

Mechanismen der Schädigung und der gestörten Regeneration im entzündeten zentralen Nervensystem

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des akademischen Grades
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
von

Diplom-Chemiker Ulf Schulze Topphoff
geboren am 15.05.1975 in Telgte

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. F. Zipp
2. Prof. H. D. Volk
3. Prof. M. Brecht

Tag der mündlichen Prüfung: 02.02.2009

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

IV

1	Einleitung	10
1.1	Die Multiple Sklerose	10
1.1.1	Epidemiologische Daten	10
1.1.2	Ätiologie	11
1.1.3	Pathologie	12
1.2	Die EAE als Tiermodell der MS	14
1.3	Apoptose	15
1.3.1	T-Zellen und Apoptose	16
1.4	Die Rolle der Todesliganden in der MS-Pathologie	17
1.4.1	Das TRAIL/TRAIL-Rezeptor-System	17
1.4.1.1	Das TRAIL-System und T-Zellen	18
1.4.1.2	Das TRAIL-System im ZNS	19
1.4.2	Duale Rolle von TRAIL	20
1.5	Neurogenese	21
1.6	Histon-Code	24
1.6.1	Histondeacetylasen (HDAC)	25
1.7	Basische Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren	26
1.8	Oxidativer Stress, neurodegenerative Erkrankungen und Neurogenese	28
2	Zielsetzung	31
2.1	Rolle von TRAIL in der Neuroinflammation	31
2.2	Mechanismen gestörter neuronaler Regeneration und reaktiver Astrogliose	31
3	Material und Methoden	33
3.1	Laborartikel	33
3.1.1	Puffer, Lösungen, Zellkulturmedien	33

3.1.2	Sonstige Reagenzien und Chemikalien	35
3.1.3	Kunststoffartikel und sonstige Verbrauchsmaterialien	37
3.1.4	Geräte	37
3.1.5	Primersequenzen	39
3.1.6	FACS Antikörper	40
3.2	Zellbiologische Methoden	41
3.2.1	Zellkultur	41
3.2.2	Zellzählung	41
3.2.3	Zellgewinnung	42
3.2.3.1	Milz	42
3.2.3.2	Lymphknoten	42
3.2.3.3	Zentrales Nervensystem	42
3.2.4	Präparation und Kultivierung von NVZ	43
3.2.4.1	Aussaat und Proliferation	43
3.2.4.2	Umstellung auf experimentelle Bedingungen	44
3.2.4.3	Klonale Analyse	44
3.2.4.4	BrdU Markierung	45
3.2.5	MTT-Test	45
3.2.6	Proliferationsanalyse	45
3.3	Molekularbiologische Methoden	46
3.3.1	Transfektion von NVZ	46
3.3.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Mausgewebe	47
3.3.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus Mauszellen	47
3.3.4	Reverse Transkription	48
3.3.5	TaqMan quantitative real-time PCR	49
3.3.6	Agarose-Gelelektrophorese	51
3.3.7	Immunpräzipitation (IP)	51
3.3.8	Histonextraktion	52
3.3.9	Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)	52
3.3.9.1	Isolierung des Chromatins	52
3.3.9.2	Immunpräzipitation des Chromatins	53
3.3.10	Allgemeine Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung	54

3.3.11	SDS Page	54
3.3.12	Western Blot Analyse	55
3.3.12.1	Blotten	56
3.3.13	Immunologischer Nachweis von Proteinen im Western Blot	56
3.3.13.1	Messung der optischen Dichte der Immunoblots	58
3.4	Experimente an lebenden Tieren	58
3.4.1	Tiermodelle	58
3.4.2	Narkotisierung von Mäusen	58
3.4.3	Aktive und passive EAE	58
3.4.3.1	Induktion der aktiven EAE	59
3.4.3.2	Induktion der passiven EAE	60
3.4.4	<i>In utero</i> Elektroporation	60
3.4.4.1	Modulation des Redoxgleichgewichts nach <i>in utero</i> Elektroporation	61
3.4.5	Modulation des TRAIL-Systems <i>in vivo</i>	61
3.4.6	Modulation des Redoxgleichgewichts in Jungtieren	61
3.4.7	Modulation von Sirt1 <i>in vivo</i>	62
3.4.8	Perfusion und Fixierung von Mausgewebe	62
3.5	Sonstige Methoden	63
3.5.1	Histologische Aufarbeitung	63
3.5.2	Immuncytochemie	63
3.5.3	Immunhistochemie	64
3.5.3.1	Quantifizierung der immunhistologischen Gewebeschnitte	64
3.5.4	Durchflusszytometrie	65
3.5.4.1	Oberflächenfärbung	65
3.5.5	Migrationsexperimente	66
3.5.6	Statistische Auswertung	66
4	Ergebnisse	67
4.1	Die Rolle von TRAIL in der Neuroinflammation	67
4.1.1	Die Blockierung von TRAIL im ZNS	67
4.1.1.1	Einfluss der TRAIL-Blockade auf Immunzellen	68
4.1.2	Transfer von TRAIL-defizienten T-Zellen	70

4.1.3	TRAIL-R-Expression auf neutrophilen Granulozyten	71
4.2	Mechanismen gestörter neuronaler Regeneration und reaktiver Astrogliose	74
4.2.1	Charakterisierung neuronaler Vorläuferzellen	74
4.2.2	Einfluss des Redox-Gleichgewichts auf die Eigenschaften NVZ	75
4.2.2.1	Einfluss auf die Selbsterneuerung von NVZ	75
4.2.2.2	Einfluss auf die Differenzierung NVZ	78
4.2.2.3	Einfluss von BSO auf die Eigenschaften von NVZ-Klonen	80
4.2.3	Die Rolle von Sirt1 in NVZ <i>in vitro</i>	81
4.2.3.1	Expression von Sirt1 in NVZ	81
4.2.3.2	Expression von HDACs in NVZ	82
4.2.3.3	Modulation der Sirt1-Aktivität in NVZ	82
4.2.3.4	Modulation von Sirt1 in NVZ	83
4.2.3.5	Sirt1 assoziiert mit Hes1 in NVZ	84
4.2.3.6	Einfluss von Sirt1 auf die Acetylierung von Chromatin	85
4.2.3.7	Auswirkung von Sirt1 auf die Mash1-Expression in NVZ	86
4.2.4	Einfluss der Redox-Modulation auf die Differenzierung NVZ <i>in vivo</i>	90
4.2.4.1	Einfluss von BSO auf die Differenzierung im postnatalen Gehirn	90
4.2.4.2	Modulation von Sirt1 und Hes1 <i>in vivo</i>	93
4.2.4.3	Einfluss von Sirt1 auf die Mash1-Expression <i>in vivo</i>	94
4.2.5	Sirt1 in der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis	95
4.2.5.1	Mash1-Expression in der EAE	97
4.2.5.2	Modulation von Sirt1 in der EAE	97
5	Diskussion	99
5.1	Die Rolle von TRAIL in der Neuroinflammation	100
5.1.1	Todesliganden in der Neuroinflammation	100
5.1.2	Die duale Rolle von TRAIL in der Neuroinflammation	102
5.2	Mechanismen gestörter neuronaler Regeneration und reaktiver Astrogliose	108
5.2.1	Einfluss des Redox-Gleichgewichts auf die Eigenschaften NVZ	109
5.2.2	Sirt1 als spezifischer Redox-Sensor in NVZ	111

Inhaltsverzeichnis	V
5.2.3 Sirt1 als spezifischer Redox-Sensor <i>in vivo</i>	115
6 Zusammenfassung	121

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AICD	engl.: <i>activation induced cell death</i>
AK	Antikörper
ALS	Alzheimer-Erkrankung
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
bFGF	engl.: <i>basic fibroblast growth factor</i>
bHLH	engl.: <i>basische Helix-Loop-Helix</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSO	Buthioninsulfoximin
CD	engl.: <i>cluster of differtiation</i>
CFA	engl.: <i>complete Freund's adjuvance</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
c.p.m.	engl.: <i>counts per mins</i>
CSF	engl.: <i>cerebrospinal fluid</i>
Cy5	Indodicarbocyanin 5
Dcx	Doublecortin
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DETC	Diethyldithiocarbamat
DISC	engl.: <i>death inducing complex</i>
DM	Differenzierungsmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i>
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalitis
EGF	engl.: <i>epidermal growth factor</i>
FACS	engl.: <i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	engl.: <i>fetal calf serum</i>
FADD	engl.: <i>Fas-Associated-Death-Domain-Protein</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	engl.: <i>forward scatter</i>
GFAP	engl.: <i>glial fibrillary acidic protein</i>
gld	engl.: <i>generalized lymphoproliverative disease</i>
Gro	groucho
GSH	Glutathion
GT	Glutamyltransferase
h	engl.: hour

H37RA	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
HAT	Histonacetyltransferase
HD	Huntingtonschen Erkrankung
HDAC	Histondeacetyltransferase
Hes1	engl.: <i>hairy and enhancer of split</i>
HLA	engl.: <i>human leukocyte antigen</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMDM	engl.: iscove's modified dulbecco's medium
IP	Immunpräzipitation
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
IPS	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
i.v.	intravenous
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
KM	Kulturmedium
Ko	engl.: knockout
L	Ligand
LN	engl.: <i>lymph node</i>
lpr	engl.: <i>lymphoproliferative</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LS	α -Liponsäure
LTB4	Leukotriene B4
LV	lateraler Ventrikel
M	Mol/L
Mash1	engl.: mammalian achate schute homolog
MBP	engl.: <i>myelin basic protein</i>
mg	Milligramm
MHC	engl.: <i>major histocompatibility complex</i>
HIV	engl.: <i>human immunodeficiency virus</i>
MOG	engl.: <i>myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>
MS	Multiple Sklerose
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NAC	N-Acetyl-Cystein
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotidhydrid

NBM	Neurobasalmedium
NeuN	engl.: <i>neuronal nuclei</i>
NGF	engl.: <i>nerve growth factor</i>
Ngn	Neurogenin
NVZ	Neurale Vorläuferzellen
nM	Nanomolar
ml	Milliliter
min	Min
mM	Millimolar
mRNA	engl.: <i>messenger ribonucleic acid</i>
nm	Nanometer
OB	olfaktorischen Bulbus
Olig	engl.: <i>oligodendrocyte transcription factor 2</i>
PBA	PBS, BSA, Azid
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i>
PZW	Pneumococcal Zellwand
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PJ	Propidiumjodid
PLP	Proteolipid-Protein
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid
qRT-PCR	quantitativer real-time PCR
RMS	rostraler Migrationsstrom
Rpm	engl.: <i>rounds per min</i>
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RSS	Reaktive Sauerstoff-Spezies
RT	Raumtemperatur
SGZ	subgranuläre Zone
shRNA	engl.: <i>short-hairpin-RNA</i>
Sir2	engl.: <i>silent information regulator 2</i>
siRNA	engl.: <i>small interfering RNA</i>
Sirt1	engl.: <i>silent mating type information regulation 2 homolog</i>
SPF	engl.: <i>specific pathogen free</i>
SSC	engl.: <i>side scatter</i>
SVZ	Subventrikularzone
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TCR	engl.: <i>T cell receptor</i>
TLE1	engl.: <i>transducin like enhancer of split</i>

TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	engl.: <i>(TNF)-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRAIL-R	engl.: <i>(TNF)-related apoptosis-inducing ligand receptor</i>
TSA	Trichostatin A
U	engl.: <i>unit</i>
UV	Ultraviolett
vgl.	Vergleich
vs.	versus
WB	Western Blot
wld	engl.: <i>wallerian degenerated slow</i>
WM	Waschmedium
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Die Multiple Sklerose

1.1.1 Epidemiologische Daten

Die Multiple Sklerose (MS), auch Encephalomyelitis disseminata genannt, ist mit einer Prävalenz von 1/1000 die häufigste chronisch entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) in Nordeuropa und Nordamerika. Die erste klinische und pathologische Beschreibung dieser neuroinflammatorischen Erkrankung durch Jean Martin Charcot führt zurück in das Jahr 1867 (Charcot, 68). Charcot beschrieb bei Patienten mit episodisch auftretenden neurologischen Dysfunktionen sowohl perivaskuläre Zellinfiltrationen in die weiße Substanz des ZNS als auch den Verlust der Markscheide im Bereich der Entzündungsherde. Durch den Nachweis oligoklonaler Immunglobuline in der Hirn- und Rückenmarksflüssigkeit (Liquor cerebrospinalis) von MS-Patienten erbrachte Kabat im Jahre 1948 einen weiteren Anhaltspunkt dafür, dass es sich bei der MS um eine entzündliche Erkrankung des ZNS handelt (Kabat et al., 48).

Durch intensive Forschung konnte die Erkrankung weitestgehend charakterisiert werden. Die genauen Ursachen und Auslöser sowie die exakten pathogenetischen Mechanismen der MS blieben bislang jedoch ungeklärt. Untersuchungen umweltbedingter Risiken deuten dabei auf geographische Faktoren: Während in äquatorialen Regionen weniger als 1/100.000 Einwohner an MS leiden, steigt die Prävalenz von 6/100.000 in Südeuropa auf 155/100.000 Einwohner in den nördlichen Regionen Europas an. Ethnische Faktoren spielen dabei wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle. Migrationsstudien zeigen, dass das Erkrankungsrisiko von Immigranten vom Lebensalter der Einwanderung abhängt und daher Umweltfaktoren wahrscheinlich eine übergeordnete Rolle in der MS spielen (Martin und McFarland, 95); (Kurtzke et al., 85); (Kurtzke, 00). Typischerweise treten die ersten Krankheitssymptome zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr auf, wobei Frauen doppelt so häufig betroffen sind wie Männer. Ungefähr 80 bis 90 Prozent der Patienten zeigen spontan auftretende, transiente klinische Symptome. Hierbei handelt es sich um die schubförmig-remittierende MS (engl.: relapsing-remitting, RR-MS). Symptome wie Lähmungserscheinungen, Sensibilitätsstörungen, Sehstörungen, Müdigkeit und Koordinationsstörungen können dabei über einen Zeitraum von Tagen bis zu Wochen andauern, worauf eine Genesung bis zum nächsten Schub erfolgt. Oftmals geht die schubförmig-remittierende MS nach mehreren Jahren in eine progrediente Verlaufsform, der sekundär-progredienten (SP-MS) MS, über. Bei einer dritten Variante, der primär-

progredienten MS (PP-MS), kommt es zu einem sukzessiven Fortschreiten des klinischen Verlaufs nach dem Auftreten der ersten klinischen Symptome. Diese Verlaufsform ist sehr selten und zeigt keinerlei geschlechterspezifische Verteilung (Frohman et al., 06); (Sotgiu et al., 04).

1.1.2 Ätiologie

Durch ständige Auseinandersetzung des Vertebraten-Immunsystems mit endogenen Krankheitserregern entstand ein System, das körperfremde von körpereigenen Strukturen zu unterscheiden gelernt hat. Man differenziert dabei zwischen der angeborenen, einer unspezifischen Abwehr von Infektionserregern ohne Lern- und Gedächtnisprozesse, und der erworbenen (adaptiven) Abwehr. Letztere stellt ein hochspezialisiertes System dar, dessen Spezifität auf der Expression membranständiger T-Zellrezeptoren (TCR) und löslicher B-Zell-Rezeptoren, den Antikörpern, beruht. Bei der MS ist diese erworbene Immunantwort fehlgeleitet. Pathomechanistisch kommt es zu einem Versagen des Immunsystems, Lymphocyten mit Reaktivität gegen körpereigene Epitope zu eliminieren, woraus eine unkontrollierte Aktivierung autoreaktiver T-Zellen resultiert (Martin et al., 92). Bei MS-Patienten wurden vermehrt zirkulierende, autoreaktive T-Zellen gegen das basische Myelinprotein (MBP) oder Proteolipidprotein (PLP) gefunden (Zhang et al., 94); (Olsson et al., 92). Diese pro-inflammatorischen Myelin-reaktiven T-Lymphocyten vom sog. T-Helfer (Th)1-Typ wurden in charakteristischen intrazerebralen Entzündungsherden von MS-Patienten gefunden. Im Tiermodell der MS, der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), lässt sich in bestimmten Nagerstämmen die Erkrankung sowohl durch Immunisierung mit Bestandteilen der Myelinscheide (aktive EAE) als auch durch den Transfer von Myelin-reaktiven T-Zellen (passive oder Transfer-EAE) auslösen (Zamvil und Steinman, 90); (Martin und McFarland, 95). Weitere Anhaltspunkte untermauern die Hypothese einer Autoimmunerkrankung: Im Liquor von MS-Patienten lassen sich autochthone Antikörper nachweisen, und die Erkrankung spricht auf immunmodulatorische Therapien an (Zipp et al., 97); (Martin et al., 92). Ferner ist die Erkrankung mit immunrelevanten Genen der „Human Leukocyte Antigen“ Regionen assoziiert. Diese kodieren die für die Antigenpräsentation verantwortlichen Major Histocompatibility Complexe (MHCs) (Zipp et al., 95); (Sospedra und Martin, 05).

1.1.3 Pathologie

Die exakten pathogenetischen Mechanismen der MS sind trotz intensiver Forschung noch nicht vollständig geklärt. Die bisher gewonnenen Erkenntnisse stammen zum großen Teil aus der EAE, dem am meisten verbreiteten Tiermodell der MS. Hierbei kommt es nach Immunisierung mit Bestandteilen der Myelinschicht oder dem Transfer von enzephalitogenen T-Zellen zu einer substanziellen Schädigung von Gewebestrukturen im ZNS, die letztendlich in neurologischen Defekten resultiert (Wekerle et al., 94). Bei der EAE werden, genauso wie bei der Entstehung der MS angenommen wird, auf noch nicht geklärte Weise zwei wesentliche Schutzmechanismen aufgehoben:

1. Die im Thymus und im Blutkreislauf stattfindende Eliminierung autoreaktiver T-Zellen (negative Selektion) scheint zu versagen. Dadurch werden körpereigene und körperfremde Antigene nicht mehr voneinander unterschieden (Immuntoleranz), wodurch Myelin-spezifische T-Zellen eine Effektorfunktion ausüben können.
2. Das ZNS gehört zu den Organen mit reduzierter immunologischer Aktivierbarkeit („Immunprivilegiertes Organ“). Die Blut-Hirn-Schranke, welche normalerweise das Eindringen von im Blut zirkulierenden Pathogenen, Toxinen und Lymphozyten zügelt, scheint nicht mehr zu funktionieren. Autoreaktive T-Zellen und inflammatorische Monozyten können somit die Barriere leichter überwinden und gelangen ins ZNS.

Auf dieser Grundlage konnte ein pathogenetisches Konzept für die Entstehung einer T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankung, die zur Entzündung des ZNS führt, aufgestellt werden (Abb. 1). Im Zentrum stehen pro-inflammatorische Myelin-reaktive T-Lymphozyten vom sog. T-Helfer (Th)1-Typ, die vor dem Auftreten eines Krankheitsschubes außerhalb des ZNS immunologischen Kontrollmechanismen entgehen, und es dadurch zu einer Aktivierung und Expansion kommt (Hohlfeld und Wekerle, 04). Neben Th1 sind auch Th17 T-Lymphozyten an der Pathologie beteiligt (Lock et al., 02). Durch ihre Aktivierung erhöhen diese T-Zellen die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Oberfläche (Butcher und Picker, 96) und werden entlang eines Gradienten von chemotaktischen Substanzen („Chemokinen“) an die Blut-Hirn-Schranke herangelockt, interagieren mit Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der Endothelzellen und sind dann in der Lage, den perivaskulären Raum zu betreten (Wekerle et al., 86); (Kivisakk et al., 01); (Bechmann et al., 07). Im Parenchym erkennen sie ihre spezifische Zielstruktur wieder und werden erneut von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) aktiviert (Greter et al., 05). Im weiteren Verlauf der Entzündungsreaktion werden B-Lymphozyten und Plasmazellen rekrutiert, die gegen die Myelinscheide gerichtete Antikörper sezernieren und damit die

immunologische Attacke verstärken (Flügel et al., 01). An diesem Prozess sind zusätzlich noch aktivierte Makrophagen (rekrutiert aus dem peripheren Blut) sowie aktivierte Mikrogliazellen (Heppner et al., 05) beteiligt. Die MS-Läsionen sind histopathologisch durch ein entzündliches Infiltrat, den Verlust der Markscheide und der Myelin-bildenden Zellen, der Oligodendrozyten, sowie der Bildung glialen Narbengewebes gekennzeichnet.

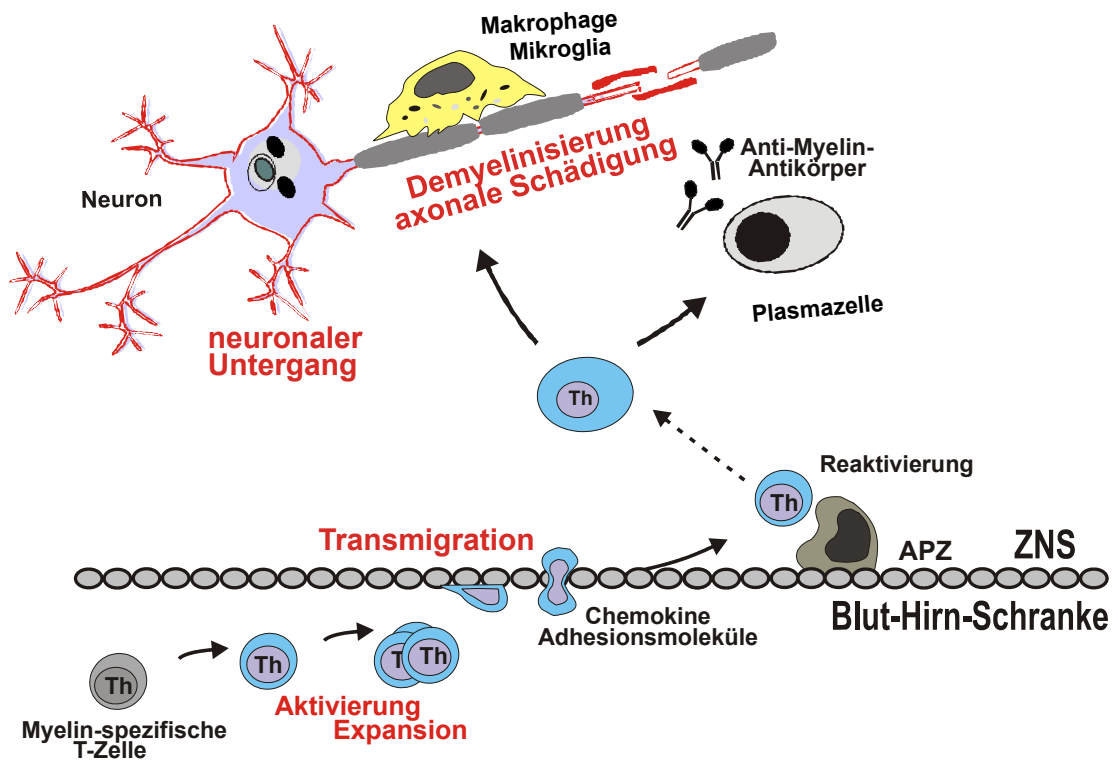


Abb. 1: Pathologisches Konzept der MS. Autoreaktive T-Zellen werden außerhalb des ZNS aktiviert, entgehen immunologischen Kontrollmechanismen und migrieren über die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS. Im Parenchym treffen diese Zellen auf Antigen-präsentierende Zellen (APZ) und werden erneut aktiviert. Es kommt zu einer Entzündungsreaktion gegen die Myelinscheide, die schließlich zum Untergang von Neuronen führt abgewandelt aus (Aktas et al., 06).

