. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Stickstoffmonoxid (NO) bei neurologischen und degenerativen Erkrankungen wie Parkinson, Alzheimer oder Epilepsie eine wichtige Rolle spielt ^{[101] [102] [103]}. Es gibt Hinweise dafür, dass NO auf einer Seite zum Zelltod führen und auf der anderen Seite immunmodulierend wirken kann, was insbesondere im frühen Krankheitsverlauf der MS protektiv zu sein scheint ^[104].

Aus diesem Grunde sollte in dieser Arbeit an Zellkulturen das apoptotische Potential von NO auf Oligodendrozyten und Neuronen untersucht sowie überprüft werden, ob es einen eventuellen Unterschied in der Sensitivität bei diesen beiden Zellarten gibt.

Hierzu wurden sowohl die Oligodendrozyten-Vorläuferzellen OLN93 als auch die neuronale Vorläuferzellen C17.2 mit verschiedenen Konzentrationen des NO-Donors SNP (*sodium nitroprusside*) inkubiert und der Zelltod nach 24 h mikroskopisch analysiert. Dabei zeigten die C17.2 Zellen lichtmikroskopisch einen signifikant stärkeren Zelluntergang als die OLN93 Zellen (Abb. 31 a). C17.2 Zellen zeigten einen etwa 50%igen Zelltod bei einer NO-Konzentration von 250 μ M, wobei für das gleiche Ergebnis bei OLN93 Zellen mindestens eine Verdoppelung der NO-Konzentration notwendig war. Bei einer SNP-Konzentration von 500 μ M waren hingegen fast alle C17.2 Zellen tot. Um die qualitativen Ergebnisse der lichtmikroskopischen Analyse zu quantifizieren, wurde die Lebendzellzahl über einen WST-1 Assay und das Ausmaß des Zelltodes über einen LDH Assay bestimmt (Abb. 31 b). Hier konnte analog zu den Ergebnissen aus der Lichtmikroskopie eine signifikant höhere Lebendzellzahl der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen OLN93 als bei neuronalen Vorläuferzellen C17.2 festgestellt werden. So waren bei einer SNP-Konzentration von 250 μ M noch fast 75% der OLN93 Zellen am Leben, während es bei den C17.2 Zellen nur noch ungefähr 30% waren.

Übereinstimmend hierzu konnte bei den neuronalen Vorläuferzellen C17.2 eine signifikant höhere Zytotoxizität als bei den OLN93 Zellen festgestellt werden (Abb. 31 c). Da bei den unbehandelten C17.2 Zellen mehr LDH als bei den unbehandelten OLN93 Zellen freigesetzt wurde, sind die gemessenen Werte im LDH Assay der unbehandelten Zellen als Hintergrund festgelegt und von den gemessenen Werten der behandelten Zellen subtrahiert worden (Abb. 31 c 1 und 2).

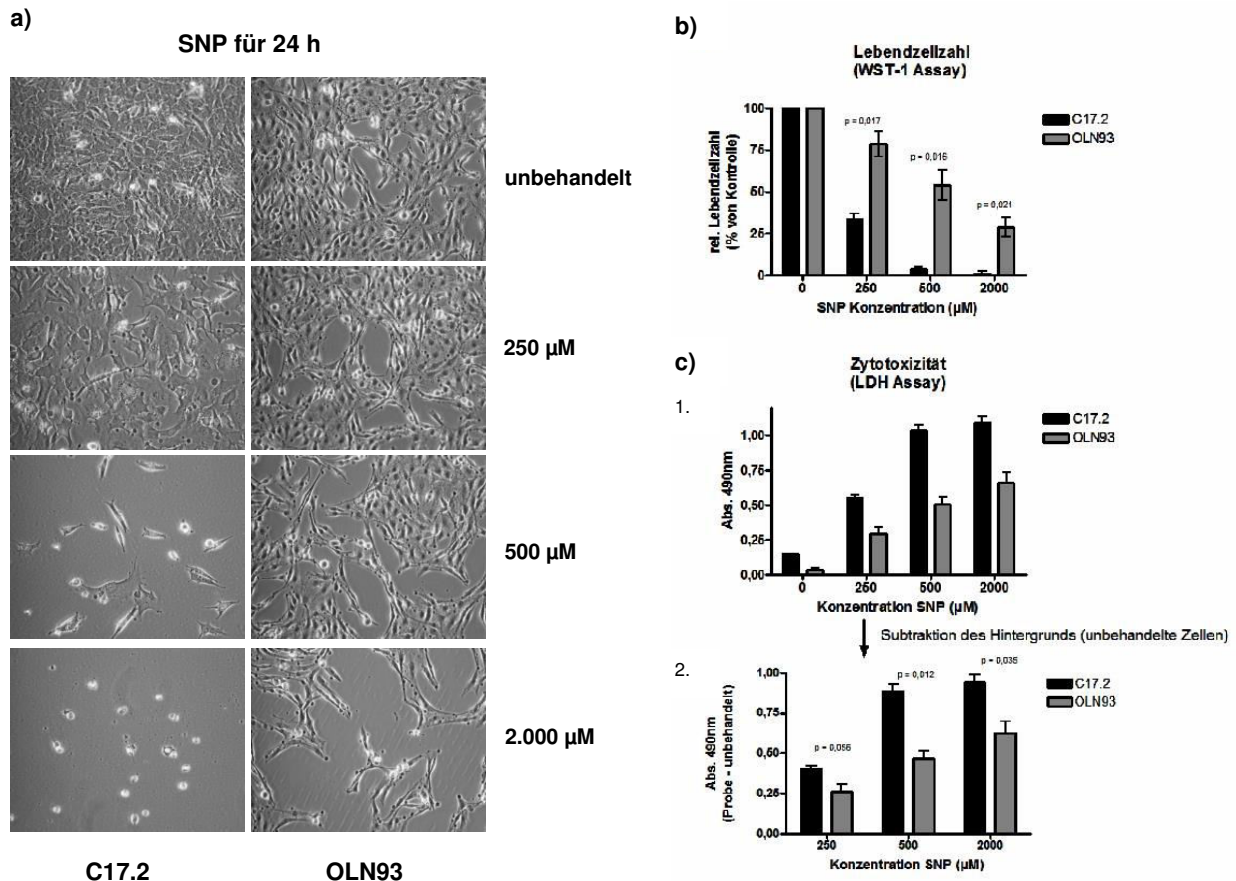


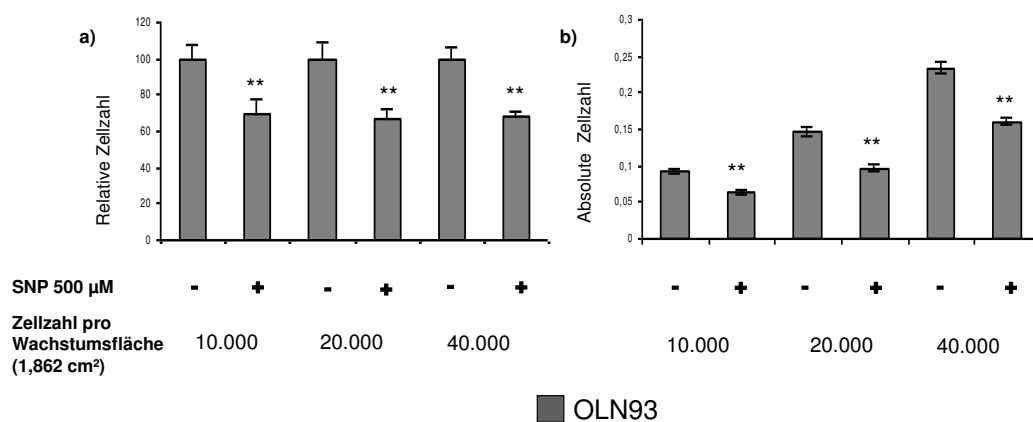
Abb. 31: a) Lichtmikroskopischer Nachweis vom NO-induzierten Zelltod der C17.2 und OLN93 Zellen mittels SNP, b) Lebendzellzahlbestimmung mittels WST-1 Assays und c) Zytotoxizitätsbestimmung mittels LDH Assays. Aufgrund der höheren Proliferationsrate der C17.2 Zellen und somit der vermehrten Freisetzung der LDH wurden die gemessenen Werte im LDH Assay der unbehandelten Zellen als Hintergrund festgelegt und von den gemessenen Werten der behandelten Zellen subtrahiert, um genauere Vergleiche erzielen zu können (c 1 und 2). In allen drei Methoden konnte eine signifikant höhere Sensitivität der neuronalen Vorläuferzellen C17.2 im Vergleich zu den Oligodendrozyten-Vorläuferzellen OLN93 gegenüber dem NO-induzierten Zelltod nachgewiesen werden. Die Quantifizierungen zeigen den Mittelwert $\pm$ SEM von einem repräsentativen Versuch von insgesamt vier unabhängigen Versuchen

3.1.1 NO-induzierter Zelltod bei unterschiedlicher Anzahl von OLN93 Zellen

Um auszuschließen, dass die unterschiedliche Proliferationsrate der beiden Zelllinien und damit eine unterschiedliche Zellzahl zu Versuchsbeginn Grund für die gefundenen Unterschiede sind, wurden exemplarisch die OLN93 Zellen mit aufsteigender Anzahl von 10.000, 20.000 und 40.000 Zellen pro Well ausplattiert. 24 Stunden später wurde der Zelltod durch 500 µM SNP induziert und nach weiteren 24 Stunden mittels WST-1 Assay die Lebendzellzahl quantifiziert. Es wurden 500 µM SNP als Konzentration gewählt, da so ein Zelltod von 50-60% zu erwarten war (Abb. 31 b). Dabei war zu beachten, dass noch genügend Raum für jede einzelne Zelle bestand, damit das Wachstum durch den Zell-Zell-Kontakt nicht inhibiert wurde.

Es stellte sich heraus, dass die absolute Zellzahl sowohl bei den unbehandelten als auch den behandelten Zellen linear anstieg (Abb.32 b). Jedoch wurde festgestellt, dass es keine Unterschiede in Bezug auf das Absterben in der relativen Zellzahl der behandelten zu den dazugehörigen unbehandelten Zellen gab, so dass das Ausmaß des Zellunterganges bei jeder Zellzahl gleich war (Abb. 32 a). Somit konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der kultivierten Zellen bei der Zelltod-Induktion keine Rolle spielte und die Ergebnisse aus den ersten Versuchen aus unterschiedlicher Sensitivität gegenüber dem NO-induzierten Zelltod resultierten.

WST-1 Assay



** p<0,01, im Vergleich zu dem jeweils unbehandelten Zellen (parametrischer t-Test)

Abb. 32: Dargestellt sind exemplarische Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchsreihen, die den NO-induzierten Zelltod mit SNP bei unterschiedlicher Anzahl von OLN93 Zellen zeigen (Mittelwert $\pm$ SEM). Die absolute Zellzahl sowohl bei den unbehandelten als auch den behandelten Zellen steigt linear an (b). Jedoch gibt es keine Unterschiede in der relativen Zellzahl der behandelten zu den dazugehörigen unbehandelten Zellen (a)

3.2 Zelltod-Induktion mit rekombinantem TNF- α der Ratte

Da nach Erkenntnissen zur Immunpathogenese der MS TNF- α eine Rolle spielt ^[15] und gezeigt werden konnte, dass durch die Bindung von TNF- α an TNF-R1 der extrinsische Weg der Apoptose durch die Aktivierung der Caspase-8 in Gang gesetzt werden kann ^{[43] [44]}, sollte untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß TNF- α bei den OLN93 und C17.2 Zellen den Zelltod induziert.

Hierbei wurden die beiden Zelllinien C17.2 und OLN93 mit verschiedenen Konzentrationen des rekombinanten TNF- α der Ratte (rrTNF- α) inkubiert und der Zelltod bzw. die Lebendzellzahl nach 24 h analysiert. Da zwischen dem TNF- α der Ratte und dem TNF- α der Maus eine Strukturhomologie von 95% besteht, konnte eine Inkubation des rekombinanten

TNF- α der Ratte mit den murinen neuronalen Zellen C17.2 wie mit den OLN93 Zellen der Ratte durchgeführt werden ^[105].

Im Vergleich zu den jeweils unbehandelten Zellen konnte keine signifikant erniedrigte Zellzahl der OLN93 und der C17.2 festgestellt werden. Somit konnte gezeigt werden, dass das rekombinante TNF- α sowohl bei den OLN93 als auch bei den C17.2 keinen Zelltod auslöst (Abb. 33).

WST-1 Assay

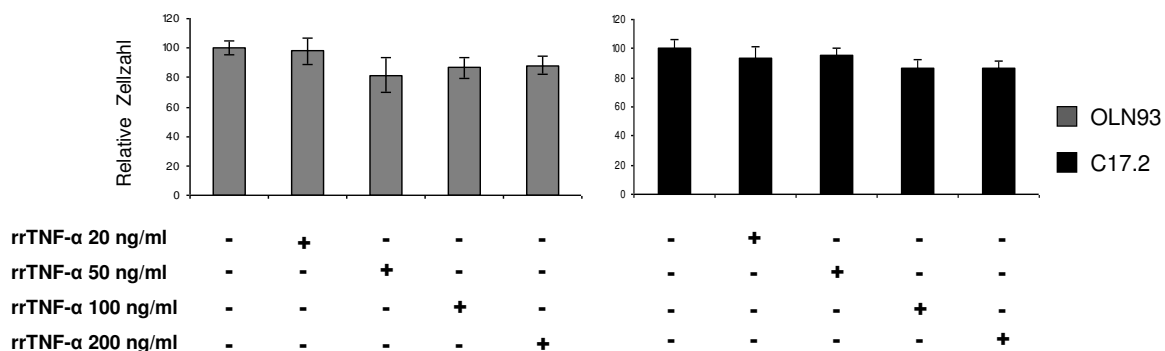


Abb. 33: Die Abbildungen zeigen den Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen. Die Induktion der OLN93 und C17.2 Zellen mit rekombinantem TNF- α der Ratte zeigte bei beiden Zelllinien keinen signifikant erhöhten Zelltod

3.3 Aktivierung des p38 MAPK-Stresssignalwegs durch NO

In der Arbeit von Cheng et al. (2001) konnte gezeigt werden, dass Stickstoffmonoxid (NO) den Zelltod von C17.2 Zellen durch die Aktivierung von p38 MAP-Kinase (p38 MAPK) induziert ^[61]. Zur Klärung der Frage, ob der NO-induzierte Zelltod der OLN93 Zellen analog zu C17.2 Zellen durch die Aktivierung von p38 MAPK erfolgt, wurden Westernblot-Experimente durchgeführt. Hierbei wurden die OLN93 Zellen mit einer Konzentration von 500 μ M SNP und die C17.2 Zellen mit 250 μ M SNP inkubiert, da bei diesen Konzentrationen ein annähernd 50%iger Zelltod in den beiden Zellreihen festgestellt wurde.

Es konnte bestätigt werden, dass der p38-Signalweg in C17.2 Zellen durch NO aktiviert wird. Dies war durch die Phosphorylierung der p38 MAPK erkennbar. Ein Aktivitätsmaximum der p38 MAPK herrschte nach 3 bis 4 Stunden nach Behandlung mit SNP (Abb. 34 Exp. I und II). Ein anderer MAPK-Signalweg, der von ERK1/2, wurde dabei nicht aktiviert. Bei den OLN93 Zellen konnte keine Phosphorylierung, somit keine Aktivität weder der p38 MAPK noch der ERK1/2 MAPK detektiert werden. Demnach löst NO in den OLN93 Zellen über einen anderen Signalweg den Zelltod aus.

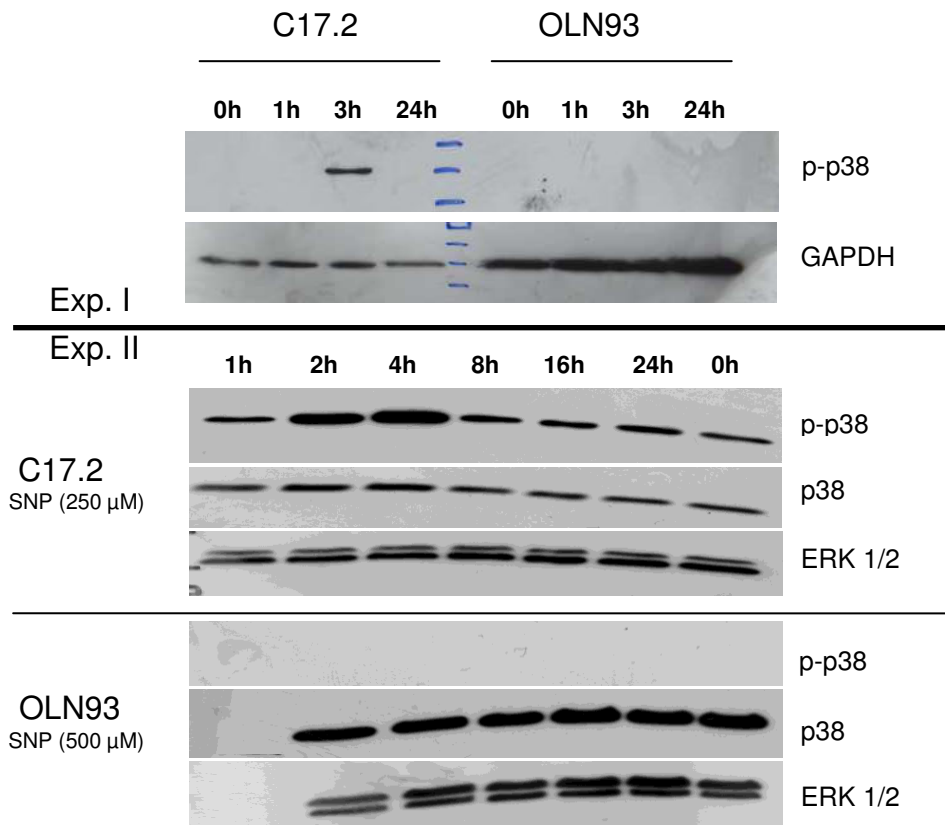


Abb. 34: Westernblot-Experimente zur Untersuchung der Aktivierung des p38-Signalwegs. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen je Versuchsreihe. In Experiment I (oben) wurden 50 µg Gesamtprotein von beiden Zelllinien auf einen Westernblot (WB) geladen, in Experiment II 100 µg pro Zelllinie auf jeweils einen eigenen WB, um die Kinetik zu erweitern. Zur Kontrolle wurde im Experiment I die konstitutiv exprimierte Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) hinzugezogen. Im Experiment II dienten die unphosphorylierten Formen von p38 und ERK 1/2 als Kontrolle. Der p38-Signalweg wird in C17.2 Zellen durch NO aktiviert, jedoch gibt es bei den OLN93 Zellen kein Anhalt für eine Aktivität von p38 MAPK

3.4 Auswirkungen der Basistherapeutika

Die bisherigen Versuche konnten zeigen, dass die neuronalen Zellen sensitiver auf NO reagieren als die Oligodendrozyten und dass hierbei in den neuronalen Zellen der p38-Signalweg involviert ist.

Die Basistherapeutika haben das Ziel, langfristig den Verlauf der Erkrankung an MS positiv zu beeinflussen. Vor allem soll das Fortschreiten der Erkrankung eingeschränkt, aber auch das Auftreten der Schübe reduziert werden. Sie sind in erster Linie Medikamente, welche die fehlgeleiteten Aktivitäten des körpereigenen Immunsystems verändern oder hemmen. Zu den Basistherapeutika gehören u. a. die Immunmodulatoren Interferon- β und Glatirameracetat. Die anschließenden Untersuchungen sollten aufklären, inwiefern eine MS-Therapie mit Basistherapeutika Einfluss auf die oben genannten Mechanismen nehmen.

3.4.1 Konzentrationsreihe Interferon (IFN)- β 1b

IFN- β führt unter anderem sowohl zu einer verminderten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und verminderten Antigenpräsentation als auch zur Verkürzung der Lebensdauer von T-Zellen ^[32].

In einer Arbeit von Cruz et al. wurden in einem EAE (*experimental autoimmune encephalomyelitis*)-Maus-Modell die EAE-Mäuse mit humanen IFN- β 1b behandelt und 48 Stunden später die akute EAE mittels Pertussistoxin induziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der EAE-Mäuse mit humanen IFN- β 1b EAE-Symptome um 33% zu reduzieren vermochte ^[106].

In Anlehnung an die Arbeit von Cruz et al. wurden die OLN93 und die C17.2 Zellen mit humanem IFN- β 1b behandelt und 24 Stunden nach Behandlung dann die Lebendzellzahl mittels WST-1 Assay bestimmt. Im Vergleich zu den jeweils unbehandelten Zellen konnte keine signifikant erniedrigte oder erhöhte Zellzahl der OLN93 und der C17.2 festgestellt werden. Es konnte somit gezeigt werden, dass IFN- β 1b keine Auswirkung auf den Zellumsatz von OLN93 und C17.2 Zellen hat (Abb. 35) und weder die Proliferationsrate beeinflusst noch einen Zelltod auslöst.

WST-1 Assay

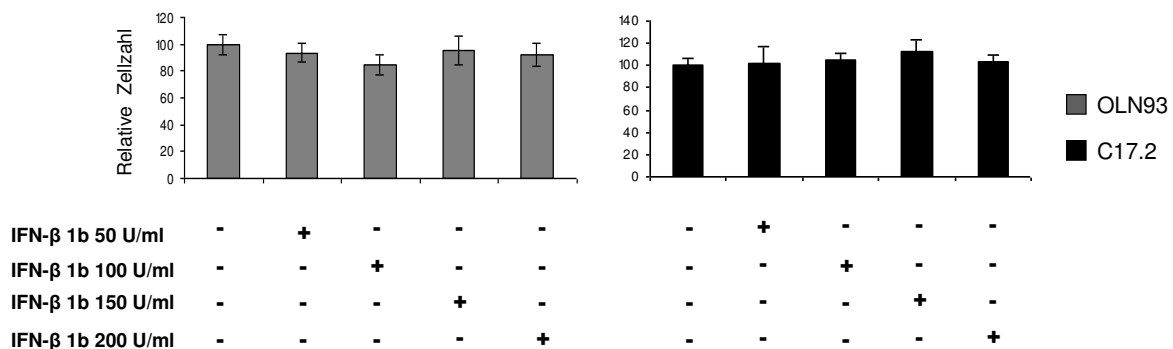


Abb. 35: In der Konzentrationsreihe des Basistherapeutikums IFN- β 1b konnte im Vergleich zu den jeweils unbehandelten Zellen keine signifikante Veränderung der Zellzahl von OLN93 und der C17.2 festgestellt werden. Die Abbildungen zeigen exemplarische Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen je Zelllinie

3.4.2 Konzentrationsreihe Glatirameracetat (GA)

Das Basistherapeutikum Glatirameracetat (GA) ist ein heterogenes Gemisch aus synthetischer Polypeptide, welches aus wenigen Aminosäuren (Glutamat, Lysin, Alanin und Tyrosin) besteht. Es hat eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem basischen Myelinprotein. Die

Immunzellen, die bei MS normalerweise die Myelinschicht angreifen würden, binden sich an dieses Polypeptid und werden somit entschärft ^[35]. Ob GA einen direkten Einfluss auf Oligodendrozyten oder neuronale Zellen hat, ist bisher unbekannt.

Um dies zu untersuchen, wurden die Zelllinien OLN93 und C17.2 mit GA in verschiedenen Konzentrationen für 24 h inkubiert und 24 Stunden nach Behandlung die Lebendzellzahl mittels WST-1 Assay bestimmt. Im Vergleich zu den jeweils unbehandelten Zellen konnte auch hier keine signifikante Veränderung der Zellzahl der OLN93 und der C17.2 festgestellt werden. Somit zeigte sich, dass auch GA keine direkte Auswirkung auf die Zellen OLN93 und C17.2 hat (Abb. 36).

WST-1 Assay

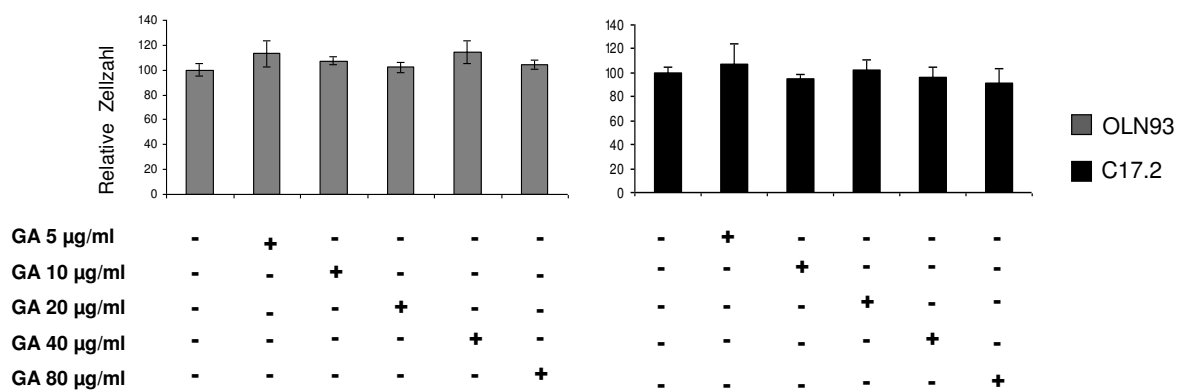


Abb. 36: Die Behandlung der OLN93 und C17.2 Zellen mit dem Basistherapeutikum GA zeigte keinen Einfluss von GA auf beiden Zelllinien. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SEM aus drei unabhängigen Versuchen

3.4.3 Auswirkungen der Basistherapeutika unter dem NO-induzierten Zelltod

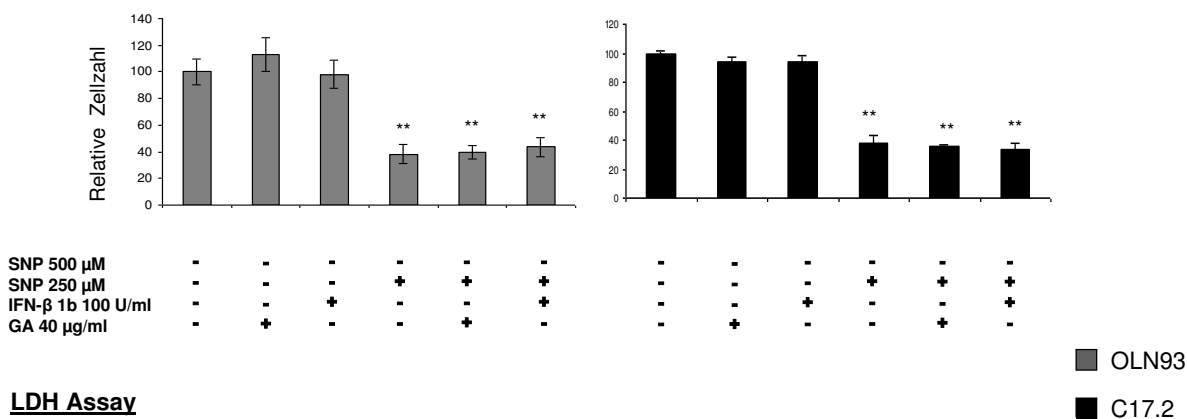
Nachdem in den Voruntersuchungen gezeigt werden konnte, dass die Basistherapeutika GA oder IFN- β 1b selbst keine Auswirkungen auf die OLN93 und C17.2 Zellen haben, sollte in der folgenden Versuchsdurchführung untersucht werden, ob die GA oder IFN- β 1b den durch NO-induzierten Zelltod beeinflussen können. Hierzu wurden die Zellen mit den Medikamenten für 1 h vorinkubiert und der Zelltod anschließend durch Gabe von SNP ausgelöst. Die Konzentrationen der Medikamente wurden für beide Zellreihen annähernd der Dosierungen wie bei der Basistherapie der MS gewählt und betrugen für IFN- β 1b etwa 100 U/ml und für GA circa 40 µg/ml. Der Zelltod wurde bei den OLN93 Zellen mit 500 µM SNP und bei den C17.2 Zellen mit 250 µM SNP induziert, um so einen Zelltod von etwa 50% zu erzeugen. Es stellte sich heraus, dass eine Behandlung mit GA oder IFN- β 1b keinen Effekt

auf den NO-induzierten Zelltod sowohl bei den OLN93 als auch bei den C17.2 Zellen hatte (Abb. 37 a).