Dieses pathogenetische Konzept wurde kürzlich modifiziert. Neben entzündlichen, demyelinisierenden Veränderungen kommt es sowohl in der MS wie auch in der EAE zu einer frühzeitigen Schädigung der Axone (Ferguson et al., 97); (Trapp et al., 98); (Kornek und Lassmann, 99). Dabei besteht eine deutliche Korrelation zwischen dem Ausmaß axonaler Schädigung und den beobachteten neurologischen Defiziten (Bjartmar et al., 00). Für den früh auftretenden axonalen Schaden wird angenommen, dass ein Zusammenhang zu dem ko-lokalisierten, entzündlichen Infiltrat aus Lymphozyten besteht. Die von Makrophagen und T-Zellen sezernierten reaktiven Sauerstoffverbindungen (RSS) tragen wahrscheinlich zu den neurodegenerativen Prozessen bei. Bislang sind die Mechanismen, die zum Untergang von Neuronen führen, jedoch nicht näher bekannt.

1.2 Die EAE als Tiermodell der MS

Viele Erkenntnisse über Autoimmunkrankheiten beruhen auf Modellen, mit denen versucht wird, menschliche Erkrankungen im Tier experimentell darzustellen. Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), eine inflammatorische Autoimmunerkrankung, dient heutzutage als gängigstes Tiermodell der MS. Sowohl klinisch als auch pathohistologisch zeigt die EAE starke Ähnlichkeit zur humanen Erkrankung und ist durch das Auftreten von Lähmungen und durch perivaskuläre Infiltration mononuklearer Zellen im ZNS gekennzeichnet (Lassmann, 05). Histologisch imponiert die Krankheit als eine akute disseminierte Enzephalomyelitis mit Zonen akuter Demyelinisierung und Fibrinablagerungen.

Schon früh wurde erkannt, dass eine EAE durch Injektion von Gesamtmyelin oder gereinigten Myelinbestandteilen, z.B. dem basischen Myelinprotein (MBP), dem Proteolipidprotein (PLP) oder auch anderen Myelinproteinen wie dem Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG), ausgelöst werden kann (Martin et al., 92). Durch die Verwendung verschiedener Myelinantigene kann zudem eine große Variabilität in den klinischen Verlauf und die Histologie gebracht werden. Das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell, die mit dem Myelinepitop MOG35-55 induzierte EAE in C57BL/6 Mäusen, ist durch eine chronische Verlaufsform mit einer T-Zell-vermittelten Autoimmunität gekennzeichnet. Die Entzündung beschränkt sich dabei auf das Rückenmark mit massiver perivaskulärer und parenchymaler Infiltration mononuklearer Zellen, die hauptsächlich aus Makrophagen und T-Zellen bestehen. B-Zellen hingegen sind nur meningeal und perivaskulär in geringerer Zahl nachweisbar. Die SJL/J-Maus zeigt einen der MS sehr ähnlichen schubförmigen Krankheitsverlauf bei Auslösung mit dem PLP139-151-Peptid und stellt daher ebenfalls ein weit verbreitetes Modell für die Erforschung der MS-Pathologie dar.

Zur Krankheitsinduktion können zwei Verfahren eingesetzt werden. In der sogenannten „aktiven“ EAE erfolgt eine subkutane Immunisierung mit Myelinbestandteilen in komplettem Freundschem Adjuvans (CFA), angereichert mit abgetöteten Zellwandbestandteilen von *Mycobacterium tuberculosis* H37RA. Hiermit wird eine gegen die Myelinscheide gerichtete, T-Zell-vermittelte Entzündung im zentralen Nervensystem (ZNS) initiiert. Die entscheidende, wenn nicht sogar essentielle Rolle der Th-Zellen für die Krankheitsauslösung, zeigt sich in der „passiven“ EAE. Hierbei werden *in vitro* voraktivierte enzephalitogene T-Zellen in naive Mäuse transferiert, wodurch ebenfalls eine der MS ähnliche Krankheit ausgelöst werden kann. Dies gelingt weder mit anderen

Zellpopulationen, noch mit naiven autoreaktiven T-Zellen (Zamvil und Steinman, 90); (Kuchroo et al., 02). Durch die Deletion oder Überexpression von Genen bietet die Maus zudem ein sehr einfaches System, um die Funktion bestimmter Zytokine, Oberflächenmoleküle oder Proteine auf verschiedenen Zelltypen zu untersuchen.

Lange Zeit galt die EAE als eine Th1-vermittelte Autoimmunität, bei der IFN- γ - und IL-2-produzierende, Myelin-spezifische T-Zellen durch Aktivierung von Makrophagen, Mikroglia und Astrozyten die Entzündungsprozesse vermitteln. Inzwischen weiß man, dass bei der EAE neben Th1-Zellen auch IL-17 produzierende T-Zellen (Th17-Zellen) einen erheblichen Anteil an der Entzündungsreaktion beitragen. Da Th17-Zellen eine höhere Enzephalitogenität besitzen, ist wahrscheinlich das Verhältnis von Th1- und Th17-Zellen entscheidend für den klinischen Verlauf der EAE (Langrish et al., 05).

1.3 Apoptose

Zelltod kann durch Nekrose oder Apoptose hervorgerufen werden. Bei der Nekrose führen externe Einflüsse, wie z.B. Verbrennungen, Vergiftungen, Strahlung oder mechanische Verletzungen, zum Stoffwechsellkollaps. Es kommt zum Anschwellen der Zellorganellen, und durch irreversible Schädigung der Plasmamembran wird das Platzen der Zelle verursacht. Hierdurch werden Stoffe aus dem Zytoplasma freigesetzt, die Fresszellen anlocken und damit eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Im Gegensatz dazu läuft bei der Apoptose ein genetisch gesteuertes Programm ab. Auf einen apoptotischen Stimulus reagiert die Zelle in der Anfangsphase mit der Schrumpfung von Zellkern, Zytoplasma und Mitochondrien. Anders als bei der Nekrose bleibt die Zellmembran intakt, sodass keine Entzündungsreaktion eintritt. Im weiteren Verlauf kommt es zur Kondensation des Chromatins, und die Zelle zerfällt in Membran-umschlossene Apoptosekörperchen, welche von phagozytierenden Zellen eliminiert werden.

Im Gegensatz zur Nekrose wird die Apoptose nicht nur durch unspezifische Signale, wie beispielsweise dem Entzug von lebenswichtigen Zytokinen, Wachstumsfaktoren und radioaktiver oder UV-Strahlung ausgelöst, sondern kann auch durch gezielte Aktivierung von spezifischen membranständigen Apoptose-vermittelnden Rezeptoren eingeleitet werden. Einer der wichtigsten spezifischen Mechanismen verläuft über das sogenannte Apoptose-induzierende Liganden-/Rezeptorsystem. Zu den bislang wichtigsten Apoptosesystemen zählen die TNF (tumor necrosis factor)/ NGF (nerve growth factor)-Superfamilie:

- TNF-Rezeptor/TNFi
- CD95/CD95-Ligand (auch Fas/Fas-Ligand oder APO-1/APO-1-Ligand)
- TRAIL-Rezeptor/TRAIL (auch APO-2/APO-2-Ligand)

Die meisten der zugehörigen Rezeptoren werden membranständig synthetisiert und bestehen aus einer intra- und extrazellulären Domäne. Durch den Kontakt der extrazellulären Einheit mit einem Todesliganden findet die Trimerisierung der Rezeptoreinheiten zum sogenannten Todeskomplex (DISC, death inducing complex) statt. Dieser Vorgang bildet die Grundlage für die Übermittlung eines Apoptosesignals (Itoh und Nagata, 93). Wichtiges intrazelluläres Ereignis ist dabei die Aktivierung von Caspase 8, die über Adaptermoleküle wie FADD (Fas-Associated-Death-Domain-Protein) und FLICE (pro-Caspase 8) an den Todeskomplex gebunden wird. Über einen autokatalytischen Aktivierungsprozess werden weitere Caspasen (Caspase 2, 3, 7, 10) aktiviert und die Degradation lebensnotwendiger Proteine sowie der DNA initiiert.

1.3.1 T-Zellen und Apoptose

Die Apoptose besitzt im Rahmen der Immunregulation eine zentrale Funktion. Während der Antigenprägung im Thymus werden Zellen, die eine hohe Affinität zu körpereigenen Epitopen aufweisen, durch Apoptose eliminiert (Nossal, 94). Neben dieser sogenannten negativen Selektion werden durch positive Selektion T-Zellen eliminiert, deren Affinität zu körpereigenen MHC-Molekülen zu gering ist und daher körpereigene Zellen nicht als solche erkannt werden können (Fowlkes et al., 88). Ist dieser Selektionsprozess gestört, können unter Umständen autoreaktive T-Zellen überleben und die Grundlage für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen bilden. Über die Prägungsphase hinaus wird die Immunantwort durch den sogenannten „aktivierungsinduzierten Zelltod“ (AICD: activation induced cell death) reguliert. Dieser Kontrollmechanismus sorgt dafür, dass schon voraktivierte T-Zellen apoptotisch untergehen, wenn sie wiederholt über ihren T-Zellrezeptor stimuliert werden. Die Eliminierung von autoreaktiven T-Zellen mittels AICD erfolgt beispielsweise durch das CD95/CD95L System (Lenardo et al., 99). Für die MS wird unter anderem ein genetisch vorhandener Fehler des AICD von autoreaktiven T-Zellen postuliert (Pender, 98).

Neben dieser regulatorischen Funktion, in Bezug auf die T-Zell-Aktivierung, ist die Apoptoseinduktion in Zielzellen ein essentieller Bestandteil der T-Zell-Effektorfunktion. Virusinfizierte oder entartete Zellen werden durch die Expression von Apoptose-

vermittelnden Liganden wie CD95L und TNF- α auf zytotoxischen T-Zellen eliminiert. Auf der anderen Seite könnte dieser Effektormechanismus im Rahmen der MS/EAE-Pathogenese für den Untergang glialer und neuronaler Strukturen verantwortlich sein (Dowling et al., 96). Somit liegt auf der Hand, dass die Modulation der T-Zell-Apoptose einen wichtigen Arm in der Therapie von Autoimmunerkrankungen darstellt.

1.4 Die Rolle der Todesliganden in der MS-Pathologie

Im Einklang mit der Autoimmunhypothese ist die MS Folge einer Th-Zell-vermittelten Autoimmunantwort, die durch fehlende Eliminierung autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie eingeleitet wird und schließlich zum Untergang körpereigener Strukturen führt. Somit kommt dem Todesligandensystem eine janusköpfige Funktion in der MS-Pathologie zu: Sie wirken nicht bloß protektiv regulierend auf autoreaktive T-Zellen, sondern besitzen auch eine zerstörerische Effektorfunktion.

1.4.1 Das TRAIL/TRAIL-Rezeptor-System

TRAIL ist ein 281 Aminosäuren umfassendes, 32,5 kDA schweres Transmembranprotein, welches nach Trimerisierung apoptotische Aktivität entfaltet (Ashkenazi et al., 99) und eine bemerkenswerte Sequenzhomologie zu CD95L (23,2 %) und TNF- α (19 %) aufweist (Wiley et al., 95); (Pitti et al., 96). Zwei kürzlich im Menschen entdeckte TRAIL-Splicevarianten (TRAIL- γ ; TRAIL- β) zeigen ein verringertes Apoptosepotenzial. Dieses findet in einer Veränderung der extrazellulären Bindungsdomäne ihre Erklärung (Krieg et al., 03). Als zugehörige Rezeptoren sind bislang vier membrangebundene TRAIL-Rezeptoren im Menschen identifiziert worden (Abb. 2). Zu diesen gehören TRAIL-Rezeptor-1 (auch TRAIL-R1, Todesrezeptor-4 (DR4)), TRAIL-Rezeptor-2 (auch TRAIL-R2, Todesrezeptor-5 (DR5)), TRAIL-Rezeptor-3 (auch TRAIL-R3, DcR1) sowie TRAIL-Rezeptor-4 (auch TRAIL-R4, DcR2). Wobei lediglich TRAIL-R1 und TRAIL-R2 über eine intrazelluläre Todesdomäne verfügen und damit in der Lage sind, Caspasen zu aktivieren und ein Todessignal zu induzieren. Die beiden anderen Rezeptoren können aufgrund fehlender oder verkürzter intrazellulärer Todesdomäne kein Apoptosesignal vermitteln und zeigen eine Apoptose-inhibierende Eigenschaft, weshalb sie auch als „decoy“-Rezeptor (decoy receptor (DcR), Köderrezeptor) bezeichnet werden (Pan et al., 97); (Walczak et al., 97); (Degli-Esposti et al., 97b); (Degli-Esposti et al., 97a).

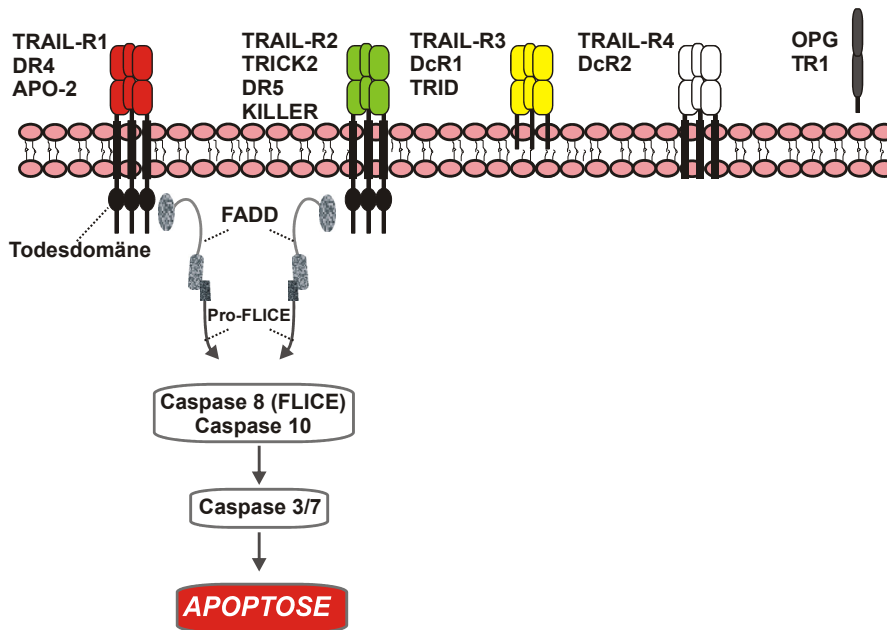


Abb. 2: TRAIL-Rezeptoren mit Synonymen und intrazellulärer Signalkaskade. TRAIL-R1 und TRAIL-R2 besitzen eine intrazelluläre Todesdomäne. TRAIL-R3 ist lediglich über einen Glycosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Anker an die Zellmembran befestigt, während TRAIL-R4 eine intrazelluläre Einheit ohne funktionsfähige Todesdomäne besitzt. Die Bindung des trimerisierten Liganden an den Rezeptor induziert das Apoptosesignal. Dies umfasst die Rekrutierung von Signalproteinen wie FADD und Pro-Caspase 8 (Pro-FLICE). Der weitere Signalweg schließt die Aktivierung von Caspase 8 und anderer Caspasen (Caspase 3/7) ein. Die Degradation lebenswichtiger Proteine führt schließlich zum Zelltod.

Im murinen System sind bislang drei TRAIL-Rezeptoren gefunden worden. Unter ihnen besitzt lediglich der TRAIL-R2 eine intrazelluläre Todesdomäne und ist in der Lage, Apoptose zu vermitteln. Aufgrund der großen Homologie zum humanen TRAIL-R2 (Wu et al., 99) erfolgte eine identische Namensgebung. Osteoprotegerin (OPG), ein rein löslicher Rezeptor, ist in der Lage, neben TRAIL noch Osteoklasten-Differenzierungs-Faktoren wie ODF, OPGL und RANKL zu binden (Emery et al., 98).

1.4.1.1 Das TRAIL-System und T-Zellen

Die Expression von TRAIL und dessen Rezeptoren auf T-Zellen zeigt sich divergent. Während ruhende T-Zellen sowohl TRAIL als auch alle vier TRAIL-Rezeptoren exprimieren, werden TRAIL-R2 und TRAIL-R3 nach TCR-spezifischer Stimulation herunterreguliert, wobei die Expression von TRAIL ansteigt. Ferner wird lösliches TRAIL auch von aktivierten T-Zellen und Makrophagen sezerniert (Wendling et al., 00); (Ehrlich et al., 03). Somit zeigen aktivierte T-Zellen eine verminderte Expression der Apoptose-vermittelnden Rezeptoren, aber eine verstärkte Effektoreigenschaft durch die Hochregulation des Apoptoseliganden.

1.4.1.2 Das TRAIL-System im ZNS

Das ZNS zählt, neben der Plazenta und der vorderen Augenkammer, zu den „immunprivilegierten“ Organen. Diese zeichnen sich durch fehlende bzw. verminderte Abstoßungsreaktion gegenüber Transplantaten aus. Inzwischen weiß man, dass diese Abstoßungsreaktionen durch eine von zytotoxischen T-Zellen vermittelte Immunreaktion hervorgerufen werden. Da das Gehirn hauptsächlich aus postmitotischem Gewebe besteht, müssen beispielsweise Entzündungsprozesse, die eine Infiltration von Immunzellen mit sich führen, streng kontrolliert werden, damit die Integrität des ZNS aufrechterhalten wird. Um dieses Immunprivileg zu gewährleisten, bedarf es daher Mechanismen, die an Ort und Stelle aktivierte Immunzellen inaktivieren oder ausschalten können. Dieser Schutz kann durch Expression von Apoptose-induzierenden Liganden auf der Oberfläche von Organzellen erfolgen, wie es für den CD95L auf Astrozyten gezeigt werden konnte. Im Rahmen der MS-Pathogenese treffen infiltrierende Immunzellen im ZNS als erstes auf astrozytäre Strukturen und können dort mittels CD95/CD95L-System eliminiert werden (Bechmann et al., 99). Für die Beteiligung des CD95/CD95L-Systems an der Aufrechterhaltung des Immunprivilegs im Gehirn spricht zusätzlich der Befund, dass Neurone CD95L exprimieren und spezifisch Apoptose in T-Zellen induzieren können (Flugel et al., 00). Für das TRAIL/TRAIL-Rezeptor-System wurde bislang die Beteiligung am Immunprivileg der humanen Plazenta postuliert (Phillips et al., 99). Im Gegensatz zu dem CD95L konnte unter physiologischen Bedingungen keine TRAIL-Expression im ZNS nachgewiesen werden (Dörr et al., 02a). Unter entzündlichen Bedingungen waren TRAIL-Rezeptoren auf Astrozyten (TRAIL-R2), Neuronen (TRAIL-R1, -R3 und -R4) und Oligodendrozyten (TRAIL-R2 und -R4) zu finden (Abb. 3). Unter pathologischen Bedingungen zeigt sich die Expression von TRAIL jedoch moduliert. Es konnte auf Neuronen im Gehirn von Alzheimerpatienten (Uberti et al., 04) und in Hirntumoren (Frank et al., 99) nachgewiesen werden. Experimentell wird eine Regulation des Apoptosemoleküls unter inflammatorischen Bedingungen mittels Interferon-gamma (IFN- γ) oder Lipopolysaccharide (LPS) auf murinen Mikrogliazellen (Genc et al., 03) und auf Astrozyten aus dem fetalen ZNS induziert (Lee et al., 03). In Tiermodell der MS ist eine Hochregulation des TRAIL-R2 auf Neuronen zu verzeichnen, während eine angestiegene TRAIL-Expression im entzündeten ZNS-Gewebe hauptsächlich auf eingewanderte, aktivierte Immunzellen wie T-Zellen und Makrophagen zurückzuführen ist (Aktas et al., 05).

1.4.2 Duale Rolle von TRAIL

Kurz nach seiner Entdeckung wurde TRAIL als Substanz zur spezifischen Bekämpfung von Tumorzellen angesehen, denn es tötete gezielt maligne transformierte Zellen, während das umliegende gesunde Gewebe keine toxische Beeinträchtigung zeigte (Ashkenazi und Dixit, 99); (Walczak et al., 99); (Roth et al., 99). TRAIL wurde zudem ein immunregulatorisches, anti-inflammatorisches Potential und damit eine protektive Wirkung im Rahmen von Autoimmunerkrankungen zugeschrieben. Diese Eigenschaft beruht auf der Beobachtung, dass TRAIL die Proliferation von aktivierten autoreaktiven T-Zellen hemmt (Lünemann et al., 02). Zudem führte die periphere Blockade von TRAIL nach Krankheitsausbruch, durch einen löslichen TRAIL-Rezeptor, zu einer Exazerbation der Inflammation und des Krankheitsverlaufes in der EAE (Hilliard et al., 01). Ein ähnlicher Effekt konnte im Rahmen der Kollagen-induzierten Arthritis beobachtet werden (Song et al., 00).

Neben seiner immunregulatorischen Eigenschaften außerhalb des ZNS besitzt TRAIL unter neuropathologischen Bedingungen auch eine schädigende Wirkung als Effektormolekül. Dieses spiegelt sich im Expressionsmuster wider: Während TRAIL auf aktivierten T-Zellen und Makrophagen zu finden ist (Abschnitt 1.4.1.1), wird es im CNS unter physiologischen Bedingungen nicht exprimiert (Abschnitt 1.4.1.2) und ist somit nicht am Immunprivileg des ZNS beteiligt (Bechmann, 05). TRAIL-Rezeptoren werden jedoch auf allen ZNS ansässigen Zellen exprimiert (Abschnitt 1.4.1.2). Nitsch et al. (Nitsch et al., 00) konnten zeigen, dass TRAIL für den Zelltod von Neuronen und Oligodendrozyten in humanen Hirnschnittkulturen verantwortlich ist und ebenfalls Apoptose in transformierten Neuronen und Gliomzellen induziert (Fulda et al., 02); (Dörr et al., 02b). Somit lässt sich mutmaßen, dass im Rahmen neuroinflammatorischer Erkrankungen wie der MS aktivierte TRAIL-exprimierende T-Zellen in das Gehirn einwandern und TRAIL als Effektormolekül für die Schädigungsmechanismen innerhalb der Neuroinflammation verantwortlich ist. Es bleibt zu klären, ob neben der immunregulatorischen Rolle der TRAIL-vermittelte Schädigungsprozess im ZNS die Pathogenese der Neuroinflammation mitbestimmt, und ob man trotz einer möglichen dualen Rolle des TRAIL-Systems in diesen Mechanismen gezielt therapeutisch eingreifen kann.