Nachdem eine Vorinkubation der Zellen keine Auswirkung auf den NO-induzierten Zelltod zeigte, wurden die beiden Zellreihen 24 h nach SNP-Behandlung zunächst mit dem Basistherapeutikum GA behandelt und anschließend für weitere 24 h inkubiert. Doch auch hier wurde kein protektiver Effekt auf den NO-induzierten Zelltod sowohl bei den OLN93 als auch C17.2 Zellen festgestellt (Abb. 37 b). Auf eine gleiche Versuchsdurchführung mit IFN- β 1b wurde aufgrund des zu erwartenden ähnlichen Ergebnisses verzichtet.

a)

WST-1 Assay



LDH Assay

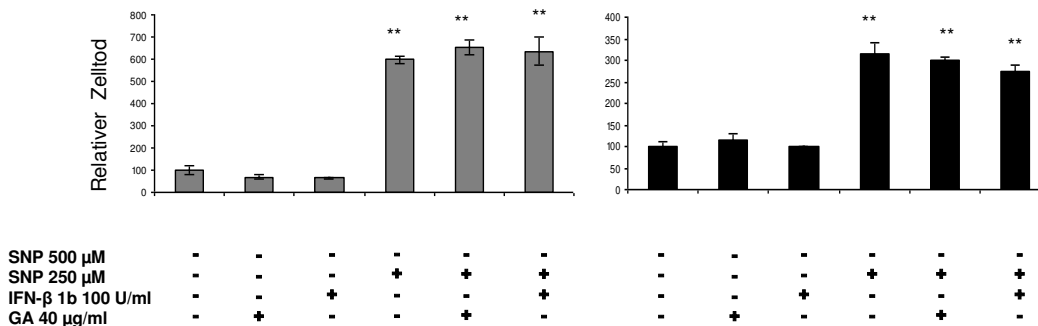
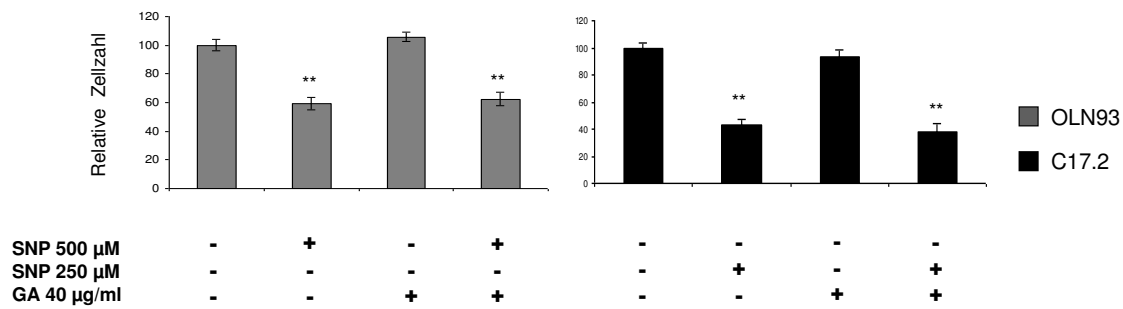


Abb. 37 a): Einfluss der Basistherapeutika auf den NO-induzierten Zelltod. Aus von drei unabhängigen Versuchen je Zelllinie wurden diese Abbildungen fertiggestellt (Mittelwert $\pm$ SEM). Es konnte gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung der OLN93 und C17.2 Zellen mit den Basistherapeutika GA und IFN- β 1b keinen schützenden Effekt auf den NO-induzierten Zelltod mit SNP hat

b)

WST-1 Assay



** p<0,01, im Vergleich zu dem jeweils unbehandelten Zellen (parametrischer t-Test)

Abb. 37 b): Auch die zeitlich spätere Behandlung der OLN93 und C17.2 Zellen mit dem Basistherapeutikum GA zeigte keine Auswirkung auf den NO-induzierten Zelltod mit SNP (Mittelwert $\pm$ SEM von drei unabhängigen Versuchen)

3.4.4 Auswirkungen von GA und rekombinantem TNF- α der Ratte bei den OLN93 Zellen

In der Untersuchung mit rekombinantem TNF- α (Unterpunkt 3.2 und Abb. 33) konnte gezeigt werden, dass dieses kein apoptotisches Potential bei den OLN93 und C17.2 Zellen aufweist. Da aber eine Synergie von Basistherapeutikum und rrTNF- α nicht ausgeschlossen werden kann, wurden exemplarisch die OLN93 Zellen mit GA in einer Konzentration von 40 μ g/ml für 1 h vorinkubiert und anschließend durch Gabe von rekombinantem TNF- α der Ratte behandelt.

Es zeigte sich, dass das rekombinate TNF- α in Anwesenheit des Basistherapeutikums GA keine synergistische Auswirkung auf die OLN93 Zellen hat (Abb. 38). Basierend auf diesem Ergebnis und der Voruntersuchungen von TNF- α auf C17.2 Zellen sowie der Wirkung von IFN- β wurde eine Versuchsdurchführung mit den C17.2 Zellen und dem Basistherapeutikum IFN- β 1b, in der Annahme ein gleiches Ergebnis zu erzielen, verzichtet.

WST-1 Assay

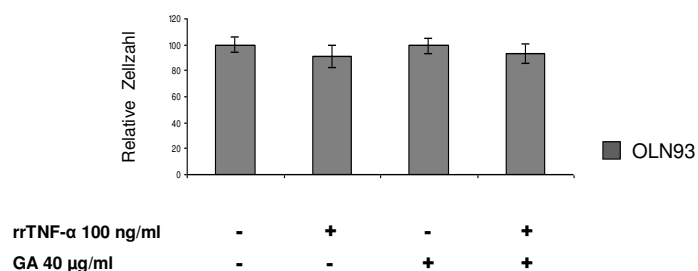


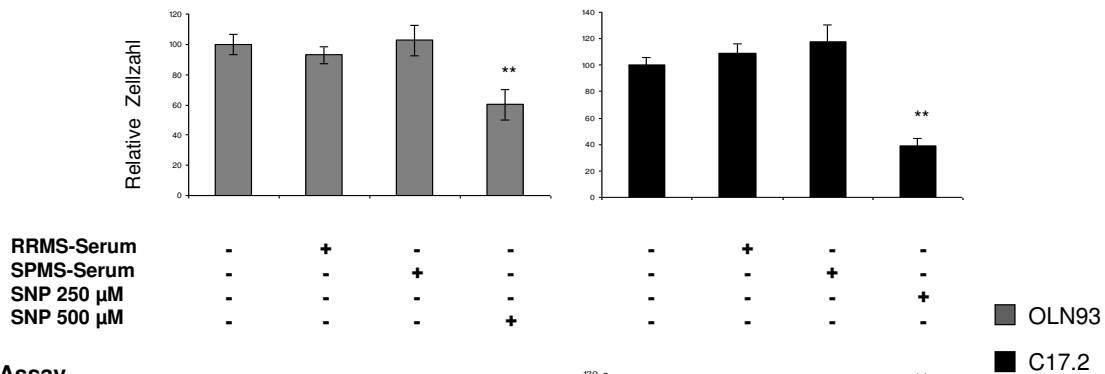
Abb. 38: Synergie zwischen dem Basistherapeutikum GA und rrTNF- α . Es konnte keinerlei Auswirkungen des rekombinanten TNF- α der Ratte in Anwesenheit des Basistherapeutikums GA auf die OLN93 Zellen gezeigt werden. Diese Abbildung steht repräsentativ für drei unabhängige Versuche

3.5 Auswirkungen der RRMS- und SPMS-Patientenseren auf C17.2 und OLN93 Zellen

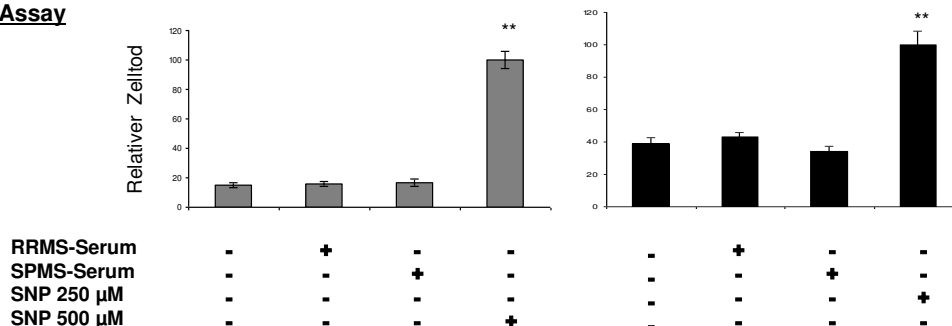
Es gibt Hinweise dafür, dass NO bei der Pathogenese der MS eine Rolle spielt. In einer Arbeit von Nur Yuceyar et al. ^[107] wurde die Konzentration von NO in den Seren der MS-Patienten untersucht. Sowohl im Liquor als auch im Serum der RRMS- und SPMS-Patienten konnten erhöhte NO-Werte festgestellt werden. Da, wie gezeigt, NO sowohl bei den neuronalen Zellen als auch bei den Oligodendrozyten apoptotisch wirkt, sollte im folgenden untersucht werden, ob die Inkubation der Zellen mit den Seren der RRMS- oder SPMS-Patienten ebenfalls einen Zelltod induzieren kann. Dazu wurden die OLN93 und C17.2 Zellen mit den Patientenseren 24 h inkubiert und 24 Stunden nach Behandlung sowohl die Lebendzellzahl mittels WST-1 Assays als auch die Zytotoxizität mittels LDH Assays bestimmt. Als Kontrollgruppen dienten zum einen unbehandelte Zellen und zum anderen Zellen, bei denen der Zelltod durch NO induziert wurde. Dabei wurde der Zelltod mit SNP in einer Konzentration von 250 μ M für C17.2 und 500 μ M für OLN93 Zellen ausgelöst.

Es zeigte sich, dass die Inkubation der OLN93 und C17.2 Zellen mit den RRMS- oder SPMS-Patientenseren keinen Zelltod auslösen konnte (Abb. 39).

WST-1 Assay



LDH Assay



** p<0.01. im Veraleich zu dem jeweils unbehandelten Zellen (parametrischer t-Test)

Abb. 39: Auswirkungen von Patientenseren auf OLN93 und C17.2 Zellen. Behandlung der beiden Zelllinien mit den jeweiligen Patientenseren hatte keinerlei Effekte auf das Zellwachstum. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte $\pm$ SEM von drei unabhängigen Versuchen je Zelllinie

3.6 NO-Bestimmung in den RRMS- und SPMS-Patientenseren

Der ausbleibende zytotoxische Effekt der Seren auf die Zelllinien könnte an einer zu geringen Konzentration an NO liegen. Um dies auszuschließen, wurde die NO-Konzentration in den Patientenseren untersucht. Hierzu wurde mittels der Griess-Reaktion NO-Konzentration in den einzelnen Patientenseren bestimmt (Abb. 40 a) und der Mittelwert der NO-Konzentration der RRMS- und SPMS-Patientenseren berechnet (Abb. 40 b).

Es stellte sich heraus, dass sich nur sehr geringe Mengen an NO in den Patientenseren befanden, jedoch konnten leicht vermehrte Konzentrationen von 3 μM an NO in den Seren der RRMS-Patienten als der SPMS-Patienten detektiert werden, die aber nicht signifikant erhöht waren (Abb. 40 b). Der ausbleibende zytotoxische Effekt der Seren auf die beiden Zelllinien konnte demnach durch die sehr geringe Konzentration von NO in den Patientenseren erklärt werden.

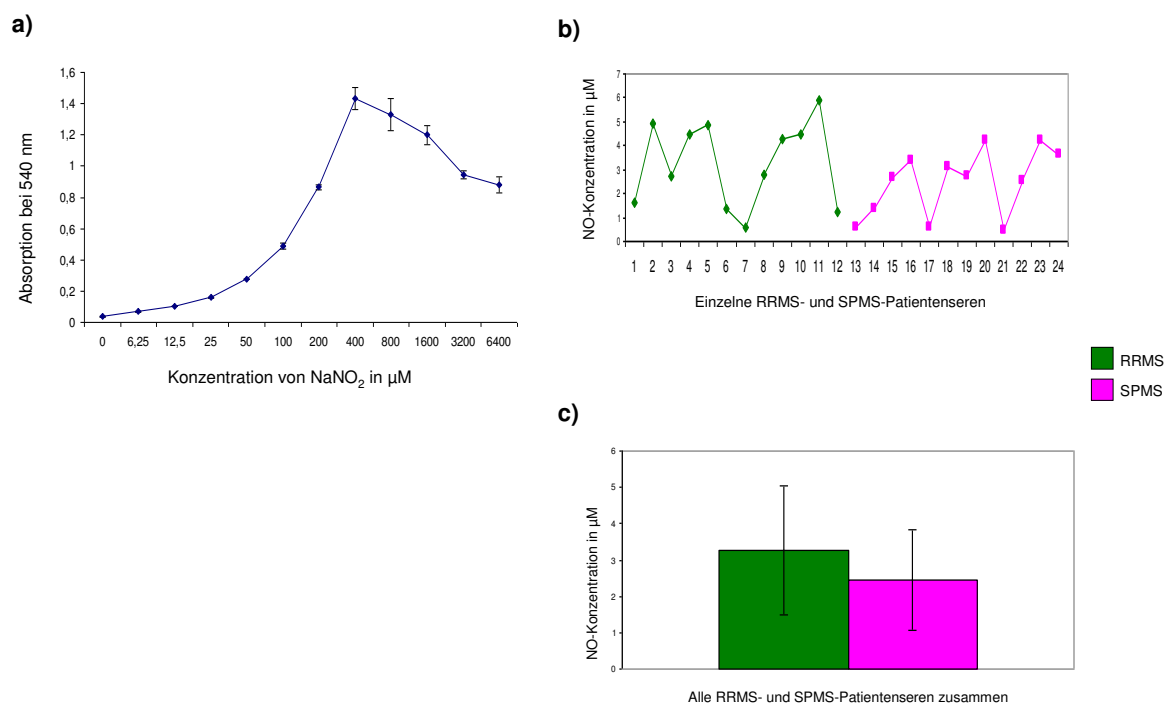


Abb. 40: Standardkonzentrationsreihe von NO in aufsteigender Natriumnitrit-Konzentration (Abb. 40 a). Bestimmung der NO-Konzentration mittels Griess-Reagenz in den einzelnen RRMS- und SPMS-Patientenseren (Abb. 40 b) und errechneter Mittelwert der NO-Konzentration der RRMS- und SPMS-Patientenseren (Abb. 40 c). Es finden sich leicht erhöhte Werte an NO-Konzentration in den RRMS-Patientenseren, jedoch ohne eine Signifikanz. Die Standardkonzentrationsreihe stellt Mittelwert $\pm$ SEM von zwei unabhängigen Versuchen dar. Die Bestimmung der NO-Konzentration wurden dreimal durchgeführt (Mittelwert $\pm$ SEM)

3.6.1 Verdünnungsreihe zur NO-Bestimmung in den RRMS- und SPMS-Patientenseren

Da in der Standardreihe der NO-Bestimmung (Abb. 40 a) festgestellt wurde, dass geringere Absorptionen auch bei höheren Konzentration an NO im ELISA-Reader detektiert wurden, sollte als nächstes untersucht werden, ob die geringe Absorption der Patientenseren mit erhöhten NO-Konzentrationen zu tun haben könnte. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe (Abb. 41) angelegt. Die einzelnen Seren der RRMS- und SPMS-Patienten wurden vereint und zur Verdünnung des Gemisches der jeweiligen RRMS- und SPMS-Patientenseren dH₂O hinzugegeben.

Es zeigte sich, dass die geringen Absorptionen im ELISA-Reader der Patientenseren tatsächlich mit den niedrigen Konzentrationen an NO in Verbindung gebracht werden konnte, da bei Verdünnung der Seren geringere NO-Konzentrationen gemessen wurden (Abb. 41).

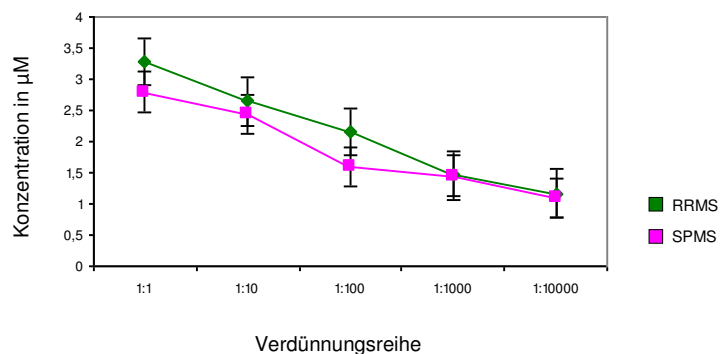


Abb. 41: Verdünnungsreihe zur NO-Bestimmung in den RRMS- und SPMS-Patientenseren. Zu sehen ist, dass bei Verdünnung der Patientenseren die Konzentration von NO sinkt. Die Abbildung beruht auf drei unabhängigen Versuchen (Mittelwert $\pm$ SEM)

3.7 Antikörperbindung der RRMS- und SPMS-Patientenseren

3.7.1 FACS-Analyse

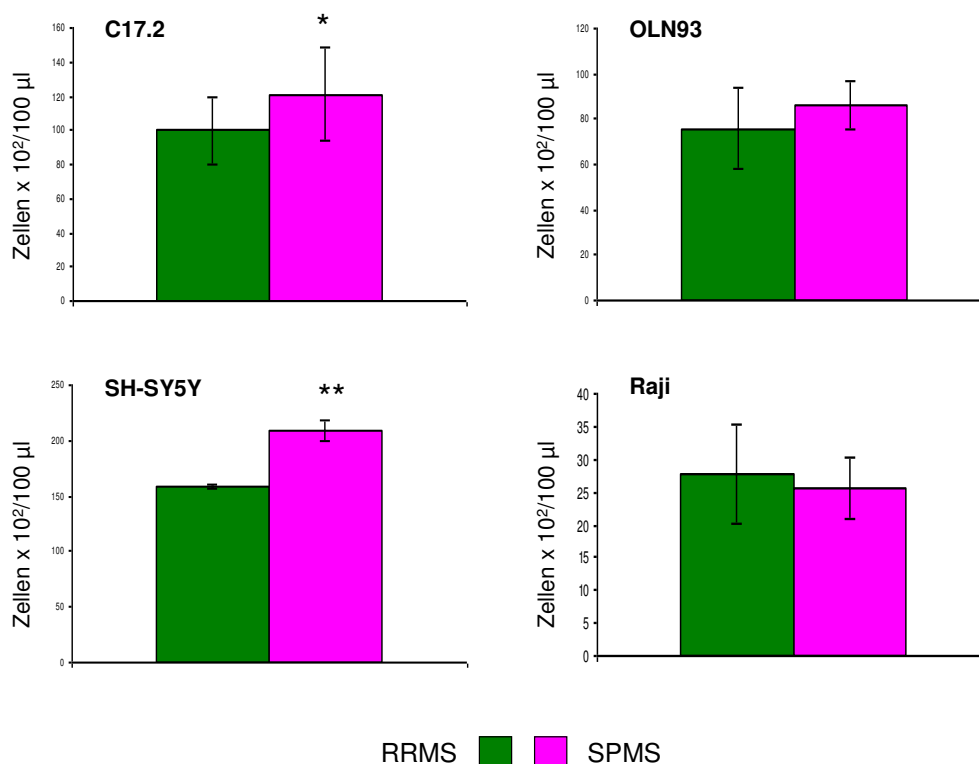
Nachdem geringe NO-Konzentrationen in den Patientenseren detektiert wurden (Abb. 40 b und c) und der Zelltod in den Konzentrationen nicht ausgelöst werden konnte, stellte sich nun die Frage, ob der Zelluntergang durch andere Mechanismen bei den MS-Patienten ausgelöst wird.

Bei der MS werden autoreaktive T-Zellen in der Peripherie bisher auf unbekannte Weise aktiviert und lösen somit auch eine humorale Immunantwort in Form einer Aktivierung von B-Zellen aus. Aufgrund der erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke im Schub, können im ZNS insbesondere die Mikroglia die mit antikörperbeladenen Zellen erkennen und durch proinflammatorische Zytokine den Zelltod auslösen. Somit sollte in der nächsten Versuchsreihe gezeigt werden, ob sich in den Seren der SPMS- und RRMS-Patienten

Antikörper befinden, die eine erhöhte Affinität zu den neuronalen Zellen oder zu den Oligodendrozyten besitzen.

Die Antikörperbindung wurde mittels FACS-Analyse erfasst. Des Weiteren wurden zu dieser Versuchreihe SH-SY5Y (humane Neuroblastomzellen) und Raji Zellen (B-Zellen des humanen Burkitt-Lymphoms) eingesetzt, die als Positiv- bzw. Negativkontrolle dienten (zur Versuchsdurchführung siehe Kapitel Material und Methoden, Unterpunkt 2.4.1).

Es stellte sich heraus, dass die Seren der SPMS-Patienten im Vergleich zu den RRMS-Patienten Antikörper besitzen, die eine signifikant höhere Affinität zu neuronalen Zellen besitzen. So binden signifikant mehr Antikörper der SPMS-Patienten an die neuronalen Vorläuferzellen C17.2 und die Neuroblastomzellen SH-SY5Y. Bei den Oligodendrozyten-Vorläuferzellen OLN93 und den B-Zellen des humanen Burkitt-Lymphoms Raji konnte eine erhöhte Antikörperbindung nicht festgestellt werden (Abb. 42). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Seren von Patienten in einem späteren MS-Stadium Antikörper besitzen, die eine höhere Affinität zu Zellen des neuronalen Ursprungs als zu Zellen des Immunsystems oder der neuronalen Stützzellen besitzen.

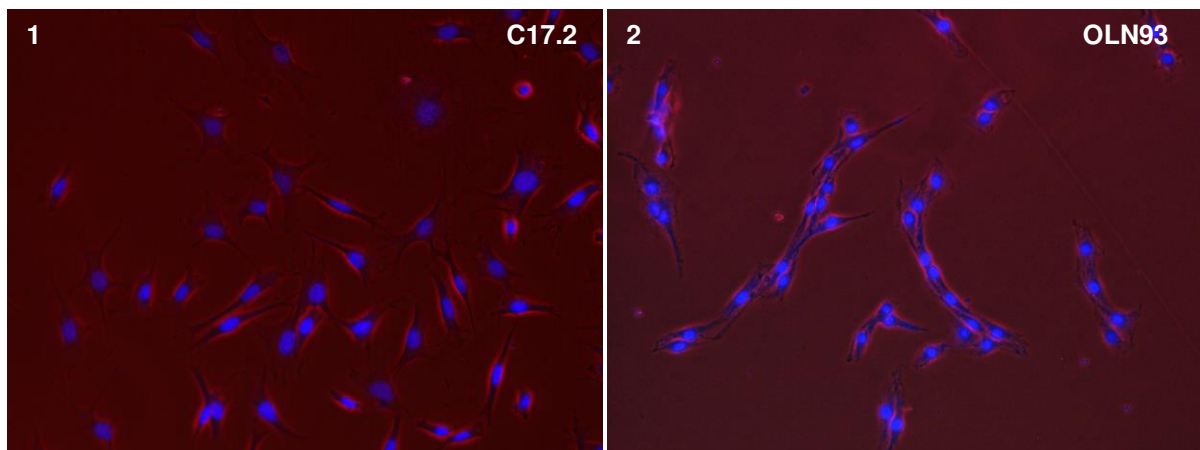


** $p < 0,01$ und * $p < 0,05$, im Vergleich zu RRMS-Patientenseren (parametrischer t-Test)

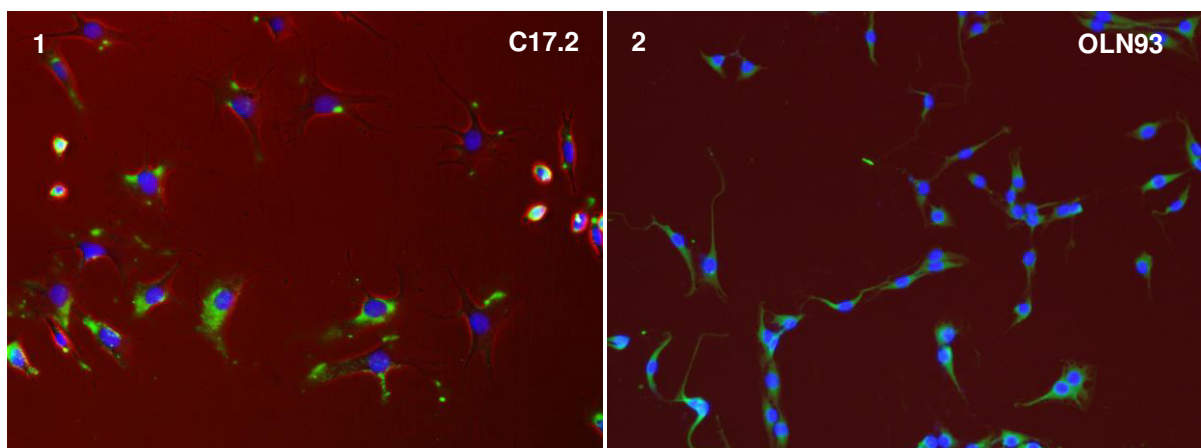
Abb. 42: FACS-Analyse zur Bestimmung der Antikörperbindung der RRMS- und SPMS-Patientenseren an C17.2, OLN93, SH-SY5Y und Raji Zellen. Die Seren der SPMS-Patienten besitzen im Vergleich zu den RRMS-Patienten Antikörper, die eine signifikant höhere Affinität zu Zellen des neuronalen Ursprungs aufweisen. Die Antikörper der SPMS-Patienten binden signifikant mehr an die C17.2 und SH-SY5Y Zellen. Eine erhöhte Antikörperbindung konnte bei den OLN93 und Raji Zellen nicht dargestellt werden. Dargestellt sind exemplarische Ergebnisse eines Versuches von insgesamt drei unabhängigen Versuchen (Mittelwert $\pm$ SEM)