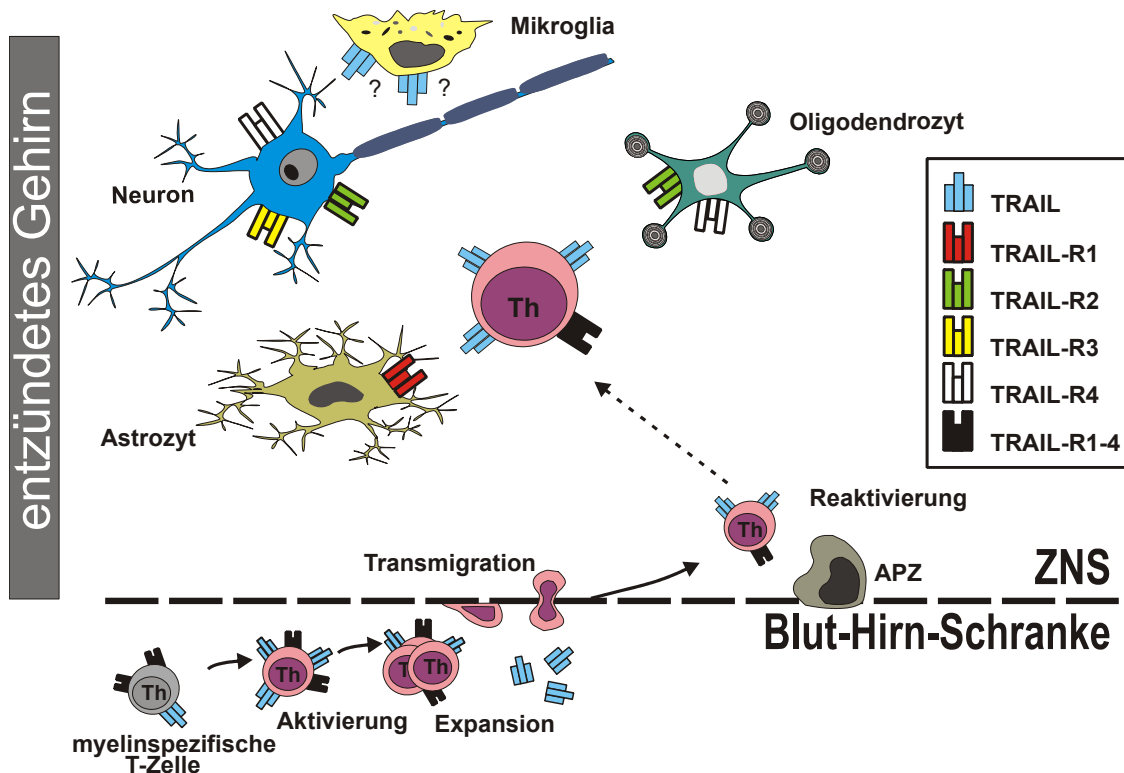


Abb. 3: Möglicher TRAIL-vermittelter Schädigungsprozess im ZNS und Expressionsmuster von TRAIL und dessen Rezeptoren. Nach bisherigen Befunden ist TRAIL an zwei wesentlichen Schritten innerhalb der MS-Pathologie beteiligt: Außerhalb des ZNS greift TRAIL regulierend in die Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen ein. Innerhalb des ZNS wird TRAIL hauptsächlich unter entzündlichen Bedingungen von infiltrierenden T-Zellen und Makrophagen exprimiert, während ZNS-ansässige Zellen den TRAIL-R1 bis -R4 exprimieren.

1.5 Neurogenese

Während der Ontogenese eines Organismus werden alle Organe aus sogenannten Stammzellen gebildet. Diese sind zu Beginn völlig unspezialisiert und erfahren eine immer stärkere Einschränkung ihrer Entwicklungsfähigkeit. Es startet mit der totipotenten Zelle (Fähigkeit, einen kompletten, lebensfähigen Organismus zu bilden), aus der pluripotente Stammzellen (Fähigkeit, nahezu jeden Zelltyp eines Organismus zu bilden), multipotente Vorläuferzellen (Fähigkeit, verschiedene Zelltypen innerhalb eines Gewebes zu bilden) und unipotente Vorläuferzellen (bilden Zellen des selben Zelltyps) hervorgehen. Am Schluss steht die ausdifferenzierte, meist noch teilungsfähige Zelle. Während der neuronalen Entwicklung entsteht das Nervensystem aus pluripotenten Stammzellen, die zu multipotenten Vorläuferzellen (neuronalen Stammzellen, NVZ) werden und zu Zellen der neuronalen und glialen Linie ausdifferenzieren. Allen Stammzellen gemein ist die Fähigkeit der Selbsterneuerung.

Lange galt die Neurogenese im adulten ZNS als ausgeschlossen, obwohl in den 60er Jahren die Existenz von Stammzellen im adulten Nagergehirn aufgezeigt wurde (Altman und Das, 65); (Kaplan und Hinds, 77). In den letzten Jahren konnte die Neubildung von Nervenzellen sowohl im adulten Gehirn von Primaten als auch für den Menschen belegt werden, wodurch die Hypothese der Regenerationsfähigkeit des Gehirns wieder an Bedeutung gewann (Rakic, 02); (Emsley et al., 05). Es stellte sich heraus, dass im Gehirn von adulten Säugetieren eine kontinuierliche Neurogenese hauptsächlich in zwei Regionen stattfindet: der subgranulären Zone (SGZ) des Gyrus Dentatus im Hippocampus (hippocampale Neurogenese) und der Subventrikularzone (SVZ) des anterolateralen Seitenventrikels (Neurogenese des olfaktorischen Systems). In beiden Regionen gibt es eine Population sich teilender Stamm- und Vorläuferzellen, deren Tochterzellen zu Neuronen oder Gliazellen differenzieren können. Im Vergleich besitzt die SVZ jedoch die größere Konzentration an sich teilenden Zellen (van et al., 99). In der Wand des Neuralrohrs entstehen in der frühen Embryogenese neurale Stammzellen. Aus diesem Neuroepithel differenzieren die neuronalen Zelltypen, indem zuerst Neurone und in späteren Stadien Gliazellen durch asymmetrische Teilung entstehen. Man vermutet, dass die „Typ E“-Zellen, die der SVZ nahegelegene ependymale Zellschicht, die ebenso Kontakt zum Ventrikel besitzt, durch Zell-Zell-Kontakt für die Aufrechterhaltung der dortigen Mikroumwelt und damit für die neurogenetische Nische verantwortlich sind (Doetsch et al., 97); (Doetsch et al., 99); (Alvarez-Buylla et al., 01). Sie sind zwar typisch differenzierte, postmitotische Epithelzellen, aber sie exprimieren eine Reihe von Markergenen für unreife Neurone und können durch den epidermalen Wachstumsfaktor (engl.: epidermal growth factor (EGF) und Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl.: fibroblast growth factor 2 (FGF) zur anhaltenden Zellteilung stimuliert werden. Es scheint, dass eine Subpopulation von Ependymzellen sich sehr selten asymmetrisch teilt, wobei die eine Zelle Teil des Ependyms bleibt und den Stammzellpool erhält. Die andere Zelle wandert in die unterliegende subventrikuläre Schicht und bildet nach häufiger Zellteilung einen Pool an Vorläuferzellen für die neurale und gliale Linie. Aus diesem Grund sind die „Typ E“-Zellen nicht direkt als Stamm- oder Vorläuferzellen definiert (Abb. 4). In der Seitenwand der lateralen Ventrikel (LV) der SVZ befinden sich proliferierende Stammzellen („Typ B“), aus denen die sogenannte Vorläuferzellen („Typ C“, transit amplifying cells) hervorgehen und den Ursprung von Neuroblasten („Typ A“) darstellen (Abb. 4). Diese wandern auf ihrem Weg zum olfaktorischen Bulbus (OB, Riechkolben) in Ketten angeordnet entlang von astrozytären Leittuben und bilden den rostral migratory stream (rostraler Migrationsstrom, RMS, (Shapiro und Ribak, 05). Dort integrieren sie sich in die Körnerzellschicht und differenzieren hauptsächlich zu GABAergen und dopaminergen

inhibitorischen Interneuronen (Carleton et al., 03); (Lois et al., 96). Diese Entwicklung ist durch eine transiente Expression von Markergenen gekennzeichnet (Abb. 4).

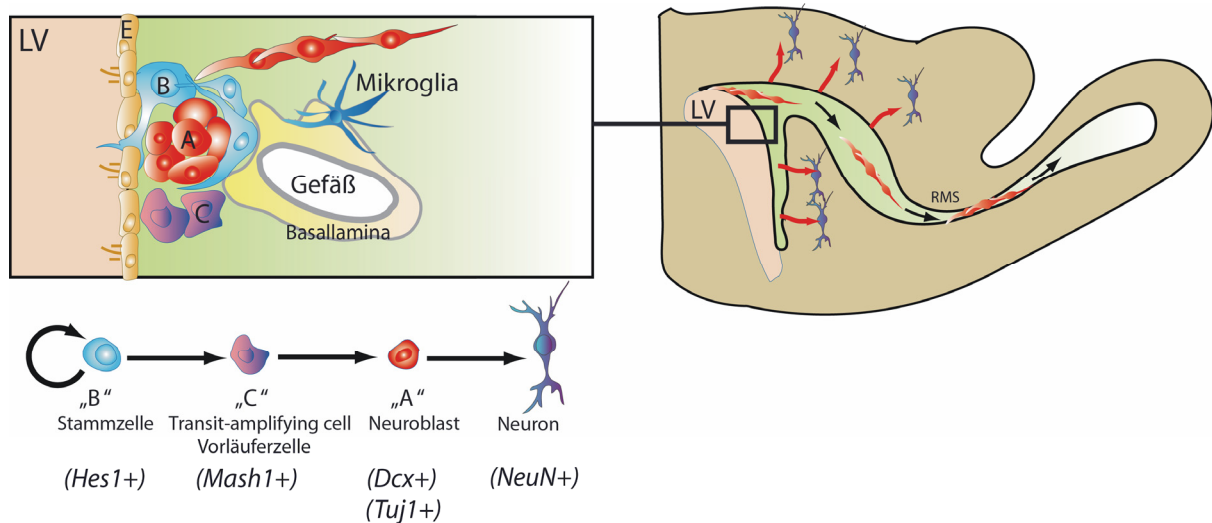


Abb. 4: Neurogenese im olfaktorischen System. In der Seitenwand (SVZ) der lateralen Ventrikel (LV) sind proliferierende Stammzellen (B) angesiedelt, aus denen die „transit amplifying cells“ (C, Vorläuferzellen) hervorgehen und diese wiederum der Ursprung der Neuroblasten (A) sind. Diese Doublecortin+-Zellen (Dcx+) wandern entlang dem rostralen Migrationsstroms (RMS) zum olfaktorischen Bulbus (OB), wo sie ausdifferenzieren und sich in das bestehende Netzwerk integrieren.

Kontinuierlich und lebenslang proliferierende neurale Stamm- und Vorläuferzellen des Hippocampus werden in der subgranulären Zone gebildet und wandern von dort über existierende neuronale Fortsätze und gliale Strukturen in die Körnerzellschicht ein (Seki und Arai, 99). Dort reifen sie zu Neuronen, entsenden Axone in die CA3-Region, bilden Synapsen aus und integrieren sich dabei in das bestehende hippocampale neuronale Netzwerk. Schließlich sind sie weder morphologisch, immunocytochemisch noch elektrophysiologisch von Körnerzellen unterscheidbar (Markakis und Gage, 99); (van et al., 02).

Multipotente neurale Stamm- und Vorläuferzellen können sowohl aus dem embryonalen als auch aus dem adulten ZNS isoliert (Reynolds und Weiss, 92) und als adhärenente Zellkultur oder Suspension-Aggregate, den sogenannten Neurosphären, kultiviert werden. Dabei behalten sie ihre stammzellspezifischen Eigenschaften: Sie sind weiterhin multipotent und besitzen die Eigenschaft der Selbsterneuerung, wodurch sie ein geeignetes *in vitro*-Modell zur Erforschung NVZ darstellen (Reynolds und Weiss, 96). Die Zugabe von Mitogenen, wie dem epidermalen Wachstumsfaktor oder dem basischen

Fibroblasten-Wachstumsfaktor, regen die Proliferation an, während dessen Entzug zur spontanen Differenzierung in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten führt.

1.6 Histon-Code

Im Zellkern eukaryotischer Zellen liegt die DNA in Form von Chromatin vor. Die Grundstruktur stellt das Nucleosom dar. Dieses besteht aus der DNA und je zwei Histonen der Typen H2A, H2B, H3 und H4 (Histonoktamere „core particle“). Die Histone sind wichtige Elemente des Chromatins und dienen der kompakten Verpackung genomischer DNA. Sie besitzen an ihren N-Termini eine Vielzahl positiv geladener Aminosäuren, was ihre DNA-Bindungseigenschaften erklärt. Einzelne Nucleosome sind über Linker-DNA-Einheiten miteinander verbunden. Die eigentliche DNA-Core-Histon-Verbindungen wird durch das Linker H1 stabilisiert (Angelov et al., 01). Alle Core-Histone sowie Linker Histon1 können an mehreren Stellen beispielsweise durch Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung modifiziert werden. Diese Vielfalt an Modifikationen von Core-Histonen ist für den sogenannten „Histon-Code“ verantwortlich und kontrolliert die Funktion und Struktur des Chromatins. Änderungen der Ladung sowie der Konformation von Histonen beeinflussen die Wechselwirkung zwischen Histonen und DNA und spielen eine wichtige Rolle in der Genregulation (Strahl und Allis, 00); (Bradbury, 92).

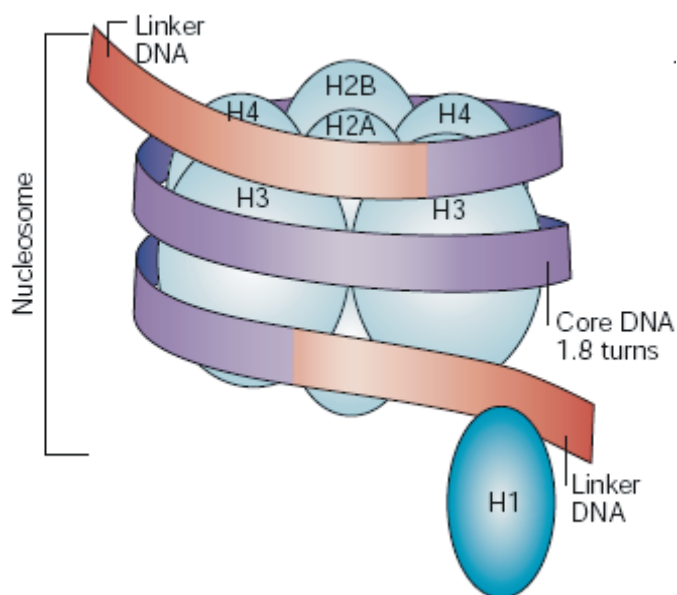


Abb. 5: Darstellung eines Histon-Oktamers bestehend aus der DNA und je zwei Histonen der Typen H2A, H2B, H3 und H4. Die Kern-DNA umspannt das Histon-Oktamer 1,8-mal. Die DNA, die sich vom Histon-Oktamer entfernt, wird als ‚Linker-DNA‘ bezeichnet (entnommen aus Georgopoulos et al., (2002).

Die erstmals durch Allfrey et al. (ALLFREY et al., 64) beschriebene Acetylierung von Core-Histonen gehört inzwischen zu der am besten untersuchten posttranslationalen Modifikation des Histone-Codes. Das Acetylierungsgleichgewicht der Kernhistone wird dabei durch zwei Enzymklassen katalysiert: den Histonacetyltransferasen (HATs) und den Histondeacetyltransferase (HDACs). Durch die HAT wird die unter physiologischen Bedingungen positiv geladene ϵ -Aminogruppe konservierter Lysinreste, in der N-terminalen Region der Core-Histone, durch eine zur Acetylgruppe gebildete Amidbindung neutralisiert. Acetylierungen von Core-Histonen führen allgemein zu einer Abnahme der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen Histon und DNA und resultieren in einer verminderten DNA-Spiralisierung und Destabilisierung des Chromatins (Davie und Delcuve, 91); (Norton et al., 89); (Nightingale et al., 98); (Nightingale und Becker, 98). Eine gelockerte Chromatinkonformation ist die Folge. In der Rückreaktion katalysieren die HDAC die hydrolytische Spaltung der Amidbindung (Abb. 6).

Die reversible Acetylierung von Histonresten spielt eine essentielle Rolle in physiologischen Prozessen. Grundsätzlich kann man sagen, dass aktive Gene hyperacetyliert sind, während eine Stilllegung der Transkription (Silencing) durch eine Hypoacetylierung erfolgt (Grunstein, 97); (Wade et al., 97). Weitere Modifikationen an bestimmten Positionen in Histonen wie z.B. Phosphorylierung (von Serinen), Methylierung (von Lysinen und Argininen) und Ubiquitinierung (von Lysinen) haben ebenfalls Einfluss auf die Transkriptionsregulierung (Turner, 02).

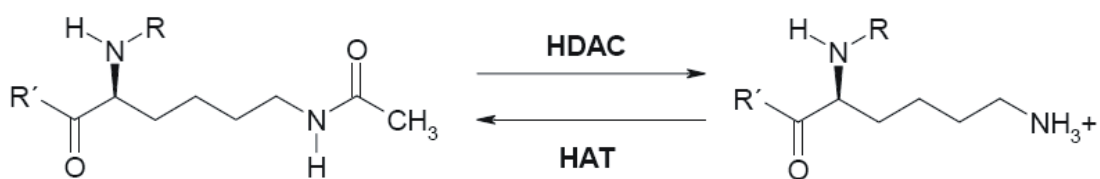


Abb. 6: Darstellung der chemischen Reaktion der HAT und HDAC. Acetylierung bzw. Deacetylierung der ϵ -Aminogruppe konservierter Lysinreste von Histon.

1.6.1 Histondeacetylasen (HDAC)

Bislang konnten zwei verschiedene Enzymfamilien der Histondeacetylasen (HDACs) charakterisiert und identifiziert werden. Die Einteilung der HDAC erfolgte dabei gemäß ihrer Homologie zu den entsprechenden Hefeproteinen. Es handelt sich hierbei zum einen um die Histondeacetylasen und zum anderen um die Sir2-ähnlichen „*silencing information*

regulator 2-Enzyme, auch Sirtuine genannt (Grozinger und Schreiber, 02); (Rice und Allis, 01). Diese Einteilung ist nicht streng konform, denn die Sir2-ähnlichen Enzyme werden auch als Klasse III-Enzyme der Histondeacetylase-Familie bezeichnet, obwohl sich diese wesentlich von Klasse I (HDAC 1-3, 8), Klasse II (HDAC 4-7, 9, 10) und Klasse IV (HDAC 11) unterscheiden. Während die Histondeacetylasen der Klassen I und II bisher ausschließlich in Eukaryonten nachgewiesen werden konnten, findet man die Sir2-ähnlichen Enzyme ebenso in Eukaryonten, wie auch in Bakterien und Archäen. In Eukaryonten wurden bislang sieben Sir2-Gene identifiziert und als *silent mating type information regulation 2 homolog 1-7* (Sirt 1-7) benannt. Die 275 Aminosäuren umfassende katalytische Domäne weist keinerlei Verwandtschaft zu denen der Histondeacetylasen Klasse I und II auf. Zusätzlich besitzen die Sir2-ähnlichen Enzyme einen von den HDACs abweichenden NAD-abhängigen Reaktionsmechanismus und werden daher nicht von reversiblen HDAC-Inhibitoren wie Trichostatin A (TSA) gehemmt (Grozinger und Schreiber, 02). Das in der vorliegenden Arbeit detaillierter untersuchte Sirt1 könnte dabei aufgrund seiner Abhängigkeit vom NAD⁺/NADH-Gleichgewicht als möglicher Sensor für metabolische Änderungen, ausgelöst durch intrazelluläre Redox-Schwankungen, dienen. In der Vergangenheit wurde Sirt1 bereits als Redox-Sensor in embryonalen murinen Fibroblasten und undifferenzierten Muskelzellen identifiziert (Brunet et al., 04).

1.7 Basische Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren der basischen Helix-Loop-Helix-Familie (bHLH) spielen in vielen Organismen eine wichtige Rolle. Diese sehr heterogene Familie von Proteinen ist innerhalb verschiedener Gewebe an der Regulation von Determinierungs- und Differenzierungsprozessen beteiligt. Genetische Studien an *Drosophila* und Vertebraten haben gezeigt, dass eine kleine Gruppe von pro-neuronalen Genen von großer Bedeutung für die Entwicklung neuronaler Zellen und deren Vorläuferzellen ist. Diese pro-neuronalen Gene gehören nicht nur der Klasse von bHLH-Transkriptionsfaktoren an, sondern deren Transkription wird auch durch selbige gesteuert (Ross et al., 03); (Bertrand et al., 02). Die bHLH-Proteine erhielten ihren Namen aufgrund ihrer Helix-Loop-Helix-Struktur. Sie besitzen eine basische DNA-Bindungsdomäne (Alanin-Threonin) mit hoher Affinität für stark konservierte Sequenzen (CANNTG) in Promotorregionen (Regulationsbereiche = sog. „E-Boxen“), gefolgt von zwei α -Helices, die über eine variable Schleife („Loop“-Region) verknüpft sind. Ein notwendiger Schritt für die DNA-Bindung und Stimulation der E-Box ist

die Interaktion zweier bHLH-Proteine zu einem Heterodimer (Dimerisation, (Sasai et al., 92). Es gibt zwei Arten von bHLH-Genen: die Repressoren und die Aktivatoren. Die Hes-Gene, Homolog des *Drosophila Hairy* and *enhancer of split*, gehören den Repressor-bHLH-Genen an. Diese sind sowohl an der Regulation neuronaler Stamm- und Vorläuferzellen als auch an der Bildung von Gliazellen beteiligt, während die Aktivator-bHLH-Gene wie Mash1 (*mammalian achate schute homolog*), Math und NGN (Neurogenin) zur Neurogenese beitragen.

Mitglieder der Hes-Familie besitzen neben der bHLH-Domäne am Carboxyterminus ein WRPW-Motiv (Trp-Arg-Pro-Trp). Dieses nur vier Aminosäure lange Peptid ist entscheidend für die Proteininteraktion mit dem Korepressor *groucho* (Gro) *Transducin Like Enhancer of split* (TLE1) und für die Rekrutierung der HDAC verantwortlich. Die Rekrutierung der HDAC führt zur Konformationsänderung des Chromatins, wodurch die Transkription bestimmter Gene inhibiert werden kann (Paroush et al., 94); (Grbavec und Stifani, 96). Die DNA-Bindung erfolgt ebenfalls an spezifischen Erkennungssequenzen. Die meisten bHLH-Proteine binden an E-Box-Sequenzen (Murre et al., 89). Hes-Proteine bevorzugen hingegen die N-Box-Sequenz CACGCG (Akazawa et al., 92); (Ohsako et al., 94).

Von den sieben Mitgliedern der Hes-Familie werden Hes1, Hes3 und Hes5 verstärkt in neuronalen Stammzellen exprimiert (Akazawa et al., 92); (Allen und Lobe, 99). Hes1 scheint dabei als Repressor die verfrühte neuronale Differenzierung im sich entwickelnden Gehirn zu verhindern, indem es direkt an den Mash1-Promotor bindet (Ishibashi et al., 95). Mash1 ist im Rahmen der neuronalen Differenzierung auf die Heterodimerisierung mit anderen bHLH-Faktoren angewiesen. Hes1 kann jedoch mit diesen für die Mash1-Aktivität wichtigen Bindungspartnern einen funktionsunfähigen Komplex bilden (Chen et al., 97); (Sasai et al., 92); (Ross et al., 03). Somit kann Hes1 sowohl die Transkription von Mash1 unterdrücken als auch auf Proteinebene inhibierend auf dessen Aktivität wirken. Genetische Analysen belegen, dass die Expression der pro-neuronalen bHLH-Gene Mash1, Math und Ngn genügt, um die Generierung NVZ zu fördern (Bertrand et al., 02). Dabei besitzen die Transkriptionsfaktoren eine duale Funktion: Zum einen induzieren sie die Expression pro-neuronaler Gene und bestimmen dadurch das Schicksal NVZ, und zum anderen sind sie für die Spezifizierung von Neuronen verantwortlich. Ein Gleichgewicht zwischen Hes1 und Mash1 ist somit zwingend erforderlich, um eine physiologische Entwicklung des ZNS zu gewährleisten. Die Überexpression von Hes1, Hes3 und Hes5 im embryonalen Gehirn führt zu einer übermäßigen Bildung glialer Strukturen auf Kosten der neuronalen Differenzierung (Ishibashi et al., 94); (Ohtsuka et al., 01); (Hirata et al., 00). Hes1/Hes5 defiziente Mäuse zeigen hingegen eine vorzeitige und übermäßige Differenzierung von Neuronen (Ishibashi et al., 95); (Hatakeyama et al., 04). Zusätzlich

beeinflussen Hes1 und Hes5 die Proliferation von kultivierten NVZ (Ohtsuka et al., 01). Die gemeinsame transiente Hes1- und Mash1-Expression zeigt sich nur vor dem Differenzierungsprozess in Stammzellen innerhalb der neurogenen Zonen. Die neuronal differenzierenden NVZ, die aus der SVZ wandern, exprimieren dagegen nur noch Mash1. Weitere bHLH-Gene wie *Olig1* und *Olig2* sind essentiell für die Oligodendrogenese verantwortlich (Fukuda et al., 04); (Fukuda und Taga, 05).

1.8 Oxidativer Stress, neurodegenerative Erkrankungen und Neurogenese

Oxidativer Stress wird definiert als die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen pro-oxidativem und anti-oxidativem Potenzial zugunsten der pro-oxidativen Seite, beispielsweise infolge erhöhter Konzentrationen an reaktiver Sauerstoffspezies (RSS).

Die endogene Produktion von RSS im Organismus ist ein permanenter Vorgang. Ungefähr 2 % des in den Mitochondrien verarbeiteten Sauerstoffs wird in die Radikalform umgewandelt. Infolge von oxidativem Stress kommt es zur Schädigung der Zellen, z.B. durch DNA-Strangbrüche, Proteinmodifikationen und Lipidperoxidation (Halliwell, 99); (Halliwell, 01). Somit ist es unabdingbar, dass es eine Reihe von Mechanismen zur Entgiftung dieser Verbindungen gibt. Das Gehirn scheint aufgrund seines Sauerstoffumsatzes (20 % des aufgenommenen Sauerstoffes) von allen Organen am meisten gefährdet zu sein. Es ist unumstritten, dass in den meisten neurodegenerativen Erkrankungen oxidativer Stress auftritt und eine Verbindung zur Neurodegeneration besteht (Zipp und Aktas, 06). Der Morbus Parkinson, die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung, ist durch den Verlust dopaminergener Neurone in der Substantia nigra gekennzeichnet. Oxidativem Stress kommt hierbei wahrscheinlich eine Schlüsselrolle bei der Fehlfaltung und Aggregatbildung von Proteinen zu (Dauer und Przedborski, 03). Pathologisch konnten im Gehirn von Parkinson-Patienten erhöhte Protein-, Lipid und DNA-Oxidation nachgewiesen werden (Alam et al., 97); (Dexter et al., 89), (Dexter et al., 89), (Kikuchi et al., 02). Oxidativer Stress kann zudem die Degeneration der dopaminergen Neuronen verursachen (Jenner und Olanow, 98). Auch bei der vererbaren Huntingtonschen Erkrankung (HD) spielt oxidativer Stress eine Rolle, da durch die Antioxidativa, wie N-acetyl-L-Cystein und Glutathion, die Apoptose von Neuronen reduziert werden konnte und daher RSS als Auslöser diskutiert werden (Wytttenbach et al., 02). Zur Anreicherung von Proteinaggregaten kommt es auch bei der häufigsten Demenzform, der Alzheimer-Erkrankung (ALS). Hierbei führen β -Amyloid-

Ablagerungen zur Bildung hoher RSS-Konzentration und zu einer Verringerung endogenen Antioxidantien (Butterfield und Boyd-Kimball, 04).

Die pathogenetische Ursache vieler entzündlicher neurodegenerativer Erkrankungen könnte in einer Fehlleitung anti-oxidativer Mechanismus zu finden sein. Ein wichtiger anti-oxidativer Mechanismus zur Bekämpfung von RSS stellt unter anderem der Glutathionstoffwechsel und das dadurch gebildete Glutathion (GSH) dar, welches durch Elektronenübertragung RSS unschädlich macht. Hinweise darauf, dass Störungen des GSH-Stoffwechsels an neurologischen Erkrankungen beteiligt sind, kommen beispielweise aus dem Morbus Parkinson (=Idiopathischen Parkinsonsyndrom (IPS)) und dem Tiermodell der MS, der EAE. In der Substantia nigra von IPS-Patienten ist der Gehalt an GSH im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen um 40 bis 50 % verringert (Sian et al., 94b); (Pearce et al., 97). Bei Patienten mit einer präsymptomatischen Form (Incidental Lewy Body Disease) des Morbus Parkinson ist in der substantia nigra ebenfalls ein verringerter GSH-Gehalt festgestellt worden (Dexter et al., 94). Beispielsweise wurden erhöhte Aktivitäten der γ -Glutamyltransferase (GT) in der substantia nigra von Parkinson-Patienten gefunden (Sian et al., 94b); (Sian et al., 94a). Auch bei der Huntingtonschen Erkrankung ist im Gehirn von Ratten und Menschen die Aktivität des Enzyms erhöht (Butterworth et al., 1985; Zhu et al., 1990). Ebenso ist nach einem ischämischen Infarkt des Gehirns die GT-Aktivität im humanen Serum gesteigert (D'Erasmus et al., 93). Ferner zeigen EAE-Tiere mit erhöhtem GSH-Spiegel eine geringe Krankheitssuszeptibilität (Mohamed et al., 03).

Die Rolle von oxidativem Stress als Auslöser entzündlicher neurodegenerativer Erkrankungen ist bislang noch nicht geklärt, jedoch weisen die bisherigen Befunde auf eine wichtige Rolle in der sekundär-vermittelten Zellschädigung. Eine therapeutische Minderung des oxidativen Stresses in den betroffenen Gehirnregionen könnte möglicherweise die fortschreitende Zellschädigung aufhalten und endogene Regenerationsprozesse begünstigen. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass oxidativer Stress die Möglichkeiten der Regeneration behindert. Dies ist relevant für weitere therapeutische Ansätze, die auf endogene und exogene NVZ zurückgreifen. Diese besitzen durch ihre Fähigkeit, Neurone, Astrozyten oder Oligodendrozyten zu generieren, ein enormes regeneratives Potenzial zur Kompensation von Schädigungen des ZNS (McKay, 97); (Wernig und Brustle, 02). Sowohl die reaktive Astroglie, die für eine verminderte Regeneration von Neuronen verantwortlich gemacht wird, als auch oxidativer Stress gehen mit einer Vielzahl neurologischer Erkrankungen einher (Zipp und Aktas, 06). Erst kürzlich konnte eine Beeinträchtigung der typischen Stammzeleigenschaften durch oxidativen Stress anhand glialer Vorläuferzellen aufgezeigt werden. Dabei wurde die

Balance zwischen Selbsterneuerung und Differenzieren dieser Vorläuferzellen durch Änderungen des intrazellulären Redox-Gleichgewichts moduliert (Smith et al., 00). Die verantwortlichen zellulären und molekularen Ursachen, die für das Ausbleiben neuronaler Regeneration im ZNS verantwortlich sind, blieben bislang jedoch völlig unverstanden. Ein Ziel ist es deshalb, die Auswirkung von oxidativen Stress auf die Eigenschaften von NVZ zu untersuchen, um später das regenerative Potenzial endogener und exogener NVZ besser nutzen und modulieren zu können.

2 Zielsetzung

Entzündliche Schädigungen im Nervensystem treten nicht nur bei der Multiplen Sklerose (MS), sondern auch bei einer Vielzahl weiterer Schadensprozesse wie bei neurodegenerativen Erkrankungen auf. Gekennzeichnet sind diese primär wie auch sekundär entzündlichen neurodegenerativen Erkrankungen durch eine eingeschränkte Regeneration von Nervenzellen und übermäßiges Auftreten von Astrozyten. Allerdings ist bislang nicht bekannt, welche entzündlichen Faktoren für eine frühe neuronale Schädigung verantwortlich sind und welche Faktoren zu einem übermäßiges Auftreten von Astrozyten beitragen. Daher gliedert sich diese Arbeit in zwei Teile:

2.1 Rolle von TRAIL in der Neuroinflammation

Vorarbeiten haben gezeigt, dass Apoptose-regulierende Systeme, wie z.B. der TRAIL-Signalweg, an der Immunregulation und an Schädigungsprozessen im Gehirn beteiligt sind. Hier blieb zu klären, ob der immunregulatorische Mechanismus oder/und der Schädigungsmechanismus durch TRAIL die Pathogenese der Neuroinflammation mitbestimmen und ob man trotz einer möglichen dualen Rolle des TRAIL-Signalwegs in diese Mechanismen gezielt therapeutisch eingreifen kann. Zur Klärung dieser Frage sollte:

1. innerhalb der EAE, dem Tiermodell der entzündlichen Autoimmunerkrankung MS, das TRAIL-System pharmakologisch blockiert und die Auswirkung auf den Krankheitsverlauf untersucht werden. Darüber hinaus sollte der Transfer von enzephalitogenen, TRAIL-defizienten T-Zellen in naive Rezipienten klären, inwiefern TRAIL als Effektormolekül auf T-Zellen in den Schädigungsprozessen der Neuroinflammation beteiligt ist.
2. in einem weiteren neuroinflammatorischen Tiermodell, der bakteriellen Meningitis, die Rolle des TRAIL-Systems in der Leukozytenkinetik analysiert werden. Hier stand der Nachweis der TRAIL-R2 Expression auf Granulozyten, die in diesem Krankheitsmodell als Effektoren die Entzündungsreaktion vermitteln, im Vordergrund. Eine mögliche Beeinflussung des Migrationsverhaltens aktivierter Granulozyten durch das TRAIL-System war ebenfalls Bestandteil der Untersuchungen.

2.2 Mechanismen gestörter neuronaler Regeneration und reaktiver Astroglie

Entzündliche neurodegenerative Prozesse zeigen eine eingeschränkte Regeneration von Nervenzellen und ein übermäßiges Auftreten von Astrozyten. Diese sog. reaktive Astroglie wird in diesem Zusammenhang für eine unzureichende neuronale Regeneration im ZNS verantwortlich gemacht. Neuronale Stammzellen besitzen durch ihre Fähigkeit der Selbsterneuerung und der Multipotenz ein enormes regeneratives Potenzial im adulten ZNS. Daher sind Kenntnisse über die Mechanismen, die den endogenen Pool neuronaler Stammzellen im ZNS regulieren, von besonderer Bedeutung für die Entwicklung neuer therapeutischer, insbesondere regenerativer Ansatzpunkte um künftig intrinsische Regenerationsprozesse nach Schädigungen des ZNS zu stärken. Bislang ist jedoch nicht bekannt, welche Faktoren die neuronale und astrogliale Entwicklung aus adulten Stammzellen reziprok regulieren können. Studien deuten auf extrinsische Faktoren, die das intrazelluläre Redox-Gleichgewicht beeinflussen, wie sie auch in einer Vielzahl entzündlicher Erkrankungen auftreten. Daher sollte:

1. an neuronalen Vorläuferzellen aus dem murinen ZNS untersucht werden, welche Auswirkungen milde, nicht toxische Veränderungen des Redox-Gleichgewichts, verursacht durch Blockierung der Glutathionsynthetase, auf die Selbsterneuerung und Multipotenz haben.
2. an neuronalen Vorläuferzellen analysiert werden, wie sich Änderungen des intrazellulären Redox-Gleichgewichts auf die Expression der Histondeacetylase Sirt1 auswirken und die Regulation pro-neuronaler Gene beeinflussen. Damit verbunden sollte überprüft werden, inwiefern eine direkte Modulation der Sirt1-Expression/Aktivität (bei konstantem Redox-Gleichgewicht) einen Einfluß auf die Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen und damit auf die neuronale Regeneration hat.
3. die Relevanz der unter Punkt 2 erhaltenen Ergebnisse *in vivo* untersucht werden. Hierzu sollte in postnatalen Tieren eine Modulation der Glutathionsynthetaseaktivität sowie der Sirt1-Expression oder -Aktivität erfolgen und die Auswirkungen auf neuronale Vorläuferzellen immunhistochemisch sowie molekularbiologisch analysiert werden. Abschließend galt es, die gewonnenen Erkenntnisse auf das Tiermodell der MS zu übertragen.

3 Material und Methoden

3.1 Laborartikel

3.1.1 Puffer, Lösungen, Zellkulturmedien

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	137,0 mM NaCl, Merck, Germany 2,7 mM KCl, Roth, Germany 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , Merck, Germany 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , Sigma, Germany pH 7,2
Neurobasalmedium (NBM)	NBM, Gibco, UK, Germany 2 % B27, Sigma, Germany 1 % GlutaMAX-I, Sigma, Germany 10 ng/ml bFGF, Sigma, Germany 1 ng/ml EGF, Sigma, Germany
Wasch-und Sortierpuffer PBS/BSA	PBS 1 % (w/v) bovines Serumalbumin (BSA), Sigma, Germany 0,5 % Natriumazid (NaN ₃), Sigma, Germany
Zellkulturmedium Maus (KM)	RPMI-1640, Seromed, Austria 10 % Fetales Kälberserum (FCS), Sigma, Germany 50 µM 2-Mercaptoethanol, Sigma, Germany 100 U/ml Penicillin, Seromed, Austria 100 µg/ml Streptomycin, Seromed, Austria
Waschmedium Maus (WM)	RPMI-1640 15 % (FCS), Sigma, Germany 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml
FACS-Puffer (PBA)	PBS 1 % (w/v) BSA 0,5 % Natriumazid (NaN ₃), Sigma, Germany
Erythrozyten-Lyse-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0

	320 mM Saccharose, Sigma, Germany
	5 mM MgCl ₂
	1 % Triton X-100, Sigma, Germany
Zellfixierlösung (PFA)	PBS
	2 % Paraformaldehyd
Kern-Lysispuffer	50 mM Tris-HCl pH 8,1
	10 mM EDTA
	1 % SDS
Chip-lysispuffer	50 mM Tris-HCl pH 8,1
	10 mM EDTA
	1 % SDS
	10 mM Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)
	10 mM PMSF (Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid)
	10 mM Aprotinin (alles Sigma, Germany)
Radioimmunpräzipitations (RIPA)-Puffer	1 x PBS
	1 % Nonidet P40
	0,5 % Natruimdeoxycholat
	0,1 % SDS (Laurylsulfat) (alles Sigma, Germany)
2 x SDS - Ladepuffer	50 mM Tris-HCl pH 6,8
	100 mM DTT
	2 % SDS
	0,1 % Bromphenolblau
	10 % Glycerol (alles Sigma, Germany)
DNA-Ladepuffer	0,25 % Bromphenolblau
	0,2 % Xylencyanol
	15 % Ficoll (alles Sigma, Germany)
10 x Elektrophoresepuffer	0,25 M Tris pH 8,3
	1,92 M Glycin
	1 % SDS (alles Sigma, Germany)
1 x Blotpuffer	2.5 mM TrisOH
	11 mM Glycin
	20 % Methanol (alles Sigma, Germany)
1 x Blockpuffer	1 M Tris-HCl pH 7.5

	0.15 M NaCl
	0.1 % Tween 20
	5 % Magermilchpulver
	2 % BSA
	0.1 % NaN ₃ (alles Sigma, Germany)
TBST-Buffer	10 mM Tris HCl pH 7,5
	0,15 M NaCl
	0,1 % BSA
	0,1 % NaN ₃
TAE-Puffer	40 mM Tris pH 8,0
	1 mM EDTA
	40 mM Natriumacetat
Waschpuffer	PBS
	0,005 % Tween 20
IP-Puffer	16,7 mM Tris-Cl pH 8,2
	0,01 % SDS
	1,1 % Triton
	1,2 mM EDTA
	167 mM NaCl
IP-Blockpufer	IP-Puffer
	0.5 % BSO (w/w)

3.1.2 Sonstige Reagenzien und Chemikalien

α-Liponsäure	Sigma-Aldrich, Germany
30 % Bisacrylamid-Lösung	Bio-Rad, USA
[Methyl-P3PH]-Thymidin: (185 GBq/mmol, 5,0 Ci /mmol 777 MBq/mg, 21 mCi/mg)	Amersham, Germany
Agarose	Serva, Germany
Amersham ECL Plus	Amersham Biosciences, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Gibco, UK
BCA-Protein Assay Kit	Pierce, USA
BSA Standard	Interchim Uptima, France

BSO	Sigma-Aldrich, Germany
Cambinol	Merck, Germany
Complete Freund's Adjuvans (CFA)	Sigma, Germany
Concanavalin A	Sigma, Germany
Cremophor EL	BASF, Germany
ddH ₂ O	Gibco, UK
Dimethylsulfoxid	Sigma, Germany
DNase	Sigma, Germany
Ethidiumbromid	Sigma, Germany
Ficoll	Sigma, Germany
Hyperfilm™ ECL	Amersham Biosciences, USA
GFX-PCR DNA-Purification-Kit	Amersham Biosciences, USA
ImmunoMount	Thermo EleCtron Corporation, USA
Kollagenase I	Sigma, Germany
Lipid β-Argfektin35-plus	Atugen, Germany
Lipopolysacharid (LPS)	Sigma, Germany
Leukotrien B4 (LTB4)	Sigma, Germany
Magermilchpulver	Fluka, Germany
2 x PCR Mastermix für qRT-PCR	EGT-Groupe, France
MOG: MOG35-55 Reinheit > 95 % (Y R S P F S R V V H L Y R N G)	Pepceuticals, Leicester, UK
N,N,N',N'-Tetramethylenethylendiamin (TEMED)	Gibco, UK
Paraformaldehyd (PFA)	Serva, Germany
peqGOLD Trifast™	peqLAB Biotechnologie GmbH
Percoll	Sigma, Germany
Pertussis-Toxin (PTx)	Sigma, Germany
PLP: P139-151 Reinheit > 95 % (H S L G K W L G H P D K F)	Pepceuticals, Leicester, UK
Poly-L-Ornithin (0.01 % Lösung)	Sigma, Germany
Precision Plus Protein™ Marker	Bio-Rad, USA
Protein A-Sepharose: lyophilisiert	Sigma, Germany
Protein G-Sepharose: lyophilisiert	Sigma, Germany
Rabbit IgG TrueBlot Set	eBioscience, USA
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, USA

Sirtinol	Sigma-Aldrich, Germany
Splitomicin	Sigma-Aldrich, Germany
TEMED	Gibco, UK,
Tissue-Tek® Compound	Sakura, USA
Trichostatin A	Sigma-Aldrich, München
Triton X-100	Sigma, Germany
Trypanblau Lösung (0,4 %)	Sigma, Germany
Tween 20	Merck, Germany
Ziegen Serum	Gibco, UK, Invitrogen, USA Cooperation

3.1.3 Kunststoffartikel und sonstige Verbrauchsmaterialien

MicroAmp-Platte	Applied Biosystem, USA
Nitrocellulose-Membran	S&S Protran® BA Porengröße 0.45 µm, Schleicher & Schuell, Germany
Kanülen, Spritzen	HSW, Braun, Germany
Kryo-Tubes	Nunc, UK
Petrischalen, 6-, 12-, 48- und 96- Loch	Corning/Costar, USA
Pipetten	Eppendorf, Germany
Pipetus	Hirschmann, Germany
Rundbodenröhrchen 5 ml (FACS)	Falcon
T-50, T-75 Kulturflaschen	Becton Dickinson
Transwell 5 µm Porengröße	Costar, USA
Vacutainer	Becton Dickinson, Germany
Zellsieb (70 µm)	Falcon, Germany

Reaktionsgefäße, Pipettenaufsätze und sonstige Verbrauchsmaterialien stammten von den Firmen Biozym, Eppendorf, Corning und Sarstedt

3.1.4 Geräte

ABI PRISM 7000 Sequence Detection	Applied Biosystems, Germany
Mastercycler	
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson, Germany
Elektrophorese Kammer	Biometra, Germany
Blotkammer Criterion™ Blotter	Bio-Rad, USA
Kodak X-Omat 1000 Processor	Kodak, Germany

Inkubatoren, B6, BB16 CU	Heraeus
Magnetrührer	Eppendorf, Germany
Mikroskope	
Wilovert, inverses Mikroskop	Hund Wetzlar, Germany
Fluoreszenzmikroskop DMRA	Leica, Germany
Kamera (Infinity 2)	BFi Optilas
Neubauer Zählkammer	Brand, Germany
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss, Germany
Photometer MRX™ II	DYNEX Technologies, Germany
Pipettierhilfe	Integra Biosciences, USA
Pipetten	Gilson
Schüttler Unimax2010	Heidolph, Germany
Spektrophotometer DN-1000	NanoDrop Technologie Inc., USA
Sterilbank, HeraSafe	Heraeus
Stickstofftank	
Teesieb	
Transilluminator 312 nm Biometric,	Kisker Biotech
Digital Graphic Printer, UP-D890	Sony
Ultraschallgerät, Sonoplus HD70	Bandelin
Vortexer	Scientific Industries, UK
Wasserbad	
Zentrifugen	
Megafuge 1.0R	Heraeus
Biofuge 22R	Heraeus
5417 C	Eppendorf; Germany
5417 R	Eppendorf; Germany