3.7.2 Immunzytochemische Darstellung der Antikörperbindung

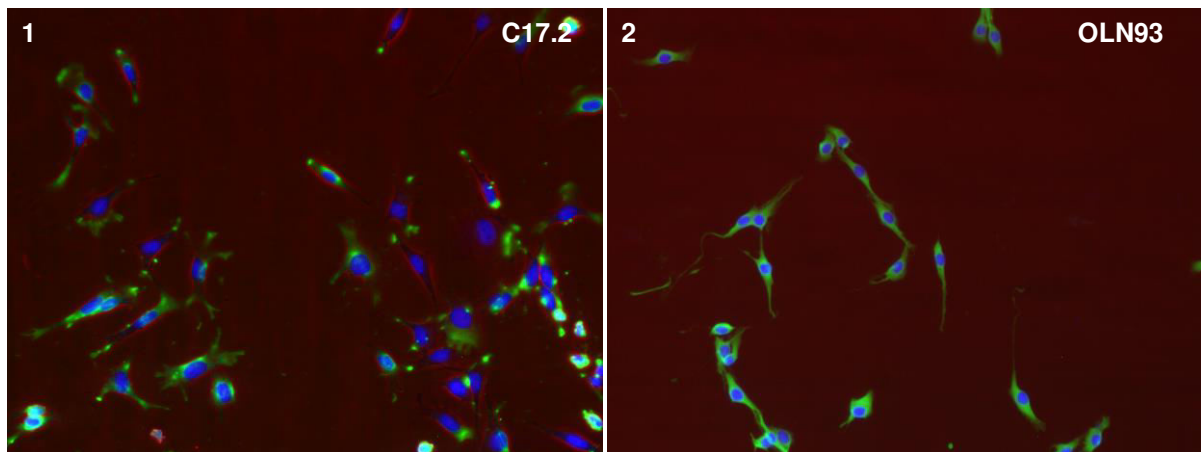
Da in der FACS-Analyse dargestellt werden konnte, dass die Antikörper der SPMS-Patientenseren eine signifikant höhere Affinität zu Zellen neuronalen Ursprungs aufweisen, sollte dies lichtmikroskopisch mittels Immunzytochemie dargestellt werden. Hierzu wurden analog zum FACS-Versuch (Unterpunkt 3.7.1) die C17.2 Zellen mit den Seren der RRMS- sowie SPMS-Patienten inkubiert und immunzytochemische Bilder gemacht. Dabei wurden die Zellen nicht permeabilisiert. Gut sichtbar ist die Bindung der Antikörper an Oberflächenstrukturen der C17.2 Zellen, wobei eine leicht verstärkte Antikörperbindung an den C17.2 Zellen erkennbar ist (Abb. 43 c 1), die mit den Seren der SPMS-Patientenseren inkubiert wurden. Des Weiteren wurden die OLN93 Zellen mit den Seren der RRMS- sowie SPMS-Patienten inkubiert und immunzytochemische Bilder gemacht. Auch hier wurden die Zellen nicht permeabilisiert. Die Bindung der Antikörper an die Oberflächenstrukturen der OLN93 Zellen konnten auch hier gut dargestellt werden, wobei optisch keine verstärkte Antikörperbindung der der jeweiligen Patientenseren erkennbar war.



a) unbehandelt



b) behandelt mit Seren der RRMS-Patienten



c) behandelt mit Seren der SPMS-Patienten

Abb. 43: Repräsentative immunzytochemische Darstellung der Antikörperbindung der RRMS- und SPMS-Patientenseren an C17.2 und OLN93 Zellen. Zu sehen ist eine erhöhte Bindung der Antikörper an Oberflächenstrukturen der C17.2 Zellen (c 1), die mit den Seren der SPMS-Patientenseren inkubiert wurden. Bei den OLN93 Zellen ist optisch keine verstärkte Antikörperbindung der der jeweiligen Patientenseren zu erkennen

4. DISKUSSION

4.1 Rolle von NO bei der Multiplen Sklerose

Die Multiple Sklerose ist eine chronisch-entzündliche, demyelinisierende und degenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems. Dabei kennzeichnen Inflammation, Demyelinisierung, axonale Degeneration, Oligodendrozytenverlust, Remyelinisierung und reaktive Gliose (Astrozytose) sowie multifokale sklerotische Plaques den Verlauf der MS ^[6]. Es gibt Hinweise dafür, dass die Beteiligung des zytotoxischen NO bei der Pathogenese der MS eine Rolle spielt ^{[14] [15]}. Einerseits konnte gezeigt werden, dass bei hohen Konzentrationen von NO sogenannte Reaktive-Stickstoff-Spezies (RNS) entstehen, welche unter anderem eine Permeabilisierung der mitochondrialen Membran induzieren ^[60]. Dies führt zur Freisetzung von Cytochrom c und zum Verlust der ATP-Produktion und somit zum apoptotischen oder nekrotischen Zelltod. Andererseits wurde die immunmodulierende Wirkung von NO dargelegt, welche protektiv sein kann, insbesondere im frühen Krankheitsverlauf der MS ^[104].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung sowohl der Oligodendrozytenzelllinie OLN93 als auch der neuronalen Zelllinie C17.2 mit NO zum Zelltod führt. Die C17.2 Zellen reagierten hierbei sensibler auf das NO, so dass eine geringere Konzentration an NO für die C17.2 Zellen zur Induktion einer Apoptose notwendig war (Abb. 31 a-c). Intrazellulär konnte nach NO-Stimulation eine Aktivierung der p38 MAP-Kinase nur in den neuronalen Zellen, nicht aber in den Oligodendrozyten, detektiert werden (Abb. 34). In einer Arbeit von Cheng et al. (2001) wurde ebenfalls festgestellt, dass Stickstoffmonoxid (NO) den Zelltod von C17.2 Zellen durch die Aktivierung von p38 MAP-Kinase (p38 MAPK) induziert ^[61]. Allerdings war unbekannt, ob dies ein allgemeingültiger Mechanismus des NO-induzierten Zelltods ist. Wie diese Arbeit hier zeigt, ist dies nicht der Fall. Somit liegt nahe, dass die Sensitivität zum NO-induzierten Zelltod in der Aktivierung von p38 MAP-Kinase zu liegen scheint. Der Zelltod der OLN93 Zellen bei höheren Konzentrationen von NO könnte zum einen durch die Aktivierung anderer Stresssignalwege, wie dem der JNKs, erklärt werden. Zum anderen wäre es auch möglich, dass der Zelltod in Oligodendrozyten durch die indirekten Effekte von RNS vermittelt wird, die vermehrt bei hohen Konzentrationen von NO entstehen ^[58]. Dabei kommt es zu Strangbrüchen und DNA-Mutationen, welches zu einer erhöhten Expression von p53 führt. Auch werden verschiedene mitochondriale Komponenten durch die RNS unselektiv und irreversibel gehemmt ^[59]. Des Weiteren induziert RNS die Permeabilisierung der mitochondrialen Membran (*mitochondrial permeability transition*, MPT), was unter anderem zur Freisetzung von Cytochrom c und zum Verlust der ATP-Produktion führt und somit in apoptotischem oder nekrotischem Zelltod endet ^[60].

Die physiologische Relevanz von NO wurde in einer Arbeit von Nur Yuceyar et al. ^[107] untersucht. Es konnten in den Seren von RRMS- und SPMS-Patienten erhöhte NO-Werte detektiert werden. Patienten mit höherer Krankheitsaktivität zeigten höhere Konzentrationen an NO im Vergleich zu den Patienten mit stabiler Erkrankung ^{[108] [109]}. Auch in einer Arbeit von Giovannoni et al. wurde gezeigt, dass die NO-Konzentration in den Patientenseren von allen klinischen Subtypen der MS erhöht waren ^[110]. Mit diesem Wissen und den Daten zur unterschiedlichen Sensibilität von Oligodendrozyten und Neuronen aus dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob die Konzentration von NO in den Patientenseren ausreicht, um den Zelltod bei den OLN93 oder C17.2 Zellen induzieren zu können. Die Behandlung der beiden Zelllinien mit den Patientenseren zeigte aber keinerlei Auswirkungen (Abb. 39). Die Detektion der NO-Konzentrationen zeigte, dass weder in den RRMS- noch in den SPMS-Patientenseren eine ausreichend hohe Konzentration von NO vorhanden war, um einen Zelltod auszulösen. Der Grund für die geringe Konzentration von NO in den Patientenseren könnte unter anderem darin bestehen, dass NO aufgrund der geringen Halbwertszeit bereits zerfallen war. Dieser Fehlerindikator würde eventuell geringer ausfallen, wenn die Seren frisch von den Patienten abgenommen werden würden, bei den RRMS-Patienten sogar während eines Schubes. Ein weiterer Grund für die geringe NO-Konzentration in den Patientenseren und somit für den Unterschied zu den publizierten Ergebnissen könnte darin bestehen, dass die Abnahme der Seren in einer anderen Erkrankungsphase oder nach Behandlung eines Schubes mit einem Immunsuppressivum wie z. B. Methylprednisolon erfolgte. Weitere Ursachen könnten in den verschiedenen Techniken zur Detektierung von NO wie fluorometrischer Assay, Kapillarelektrophorese, Gaschromatographie, Massenspektrometrie, Nitratreduktase und/oder Griess-Reaktion liegen ^{[109] [110]}. Des Weiteren haben eine gastrointestinale bakterielle Produktion sowie die Nahrungsaufnahme ebenfalls einen Einfluss auf die NO-Konzentration.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass neuronale Zellen sensibler gegenüber dem NO-induzierten Zelltod reagieren als Oligodendrozyten und dass dies wahrscheinlich mit der Aktivierung des p38 MAPK-Signalweges in den Neuronen zu tun hat. Die in Patientenseren gefundenen NO-Konzentrationen reichen nicht aus, um per se einen Zelltod auszulösen, so dass eine intracraniale NO-Produktion von aktivierten Immunzellen wie Makrophagen nahe liegt.

4.1.1 Einfluss der Basistherapeutika beim NO-induzierten Zelltod

Die Basistherapie der MS beinhaltet unter anderem Interferon- β 1a/b (IFN- β 1a/b) sowie Glatirameracetat (GA). Diese sollen neue neurologische Defizite verhindern bzw. die Verschlechterung bereits bestehender Defizite verzögern.

In einer Arbeit von Cruz et al. konnten im EAE (*experimental autoimmune encephalomyelitis*)-Maus-Modell mit humanen IFN- β 1b die Symptome um 33% reduziert werden ^[106]. Ob dies an einem reduzierten Zelluntergang durch einen direkten Einfluss auf den Zelltod oder nur an einer reduzierten inflammatorischen Antwort lag, wurde nicht geklärt. Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit der direkte Einfluss von IFN- β 1b und GA auf den NO-induzierten Zelltod untersucht. Es zeigte sich, dass die alleinige Behandlung der Zellen OLN93 und C17.2 mit den Basistherapeutika GA und IFN- β 1b keinerlei Einfluss hat (Unterpunkte 3.4.1 und 3.4.2 sowie Abb. 35 und 36). Auch konnte keines der Basistherapeutika den NO-induzierten Zelltod beeinflussen (Unterpunkt 3.4.3 und Abb. 37 a sowie b). Somit ist davon auszugehen, dass die positiven Wirkungen der Basistherapeutika nicht in der Hemmung der NO-Wirkung, sondern eher in der NO-Entstehung beruhen. IFN- β führt sowohl zu einer verminderten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und verminderten Antigenpräsentation als auch zur Verkürzung der Lebensdauer von T-Zellen ^[32]. Auch hat es einen Einfluss auf die Blut-Hirn-Schranke, die weniger durchlässig wird und somit die Migration von T-Zellen in die Entzündungsherde im ZNS reduziert ^[33]. Somit könnte auf diese Weise die NO-Produktion durch reduzierte Aktivierung des Immunsystems durch das IFN- β verringert werden. Da GA eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem basischen Myelinprotein hat, können sich die Immunzellen, die bei MS normalerweise die Myelinschicht angreifen würden, an dieses Polypeptid binden und entschärft werden ^[35]. Des Weiteren kann GA eine Verschiebung des Verhältnisses von Th1- zu Th2-Zellen induzieren. Dabei passieren die aktivierten Th2-Zellen die Blut-Hirn-Schranke und sorgen für eine Freisetzung von antientzündlich wirkenden Zytokinen wie IL-4, IL-6 und IL-10 sowie auch gleichzeitig für eine Hemmung der Synthese von entzündungsfördernden Zytokinen wie IL-12 ^[36].

Die Bindung der Antikörper mit späterer Aktivierung des Immunsystems spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der MS. Die Basistherapeutika haben keine direkte schützende Wirkung auf die toxischen Eigenschaften von NO. Ein Therapieansatz besteht in der indirekten Hemmung der NO-Entstehung. Ein neuer entscheidender Therapieansatz bei der MS wäre eine Entwicklung eines Medikamentes mit der Eigenschaft die p38 MAP-Kinase zu hemmen, da zumal in dieser Arbeit dargestellt worden ist, dass der NO-induzierte Zelltod in den neuronalen Zellen unter anderem durch Aktivierung von p38 MAP-Kinase beeinflusst wird. Aber auch die Produktion von NO ist p38 MAPK abhängig ^[111].

4.2 Rolle des TNF- α bei der Pathogenese von MS

Viele biologische Effekte werden dem TNF- α zugesprochen, neben Zytotoxizität und Wachstumsmodulation auch Zelldifferenzierung ^[112]. Bei der MS konnten in der akuten Entzündungsphase mit Auftreten erster klinischer Symptome eine verstärkte Expression von TNF- α im EAE-Tiermodell festgestellt werden ^[113]. Außer im Liquor konnten auch im Serum erhöhte Werte für TNF- α gemessen werden, so dass dies als wichtiger Hinweis auf eine proinflammatorische Rolle von TNF- α bei der Pathogenese der MS gewertet wurde ^{[114][115]}. Durch die Bindung von TNF- α an TNF-R1 wird der extrinsische Weg der Apoptose durch die Aktivierung der Caspase-8 in Gang gesetzt ^{[43][44]}. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß TNF- α bei den OLN93 und C17.2 Zellen den Zelltod induziert. Es zeigte sich, dass die Behandlung der Zelllinien OLN93 und C17.2 mit rekombinanten TNF- α der Ratte keinen Einfluss auf den Zelltod hat (Abb. 33). Da zwischen dem TNF- α der Ratte und dem TNF- α der Maus eine Strukturhomologie von 95% besteht, ist ein Ausbleiben der Apoptose bei den murinen neuronalen Zellen C17.2 aufgrund von Strukturunterschieden eher unwahrscheinlich. Zudem zeigt sich in der Praxis, dass TNF- α der Ratte auch bei Maussystemen reagiert ^[105]. Dass die Behandlung der Zellen mit TNF- α nicht zum Zelltod führte, könnte auch mit der antiinflammatorischen und neuroprotektiven Wirkung von TNF- α zusammenhängen. Denn einige Arbeiten deuten darauf hin, dass TNF- α neben seinen proinflammatorischen auch antiinflammatorische und neuroprotektive Eigenschaften zu besitzen scheint ^[116]. Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass entgegen den Erwartungen aus der Interpretation des EAE-Tiermodells eine Therapie mit TNF- α -bindenden Antikörpern oder löslichen TNF- α -Rezeptoren die Erkrankung nicht verbessern konnte, sondern sie sogar verschlimmerte ^[117]. In Experimenten an Knockout-Tieren, die kein TNF- α bilden können, konnte festgestellt werden, dass die EAE sogar schwerer verlief ^[118].

Eine in 2012 veröffentlichte Studie konnte zeigen, dass Patienten mit MS einen Austausch in einem Gensegment des TNF-R1 aufweisen ^[119]. Eine solche Assoziation dieser Rezeptorvariante mit anderen Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis, Psoriasis oder Morbus Crohn bestand nicht, so dass die Rezeptorvariante spezifisch für MS-Patienten ist und darum einen Ansatzpunkt für die Entwicklung eventuell verbesserter Therapien darstellt. Durch diese Mutation würde der TNF-R1 löslich werden und aktives TNF- α binden. Dieses „Neutralisieren“ vom TNF- α könnte an der Entstehung von MS beteiligt sein. Für diese These sprach unter anderem die Feststellung in den EAE-Tiermodellen, dass eine Behandlung mit löslichen TNF- α -Rezeptoren den Krankheitsverlauf verschlimmerte ^[117].

4.3 Unterschiede in der Antikörperbindung

Bei der MS werden autoreaktive T-Zellen in der Peripherie auf unbekannte Weise aktiviert, welche unter anderem durch das molekulare Mimikry erklären lässt ^[16]. Dabei reagiert das Immunsystem aufgrund der Ähnlichkeit antigener Determinanten von Infektionserregern und Zellen des Wirtsorganismus mit der Bildung von Auto-Antikörpern bzw. auto-aggressiven T-Lymphozyten ^[17].

Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Patientenserum keine ausreichend hohe Konzentration an NO zur Induktion eines Zelltodes besitzen, sollte noch überprüft werden, ob eventuell das Immunsystem durch Opsonierung (Antikörperbeladung) der Zellen aktiviert wird und somit entweder eine direkte Zerstörung der Zellen in Gang setzt oder die Produktion von NO ankurbelt. Bei den Zellen neuronalen Ursprungs zeigte sich eine erhöhte Antikörperbindung der SPMS-Patientenserum im Vergleich zu den Serum von RRMS-Patienten (Unterpunkt 3.7.1 und Abb. 42). Bei den Oligodendrozyten-Vorläuferzellen konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Antikörperaffinität der RRMS- bzw. SPMS-Patientenserum gesehen werden. Als Positivkontrolle dienten die humanen Neuroblastomzellen und als Negativkontrolle die B-Zellen des humanen Burkitt-Lymphoms. Die höhere Bindung der Antikörper der SPMS-Patientenserum könnte dadurch erklärt werden, dass die lokalen Entzündungen im ZNS durchgehend bestehen, so dass auch die jeweiligen Antikörper in der Peripherie in höherer Konzentration nachweisbar sind. Bei den RRMS-Patienten sind aufgrund des schubförmigen Verlaufes die jeweiligen Antikörper in geringerer Konzentration nachweisbar, da diese in einem schubfreien Intervall nicht produziert, sondern nur abgebaut werden. Des Weiteren könnten die Antikörper der SPMS-Patienten aufgrund einer längeren Erkrankungsdauer gereift sein, so dass sie eine höhere Affinität zu ihren Antigenen aufweisen.

Warum die SPMS-Patientenserum eine erhöhte Antikörperbindung an den neuronalen Vorläuferzellen zeigen, ist unklar und könnte in der Zukunft in einer Arbeit untersucht werden. Die Berücksichtigung des Krankheitsstadiums könnte eine mögliche Erklärung darstellen. Denn im schubförmigen Verlauf findet vor allem eine Zerstörung der Myelinschicht statt, so dass auch eine höhere Affinität zu Oligodendrozyten bei Auto-Antikörpern von RRMS-Patienten zu erwarten ist. Beim Voranschreiten der Erkrankung und dem Übertritt in den progredienten Verlauf findet zusätzlich zur Zerstörung der Oligodendrozyten und Myelinschichten noch eine vermehrte Neurodegeneration statt. Durch das „Offenliegen“ neuronaler Strukturen könnten so das vermehrte Aufkommen neuronaler Auto-Antikörper im Serum von SPMS-Patienten und die verstärkte Neurodegeneration erklärt werden.

4.4 Schlussfolgerungen und Aussichten

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass neuronale Vorläuferzellen sensitiver auf den NO-induzierten Zelltod reagieren als Oligodendrozyten-Vorläuferzellen. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich die Aktivierung der p38 MAP-Kinase. In Patientenseren wurden sehr niedrige NO-Konzentrationen gemessen, so dass der Zelltod nicht induziert werden konnte. Auch das potenziell zytotoxische TNF- α war nicht in der Lage, einen Zelltod auszulösen. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Basistherapeutika GA und IFN- β keinen Einfluss auf den NO-induzierten Zelltod haben. Diese Basistherapeutika hemmen indirekt die NO-Entstehung über verminderte Freisetzung von proinflammatorischen sowie vermehrte Ausschüttung von antiinflammatorischen Zytokinen. Zukünftig könnten neue Medikamente, die die Produktion von NO in den Mikrogliazellen direkt unterbinden und bestenfalls auch den NO-induzierten Zelltod inhibieren, einen großen Fortschritt in der MS-Therapie sein. Ein attraktives Ziel wäre hier die Hemmung der p38 MAPK, da diese sowohl beim Zelltod als auch in der NO-Synthese involviert ist.

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit konnte in der Antikörper-Bindung von RRMS- und SPMS-Patienten gezeigt werden. Unabhängig vom Krankheitsstadium, in dem sich ein Patient befand, konnte eine Bindung von Auto-Antikörpern an Oligodendrozyten detektiert werden. Interessanterweise zeigte sich aber bei der Bindung an neuronale Zellen eine höhere Affinität von Auto-Antikörpern der SPMS-Patienten. Ungeklärt bleibt, ob die neurospezifischen Auto-Antikörper bereits vorhanden sind und so die Neurodegeneration einleiten oder ob sie erst durch das „Offenliegen“ neuronaler Strukturen gebildet werden. Wäre man allerdings in der Zukunft in der Lage, gezielt diese neurospezifischen Auto-Antikörper zu neutralisieren, könnte man unter Umständen die Neurodegeneration und somit das Voranschreiten der Erkrankung verhindern.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Multiple Sklerose (MS) zählt zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen im jungen Erwachsenenalter. Sie ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), deren Ursache noch nicht vollständig geklärt ist. Die MS kann sowohl schubförmig (*relapsing-remitting multiple sclerosis*, RRMS) als auch chronisch-progredient (*secondary/primary progressive multiple sclerosis*, SPMS/PPMS) verlaufen. Kennzeichnend sind multiple entzündliche Entmarkungsherde in der weißen Substanz von Gehirn und Rückenmark, die nach heutigem Wissensstand durch den Angriff körpereigener Immunzellen verursacht werden und Ursache der auftretenden Myelin- und Axondegeneration sind.

Stickstoffmonoxid (NO) spielt bei neurologischen und degenerativen Erkrankungen wie Parkinson, Alzheimer oder Epilepsie eine wichtige Rolle. Die Beteiligung von NO bei MS wird hingegen kontrovers diskutiert. So kann es auf der einen Seite zum Zelltod führen und auf der anderen Seite immunmodulierend wirken, was insbesondere im frühen Krankheitsverlauf der MS schützend sein kann. Primäres Ziel dieser Arbeit war es, an Oligodendrozyten- und neuronalen Zellkulturen das apoptotische Potential von NO zu vergleichen. Außerdem sollte der Einfluss von Basistherapeutika sowie von Patientenseren auf die beiden Zellarten untersucht werden. Es zeigte sich, dass NO sowohl in neuronalen Zellen als auch in Oligodendrozyten einen Zelltod induzieren kann, wobei die neuronalen Zellen sensibler als die Oligodendrozyten reagierten. Interessanterweise war die Induktion der p38 MAP-Kinase durch NO in den neuronalen Zellen, nicht aber in den Oligodendrozyten, nachweisbar. Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Behandlung der Zellen mit den Basistherapeutika Glatirameracetat und Interferon- β 1b, die bei der MS den Verlauf der Erkrankung positiv beeinflussen können. Auf den NO-induzierten Zelltod zeigten die Basistherapeutika jedoch keinen Einfluss. Eine Inkubation der beiden Zelltypen mit Patientenseren konnte ebenfalls keinen Zelluntergang auslösen. Mittels FACS-Analyse und Immunzytochemie konnte allerdings gezeigt werden, dass Seren von SPMS-Patienten Antikörper besitzen, die eine signifikant höhere Affinität zu den neuronalen Vorläuferzellen C17.2 aufwiesen. Seren von RRMS-Patienten zeigten zwar eine Bindung, allerdings ohne Zellpriorität.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Neurone durch die Aktivierung des p38 MAPK-Signalweges sensibler gegenüber dem NO-induzierten Zelltod sind als Oligodendrozyten und dass die Basistherapeutika keinen Einfluss auf diesen Prozess haben. Patientenseren sind per se nicht zytotoxisch, da die Konzentration von NO kaum messbar ist. Allerdings enthalten Patientenseren Antikörper, die mit Voranschreiten der Erkrankung selektiver für Neurone werden.

Schlagwörter: Zelltod - Oligodendrozyten - Neurone - p38 - Antikörper

6. ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is one of the most common neurological diseases in young adults. It is a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS), the cause of which is still not fully understood. The disease can have a relapsing (relapsing-remitting multiple sclerosis, RRMS) or a chronic progressive (secondary/primary progressive multiple sclerosis, SPMS/PPMS) course. Characteristic are multiple inflammatory spots in the white matter of the brain and spinal cord, caused by the attack of the body's own immune cells which leads to myelin and axon degeneration.