3.1.5 Primersequenzen

Zielgen	Spezifizierung	Primer (5'→ 3')	Sequenz
HDAC1	NM_008228.2	Forward	GGATGTTGGAACTACTATTATGGACAAG
		Reverse	CCTCAGCATTGGCTTTGTGA
HDAC2	NM_008229.2	Forward	CTATACCATCTCTCATGGGAAAATTGAC
		Reverse	TCCATAAATATGGGGAATACTTTCCT
HDAC3	NM_010411.2	Forward	AGTCAGCCCCACCAATATGC
		Reverse	CCTGTGTAACGGGAGCAGAACT
Hes1	NM_008235.2	Forward	CAGACATTCTGGAAATGACTGTGAA
		Reverse	CGCGGTATTTCCCAACAC
		Probe (Fam/TAMRA)	CACCTCCGGAACCTGCAGCG
Hes5	NM_010419.4	Forward	GGCGGTGGAGATGCTCAGT
		Reverse	GCTGCTCTATGCTGCTGTTGA
Mash1 (Ascl1)	NM_008553.4	Forward	GAGGGATCCTACGACCCTCTTAG
		Reverse	TTTCTGCCTCCCCATTTGAC
		Probe (Fam/TAMRA)	CCTGCATCTTTAGTGTTTCTCGCCAACG
NeuroD1	NM_010894.2	Forward	AATTCGCCCACGCAGAAG
		Reverse	GCTGTATGATTTGGTCATGTTTCC
Olig1	NM_016968.4	Forward	ACGTCGTAGCGCAGGCTTAT
		Reverse	CTCGCCCAACTCCGCTTAC
Olig2	NM_016967.2	Forward	CCGAAAGGTGTGGATGCTTATT
		Reverse	CTAAGCTCTCGAATGATCCTTCTTTT
Sirt1	NM_019812.1	Forward	GATGACGATGACAGAACGTCACA

		Reverse	GGATCGGTGCCAATCATGAG
		Probe (Fam/TAMRA)	CGCGGATAGGTCCATATACTTTTGTTCAGC AAC
TLE1	NM_011599.3	Forward	GCTGCGTGCTGTCCCTAAAG
		Reverse	CACAGCTAAGCACTGATGAAGATTCT

Primer für die ChIP-Analyse

β-Actin	NM_007393.3	Forward	CGGCCCAGGCTTAGTCTTG
		Reverse	CAGTGGTCCAATAACTGGAGGTG
Mash1 (Ascl1)	NM_008553.4	Forward	GGCTCCCGAAGCCAACC
		Reverse	GGCTGCGAAGCACGATCA
		Probe (Fam/TAMRA)	CCCAGGCACCTTCCTCCGCTG

3.1.6 FACS Antikörper

Name	Klon	Konzentration	Herkunft
α-m-CD3-FITC-	145-2C11	0,5 µg/ml	Pharmingen, Germany
α-m-CD11b-APC	M1/70	0,2 µg/ml	Pharmingen, Germany
α-m-CD25-APC	PC61	0,2 µg/ml	Pharmingen, Germany
α-m-CD44-Biotin	IM7	0,5 µg/ml	Pharmingen, Germany
α-m-CD54-Biotin	3E2	0,5 µg/ml	Pharmingen, Germany
α-m-Gr-1-PE	R36-8C5	0,2 µg/ml	Pharmingen, Germany
α-m-TRAIL-R2		1,0 µg/ml	Alexis, Germany

Zweit-Antikörper/ Isotypkontrolle

APC Isotyp	rat IgG2κ	0,1 µg/ml	Pharmingen, Germany
APC Isotyp	rat IgG1κ	0,2 µg/ml	Pharmingen, Germany
PE Isoty	rat IgG2κ	0,2 µg/ml	Pharmingen, Germany
Bio Isotyp	hamster IgG1κ	0,5 µg/ml	Pharmingen, Germany
Bio Isotyp	rat IgG2κ	0,5 µg/ml	Pharmingen, Germany
SA-APC		0,5 µg/ml	Pharmingen, Germany
SA-PerCP		0,5 µg/ml	Pharmingen, Germany
α-goat-FITC			Invitrogen, USA

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Zellkultur

Alle Materialien, die in Kontakt mit Zellen kamen wurden sterilisiert. Das Tiersektionsbesteck sowie Instrumente wurden für 5 min abgekocht und anschließend in 70 % Ethanol desinfiziert. Sämtliche weiteren Geräte, Puffer sowie Medien wurden für 20 min bei 120°C und 1 bar Überdruck autoklaviert bzw. sterilfiltriert. Beim Umgang mit den Zellen wurde unter einer Sterilbank gearbeitet. Die Zellkultivierung erfolgte stets in Brutschränken bei einer Temperatur von 37°C, einer Luftfeuchte von 95 % und einer CO₂ Konzentration von 5 %.

Stocklösungen von alpha-Liponsäure (α -LA, 250 mM), Resveratrol (100 mM), Sirtinol (500 μ M) und Splitomicin (1mM) wurden in 100 % DMSO hergestellt. Buthioninsulfoximin (BSO, 100 mM, pH 7,0), N-Acetylcystein (NAC, 200 mM, pH 7,0) und Diethyldithiocarbamat (DETC, 100 mM) wurden in H₂O gelöst. Kurz vor dem Experiment wurden die Stocklösungen in NBM verdünnt. Als Vehikellösung wurde routinemäßig in allen experimentellen Bedingungen 0,005 %iges (v/v) DMSO in NBM verwendet.

3.2.2 Zellzählung

Hierzu wurden die Zellen eins zu eins mit Trypanblau gemischt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Unter dem Mikroskop wurden dann die Zellen in 16 Feldern eines Quadrats ausgezählt (n), wobei tote Zellen dadurch ausgeschlossen werden konnten, dass sie den Farbstoff aufnehmen und blau erscheinen. Die Gesamtzahl der vitalen Zellen ergab sich aus der folgenden Formel:

Gesamtzellzahl = n x Verdünnungsfaktor (Trypanblau) x ml Resuspensionsvolumen x 10⁴
(Neubauer-Faktor)

Danach wurden die Zellen wieder gewaschen und auf eine Konzentration von 2 x 10⁶ Zellen pro ml in Kulturmedium (KM) gebracht.

3.2.3 Zellgewinnung

3.2.3.1 Milz

Zur Gewinnung von Maus-Milzzellen wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet, mit 70 % Ethanol desinfiziert und mittels eines medianen Längsschnitts am Bauch das Peritoneum freigelegt. Die dann sichtbare Milz wurde mit einer desinfizierten Pinzette gelöst und in Waschmedium aufgenommen. Alle folgenden Arbeiten wurden in einer Sterilbank und auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Die Milz wurde durch ein Teesieb gedrückt, durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in einer 10 ml Pipette weitgehend zerkleinert und mit Waschmedium gewaschen. Dazu wurden die Zellen in 50 ml Medium aufgenommen und mit 500xg bei 4°C für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet wiederum in Waschmedium resuspendiert. Zur Entfernung der in der Milz vorhandenen Erythrozyten wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Zu dem Zellpellet wurden dafür 10 ml Erythrozyten-Lysis-Puffer und 5 ml Waschmedium hinzugegeben, sofort abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach einem weiteren Waschschrift wurde das weiße Pellet in 20 ml Waschmedium aufgenommen, die Zellzahl bestimmt und wieder gewaschen. Abschließend wurden die Zellen auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen pro ml in Kulturmedium gebracht.

3.2.3.2 Lymphknoten

Die Lymphknoten wurden an der Mesenterialwurzel bzw. im Bereich der tiefen lateralen Halsregion dargestellt und entfernt. Alle folgenden Schritte waren identisch zur Aufarbeitung der Milzzellen.

3.2.3.3 Zentrales Nervensystem

Zur Gewinnung von Lymphozyten aus dem ZNS musste zuerst das gesamte Blut aus dem Gefäßsystem entfernt werden. Dazu wurden die Tiere narkotisiert und mit eiskaltem PBS perfundiert. Dann wurden Schädel und Wirbelsäule vom umliegenden Gewebe befreit und mit Hilfe einer kleinen Schere eröffnet, Rückenmark und Gehirn gelöst und in eine Petrischale gelegt. Dort wurden sie mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und in 5 ml IMDM Medium aufgenommen, welches mit 200 U/ml DNase und 300 U/ml Kollagenase versetzt war. Dieses Gemisch wurde in einem Rotator bei 37° für 30 min gerührt. Nach Ablauf der Zeit wurde die Suspension über ein Zellsieb gegeben und mit kaltem IMDM Medium gewaschen. Dann wurde das Pellet in 6 ml 40 %iger Percolllösung resuspendiert und 6 ml einer 70 %igen Percolllösung damit überschichtet. Anschließend

wurde bei Raumtemperatur (RT) für 30 min und 550xg ohne Bremse zentrifugiert, sofort die Interphase abgenommen und in IMDM gewaschen.

Die Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen, gezählt und auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen pro ml gebracht.

3.2.4 Präparation und Kultivierung von NVZ

Die Isolierung neuraler Stamm- und Vorläuferzellen aus dem zerebralen Kortex von C57BL/6 Mäusen wurde im Embryonalstadium E17 (Tag 17 nach Befruchtung) durchgeführt. Dazu wurde unter sterilen Präparationsbedingungen das Peritoneum einer terminiert verpaarten C57BL/6 Maus eröffnet, der Uterus freigelegt, die Schädel der E17 Tiere abgetrennt und diese in eiskaltem PBS gesammelt. Anschließend wurde das Cerebellum und die Kortizes isoliert, in eiskalten HBSS+/+ (Hank's balanced salt solution mit Ca^{2+} , Mg^{2+} und 100 U/ml Penicillin-Streptomycin) aufbewahrt. Nach Entfernung der Meningen folgte die mechanische Zerkleinerung der Kortizes in 1 mm große Stücke. Die Gewebestücke wurden zweimal bei 250xg für 2 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in HBSS-/- (Hank's balanced salt solution ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) resuspendiert. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Gewebepellet in Trypsinlösung (0.025 % Trypsin (v/v) in HBSS -/-) mit 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNase aufgenommen und für 30 min bei 37°C verdaut. Der Verdaustopp erfolgte durch Zugabe von FKS (fetales Kälberserum, 10 % (v/v)), wonach auf das gewünschte Volumen aufgefüllt, erneut bei 250xg für 2 min zentrifugiert und das Gewebepellet mit PBS gewaschen wurde. Nach diesem Waschschrift wurde der Überstand abgenommen und erneut bei 250xg für 2 min zentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wurde vorsichtig in Neurobasalmedium (NBM) resuspendiert, bis eine Einzelzellsuspension vorlag. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die NVZ in Gewebekulturflaschen ausgesät.

3.2.4.1 Aussaat und Proliferation

Zur Kultivierung der NVZ wurden die Zellen mit einer Dichte von 1 - 2 Zellen pro mm^2 in einer T75-Gewebekulturflasche ausgesät. Die Zugabe der Wachstumsfaktoren EGF sowie bFGF induzierte die Proliferation der NVZ. Alle drei bis vier Tage wurde ein halber Mediumwechsel vorgenommen und am siebten Kulturtag wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden die Neurosphären mit einer Pipette geerntet, bei 250xg für 5 min zentrifugiert und das Pellet mit HBSS-/- gewaschen. Mit einer abgeflamnten Pasteurpipette

erfolgte die mechanische Herstellung einer Einzelzellsuspension und die anschließende Aussaat in frischem NBM.

3.2.4.2 Umstellung auf experimentelle Bedingungen

Vor dem experimentellen Einsatz wurden die NVZ dreimal passagiert und als Einzelzellschicht in 6- oder 24-Lochplatten ausgesät. Dazu wurde aus den kultivierten Neurosphären mit einer abgeflamten Pasteurpipette eine Einzelzellsuspension hergestellt und 4×10^5 Zellen pro Vertiefung (2×10^5 Zellen pro ml, 6-Lochplatte) oder 2×10^4 Zellen pro Vertiefung (4×10^4 Zellen pro ml, 24-Lochplatte) vorsichtig auf mit Poly-D-Lysin (1 mg/ml) beschichtete Glasplättchen verteilt. Nach 24 stündiger Anzüchtphase wurden die verwendeten Redox-Substanzen zugegeben. Alle 48 h wurde ein halber Mediumwechsel durchgeführt und die entsprechende Menge an Redox-Substanzen erneuert. Zur Zellproliferation wurde serumfreies Medium unter bFGF Zusatz verwendet. Die Induktion der Zelldifferenzierung erfolgte durch Umstellung auf bFGF freies Medium. Sieben Tage nach Ausplattierung der Einzelzellschicht wurde das Differenzierungsmuster immunocytochemisch analysiert. Für RNA-Untersuchungen wurden die Zellen 24 h, für Protein-Untersuchung 48 h mit den Redox-Substanzen kultiviert.

3.2.4.3 Klonale Analyse

Für die klonale Analyse wurden NVZ auf 12 mm große mit Poly-D-Lysin beschichtete Glasplättchen in einer 24-Lochplatte ausplattiert (50-100 Zellen pro Vertiefung in 0,25 ml NBM). Nach ungefähr 30 min hatten sich die NVZ abgesetzt und es wurden weitere 0,25 ml serumfreies Medium mit 40 ng/ml bFGF und $1 \mu\text{M}$ BSO oder Vehikel zugegeben. Nach zwei Stunden wurden einzelne Zellen am Boden der 24-Lochplatte markiert und für weitere 96 h expandiert. Diese einzelnen Klone bildeten in dieser Zeit klar abgegrenzte Zellkolonien bevor für weitere sieben Tage auf bFGF-freies Medium umgestellt wurde. Für Analysen mit freischwimmenden Neurosphären wurden die NVZ in einer Dichte von zehn Zellen pro Vertiefung (96-Lochplatte; unbeschichtet) ausplattiert und als Neurosphären in Anwesenheit von 20 ng/ml bFGF expandiert. Nach 5-7 Tagen wurden einzelne Neurosphären isoliert und auf Poly-D-Lysin beschichtete Glasplättchen für weitere sieben Tage (bFGF-freies Medium) kultiviert. Abschließend wurden die Zellen immunocytochemisch auf beta-III-Tubulin (Tuj1, für Neurone) und GFAP (für Astrozyten) analysiert (Abschnitt 3.5.2).

3.2.4.4 BrdU Markierung

Zur Inkorporation von BrdU (Proliferationsanalyse) wurden die auf Glasplättchen (beschichtet mit Poly-D-Lysin) kultivierten NVZ nach 48 stündiger Anwesenheit der Redox-Modulatoren und bFGF, für 2 h mit 5-Bromodeoxyuridin (BrdU 10 μ M) versetzt und anschließend für die immunocytochemische Analyse mit 4 % PFA fixiert (Abschnitt 3.5.2).

3.2.5 MTT-Test

Der MTT-Test ist ein Zytotoxizitäts-Test bei dem Zellen *in vitro* mit dem gelben Tetrazoliumsalz behandelt werden, um ihre Lebensfähigkeit beziehungsweise den Anteil lebender Zellen im Vergleich zu einer Kontrollprobe zu messen. Der Nachweis der Zellvitalität mittels MTT-Test beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blauviolett, wasserunlösliches Formazan. Diese Umwandlung erfolgt jedoch nur im Mitochondrium lebender Zellen. Dazu wurden NVZ in Poly-D-Lysin beschichteten 96-Lochplatten (5 x 10⁴ Zellen/Vertiefung, + 10 ng/ml bFGF, + 2 μ g MTT) für 2, 5 und 7 Tage mit den Redox-aktiven Substanzen (Ergebnisse 4.2.2.1) versetzt und der Farbumschlag an einem Photometer (MRX II microplate reader, DYN-Ex Technologies) bei 570 nm gemessen.

3.2.6 Proliferationsanalyse

Die Proliferationsanalyse wurde in Zellkultur-Mikroplatten mit 96 Rundboden-Vertiefungen („96-well-Platten“) durchgeführt. Zervikale Lymphknotenzellen und Milzzellen (jeweils 2 x 10⁵ Zellen pro Vertiefung) wurden ohne weitere Aufreinigung mit 5 μ g/ml sowie 12,5 μ g/ml Peptid und 2 μ g/ml Concanavalin A pro Vertiefung in einem Endvolumen von jeweils 200 μ l inkubiert und für 72 h kultiviert. Die letzten 10 h wurden die Zellen mit 0,5 μ Ci/Vertiefung [³H]-Thymidin inkubiert („gepulst“). Der [³H]-Thymidin-Einbau wurde mit einem „ β -Strahlen-Szintillationsmessgerät in der Einheit „counts per min“ (c.p.m) bestimmt.

3.3 Molekularbiologische Methoden

Alle Materialien wurden vor Gebrauch 20 min autoklaviert und die benötigten Puffer mit sterilen Lösungen angesetzt, um die Zerstörung der RNA durch RNasen zu vermeiden.

3.3.1 Transfektion von NVZ

Zur spezifischen Ausschaltung (Silencing) von Genen wurden synthetische siRNAs (small interfering RNA; Tabelle 1) durch Lipofektion in NVZ geschleust. Hierzu wurden die siRNAs in sogenannte Transfektionsvehikel verpackt, wodurch sie wesentlich leichter von Zellen endozytiert werden als nackte RNA Strukturen. Für die Transfektion wurden die NVZ mit einer Dichte von 200.000 Zellen pro Vertiefung (24-Lochplatte) in serum- und antibiotikafreiem NBM ausplattiert. Die Komplexbildung aus siRNA und Lipid erfolgte für eine halbe Stunde bei 37°C in NBM (ohne jegliche Zusätze). Im Anschluss wurde der Komplex vorsichtig auf die Zellen gegeben, so dass die eigentliche Transfektion über einen Zeitraum 4 bis 5 Stunden mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml kationischem Lipid (β-Argfektin 35-plus) und 30 nM siRNA stattfand. Nachfolgend wurde wieder auf normales NBM (10 ng/ml bFGF) umgestellt. Die Differenzierung der transfizierten NVZ erfolgte unter bFGF Entzug. Die Analyse der Genexpression wurde 24 h nach Lipofektion mittels quantitativer Real-time PCR (qRT-PCR, Abschnitt 3.3.5) vorgenommen. Vor der experimentellen Verwendung erfolgte die Validierung der verwendeten siRNAs durch immunologische Detektion der jeweiligen Proteinexpression im Western Blot. Alle verwendeten siRNAs zeigten dabei eine deutliche Inhibierung der Proteinexpression (Abb. 7:).

Tabelle 1: Liste der verwendeten siRNAs

siRNA	spezifisch für	Firma Ambion ID
Sirt1 siRNA 2	Exon 2'	ID#174219
Sirt1 siRNA 1	Exon 5'	ID#174220
Hes1 siRNA 2	Exon 2'	ID#100393
Hes1 siRNA 1	Exon 5'	ID#158034

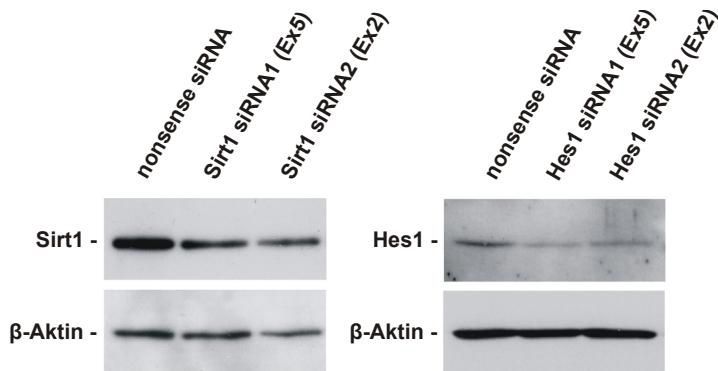


Abb. 7: Validierung der siRNAs im Western Blot. Immunologische Detektion der inhibierten Proteinexpression von Sirt1 und Hes1 nach Lipofektion der synthetischen siRNAs (48 h nach Lipofektion der siRNAs aus Tabelle 1) .

3.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Mausgewebe

Die Isolierung der RNA aus Mausgewebe wurde mittels Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt. Hierzu wurden die postnatalen Mäuse narkotisiert (Kap. 3.4.2) und das Gewebe um den lateralen Ventrikel, die subventrikuläre Zone, auf Eis isoliert. Nach Zugabe von 1 ml Lyselösung (peqGOLD Trifast™), wurde das Gewebe mit einer Spritze (0,7 x 2 mm) homogenisiert, 200 µL Chloroform zugesetzt, gevortext und für 5 - 10 min bei 6000xg zentrifugiert. Die Extraktion der im Überstand befindlichen RNA erfolgte durch Zugabe von 0,5 ml 100 % Ethanol. Diesem Schritt folgte eine erneute Zentrifugation und die Resuspension der Pellets mit 2 ml eiskalter 75 %iger Ethanollösung. Der Überstand wurde wiederum verworfen, das verbleibende Ethanol für 5 – 10 min im Thermoschüttler bei 60°C abgedampft und nach Aufnahme in 50 µL ddH₂O direkt in cDNA umgeschrieben. Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte bei 260 nm an einem Spektrophotometer der Firma (NanoDrop Technologie).

3.3.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Mauszellen

Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Die Abtrennung der RNA vom restlichen Zelllysat erfolgte mit Glasfaservlies-Säulen, an die Nukleinsäuren in Gegenwart chaotroper Salze spezifisch binden. So gelingt bei optimierten Bedingungen die Abtrennung der RNA vom restlichen Zelllysat. Nach Absaugen des Kulturmediums wurde zu den Zellproben 350 µL RLT-Puffer (mit 10 % β-Mercaptoethanol (v/v)) gegeben und durch zehnmalsiges Resuspendieren mit einer Spritze aufgeschlossen. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 350 µL 70 % Ethanol

versetzt, durchmischt und auf die Säule gegeben. Nach kurzer Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit (10000xg, 1 min) wurde zweimal mit 500 μL RWI-Lösung gewaschen, der Durchlauf stets verworfen und nach Zugabe von 500 μL RPE-Puffer bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min zentrifugiert. Die Eluation der an die Säule gebundenen RNA erfolgte durch 50 μL ddH₂O und einer Zentrifugation bei bei 10000xg für 1 min.

3.3.4 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird spezifisch mRNA durch das aus Retroviren stammende Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Dabei wird das Poly(A)-5'-Ende der mRNA genutzt, um durch Anbindung eines Random Hexamer Primers die Erststränge der cDNA zu synthetisieren. Die Pipettierung der Reagenzien erfolgte nach dem angegebenen Schema.

Tabelle 2: Pipettierschema für die Reverse Transkription

Reagenz	Menge
Puffer (10x)	2 μL
MgCl ₂ (25 mM)	4,4 μL
dNTPs (10 mM)	4 μL
Random Hexamer (50 μM)	1 μL
RNase Inhibitor (20U/ μL)	0,4 μL
Reverse Transkriptase (50U/ μL)	0,5 μL
RNA	8 μL

Für die Reverse Transkription wurde ein Mastermix aus 10 x RT-Puffer, Magnesiumchlorid, dNTPs (Desoxyribonukleosid-triphosphate), RNase-Inhibitor und der Reversen Transkriptase benutzt, wobei immer auf Eis gearbeitet wurde. Das Endvolumen des Ansatzes betrug 20 μL . Dazu wurde 1 μg mRNA mit RNase freiem Wasser auf 8 μL aufgefüllt und mit 12,3 μL Mastermix versetzt.

Zur Umschreibung wurde das nachfolgende Temperaturprogramm verwendet.

Tabelle 3: Temperaturprogramm für die Reverse Transkription

	Temperatur	Dauer	Wiederholung
Anlagerung	25°C	10 min	1 x
Reverse Transkription	48°C	30 min	1 x
Enzyminaktivierung	95°C	5 min	1 x
Abkühlphase	4°C	30 min	1 x

3.3.5 TaqMan quantitative real-time PCR

Bei der konventionellen PCR erfolgt eine Endmengenbestimmung mit Primersätzen, die sich in ihrer Effizienz und somit in der amplifizierten DNA-Menge unterscheiden. Deshalb kann mit dieser Methode keine genaue Quantifizierung von Nukleinsäuren in einer Probe durchgeführt werden. Für die quantitative RNA-Bestimmung in einer Probe wird zuerst eine Reverse Transkription durchgeführt und danach die cDNA als Template für eine PCR eingesetzt, bei der die Primer festgelegte Kriterien erfüllen müssen. Dabei ist es besonders wichtig, dass die amplifizierte DNA-Menge kontinuierlich in der exponentiellen Phase gemessen wird, da die Endmenge keine Proportionalität zur eingesetzten Ausgangsmenge aufweist. Die Betrachtung der Amplifikation in der real-time-PCR erfolgt mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes. Basierend auf der 5'→3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase, wird eine fluorogene Sonde (engl.: Probe), die zwischen den Bindungsstellen der verwendeten Primer spezifisch mit der Sequenz des zu amplifizierenden Zielgens hybridisiert, enzymatisch zerkleinert. Diese Sonde enthält am 5'-Ende einen fluorogenen Reporter-Farbstoff (6-Carboxy-Fluoreszein = FAM) und am 3'-Ende einen fluorogenen Quencher-Farbstoff (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin = TAMRA). Ist die Sonde intakt, so stehen beide Fluoreszenzfarbstoffe in direkter Nachbarschaft zueinander und es kommt zu einer physikalischen Interaktion zwischen den Farbstoffen. Die Reporterfluoreszenz wird bei Anregung die Absorption durch den Quencherfarbstoff aufgrund des stattfindenden Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) unterdrückt. Durch den Beginn des Abbaus der 5'→3' Exonukleaseaktivität der Polymerase wird dieses Quenching unterbrochen. Als Folge kann die Reporterfluoreszenz unmaskiert detektiert werden. Die Intensität der emittierten Reporterfluoreszenz steigt entsprechend der Amplifikation des PCR-Produktes, aufgrund des fortschreitenden Sondenabbaus mit steigender Zyklenzahl, an. So kann nach einer bestimmten Zyklenzahl die relative Expression des betreffenden Genabschnittes anhand der Stärke der Reporterfluoreszenz

ermittelt werden. Um mögliche Volumenschwankungen durch Pipettierfehler oder unterschiedlichen Konzentrationen innerhalb der Reagenzien zu vermeiden, wird dem verwendeten Mastermix ein passiver Fluoreszenzfarbstoff (ROX) beigefügt. Eine Erhöhung der Fluoreszenz entspricht damit einer vermehrten Anzahl an DNA-Amplikonen. Nach Auftragung der Zyklenzahl gegen die Fluoreszenzintensität wird der *threshold* (Schwellenwert) festgelegt, bei dem sich jede Probe in der exponentiellen Phase befinden muss, damit die Anzahl der Amplikone proportional zur eingesetzten Template-Menge ist. Dieser so genannte Zyklus-Schwellenwert (C_T -Wert) gewährleistet die Vergleichbarkeit von Proben mit analogen Primerpaaren. Der Zyklus-Schwellenwert wurde mit der Auswertungssoftware GenAmp 5700 bestimmt. Zur Berechnung der relativen Expression wurde das $\Delta\Delta C_T$ -Verfahren angewendet. Es wird zunächst der ΔC_T -Wert ermittelt, wobei es sich um den Mittelwert der C_T -Werte einer Mehrfachbestimmung der zu untersuchenden Gene und des Housekeeping-Gens handelt. Für die Berechnung des $\Delta\Delta C_T$ -Wertes wird die Differenz aus dem ΔC_T -Wert des Zielgens und dem des Housekeeping-Gens gebildet. Die relative Expression wird dann durch den negativen Exponenten des $\Delta\Delta C_T$ -Wertes von 2 kalkuliert.

Die verwendeten Primer- und Probesequenzen sind in Abschnitt 3.1.5 aufgelistet.

Tabelle 4: Pipettierschema für die qRT-PCR

Reagenz	Menge
PCR-Mastermix (x10)	12,5 μ L
Forward-Primer (10 μ M)	1 μ L
Reverse-Primer (10 μ M)	1 μ L
Probe (5 μ M)	1 μ L
H ₂ O	4,5 μ L
cDNA	5 μ L
Gesamtvolumen	25 μ L

Tabelle 5: Temperaturprogramm für die qRT-PCR

	Temperatur	Dauer	Repetition
Aktivierung der Uracil-N-Glycosylase (UNG)	50°C	2 min	1 x
Aktivierung der Taq-Polymerase	95°C	10 min	1 x
Strang-Denaturierung	95°C	15 s	1 x
Primeranlagerung und Elongation	60°C	1 min	40 x

3.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Größenauftrennung linearer Nukleinsäuren. In dieser Arbeit wurden ausschließlich nicht-denaturierende Agarose-Gele mit einem Agaroseanteil von 1 % bzw. 2 % verwendet. Das Lösen der Agarose in 0,5 x TAE-Puffer erfolgte durch Erhitzen in der Mikrowelle. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C konnte das Gel in einen Gelschlitten gegossen und nach dem Aushärten in die mit 0,5 x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt werden. Die Proben wurden mit DNA-Ladepuffer (1/10) vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 10 V/cm Elektrodenabstand. Abschließend ließen sich die Nukleinsäurebanden durch Anfärbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar machen und fotografieren (BioDoc Analyse, Biometra).

3.3.7 Immunpräzipitation (IP)

Die Immunpräzipitation ermöglicht eine Aussage über das Assoziationsverhalten einzelner Proteine im Zelllysate. Dazu wird das gesuchte Protein durch spezifische Antikörper gebunden und mit sogenannten Beads (an Agarosekügelchen gekoppeltes Protein A oder G) ausgefällt. Dabei bindet das Protein A an die Fc-Fragmente von IgG, A, M wodurch eine Ausfällung des Immunkomplexes ermöglicht wird. Durch SDS-Page werden die Beads und die Antikörper abgetrennt und eine immunologische Detektion der Proteinkomplexe ermöglicht. Für die IP wurden 0,250 g Protein-A- oder G-Sepharose abgewogen und 4 h auf einem Rad bei 4°C in IP-Block Puffer inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Beads für 2 min bei 550xg wurden diese erneut in 1 ml IP-Block Puffer aufgenommen.

Die NVZ wurden für 48 h in Anwesenheit von bFGF (10ng/ml) und BSO (5 mM) oder Vehikel (NaCl) in Poly-D-Lysin beschichteten 6-Lochplatten kultiviert. Für die IP wurden die NVZ zweimal mit PBS gewaschen, in 2 ml PBS von der Platte abgeschabt und bei 550xg für 5 min pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 1ml RIPA-Puffer resuspendiert, für 15 min auf Eis lysiert und bei 10000xg zentrifugiert und anschließend die Proteinkonzentration bestimmt. Das Zelllysate wurde mit 50 µl Protein-G-Sepharose für 60 min bei 4°C rotierend inkubiert (preclearing). Die Eppendorfgefäße wurden bei 10000xg für 2 min zentrifugiert und der Überstand in neue Röhrchen überführt. In der Zwischenzeit wurden die Protein-G-Sepharose-Beads mit 1 µg des entsprechenden Antikörpers (beispielsweise anti-Sirt1-AK) versetzt und für 60 min bei 4°C rotierend inkubiert und zu 500 µg Zelllysate gegeben. Die Bildung der Immunkomplexe erfolgte über Nacht bei 4°C unter ständiger Rotation. Nach Zentrifugation (2 min 1000xg) wurden die Beads zweimal

mit 1 ml RIPA-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 30 µL Ladepuffer aufgenommen und die Proben auf ein 8 %iges oder 15 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, geblottet und mit anti-Hes1 (H-140, Santa Cruz) oder anti-Sirt1 (Sigma, Germany) detektiert. Als interne Kontrollen wurde ebenfalls ein IgG-Isotyp mitgeführt und 10 % des initial erhaltenen Zelllysats ebenfalls analysiert.

3.3.8 Histonextraktion

Die Analyse des Acetylierungszustandes von Histon H3 und H4 erfolgte mittels 15 %igen SDS-PAGE durch anti-Acetyl-H3K9, anti-Acetyl-H4K16, anti-Acetyl-H3, anti-Acetyl-H4, anti-H3, anti-H4 (Biomol). Zur Histonisolierung wurden NVZ in Tritonpuffer (PBS, 0.5 % Triton-X100) mit HDAC-Inhibitoren (10 mM Natriumbutyrat, 10 mM Nicotinamid) und Proteaseinhibitoren (10 mM Na₃VO₄, 10 mM PMSF, 10 mM Aprotinin) für 10 min bei 4°C. Nach Zentrifugation (10 min bei 550xg) wurde das Pellet in 10 mM Tris-HCL (pH 7.5), 10 mM EDTA und 0.2 N HCl resuspendiert und über Nacht mit den entsprechenden Antikörpern präzipitiert. Nach der Präzipitation folgte ein Zentrifugationsschritt (550xg, 5 min, 4°C) und die Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Kit.

3.3.9 Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)

Dazu wurden 0,250 g Protein-A-Sepharose abgewogen und 4 h auf einem Rad bei 4°C in IP-Blockpuffer zum Aufquellen inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Beads für 2 min bei 550xg wurden diese in 1 ml IP-Blockpuffer aufgenommen.

3.3.9.1 Isolierung des Chromatins

Die NVZ deren Chromatin isoliert werden sollte, wurden für 48 h in Anwesenheit von bFGF (10ng/ml) in Poly-D-Lysin beschichteten 6-Lochplatten kultiviert. Zur Induktion der Differenzierung wurden die Zellen gewaschen und für 24 h mit frischem, bFGF-freien NBM versetzt. Über den gesamten Kultivierungszeitraum war BSO in einer Konzentration von 5 µM dem NBM zugesetzt. Zur Verknüpfung der chromatin-assoziierten Proteine an das Chromatin wurden die Zellen mit 1 %iger Paraformaldehydlösung für 10 min bei RT leicht schüttelnd inkubiert. Die Quervernetzung wurde durch Zugabe von 125 mM Glycin für 5 min gestoppt. Auf Eis wurden die Platten zweimal mit PBS gewaschen, in 2 ml PBS von der Platte abgescharbt und bei 550xg für 5 min pelletiert. Anschließend wurde das

Zellpellet in 1 ml ChIP-Lysispuffer resuspendiert und 10 min auf Eis lysiert. Nach Zentrifugation bei 550xg für 5 min befanden sich die Zellkerne im Pellet.

Das Chromatin wurde durch Sonifizierung auf die gewünschte Größe im Bereich von 200 - 600 bp gebracht. Dies erfolgte durch 3-malige Beschallung für 30 s bei 80 %iger Amplitude in ChIP-Lysispuffer. Dabei wurde das Falcon auf Eis gehalten und 30 s Pause zwischen den einzelnen Sonifizierungsphasen eingehalten, um die durch die Sonifikation entstehende Temperaturerhöhung so gering wie möglich zu halten. Danach wurden die Proben bei 4°C und 1000xg für 10 min zentrifugiert und der Überstand, der das Chromatin enthält, 1:10 in Verdünnungspuffer (1% Triton X-100, 150mM NaCl, 2mM EDTA, pH 8.0, 20mM Tris-HCl, pH 8.0, mit Proteaseinhibitoren) aufgenommen, um das SDS zu verdünnen, das bei der darauf folgenden Zugabe der entsprechenden Antikörpern für deren Bindung an die assoziierten Proteine hinderlich ist. Vor Zugabe der Antikörper wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

3.3.9.2 Immunpräzipitation des Chromatins

Vor der Zugabe der Antikörper für die Immunpräzipitation wurden 40 µl geblockte Protein-A-Sepharose zu 300 µg Chromatinlysate gegeben und für zwei Stunden bei 4°C auf einem Rad inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt, um die Sepharose zu entfernen. Zum Überstand wurden dann die gewünschten Antikörper hinzugegeben. Als Kontrolle wurde das entsprechende IgG verwendet. Die spezifische Bindung der Antikörper (3 µg anti-Sirt1 (Sigma), anti-Hes1 (SantaCruz) und anti-ach3K9 (Biomol) pro 300 µg Zelllysate) an die Proteine erfolgte bei 4°C für 12 h. Anschließend wurden die Antikörper-Protein-Chromatin-Komplexe durch Zugabe von 60 µl geblockter Protein-A-Sepharose für zwei Stunden bei 4°C rotierend gebunden. Die Protein-A-Sepharose mit den gebundenen Komplexen setzte sich nach einminütiger Zentrifugation bei 550xg bei 4 °C am Boden des Gefäßes ab. Der Überstand wurde entfernt und die Sepharose-Beads zweimal mit 1 ml IP-Puffer gewaschen, um unspezifisch an die Beads gebundenes Protein zu entfernen.

Zur Elution der Protein-Chromatin-Komplexe von den Beads wurde zweimal Elutionspuffer (1% SDS, 100mM NaHCO₃) - einmal 100µl, das zweite mal 150µl - zugegeben und 15 min auf einem Schüttler inkubiert. Die Beads wurden herunterzentrifugiert und der Überstand, der das Chromatin enthält, in ein neues Gefäß überführt. Anschließend wurde der Überstand mit Proteinase-K (500 µg/ml) und RNase (500 µg/ml) bei 55°C für 1 h behandelt. Die Quervernetzung wurde durch 12 stündige Inkubation mit 200 mM NaCl bei

65°C aufgehoben und die Proben mit einem GFX-PCR DNA-Purification-Kit aufgereinigt. Die Eluation von den Säulen erfolgte mit 50 µl ddH₂O.

Um die Präsenz des Mash1-Promotors in diesen Proben zu untersuchen wurden PCR Primer benutzt, die die Hes1 Bindungsstelle (CACGCG (-287 bis -282) und CACGCG (-276 bis -271)) innerhalb des Mash1-Promotors (-268 bis +28 bp vom ATG Startkodon) flankieren. Nach Amplifizierung mittels qRT-PCR wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und die Bandenintensität analysiert. Die verwendeten Primersequenzen für die ChIP-Analyse sind in Abschnitt 3.1.5 aufgelistet.

3.3.10 Allgemeine Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung

Diese Bestimmung macht sich die Reduktion von Kupfer-2+ (Cu²⁺) zu Kupfer-1+ (Cu¹⁺) durch Proteine in alkalischer Lösung zunutze. Die Proteinproben wurden zweimal mit eiskalten PBS gewaschen und auf Eis mit Kernlysis-Puffer versetzt. In Abhängigkeit von der Zellmenge wurde die Lyse in einem Volumen von 20-60 µL vorgenommen. Hierzu wurde die Zellsuspension mit einer Hamilton-Spritze homogenisiert, für 10 min auf Eis inkubiert und abschließend bei 10000xg für 15 min und 4°C zentrifugiert. Die Proben wurden mit ddH₂O 1:10 verdünnt. Zur Erstellung der Standardkurve wurde bovines Serum Albumin (BSA) in verschiedenen Konzentrationen (62,5; 125; 250; 500; 1000 µg/ml) benutzt. Die Proben sowie der Standard wurden in eine 96-Loch-Flachbodenplatte pipettiert. Die BCA-Lösung setzte sich aus 50 Teilen BCA-Reagenz A und einem Teil BCA-Reagenz B zusammen, es wurden 150 µl der frisch angesetzten BCA-Lösung in jede Vertiefung gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Messung an einem Spektrophotometer (MRX II microplate reader, DYN-Ex Technologies) bei 562 nm. Der Proteingehalt der zu bestimmenden Probe ergab sich aus dem Vergleich der Extinktion der Probe mit den aus den Standardwerten ermittelten Eichgeraden.

3.3.11 SDS-Page

Die verwendete SDS-PAGE entspricht der Methode nach Laemmli (Laemmli, 1979). Diese Methode dient der Trennung von Proteinen aufgrund ihres jeweiligen Molekulargewichts. Nach Laemmli werden Proteine bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE zunächst in einem weitmaschigen Sammelgel aufgrund sich ausbildender Ladungsgradienten zu einer schmalen Bande fokussiert, bevor sie im engmaschigen Trenngel je nach Molekülgröße

voneinander separiert werden. Für die Auftrennung wurden 12 %ige oder 18 %ige (Histonquantifizierung) Gele verwendet.

Für die Gele benötigte man folgende Reagenzien:

Tabelle 6: Pipettierschema SDS-Gele

Reagenz	Sammelgel 5 %	Trenngel 12 %	Trenngel 18 %
Trenngelpuffer		3,8ml	3.75 ml
Sammelgelpuffer	1,0 ml		
H ₂ O	5,5 ml	4,9 ml	2 ml
30 % Acrylamid	1,3 ml	6,0ml	9 ml
10 % SDS (v/v)	0,08 ml	0,15 ml	0,15 ml
10 % APS (v/v)	0,08 ml	0,15ml	0,15 ml
TEMED	0,008 ml	0,015 ml	0,015 ml

Die verwendeten Glasplatten (14,7 cm x 14,0 cm) wurden gründlich mit bidest. H₂O und Ethanol gewaschen, die Gelkomponenten nach Tabelle 6 zusammenpipettiert, zwischen die Glasplatten gegossen und das Trenngel mit Ethanol beschichtet. Nach ca. 20 min wurde das Ethanol entfernt und das Sammelgel gegossen, in das der Probenkamm eingesetzt wurde. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurden die Glasplatten in die Laufapparatur eingespannt und die Anoden- bzw. Kathodenkammer mit Laufpuffer gefüllt. Pro Tasche wurden stets 30 µg Protein aufgetragen, die zuvor im Verhältnis 1:2 mit Probenpuffer (2x) vermischt wurden. Die Proteine wurden kurz vor dem Auftragen 5 min bei 95°C erhitzt und in die Sammelgeltaschen pipettiert. Als Größenmarker wurde der Precision Plus Protein™ Standards – Dual Color von Bio-Rad benutzt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 80 V für das Sammelgel gestartet und im Bereich des Trenngels mit 150 V (8-15 V/cm) fortgeführt.

3.3.12 Western Blot Analyse

Der Vorgang des Western Blotting basiert auf dem Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose-Membran. Diese Membran wird mit primären Antikörpern, die spezifisch an Proteine auf der Membranoberfläche binden, versetzt, über einen zweiten Antikörper, meist mit einer enzymatischen Nachweis-Reaktion (Chemilumineszenz; Luminogen), wird dieser detektiert. Die gleichmäßige Beladung der

Polyacrylamidgele wurde stets durch die Detektion von beta-Aktin sichergestellt (anti- β -Aktin, Sigma, Germany).

3.3.12.1 Blotten

Für den Proteintransfer auf die Nitrocellulosemembran wurde Whatman-Papier (Whatman No.3) und eine Nitrocellulose-Membran auf die Größe des zu blottenden Gels zurechtgeschnitten und in Blotpuffer getränkt. Auf die Anodenseite wurden vier Lagen Whatman-Papier gegeben, darauf eine Nitrocellulose-Membran von *Amersham Pharmacia* (Hybond™ECL™), schließlich das Gel und darauf nochmals vier Lagen Whatman-Papier. Der Stapel wurde erneut mit Blotpuffer getränkt und in mit Transferpuffer gefüllte Transferapparatur gesteckt. Das Transferieren der Proteine von der Gelmatrix auf Membran erfolgte bei 100V für 1 h 15 min, dies entspricht 0,65 mA/cm².

3.3.13 Immunologischer Nachweis von Proteinen im Western Blot

Die auf die Membran transferierten Proteine wurden mittels der ECL-Methode (*Enhanced Chemoluminescence*) nachgewiesen. Diese Methode ermöglicht den spezifischen Nachweis eines Proteins in Gegenwart einer großen Menge anderer Proteine. Nach dem Blockieren der Membran mittels Milchpulverlösung erfolgt die Bindung des Protein-spezifischen Erstantikörpers, an den ein Peroxidase-(POD)-gekoppelter Zweitantikörper bindet. Die Peroxidase überführt in Gegenwart von H₂O₂ Luminol in einen angeregten Zustand. Durch das Zurückfallen des Luminols in den energetischen Grundzustand wird an den markierten Stellen der Membran Licht emittiert. Der Fotofilm wird nur an den Stellen dunkel gefärbt, an denen sich das gesuchte Protein befindet. Die Signalstärke des entwickelten Films gibt Auskunft über die Menge des entsprechenden Proteins. Verschiedene Waschschrte zwischen den Antikörperinkubationen entfernen unspezifisch angebundene Antikörper. Tabelle 4.5 gibt Auskunft über die immunologische Detektion mit Hilfe der Milchpulver-Methode. Die Durchführung des ECL-Nachweises erfolgte nach den Herstellerangaben (Amersham Bioscience). Die Reagenzien enthalten neben H₂O₂ und Luminol noch ein Gemisch verschiedener Substanzen, die die Chemolumineszenz verstärken. Die beiden ECL-Plus-Lösungen wurden 1:40 vermischt und die Membran mit der Mischung gleichmäßig überschichtet. Nach kurzer Inkubation (1 min) wurde die Membran leicht abgetrocknet, auf eine Glasplatte gelegt und mit Klarsichtfolie abgedeckt. Die Expositionsdauer variierte zwischen 30 s und 5 min

Um eine unsepezifische Bindung an die schwere und leichte Kette der in der IP verwendeten Antikörper zu verhindern, und damit die Detektion der Zielproteine zu gewährleisten wurde das „Rabbit IgG TrueBlot Set“ von eBioscience verwendet. Die Durchführung erfolgte streng nach Herstellerangaben.

Tabelle 7: Ablauf des immunologischen Nachweises im Western Blot mit der Milchpulver-Methode

Detektionsschritt	Reagenzien	Inkubation
Blockieren	TBST-Puffer + 5 % (w/v) MP	60 min RT
Waschen	TBST-Puffer	3 x 10 min RT
Erst-Antikörper	Erstantikörper in TBST-Puffer + 0,5 % (w/v) MP	12 h 4°C
Waschen	TBST-Puffer	3 x 10 min RT
Zweit-Antikörper	Zweitantikörper in TBST-Puffer + 0,5 % (w/v) Milchpulver	60 min RT
Waschen	TBST-Puffer	3 x 10 min RT
ECL-Nachweis		

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Erst- und Zweit-Antikörper

Erst-Antikörper	Hergestellt in	Verdünnung	Firma
anti Hes1	Kaninchen	1:200	Santa Cruz, Germany
anti Mash1	Kaninchen	1:200	Santa Cruz, Germany
anti Sirt1	Kaninchen	1:200	Sigma, Germany
anti H3	Kaninchen	1:2000	Biomol, Germany
anti acH3	Kaninchen	1:2000	Biomol, Germany
anti acH3K9	Kaninchen	1:2000	Biomol, Germany
anti H4	Kaninchen	1:2000	Biomol, Germany
anti acH4	Kaninchen	1:2000	Biomol, Germany
anti acH4K16	Kaninchen	1:2000	Biomol, Germany
anti β -Actin	Maus	1:10000	Sigma, Germany
Zweit-Antikörper			
anti Kaninchen	Schwein	1:500	Dako Cytomation, Germany
anti Maus	Schwein	1:500	Dako Cytomation, Germany

3.3.13.1 Messung der optischen Dichte der Immunoblots

Die Messung der optischen Dichte (OD) der Bandenintensität wurde anhand Adobe Photoshop vorgenommen. Der Mittelwert der OD wurde von drei unabhängigen Experimenten ermittelt und für die Evaluierung des densitometrischen Verhältnisses verwendet

3.4 Experimente an lebenden Tieren

Alle in dieser Arbeit vorgenommenen Versuche an lebenden Tieren entsprachen den Institutsrichtlinien, folgten den staatlichen Gesetzen und waren durch die Tierversuchsvorhaben G0148/05, G0147/05 und T0087/06 genehmigt.