Nitric oxide (NO) plays a role in neurological and degenerative diseases such as Parkinson's disease, Alzheimer's disease and epilepsy. However, the participation of NO in MS is controversial. On the one hand it can lead to cell death, on the other hand it could have immunomodulatory effects which can be protective particularly in the early disease course of MS. The first aim of this study was to compare the apoptotic potential of NO in cell cultures of oligodendrocytes and neuronal cells. In addition, the effect of immunomodulatory drugs and patients' sera should also be investigated. It was found that NO is able to induce cell death in both neuronal cells and oligodendrocytes. However, neuronal cells responded more sensitive than oligodendrocytes to NO. Interestingly, the activation of the p38 MAP kinase was induced by NO in neuronal cells, but not in the oligodendrocytes. Another aim of this study was the treatment of the cells with immunomodulatory drugs glatiramer acetate and interferon- β 1b, which can positively influence the course of disease in MS. However, the immunomodulatory drugs show no influence on the NO-induced cell death. Incubation of both cell types with patients' sera could also not trigger a cell death. By using FACS analysis and immunocytochemistry it could be demonstrated that sera of SPMS patients have antibodies, which exhibited a significantly higher affinity for the neuronal precursor cells C17.2. Although sera from RRMS patients showed antibody binding, there was no cell priority observed.

In summary, the results show that neurons are more sensitive to the NO-induced cell death than oligodendrocytes probably by activation the p38 MAPK pathway and that therapeutic drugs have no effect on this process. Patients' sera are non-cytotoxic due to very small amounts of NO. However, patients' sera contain antibodies which become more selective for neurons with progression of the disease.

Keywords: cell death - oligodendrocytes - neurones - p38 - antibodies

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Die folgende Liste enthält keine in der Biochemie oder Molekularbiologie allgemein gebräuchliche Abkürzungen (wie z. B. μl , min, h, DNA, ATP, usw.) sowie auch keine Abkürzungen, die zu den SI-Einheiten (Système International d'Unités) zählen.

(d) H_2O	(destilliertes) Wasser
(rr)TNF- α	(recombinant rat) tumor necrosis factor- α
Abb.	Abbildung
AP	activator protein
Apaf-1	apoptotic protease activating factor-1
ATF	activating transcription factor
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
C17.2	murine neuronale Vorläuferzelle
ca.	circa
CARD	caspase-associated recruitment domain
CD	cluster of differentiation
CHOP	cAMP response element-binding protein homologous protein
CO_2	Kohlendioxid
cPLA	cyclische Phospholipase A
CREB	cAMP response element-binding protein
DD	death domain
DED	death effector domain
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis
EDSS	expanded disability status scale
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eEF2K	eukaryotische Elongationsfaktor 2 Kinase
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	Extrazellulär-Signal regulierte Kinase
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FADD	Fas-associated protein with death domain
FBS	fetal bovine serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GA	Glatirameracetat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GRB2	growth-factor-receptor-bound-protein 2
HRP	horseradish peroxidase
IFN- β	Interferon- β
IL	Interleukin
JNK	cJun-NH ₂ -terminale Kinase
KCl	Kaliumchlorid
LDH	Laktatdehydrogenase

M	Molare Masse in [g/mol]
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK oder MKK	MAPK-Kinase
MAPKKK oder MKKK	MKK-Kinase
MAPKKAPK oder MK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-aktivierte Proteinkinase
MBP	basisches Myelinprotein
MEF2C	<i>myocyte-specific enhancer factor 2C</i>
MEK	<i>MAPK/ERK kinase</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MNK	<i>MAP kinase-interacting kinase</i>
MPT	<i>mitochondrial permeability transition</i>
MS	Multiple Sklerose
MSK	Mitogen- und stressaktivierte Proteinkinase
NaCl	Natriumchlorid
NaNO ₂	Natriumnitrit
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
OLN93	Oligodendrozyten-Vorläuferzelle der Ratte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	Tween 20 in PBS
PFA	Paraformaldehyd
PML	progressive multifokale Leukencephalopathie
Raji	B-Zelle des humanen Burkitt-Lymphoms
RNS	Reaktive-Stickstoff-Spezies
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RRMS	<i>relapsing-remitting multiple sclerosis</i>
RT	Raumtemperatur
SDS(-PAGE)	<i>sodium dodecyl sulfate (-polyacrylamide gel electrophoresis)</i>
sGC	lösliche Guanylatcyclase
SH-SY5Y	humane Neuroblastomzelle
SNP	<i>sodium nitroprusside</i>
SPMS	<i>secondary progressive multiple sclerosis</i>
SOS	<i>son of sevenless</i>
TdT	terminale Desoxynucleotidyl-Transferase
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Th-Zelle	T-Helferzelle
TNF-R	Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor
TRADD	<i>TNF-R1 associated death domain protein</i>
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
UV	Ultraviolett
u. a.	unter anderem
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
WST-1	<i>water-soluble tetrazolium salt-1</i>
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

8. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Pugliatti M., Rosati G., Carton H., Riise T., Drulovic J., Vécsei L. and Milanov I. (2006). The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur J Neurol* 13: 700-22.
- [2] Flachenecker P. and Zettl U. (2006). Epidemiologie. In: Schmidt R., Hoffmann F. (Hg.), *Multiple Sklerose*. Elsevier, Urban & Fischer, München; Jena, S. 11-18.
- [3] Kesselring J. (2005). Epidemiologie. In: Brandt T., Cohen R., Helmchen H. and Schmidt L. (Hg.) *Multiple Sklerose*. Verlag W. Kohlhammer, Stuttgart, S. 79-86.
- [4] Gale and Martyn. (1995). Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiology*, 47 (4-5): 425-48.
- [5] Alter et al. (2006). Multiple sclerosis frequency in Israel's diverse populations. *Neurology*. 66(7): 1061-6.
- [6] Compston A. and Coles A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet* 372: 1502-17.
- [7] Dymment D., Ebers G. and Sadovnick A. (2004). Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 3: 104-10.
- [8] Ebers G.C., Yee I.M., Sadovnick A.D. and Duquette P. (2000). Conjugal multiple sclerosis: population-based prevalence and recurrence risks in offspring. Canadian Collaborative Study Group. *Ann Neurol*; 48: 927-931.
- [9] Robertson N.P., Fraser M., Deans J. et al. (1996). Age-adjusted recurrence risks for relatives of patients with multiple sclerosis. *Brain*, 119: 449-455.
- [10] Willer C., Dymment D., Risch N., Sadovnick A., Ebers G. and Group C.C.S. (2003). Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 12877-82.
- [11] Ebers G., Sadovnick A. and Risch N. (1995). A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature* 377: 150-1.
- [12] Sadovnick A., Ebers G., Dymment D. and Risch N. (1996). Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group. *Lancet* 347: 1728-30.
- [13] Gold R., Linington C. and Lassmann H. (2006). Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129: 1953-71.
- [14] Pittock S. and Lucchinetti C. (2007). The pathology of MS: new insights and potential clinical applications. *Neurologist* 13: 45-56.
- [15] Sospedra M. and Martin R. (2005). Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23: 683-747.
- [16] Hemmer B. und Martin R. (1998). Neuroimmunology und Multiple Sklerose. *Aktuelle Neurologie* 25: 83-95.
- [17] Benoist C. and Mathis D. (2001). Autoimmunity provoked by infection: How good is the case for T cell epitope mimicry? *Nat Immunol*. 2(9): 797-801.
- [18] Meinl E. and Voltz R. (2006). Immunpathogenese. In Schmidt R., Hoffmann F. (Hg.) *Multiple Sklerose*. Elsevier, Urban&Fischer, München; Jena, S. 43-51.

- [19] Lucchinetti C., Brück W., Parisi J., Scheithauer B., Rodriguez M. and Lassmann H. (1999). A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study in 113 cases. *Brain* 122: 2279-95.
- [20] Dargin and Lowenstein. (2008). The painful eye. *Emerg Med Clin North Am.*, 26(1): 199-216.
- [21] Solaro C. et al. (2004). The prevalence of pain in multiple sclerosis: a multicenter cross-sectional study. *Neurology*, 63(5): 919-21.
- [22] Ghaffar and Feinstein. (2007). The neuropsychiatry of multiple sclerosis: a review of recent developments. *Curr Opin Psychiatry*, 20(3): 278-85.
- [23] Rao S.M. (1990). Multiple sclerosis. In: Cummings JL, editor. *Subcortical dementia*. New York: Oxford University Press, 164-180.
- [24] Kurtzke J.F. (1983). Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, 33: 1444-52.
- [25] Weinshenker B., Bass B., Rice G., Noseworthy J., Carriere W., Baskerville J. and Ebers G. (1989). The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain* 112: 133-46.
- [26] Söderström M. (2001). Optic neuritis and multiple sclerosis. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 79: 223-227.
- [27] McDonald W., Compston A., Edan G., Goodkin D., Hartung H., Lublin F., McFarland H., Paty D., Polman C., Reingold S., Sandberg-Wollheim M., Sibley W., Thompson A., van den Noort S., Weinshenker B. and Wolinsky J. (2001). Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50: 121-7.
- [28] Polman C.H., Reingold S.C., Banwell B., et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 2011; 69:292-302.
- [29] Sutton D.M. et al. (1989). Complications of plasma exchange. *Transfusion.*, 29(2): 124-7.
- [30] Mokrzycki M.H. and Kaplan A.A. (1994). Therapeutic plasma exchange: complications and management. *Am J Kidney Dis*, 817-27.
- [31] Weinshenker B.G. et al. (1999). A randomized trial of plasma exchange in acute central nervous system inflammatory demyelinating disease. *Ann Neurol*, 878-86.
- [32] Yong V.W. (2002). Differential mechanisms of action of interferon-beta and glatiramer acetate in MS. *Neurology*, 59: 802-8.
- [33] Stone L.A., Frank J.A., Albert P.S. et al. (1997). Characterization of MRI response to treatment with interferon beta-1b: contrast-enhancing MRI lesion frequency as a primary outcome measure. *Neurology*, 49: 862-9.
- [34] Jeffery D.R. and Herndon R. (2004). *Neurology*, 63(12 Suppl 6): S19-24.
- [35] Aharoni R., Teitelbaum D., Arnon R. and Sela M. (1999). Copolymer 1 acts against the immunodominant epitope 82-100 of myelin basic protein by T cell receptor antagonism in addition to major histocompatibility complex blocking. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:634-9.

- [36] Ruggieri M., Avolio C. et al. Glatiramer acetate in multiple sclerosis: a review. In: CNS Drug Reviews. Band 13, Nummer 2, 2007, S. 178-191.
- [37] Comi G., Filippi M., Barkhof F., Durelli L., Edan G., Fernandez O., Hartung H., Seeldrayers P., Sorensen P.S., Rovaris M., Martinelli V. and Hommes O.R. (2001). Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet*, 357: 1576-82.
- [38] Ruggieri M. et al. (2007). Glatiramer acetate in multiple sclerosis: a review. *CNS Drug Reviews*, 13: 178-91.
- [39] Farina C. et al. (2005). Glatiramer acetate in multiple sclerosis: update on potential mechanisms of action. *Lancet Neurol*, 4: 567-75.
- [40] Yousry T.A., Major E.O., Ryschkewitsch C. et al. (2006). Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy. *New England Journal of Medicine*; 354: 924-33.
- [41] Kroemer G., Petit P., Zamzami N., Vayssière J.L. and Mignotte B. (1995). The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.*, 9(13): 1277-87.
- [42] Kermer P. und Bähr M. (2002). Prävention neuronaler Apoptose: Implikationen für die Therapie neurodegenerativer Erkrankungen. *Neuroforum* 2, 193-198.
- [43] Fesus L. (1993). Biochemical events in naturally occurring forms of cell death. *FEBS Letters*, 328; 1-5.
- [44] Fraser A. and Evan G. (1996). A License to kill. *Cell*, 85; 781-784.
- [45] Evan G. and Littlewood T. (1998). A matter of life and cell death. *Science* 281 (28), 1317-1321.
- [46] Salomon R.N. and Diaz-Cano S. (1995). Introduction to apoptosis. *Diagnostic Mol. Pathol.* 4 (4), 235-238.
- [47] Li P., Nijhawan D., Budihardjo S.M., Ahmad M., Alnemri E.S. and Wang X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* (4), 479-489.
- [48] Au J., Panchal N., Li D. and Gan Y. (1997). Apoptosis: A new pharmacodynamic endpoint. *Pharmaceutical Res.*, 14 (12): 1659-1671.
- [49] Bortner C.D. et al. (1995). *Trends Cell Biol.*, 5: 21.
- [50] Alderton W.K., Cooper C.E. and Knowles R.G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, 357, 593-615.
- [51] Marsden P.A., Schappert K.T., Chen H.S., Flowers M., Sundell C.L., Wilcox J.N., Lamas S. and Michel T. (1992). Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett*, 307, 287-93.
- [52] Nakane M., Schmidt H.H., Pollock J.S., Forstermann U. and Murad F. (1993). Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett*, 316, 175-80.
- [53] Drapier J.C., Wietzerbin J. and Hibbs J.B. JR. (1988). Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur J Immunol*, 18, 1587-92.