3.4.1 Tiermodelle

Die verwendeten Mäuse (SJL/J, C57BL/6) wurden unter speziell pathogenfreien (SPF) Bedingungen gezüchtet. Die Zucht der SJL/J und C57BL/6 Mäuse erfolgte durch den kommerziellen Mauseanbieter Charles River (Sulzfeld). Für die experimentelle Phase wurden die Mäuse im NWFZ Tierstall (klimatisiert, 12:12-Hell-Dunkel-Rhythmus) in isoliert belüfteten Käfigen (IVC) gehalten.

3.4.2 Narkotisierung von Mäusen

Alle verwendeten Mäuse wurden durch intraperitoneale Injektion einer Mischung aus Ketamin/Xylazine (415 mg/kg / 9,7 mg/kg) narkotisiert. Anschließend wurden die Organe für spätere immunhistochemische oder molekularbiologische Analysen entnommen. Für die intrazisternale Injektion wurden die Tiere vorübergehend mit einer Mischung aus Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (3 mg/kg) betäubt.

3.4.3 Aktive und passive EAE

Die EAE, das gängigste Tiermodell der MS, kann in suszeptiblen Nagerstämmen oder Primaten ausgelöst werden. Zur Krankheitsinduktion in der Maus wurden zwei Verfahren eingesetzt: In der sogenannten „aktiven“ EAE erfolgt eine subkutane Immunisierung mit

Myelinbestandteilen (definierte Peptide aus Markscheidenproteinen) in komplettem Freundschens Adjuvans (CFA), angereichert mit abgetöteten Zellwandbestandteilen von *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA. Hiermit kann eine gegen die Myelinscheide gerichtete, T-Zell-vermittelte Entzündung im Zentralnervensystem (ZNS) initiiert werden, die zur Schädigung im ZNS führt. Die zentrale Rolle myelinspezifischer, CD4-positiver T-Zellen für die Pathogenese zeigt sich in der sogenannten „passiven“ EAE, die in zwei Schritten ausgelöst wird. Zunächst erfolgt - ähnlich der aktiven Induktionsweise - eine Immunisierung von EAE-suszeptiblen Tieren (Donoren) mit enzephalitogenen Myelinbestandteilen in CFA. Die Donoren werden vor Ausbruch der Erkrankung geopfert, um aus den drainierenden Lymphknoten und der Milz eine Zellsuspension zu generieren. Diese Zellen werden mit dem initial verwendeten Myelinbestandteil *in vitro* restimuliert und schließlich intravenös in syngene naive Tiere transferiert. Die passive EAE erlaubt somit die weitgehend isolierte Betrachtung der Effektorphase der Neuroinflammation. Zudem kann durch die gezielte Anpassung der Zahl transferierter Zellen der Schweregrad der Krankheit besser moduliert und klinisch ein vergleichsweise homogener Krankheitsverlauf erreicht werden. Der klinische Schweregrad erkrankter Tiere lässt sich quantitativ anhand der motorischen Defizite, die gemäß standardisierter Kriterien auf einer Skala von 0 (gesunde Maus) bis 5 (Tod durch EAE) operationalisiert sind, erfassen.

3.4.3.1 Induktion der aktiven EAE

Zum Zeitpunkt der Immunisierung waren die Tiere ungefähr 8 Wochen alt und wogen um die 19 g. Alle Mausstämme wurden nach dem gleichen Protokoll immunisiert. Dazu wurde an Tag 0 ein Immunisat bestehend aus Complete Freundschens Adjuvans (CFA, *Mycobacterium tuberculosis* und dem entsprechenden enzephalitogenen Peptid hergestellt (Angaben pro Maus):

Tabelle 9: Bestandteile des EAE-Immunisats pro Maus

Mausstamm	CFA	H37ra	PLP139-151	MOG35-55	ptx
SJL/J	100 µl	800 µg	200 µg		200 ng
C57B/6	100 µl	800 µg		250 µg	400 ng

Jeder Maus wurde streng subkutan an 4 Stellen, die sich über den Flanken befanden, je 50 µl dieses Immunisats injiziert. An Tag der Immunisierung und am zweiten Tag nach Immunisierung wurde den Tieren Pertussistoxin (ptx) in 200 µl PBS intraperitoneal gespritzt. Im Anschluss wurden die Mäuse jeden Tag auf Lähmungserscheinungen

untersucht und anhand ihres Krankheitsschweregrads ein Punktwert (Score) zugeordnet. Tiere mit einem Scorewert ab 3 wurde zweimal tägliche 200 µl einer 5 % igen Glukoselösung intraperitoneal injiziert. Der Behinderungsgrad wurde anhand des folgenden klinischen Index bewertet:

- 1: Der Schwanz ist gelähmt. (Schwanzparalyse)
- 2: Die Hinterbeine sind in ihrer Funktion stark eingeschränkt. (Paraplegie)
- 3: Die Hinterbeine sind gelähmt. (Paralyse)
- 4: Die Vorderbeine sind gelähmt. (Tetraplegie)
- 5: Die Maus ist moribund/tot

3.4.3.2 Induktion der passiven EAE

Gemäß etablierten Schemata wurden die Donortiere (Alter 6-12 Wochen) identisch zur aktiven EAE (Abschnitt 3.4.3.1) immunisiert. Vor Krankheitsausbruch (Tag 10 nach Immunisierung) erfolgte die Isolierung der Lymphozyten aus den drainierenden Lymphknoten und der Milz (Abschnitt 3.2.3.1, 3.2.3.2). Die nachfolgende Restimulation der Zellsuspension (ca. 4×10^6 Zellen/ml) wurde mit PLP139-151 (12,5 µg/ml) oder MOG35-55 (25 µg/ml) für 72 h bei 37°C und 5 % CO₂ durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen geerntet, zweimal mit PBS gewaschen. Der Zelltransfer erfolgte durch die intravenöse Injektion von 10×10^6 Zellen in naive SJL/J Mäuse oder 20×10^6 Zellen in naive C57BL/6 Mäuse. Im Gegensatz zu dem SJL Model war im C57B/6 Model eine zusätzliche Injektionen der Rezipienten mit Pertussistoxin (ptx) notwendig (400 ng PTX je Maus am Tag des Transfers sowie 2 Tage später). Der klinische Schweregrad erkrankter Tiere wurde identisch zur aktiven EAE ermittelt (Abschnitt 3.4.3.1).

3.4.4 *In utero* Elektroporation

Die in utero Elektroporation wurde von Jan Baumgart durchgeführt. Die Generierung der shRNA Konstrukte verfolgte durch Olaf Ninnemann. Beide sind dem Institut für Zell- und Neurobiologie der Universitätsmedizin Berlin zugeordnet.

Die Sequenzen der shRNAs wurden entsprechend der kommerziell erhältlichen siRNAs von Ambion generiert (Sirt1 siRNA ID#174219 spezifisch für Exon 2, Hes1 siRNA ID#158034 spezifisch für Exon 5). Für die Kontroll shRNA (nonsense shRNA) wurde folgende Sequenz verwendet:

Forward 5' → 3'

ATCTCGTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCCGGAGAATTTTTTGGAAAC

Reverse 5' → 3'

TCGAGTTCCAAAAATTCTCCGAACGTGTCACGTTCTTTGAAACGTGACACGTCGGAGAACGA

3.4.4.1 Modulation des Redox-Gleichgewichts nach *in utero* Elektroporation

Die Modulation des Redox-Gleichgewichts wurde nach dem in Abbildung 8 dargestellten Schema durchgeführt. Nach Elektroporation an Tag E17.5 wurden die Embryos in der postnatalen Phase (P3 bis P6) zweimal täglich mit BSO (2 mMol/kg, subcutan) behandelt. Als Vehikelkontrolle diente isotonische Kochsalzlösung (pH 7,4). Nach viertägiger Behandlung wurden die P10 Tiere getötet, mit PBS und 4 %iger PFA Lösung perfundiert. Das Gehirn wurde in Tissue-Tek eingebettet und bis zur immunhistologischen Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

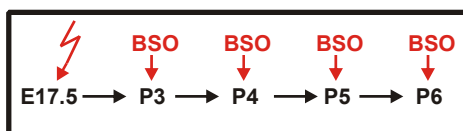


Abb. 8: Schematische Darstellung der Redox-Modulation nach *in utero* Elektroporation.

3.4.5 Modulation des TRAIL-Systems *in vivo*

Zur Modulation des TRAIL-Signalwegs *in vivo* wurden den Rezipienten Mäusen an Tag 1, 3, 5 sowie an Tag 7 Tag nach erfolgtem Zelltransfer intrazisternal 1 µg DR5:Fc-Fragment oder 1 µg reines Fc-Fragment injiziert. Dazu wurden die SJL-Mäuse narkotisiert (Abschnitt 3.4.2) und im Bereich der Halswirbel das Fell entfernt. Mit einer Hamiltonspritze wurden die Substanzen in einem Volumen von 5 µl intrazisternal injiziert. Die gesamte Prozedur erfolgte unter Anweisung und Anleitung von Dr. Orhan Aktas.

3.4.6 Modulation des Redox-Gleichgewichts in Jungtieren

Zur Modulation des Redox-Gleichgewichts *in vivo* wurde postnatalen Mäusen von Tag 5 bis Tag 9 nach der Geburt (P5-P9) zweimal täglich BSO (2 mMol/kg, subcutan) injiziert (Abb. 9). An den letzten Tagen (P7-P9) wurde zusätzlich BrdU (0,1 mM/kg, subcutan) verabreicht. Als Vehikelkontrolle diente isotonische Kochsalzlösung (pH 7,4). Nach fünftägiger Behandlung wurden die P10 Tiere getötet, mit PBS und 4 %iger PFA Lösung

perfundiert. Das Gehirn wurde in Tissue-Tek eingebettet und bis zur immunhistologischen Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

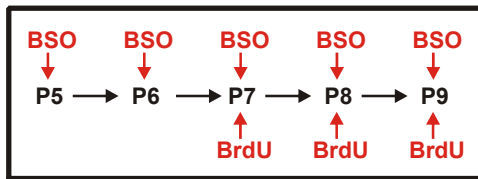


Abb. 9: Schematische Darstellung der Redox-Modulation in postnatalen Mäusen.

3.4.7 Modulation von Sirt1 *in vivo*

Die *in vivo* Modulation von Sirt1 erfolgte durch subkutane Injektion des Sirt1 Inhibitors Cambinol (100 mg/kg). Es wurden hierzu P5 Mäuse für zwei Tage (P5-P7) mit Cambinol oder Vehikel (Cremophor EL 10 %; EtOH 5 %) behandelt. Nach erfolgter Applikation wurden die P8 Tiere getötet. Mit PBS perfundiert, das Gewebe der SVZ isoliert und die Mash1 Expression mittels qRT-PCR analysiert.

3.4.8 Perfusion und Fixierung von Mausgewebe

Zur Fixierung des ZNS wurde das gesamte Blut mit eiskaltem PBS ausgespült. Nach erfolgter Narkotisierung wurden dazu die Mäuse sternotomiert, eine Kanüle in die linke Herzkammer eingeführt und der rechte Vorhof eröffnet und mit eiskaltem PBS gefolgt von 4 % iger PFA Lösung gespült. Nach Enthauptung wurde das Gehirn inklusive OB entnommen, für weitere 4 h in 4 % iger PFA Lösung nachfixiert und anschließend dreimal gründlich mit PBS gewaschen. Die Entwässerung des Gewebes erfolgte über Nacht bei 4°C in 15 %iger Saccharoselösung gefolgt von einer 24 stündigen Inkubation in 30 %iger Saccharoselösung. Abschließend wurde das Gewebe mit flüssigem Stickstoff langsam in Tissue-Tek eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.5 Sonstige Methoden

3.5.1 Histologische Aufarbeitung

Zur histologischen und immunhistologischen Analyse wurde das entsprechende Mausegewebe am Kryostat mit einer Schnittdicke von 10 µm geschnitten, auf Objektträger (Marienfeld, 75x25x1mm, HistoBond®) gesammelt und bei -20°C gelagert.

3.5.2 Immuncytochemie

Die auf Glasplättchen kultivierten NVZ wurden für 5 min mit 4 % PFA bei RT fixiert. Nach kurzer Spülung mit PBS folgte die Blockierung und Permeabilisierung des Materials mit 5 % Ziegen Serum und 0,5 % Triton X-100 in PBS für 2 h bei RT. Die Inkubation mit dem Erst-Antikörper wurde über Nacht bei 4°C oder für 2 h bei RT vorgenommen. Nachfolgend wurde mit 0,1 % Triton in PBS dreimal für je 5 min gewaschen und die Zellen für eine Stunde (RT) mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert. Die Zellkern-Färbung Hoechst 33258 erfolgte gleichzeitig zur Inkubation mit dem Zweitantikörper. Für die Detektion des Proliferationsmarkers BrdU wurden die fixierten Zellen für 20 min bei 37°C mit 2N HCl inkubiert, mit Natriumperborat (50 mM, pH 8,5) gewaschen und mit anti-BrdU inkubiert. Für Doppelfärbungen mit GFAP oder beta-III-Tubulin wurde die Behandlung mit HCl im Anschluss an die linienspezifische Färbung durchgeführt. Kontrollfärbungen wurden in Abwesenheit eines Erst-Antikörpers vorgenommen. Nach abgeschlossener Färbung wurden die Objekte mit ImmuMount eingedeckelt und unter einem inversen Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die verwendeten Erst- und Zweit-Antikörper sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Erst- und Zweit-Antikörper

Erst-Antikörper	Hergestellt in	Verdünnung	Firma
anti-Ki67	Ratte	1:50	Dako, Germany
anti-BrdU	Maus	1 :1000	Sigma, Germany
anti-Tuj1	Kaninchen	1:600	Sigma, Germany
anti-Nestin	Kaninchen	1:400	Chemicon, Germany
anti-NeuN	Maus	1:1000	Chemicon, Germany
anti-GFAP	Kaninchen	1:600	Dako, Germany
anti-O4	Maus	1:50	Boehringer, Germany
anti-GalC	Maus	1:100	Boehringer, Germany

Hoechst 33258		1:1000	Invitrogen
Zweit-Antikörper	Gerichtet gegen		
Ziegen-konjugiertes Cy2	Kaninchen/Ratte	1:100	eBioscience, Germany
Ziegen-konjugiertes Cy3	Kaninchen/Maus	1:100	eBioscience, Germany

3.5.3 Immunhistochemie

Die am Kryostaten hergestellten Gewebeschnitte wurden für mindestens eine Stunde luftgetrocknet, mit einem Dako Pen (Dako) umrandet und nochmals mit 4 % PFA für 5 min fixiert. Die nachfolgenden Schritte wurden wie in Kapitel 3.5.2 durchgeführt. Die verwendeten Erst- und Zweit-Antikörper sind in Tabelle 11 zu sehen. Für die Mash1 Färbung wurde das „Tyramide Signal Amplification“ System von Perkin Elmer verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt.

Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Erst- und Zweit-Antikörper

Erst-Antikörper	Hergestellt in	Verdünnung	Firma
anti-Sirt1	Kaninchen	1:200	Santa Cruz, Germany
anti-Hes1	Kaninchen	1 :50	Santa Cruz, Germany
anti-BrdU	Ratte	1:400	Biozol, Germany
anti-GFAP	Kaninchen	1:400	Dako, Germany
anti-Mash1	Ziege	1:100	R&D, Germany
anti-Dcx	Kaninchen	1:200	Abcam, Germany
Hoechst 33258		1:1000	Sigma, Germany
Zweit-Antikörper	Gerichtet gegen		
Ziegen-konjugiertes Cy2	Kaninchen/Ratte	1:1000	eBioscience, Germany
Ziegen-konjugiertes Cy3	Kaninchen / Maus	1:1000	eBioscience, Germany

3.5.3.1 Quantifizierung der immunhistologischen Gewebeschnitte

Die gefärbten Gehirnschnitte wurden an einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Leica (Leica DMRA) analysiert. Die Präparate wurden bei einer 4-, 10- und 20-fachen Vergrößerung analysiert und mit einer Infinity 2-Kamera (Bfi Optilas) aufgezeichnet. Die Interpretation und Quantifizierung erfolgte mit Adobe Photoshop 7.0.

3.5.4 Durchflusszytometrie

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie dazu benutzt, die Expression von Oberflächenmolekülen zu analysieren. Zwei physikalische Phänomene werden dafür genutzt: Einerseits die natürliche Streuung von Licht an den Strukturen der Zellen und andererseits das Emissionsvermögen (Fluoreszenz) von Farbstoffen, die durch spezifische Antikörper an die Zellen gebunden werden. Dabei ist die Intensität des produzierten Lichts proportional zur Konzentration des Farbstoffs. Dazu werden die darzustellenden Moleküle auf den Zellen mit monoklonalen Antikörpern spezifisch markiert, die den fluoreszierenden Farbstoff direkt tragen oder mit nicht-fluoreszierendem Biotin verbunden sind und die eigentliche Fluoreszenz mit einem „Zweit-Antikörper“ (Streptavidin+Farbstoff) an den spezifischen Antikörper anlagern (indirekte Färbemethode). Zur Messung der Streuung und Fluoreszenz wurde ein FACSCalibur verwendet, der die Zellen einzeln in einem Flüssigkeitsstrom an zwei verschiedenen Lasern (480 nm Argonlaser und 630 nm Diodenlaser, 200mW) vorbeileitet und in ein optisches Signal umwandelt. Am FACSCalibur können sechs verschiedene Parameter aufgenommen werden:

Tabelle 12: Messparameter am FACS-Calibur (BD)

Parameter	Proportional zu	Absorption	Emission
Forward Scatter(FSC)	Streuung längs des Laserstrahls (Zellgröße)		
Sideward Scatter (SSC)	Streuung quer zum Laserstrahl (Granularität)		
Fluoreszenz 1	Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)	492 nm	520-530 nm
Fluoreszenz 2	Phycoerythrin (PE)	488 nm	570-576 nm
Fluoreszenz 3	Propidiumiodid (PI)	495 nm	639 nm
	PerCP	490nm	675 nm
Fluoreszenz 4	Cy5 und Allophycocyanin (APC)	625-650nm	660-670 nm

3.5.4.1 Oberflächenfärbung

Ungefähr 10^6 Zellen wurden in ein 2 ml Eppendorfgesäß überführt und in FACS-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 0,75 µg/ml anti-m-Fc-Rezeptor in FACS-Puffer für 10 min bei 4°C geblockt, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Dann wurde mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und die Erst-Antikörper, die spezifisch an die Oberflächenmoleküle binden, dazu gegeben und für 15 min in einem Konzentrationsbereich von 0,5 bis 5 µg/ml mit den Zellen inkubiert (Volumen

100 µl). Nach einem erneuten Waschschrift folgt die optionale Färbung mit einem Zweit-Antikörper, der ebenfalls durch zweimaliges Waschen entfernt wurde. Zuletzt wurden die Zellen in 300µl FACS-Puffer aufgenommen und die Streuung und Fluoreszenz am FACSCalibur gemessen. Die Daten wurden dann mit dem Programm FCS Express analysiert

3.5.5 Migrationsexperimente

Die Donormäuse wurden narkotisiert und die langen Röhrenknochen (Femur und Tibia) entnommen. Aus diesen wurde mit einer 0,7 mm Nadel das Knochenmark mit RPMI herausgespült, durch ein Zellsieb gepresst, mit PBS gewaschen und gezählt. Die Knochenmarkszellen wurden im Anschluss mit LPS (1 µg/ml, 6 h), PZW (Pneumokokkenzellwand, 1:20, 12 h) oder TRAIL (1 µg/ml, 12 h) behandelt (Kap. 4.1.3). Die Migrationsexperimente wurden in Transwell-Migrationskammern (6,5 mm Transwell-Einsätze, 5 µm Porengröße, Costar) durchgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet, für 5 min bei 500xg zentrifugiert in Kulturmedium resuspendiert, gezählt und auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Der entsprechende LTB₄-Stimulus (0,1 – 1 nM) wurde zu 600 µl Kulturmedium in einer 14-Lochplatte, die zuvor für 30 min bei 37°C vorgewärmt wurde, zugegeben. Die Transwell-Einsätze wurden dann eingehängt und unmittelbar danach 150 µl Zellsuspension je Transwell-Einsatz zugegeben. Die Migration fand für 1-2 h unter Kulturbedingungen statt. Schließlich wurden die Transwell-Einsätze ausgehängt, 500 µl je Vertiefung entnommen, für 3 min bei 500xg zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden schließlich in 400 µl FACS-Puffer resuspendiert und auf Gr-1 positive Zellen gefärbt und schließlich am Durchflusszytometer FACSCalibur für jeweils 20 Sekunden ausgezählt.

3.5.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS 12.0 für Windows. Die Tiere oder das Material der Untersuchungsgruppe wurden mit den korrespondierenden Kontrolltieren oder Kontrollmaterial verglichen. Dazu diente der Mann-Whitney-U Test in dem jedes Gen, bzw. immuncytochemisches- oder immunhistologisches Merkmal mit der entsprechenden Kontrolle verglichen wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Die Rolle von TRAIL in der Neuroinflammation

4.1.1 Die Blockierung von TRAIL im ZNS

Zur Überprüfung der Hypothese, dass TRAIL im ZNS als Effektormolekül für primäre Schädigungsmechanismen innerhalb der Neuroinflammation verantwortlich ist, wurde die Rolle von TRAIL im Rahmen der T-Zell-vermittelten Pathogenese der EAE, dem gängigen Tiermodell der MS, untersucht. Dazu wurde das TRAIL-System mit einem löslichen, rekombinanten TRAIL-R2:Fc-Konstrukt (DR5:Fc) nach Induktion einer Transfer-EAE (durch Übertragung enzephalitogener T-Zellen) blockiert. Die Transfer- (oder sogenannte „passive“) EAE wurde bewusst zur Fokussierung auf die Schädigungsphase der Erkrankung ausgewählt. Durch die intrazisternale Applikationsweise wurde sichergestellt, dass sich die TRAIL-Blockade auf das ZNS beschränkte. Um einen immunmodulatorischen Effekt des Fc-Fragments ausschließen zu können, wurde einer Kontrollgruppe von Tieren reines Fc-Fragment (Fc) verabreicht. Aus Abbildung 10 wird ersichtlich, dass eine Applikation von DR5:Fc zu einer deutlichen Abnahme der klinischen Symptome führt. Während die Kontrolltiere einen mittleren klinischen Krankheitsgrad um 2,5 entwickeln, ist durch die Blockade des TRAIL-Systems der mittlere Krankheitsgrad auf 1 reduziert.