- [54] Liew F.Y., Li Y., Severn A., Millott S., Schmidt J., Salter M. and Moncada S. (1991). A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th2) cells of a Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages. *Eur J Immunol*, 21, 2489-94.
- [55] Wink D.A. and Mitchell J.B. (1998). Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*, 25, 434-56.
- [56] Lowenstein C.J. and Snyder S.H. (1992). Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell*, 70, 705-7.
- [57] Haddad I.Y., Zhu S., Crow J., Barefield E., Gadilhe T. and Matalon S. (1996). Inhibition of alveolar type II cell ATP and surfactant synthesis by nitric oxide. *Am J Physiol*, 270, L898-906.
- [58] Messmer U.K., Ankarcrona M., Nicotera P. and Brune B. (1994). p53 expression in nitric oxide-induced apoptosis. *FEBS Lett*, 355, 23-6.
- [59] Cassina A. and Radi R. (1996). Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*, 328, 309-16.
- [60] Bernardi P., Petronilli V., Di Lisa F. and Forte M. (2001). A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem Sci*, 26, 112-7.
- [61] Cheng A., Chan L.S., Milhavet O., Wang S. and Mattson M.P. (2001). p38 MAP kinase mediates nitric oxide-induced apoptosis of neural progenitor cells. *J Biol Chem* 276, 43320-43327.
- [62] Kyriakis J.M. and Avruch J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81(2), 807-869.
- [63] Pearson G., Robinson F., Beers Gibson T., Xu B.E., Karandikar M., Berman K. and Cobb M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22(2), 153-183.
- [64] Dan I., Watanabe N.M. and Kusumi A. (2001). The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol* 11(5), 220-230.
- [65] Kolch W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351 Pt 2, 289-305.
- [66] Farooq A. and Zhou M.M. (2004). Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal* 16(7), 769-779.
- [67] Ludwig S., Hoffmeyer A., Goebeler M., Kilian K., Hafner H., Neufeld B., Han J. and Rapp U.R. (1998). The stress inducer arsenite activates mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 via a MAPK kinase 6/p38-dependent pathway. *J Biol Chem* 273(4), 1917-1922.
- [68] Jiang Y., Gram H., Zhao M., New L., Gu J., Feng L., Di Padova F., Ulevitch R.J. and Han J. (1997). Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J Biol Chem* 272(48), 30122-30128.

- [69] Wang X.S., Diener K., Manthey C.L., Wang S., Rosenzweig B., Bray J., Delaney J., Cole C.N., Chan-Hui P.Y., Mantlo N., Lichenstein H.S., Zukowski M. and Yao Z. (1997). Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen activated protein kinase. *J Biol Chem* 272(38), 23668-23674.
- [70] Kramer R.M., Roberts E.F., Um S.L., Borsch-Haubold A.G., Watson S.P., Fisher M.J. and Jakubowski J.A. (1996). p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2. *J Biol Chem* 271(44), 27723-27729.
- [71] Waskiewicz A.J., Flynn A., Proud C.G. and Cooper J.A. (1997). Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *Embo J* 16(8), 1909-1920.
- [72] Knebel A., Morrice N. and Cohen P. (2001). A novel method to identify protein kinase substrates: eEF2 kinase is phosphorylated and inhibited by SAPK4/p38delta. *Embo J* 20(16), 4360-4369.
- [73] Feijoo C., Campbell D.G., Jakes R., Goedert M. and Cuenda A. (2005). Evidence that phosphorylation of the microtubule-associated protein Tau by SAPK4/p38delta at Thr50 promotes microtubule assembly. *J Cell Sci* 118(Pt 2), 397-408.
- [74] Han J., Jiang Y., Li Z., Kravchenko V.V. and Ulevitch R.J. (1997). Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* 386(6622), 296-299.
- [75] Wang X.Z. and Ron D. (1996). Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science* 272(5266), 1347-1349.
- [76] Raingeaud J., Gupta S., Rogers J.S., Dickens M., Han J., Ulevitch R.J. and Davis R.J. (1995). Proinflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 270(13), 7420-7426.
- [77] Caivano M. and Cohen P. (2000). Role of mitogen-activated protein kinase cascades in mediating lipopolysaccharide-stimulated induction of cyclooxygenase-2 and IL-1 beta in RAW264 macrophages. *J Immunol* 164(6), 3018-3025.
- [78] McLaughlin M.M., Kumar S., McDonnell P.C., Van Horn S., Lee J.C., Livi G.P. and Young P.R. (1996). Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase. *J Biol Chem* 271(14), 8488-8492.
- [79] Stokoe D., Campbell D.G., Nakielnny S., Hidaka H., Leever S.J., Marshall C. and Cohen P. (1992). MAPKAP kinase-2; a novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase. *Embo J* 11(11), 3985-3994.
- [80] Ullrich, A. and Schlessinger J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61: 203-12.
- [81] Schlessinger J. (1993). How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem Sci* 18: 273-5.

- [82] Buday L. and Downward J. (1993). Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 73: 611-20.
- [83] Bourne H.R., Sanders D.A., and McCormick F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349: 117-27.
- [84] Howe L.R., Leever S.J., Gomez N., Nakielnny S., Cohen P. and Marshall C.J. (1992). Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* 71: 335-42.
- [85] Moodie S.A., Willumsen B.M., Weber M.J. and Wolfman A. (1993). Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* 260: 1658-61.
- [86] Morrison D.K. and Cutler R.E. (1997). The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9: 174-9.
- [87] Kyriakis J.M., App H., Zhang X.F., Banerjee P., Brautigan D.L., Rapp U.R. and Avruch J. (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 358: 417-21.
- [88] Alessi D.R., Saito Y., Campbell D.G., Cohen P., Sithanandam G., Rapp U., Ashworth A., Marshall C.J. and Cowley S. (1994). Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *Embo J* 13: 1610-9.
- [89] Snyder E.Y., Deitcher D.L., Walsh C., Arnold-Aldea S., Hartwig E.A. and Cepko C.L. (1992). Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell* 68(1), 33-51.
- [90] Villa A., Snyder E.Y., Vescovi A., Martinez-Serrano A. (2000). Establishment and properties of a growth factor-dependent, perpetual neural stem cell line from the human CNS. *Exp Neurol* 161(1): 67-84.
- [91] Richter-Landsberg C. and Heinrich M. (1996). OLN-93: a new permanent oligodendroglia cell line derived from primary rat brain glial cultures. *J Neurosci Res* 45 (2): 161-73.
- [92] Buckinx R., Smolders I., Sahebali S., Janssen D., Smets I., Ameloot M. and Rigo J.M. (2009). Morphological changes do not reflect biochemical and functional differentiation in OLN-93 oligodendroglial cells. *J Neurosci Methods*;184(1): 1-9.
- [93] Biedler J.L., Roffler-Tarlov S., Schachner M. and Freedman L.S. (1978). Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res.* 38 (11 Pt 1): 3751-7.
- [94] Pulvertaft R.J.V. (1964). Cytology of Burkitt's tumour (African lymphoma). *Lancet*; I: 238-240.
- [95] Hudewentz J., Bornkamm G.W. and zur Hausen H. (1980). Effect of the diterpene ester TPA on Epstein-Barr virus antigen- and DNA synthesis in producer and nonproducer cell lines. *J Virology* 100: 175-178.
- [96] Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76(9): 4350-54.

- [97] Renart J., Reiser J. and Stark G.R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76 (7): 3116-20.
- [98] Carter P.H., Resto-Ruiz S., Washington G.C., Ethridge S., Palini A., Vogt R., Waxdal M., Fleisher T., Noguchi P.D. and Marti G.E. (1992). Flow cytometric analysis of whole blood lysis, three anticoagulants and five cell preparations. *Cytometry* 13: 68-74.
- [99] Green L.C., Wagner D.A., Glokowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S. and Tannenbaum S.R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126: 131-8.
- [100] Roméro-Graillett C., Aberdam E., Biagioli M., Massabni W., Ortonne J.P. and Ballotti R. (1996). Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxide and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes. *J Biol Chem* 271(45): 28052-6.
- [101] Pennathur S., Jackson-Lewis V., Przedborski S. and Heinecke J.W. (1999). Mass spectrometric quantification of 3-nitrotyrosine, ortho-tyrosine, and o,o'-dityrosine in brain tissue of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine-treated mice, a model of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Biol Chem* 274(49), 34621-34628.
- [102] Weldon D.T., Rogers S.D., Ghilardi J.R., Finke M.P., Cleary J.P., O'Hare E., Esler W.P., Maggio J.E. and Mantyh P.W. (1998). Fibrillar beta-amyloid induces microglial phagocytosis, expression of inducible nitric oxide synthase, and loss of a select population of neurons in the rat CNS in vivo. *J Neurosci* 18, 2161-2173.
- [103] Schuchmann S., Albrecht D., Heinemann U. and von Bohlen und Halbach O. (2002). Nitric oxide modulates low-Mg²⁺-induced epileptiform activity in rat hippocampal-entorhinal cortex slices. *Neurobiol Dis.*; 11(1): 96-105.
- [104] Giovannoni G., Heales S.J.R., Land J.M. and Thompson E.J. (1998). The potential role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Mult Scler*; 4, 212-216.
- [105] Rees G.S., Gee C.K., Ward H.L., Ball C., Tarrant G.M., Poole S. and Bristow A.F. (1999). Rat tumour necrosis factor-alpha: expression in recombinant *Pichia pastoris*, purification, characterization and development of a novel ELISA. *European Cytokine Network*. Volume 10, Number 3, 383-92.
- [106] Cruz T.F. and Pastrak A. (2001). Pharmaceutical compositions comprising Vitamin B12 and Interferon for treating multiple sclerosis. *Appl. No.:* 09/908, 298.
- [107] Yuceyar N., Taskiran D. and Sagduyu A. (2001). Serum and cerebrospinal fluid and nitrate level in relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis patients. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 103: 206-211.
- [108] Brundin L., Morcos E., Olsson T., Wiklund N.P. and Anderson M. (1998). Nitric oxide production in multiple sclerosis - an indicator of active disease. *Mult Scler*; 4: 327 Abstract.
- [109] Swenningsson A., Petersson A.S., Anderson O. and Hansson G.K. (1999). Nitric oxide metabolites in CSF of patients with MS are related to clinical disease course. *Neurology*; 53: 1880-2.

- [110] Giovannoni G., Heales S.J.R., Silver N.C., Oriordan J., Miller R.F., Land J.M., Clark J.B. and Thompson E.J. (1997). Raised serum nitrate and nitrite levels in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci*; 145:77-81.
- [111] Choi Y.Y., Kim M.H., Han J.M., Hong J., Lee T.H., Kim S.H. and Yang W.M. (2014). The anti-inflammatory potential of Cortex Phellodendron in vivo and in vitro: Down-regulation of NO and iNOS through suppression of NF- κ B and MAPK activation. *Int Immunopharmacol*. pii: S1567-5769(14)00034-4.
- [112] Barbara J.A., Van Ostade X. and Lopez A. (1996). Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α): The good, the bad and potentially very effective. *Immunol Cell Biol* 74, 434-443.
- [113] Issazadeh S., Ljungdahl A., Hojeberg B., Mustafa M. and Olsson T. (1995). Cytokine production in the central nervous system of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis: dynamics of mRNA expression for interleukin-10, interleukin-12, cytolytic, tumor necrosis factor alpha and tumor necrosis factor beta. *J Neuroimmunol* 61, 205-212.
- [114] Hauser S.L., Doolittle T.H., Lincoln R., Brown R.H. and Dinarello C.A. (1990). Cytokine accumulations in CSF of multiple sclerosis patients: frequent detection of interleukin-1 and tumor necrosis factor but not Interleukin-6. *Neurology* 40, 1735-1739.
- [115] Maimone D., Gergory S., Arnason B.G. and Reder A.T. (1991). Cytokine levels in the CSF and serum of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 32, 67-74.
- [116] Liu J., Marino M.W., Wong G., Grail D., Dunn A., Bettadapura J., Slavin A.J., Old L. and Bernard C.C. (1998). TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination. *Nat Med* 4, 78-83.
- [117] The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. (1999). TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. *Neurology* 53, 457-465.
- [118] Frei K., Eugster H.P., Bopst M. et al. (1997). Tumor necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha are not required for induction of acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 185, 2177-2182.
- [119] Gregory A.P. et al. (2012). Functional effect of a predisposing TNF receptor 1 common genetic variant mirrors outcome of anti-TNF therapy for multiple sclerosis. *Nature*.
- [120] Brex P.A., Ciccarelli O., O'Riordan J.I. et al. (2002). A longitudinal study of abnormalities on MRI and disability from multiple sclerosis. *N Engl J Med*; 346: 158-164.
- [121] Weinshenker B.G., Bass B., Rice G.P. et al. (1989). The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 2. Predictive value of the early clinical course. *Brain*; 112: 1419-1428.
- [122] Kallmann B.A., Fackelmann S., Toyka K.V. et al. (2006). Early abnormalities of evoked potentials and future disability in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler*; 12: 58-65.

9. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Essen, 28. April 2014

(Unterschrift)

Ahmet Ayar

10. DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei PD. Dr. med. Berghoff für die sehr gute Betreuung und die produktive Zusammenarbeit bedanken. Seine Begeisterung für die Forschung im Laufe der gesamten Zeit im Labor hat mich sehr beeindruckt, so dass meine Motivation im Labor tätig zu sein stetig wuchs.

Ein sehr großes Dankeschön auch an Dr. rer. nat. Dipl-Biochemiker T. Thomas für die Einführung in die Zellkulturarbeit und die gesamte Zusammenarbeit sowie die Anregungen zur Erstellung dieser Dissertation. Auf ihn konnte ich bei den vielen kleinen unerwarteten Schwierigkeiten im Laboralltag immer verlassen.

Einen ganz besonderen Dank verdient auch mein Mitdoktorant und Freund Andreas Knoll für die zahlreichen Hilfen im Labor.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Eltern für die bedingungslose Unterstützung herzlich bedanken.

Zudem möchte ich mich bei meiner Freundin Caroline für die Hilfe zur Erstellung der Dissertation herzlichst bedanken.