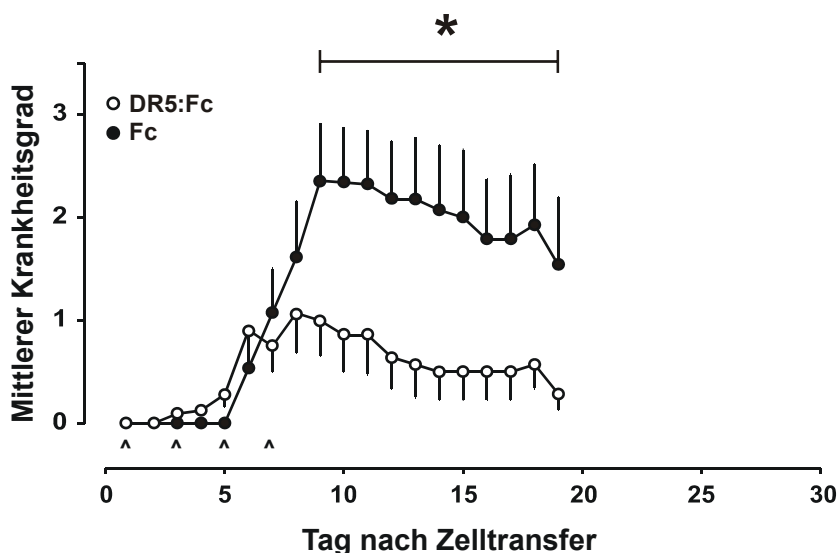


Abb. 10: Einfluss der TRAIL-Blockade im ZNS auf den klinischen EAE-Verlauf. Dargestellt sind Mittelwerte der klinischen Symptome von SJL-Mäusen einer Gruppe an den angegebenen Tagen nach dem Transfer von Myelin-spezifischen T-Zellen: (●) SJL-Mäuse nach intrazisternaler Injektion von 1 µg DR5:Fc oder 1 µg Fc-Fragment (○) pro Maus. Applikation der Substanzen erfolgte an Tag 1, 3, 5 und 7 nach Immunisierung. Der klinische Krankheitsgrad ist als Mittelwert (\pm SEM) aufgezeigt. *, $P < 0.05$, verglichen zur FC-Gruppe.

4.1.1.1 Einfluss der TRAIL-Blockade auf Immunzellen

Im Gegensatz zu den Kontrolltieren zeigt die DR5:Fc-Gruppe einen leicht früheren Krankheitsausbruch. Die ersten Krankheitssymptome sind an Tag 3 nach Immunisierung zu verzeichnen, während in der Fc-Kontrollgruppe die ersten Tiere an Tag 5 nach Immunisierung erkranken. Dieser verfrühte Krankheitsausbruch in der passiven EAE (Abb. 10) lässt auf einen systemischen, immunregulatorischen Effekt infolge der intrazisternalen DR5:Fc-Applikation schließen. Um einen möglichen Einfluss auf Immunzellen außerhalb des ZNS zu untersuchen, wurden diese an Tag 11 nach EAE-Induktion sowohl aus den zervikalen Lymphknoten als auch aus der Milz isoliert und auf ihr antigenspezifisches Proliferationsverhalten untersucht. Die Proliferationsanalyse erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen des enzephalitogenen Myelinepitops PLP139-151 (5 und 25 µg/ml). Als Positivkontrolle wurde die Zellproliferation mit dem unspezifische Mitogen Concanavalin A (ConA; 2 µg/ml) induziert. Die Kultivierung der Zellen ohne Zusatz eines Proliferationsstimulus (Medium) diente als Bezugswert. Nach 18-stündiger Inkorporation von 3H-Thymidin wurde die Proliferation in „counts per min“ (c.p.m.) mit einem beta-Zähler bestimmt (Kap.3.2.6). Aus Abbildung 11 geht hervor, dass eine intrazisternale Injektion von DR5:Fc keinen Einfluss auf die antigenspezifische Immunantwort hat. Im Vergleich zur Mediumkontrolle zeigen Lymphknotenzellen ebenso wie Milzzellen eine antigenspezifische (PLP 5 und 25 µg/ml) Proliferation. Hierbei ist jedoch kein quantitativer Unterschied im Proliferationsverhalten erkennbar (vgl. DR5:Fc vs. Fc). Auch der unspezifischen ConA-Stimulus (ConA 2 µg/ml) aktiviert die Zellproliferation beider Gruppen im gleichen Umfang.

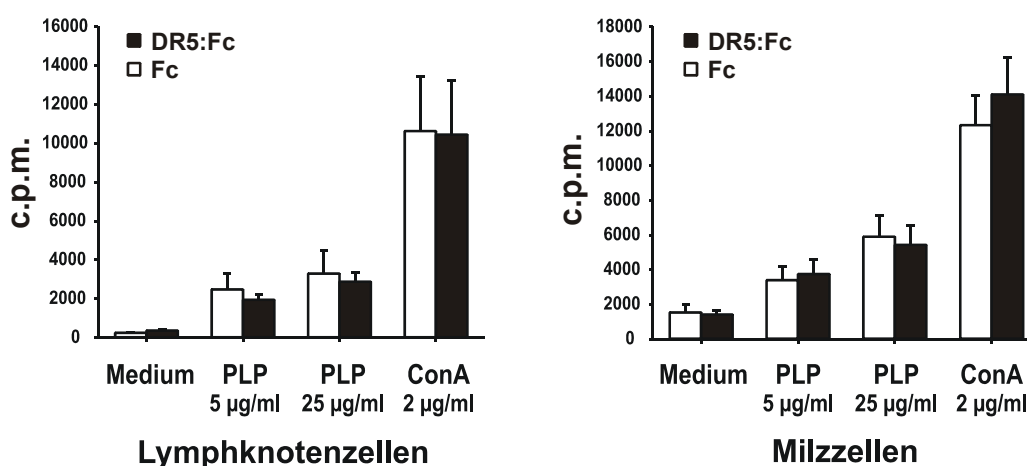


Abb. 11: Proliferationsanalyse von Lymphknoten- und Milzzellen nach intrazisternaler DR5:Fc-Injektion mittels 3H-Thymidin Inkorporation. Dargestellt ist die Proliferation in „counts per minute“ infolge antigenspezifischer Stimulation mit 5 und 25 µg/ml PLP139-151 sowie einem unspezifischen Concanavalin-A-Stimulus (ConA 2 µg/ml) und einer Mediumkontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte (\pm SD).

Nachdem ein immunregulatorischer Effekt auf die periphere T-Zellaktivierung ausgeschlossen werden konnte, wurde die Aktivierung von infiltrierten Zellen aus dem ZNS analysiert. Infolge der Applikation des DR5:Fc-Konstruktes in das ZNS ist ein direkter Kontakt mit infiltrierenden Immunzellen gewährleistet und ein immunmodulatorischer Effekt in situ denkbar. Zur genaueren Untersuchung wurden bei Krankheitsausbruch (Tag 7) und während der Remissionsphase (Tag 14) sowohl CD3 positive Zellen (CD3+; T-Zellen) als auch CD11b positive Zellen (CD11b+; Makrophagen/Mikrogliazellen) aus dem ZNS isoliert (Kap. 3.2.3.3). Die Analyse der Zellaktivierung erfolgte durch die Färbung spezifischer Aktivierungsmarker auf der Zelloberfläche und anschließender Analyse am FACS (Kap. 3.5.4). Als T-Zell-Aktivierungsmarker wurden CD25 und CD44 verwendet. CD11b+ Zellen wurden auf CD54 (iCAM) gefärbt. Nach Isolierung der Zellen aus dem ZNS und vorgenommener FACS-Analyse zeigten die zwei Gruppen weder einen Unterschied in der absoluten Zellzahl noch in dem Anteil von CD3+ und CD11b+ Zellen im Infiltrat. Pro Maus lag die durchschnittliche Zahl infiltrierter Zellen an Tag 7 nach Zelltransfer bei $3.2 \times 10^6 \pm 1.6$ Zellen (Fc-behandelte Gruppe) und bei $2.7 \times 10^6 \pm 1.4$ Zellen (DR5:Fc-behandelte Gruppe). Nach dem Krankheitspeak konnten $2.0 \times 10^6 \pm 0.8$ Zellen (Fc-behandelte Gruppe) und $2.5 \times 10^6 \pm 1.1$ Zellen (DR5:Fc-behandelte Gruppe) isoliert werden. Mit einer Ausnahme geht aus der FACS-Analyse zu keinem Untersuchungszeitpunkt ein Unterschied in der Zellaktivierung hervor. In der DR5:Fc-Gruppe zeigt sich lediglich bei Krankheitsausbruch (Tag 7) eine verstärkte Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf CD3+ Zellen (Abb. 12).

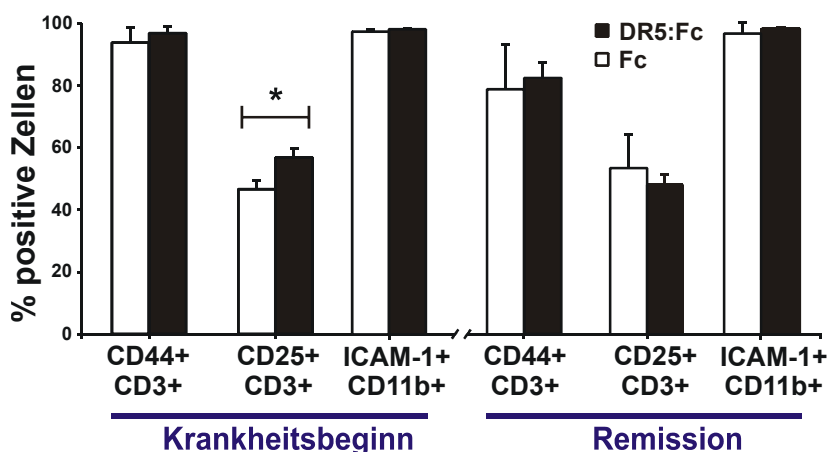


Abb. 12: FACS-Analyse von ZNS-infiltrierten Immunzellen nach intrazisternaler DR5:Fc-Injektion. Immunzellen wurden zum Zeitpunkt des Krankheitsausbruchs (Tag 7) und in der Remissionsphase (Tag 14) aus dem ZNS isoliert. CD3+ Zellen wurden auf die Expression von CD44, CD25 und CD11b+ Zellen auf die Expression von CD54 (iCAM) gefärbt. Dargestellt sind Mittelwerte in Prozent (\pm SD). *, $P < 0.05$, verglichen zur Fc-Gruppe.

4.1.2 Transfer von TRAIL-defizienten T-Zellen

Bislang konnte gezeigt werden, dass die intrazerebrale Hemmung der TRAIL-Signalkaskade zu einer signifikanten Abschwächung der klinischen Symptome in der EAE führt und TRAIL somit eher eine schädigende Rolle im entzündeten ZNS einnimmt. Um zu bestätigen, dass Myelin-spezifische aktivierte T-Zellen durch ihre Fähigkeit, TRAIL zu exprimieren, eine zerstörerische Effektorfunktion innerhalb der MS-Pathologie besitzen, wurde erneut eine passive EAE induziert. Diesmal erfolgte die Krankheitsauslösung durch den Transfer von TRAIL-defizienten oder Wildtyp-Zellen. Hierfür wurden TRAIL-defiziente und C57BL/6 Wildtyp-Mäuse mit MOG35-55 immunisiert und MOG-spezifische Lymphozyten für den Zelltransfer gewonnen (Kap. 3.4.3.2). Um gleichzeitig den Effekt von TRAIL auf die T-Zellaktivierung zu überprüfen, wurden die Donor-Lymphozyten am Tag der Zellisolierung am FACS auf ihren Aktivierungszustand analysiert. TRAIL-defiziente Mäuse zeigten dabei eine signifikant erhöhte CD25-Expression auf CD3+ Zellen ($64.8 \% \pm 1.6 \text{ SEM}$) im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen ($51.5 \% \pm 1.4 \text{ SEM}$). Es war jedoch kein Unterschied in der CD44-Expression ersichtlich. Nach antigenspezifischer Restimulation folgte der Zelltransfer in naive C57BL/6 Wildtyp-Mäuse. Aus Abbildung 13 wird ersichtlich, dass TRAIL-defiziente T-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-T-Zellen eine signifikant verminderte Kapazität zur EAE-Auslösung besitzen. Dies geht aus einer stark verminderten EAE-Inzidenz und einem verminderten Krankheitsgrad der Rezipienten von TRAIL-defizienten T-Zellen hervor. In der Kontrollgruppe zeigen 9 von 11 Tieren klinische Symptome, während durch den Transfer von TRAIL-defizienten Zellen lediglich 1 von 7 Rezipienten erkrankt.

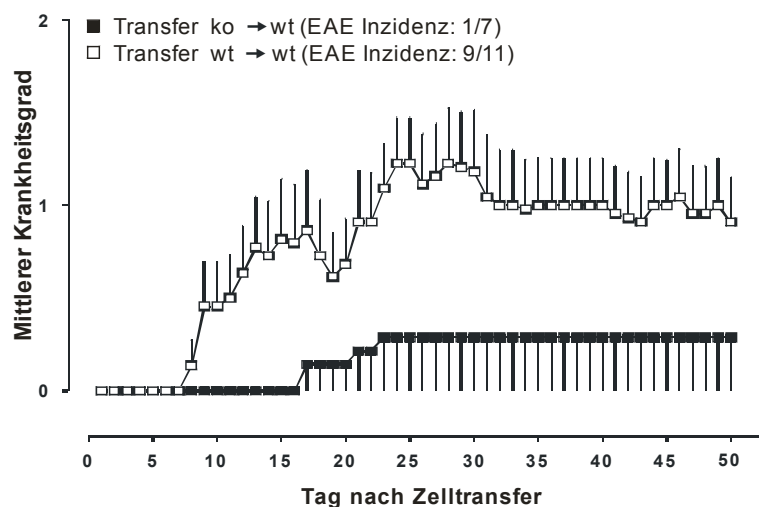


Abb. 13: Passive EAE mit TRAIL-defizienten myelinspezifischen T-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte der klinischen Symptome von C57BL/6-Rezipienten einer Gruppe an den angegebenen Tagen nach Zelltransfer von: (■) TRAIL-defizienten T-Zellen; (□) C57BL/6 T-Zellen. Der klinische Score ist als Mittelwert ($\pm \text{SEM}$) aufgezeigt.

4.1.3 TRAIL-R-Expression auf neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten werden permanent im Knochenmark gebildet und zirkulieren während ihrer kurzen Lebensdauer in der Blutbahn. Durch verschiedene, am Ort der Entzündung gebildete Chemokine, wie beispielsweise TNF-alpha, CXCR4 (Chemokin Rezeptor 4) und LTB4 (Leukotrien B4), wird die Migration der Neutrophilen zum Entzündungsort initiiert, wo sie durch die Sekretion von Proteasen, RSS und anderer pro-entzündlicher Mediatoren eine Entzündungsreaktion hervorrufen können. Im Rahmen der bakteriellen Meningitis werden sie als Effektoren für die fortschreitende Entzündungsreaktion und Zellschädigung verantwortlich gemacht. In TRAIL-defizienten Mäusen zeigte sich diese Entzündungsreaktion stark abgeschwächt. Dieser protektive Effekt von TRAIL konnte auf eine veränderte Rekrutierung und Lebensdauer von Granulozyten im Liquor zurückgeführt werden. Um die Rolle des TRAIL-Systems auf das Überleben und die Migration der neutrophilen Granulozyten zu untersuchen, wurde sowohl die Expression des TRAIL-R2 als auch deren Migrationsfähigkeit gegenüber LTB4 untersucht. Die Detektion des TRAIL-R2 auf Granulozyten aus dem Blut naiver C57BL/6-Mäuse erfolgte mit einem polyklonalen anti-TRAIL-R2. Durch einen FITC-gelabelten Zweit-Antikörper konnte die Rezeptorexpression mit dem FACS analysiert werden. Die Granulozytenpopulation wurde dabei mit einem PE-gelabelten Antikörper gegen ein granulozytäres Oberflächenantigen (anti-Gr-1 Antikörper) von den restlichen Zellpopulationen im Blut abgegrenzt. Abbildung 14 zeigt die FACS-Färbung des TRAIL-R2 auf Gr-1 positiven Granulozyten (X-Achse). Dargestellt ist zum einen die Isotyp-Kontrolle nach Färbung mit dem FITC-gelabelten Zweitantikörper (links) und zum anderen die Färbung des TRAIL-R2 (rechts). Im Dot Blot ist eine deutliche Verschiebung des Gr-1-Signals im Vergleich zur Isotypkontrolle erkennbar. Um die Existenz des TRAIL-R2 auf Granulozyten zu verdeutlichen, wurden zusätzlich nur Gr-1 positive Zellen angeschaut und die TRAIL-R2-Expression im Histogramm dargestellt (untere Abbildung). Im Vergleich zur Istotyp-Kontrolle (gefülltes Histogramm) zeigt sich eine deutliche Expression des TRAIL-R2 auf Gr-1 positiven Zellen (schwarze Linie).

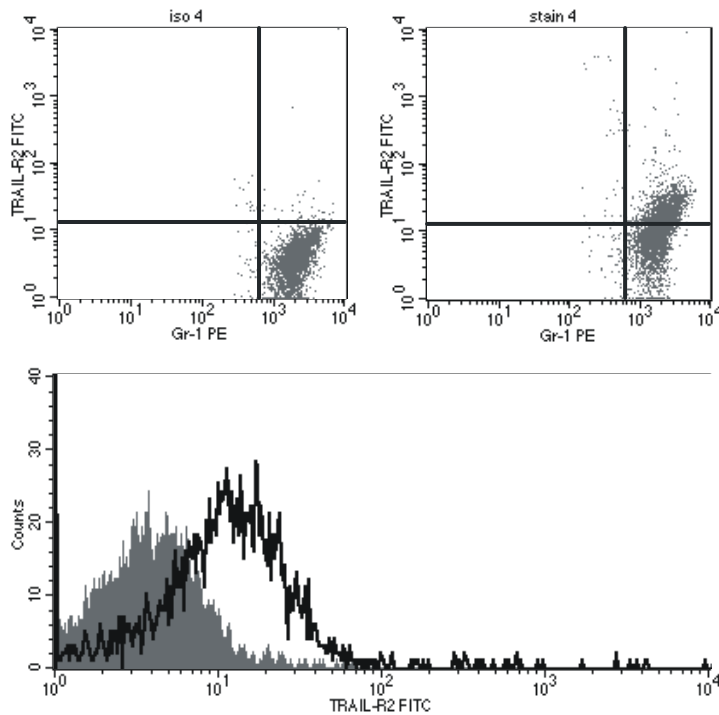


Abb. 14: Detektion des TRAIL-R2 auf Gr-1+ Zellen mittels FACS-Analyse. Im Blut von naiven C57BL/6-Mäusen wurde der TRAIL-R2 durch einen polyklonalen TRAIL-R2-Antikörper detektiert. Die Visualisierung erfolgte mit einem FITC-gelabelten Zweitantikörper am FACS. Gr-1+ Zellen wurden mit einem PE-gelabelten anti-Gr-1-Antikörper von den übrigen Zellen abgegrenzt. Dargestellt ist die Isotypkontrolle (oben links) und die TRAIL-R2-Färbung (oben rechts). Das untere Histogramm zeigt den Isotyp (grau) und die TRAIL-R2-Färbung (schwarze Linie) auf Gr-1+ Zellen.

Um zu untersuchen, ob die Anwesenheit von TRAIL das Migrationsverhalten von Granulozyten beeinflusst, wurden in einem Vorversuch Knochenmarkzellen von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen isoliert und für 6 h mit Lipopolysaccharid (LPS) aktiviert. In einem Transwellssystem wurde mittels LTB₄ ein Chemokingradient angelegt und die Migration der Granulozyten induziert (Kap. 3.5.5). Die quantitative Auswertung der migrierten Gr-1+ Zellen erfolgte am FACS. Wie aus Abbildung 15 hervorgeht, sind nach zweistündiger Migrationsdauer Granulozyten aus C57BL/6-Mäusen gegenüber LTB₄ chemotaktisch aktiv. Bei einer LTB₄-Konzentration von 0,1 μ M ist jedoch ein Migrationsmaximum erreicht, eine Konzentrationserhöhung auf 1 μ M führt zu keiner weiteren Erhöhung der Migrationsrate. Somit wurde in allen weiteren Versuchen eine Konzentration von 0,1 μ M LTB₄ verwendet (Abb. 15).

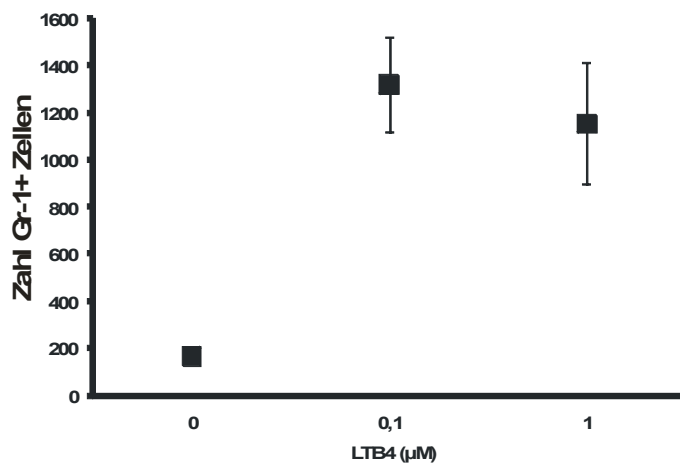


Abb. 15: Migration Gr-1 positiver Zellen infolge eines LTB4-Gradienten. Zu sehen ist die Gesamtzahl an migrierten Gr-1-positiver Zellen nach Aktivierung mit LPS (LPS 1 µg/ml; 6h). Ausgelöst wurde die Migration durch einen LTB4-Gradienten (0,1 und 1 µM). Dargestellt sind Mittelwerte (\pm SD).

Der Einfluss von TRAIL auf das Migrationsverhalten von Granulozyten wurde in der nachfolgenden Migrationsserie mit Hilfe von TRAIL-defizienten Knochenmarkszellen untersucht. Hierzu wurde die Wanderung Gr-1 positiver Zellen, über eine permeable Membran, mit 0,1 µM LTB4 induziert. Die Aktivierung der Knochenmarkszellen von TRAIL-defizienten und Wildtyp-Mäusen erfolgte diesmal durch zwölfstündige Inkubation mit Pneumokokken-Zellwandbestandteilen (PZW), da diese im Tiermodell der bakteriellen Meningitis zur Entzündungsinduktion eingesetzt werden. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen vor Migrationsstart für 12 h mit löslichem TRAIL inkubiert. Erneut zeigt sich eine durch LTB4 induzierbare Migration aktivierter Gr-1+ Zellen. Nach einstündiger Migrationsdauer ist ohne LTB4 eine Basalmigration von ungefähr 100 Gr-1+ Zellen zu verzeichnen. Diese steigt infolge des angelegten LTB4-Gradienten um das Vierfache an. Es ist festzustellen, dass weder die Aktivierung mit PZW noch die Inkubation mit löslichem TRAIL eine Veränderung im Migrationsverhalten von Gr-1+ Zellen hervorruft (Abb. 16). Granulozyten aus TRAIL-defizienten und Wildtyp-Mäusen weisen ebenfalls keinerlei Unterschied in ihrem Wanderungsverhalten auf.

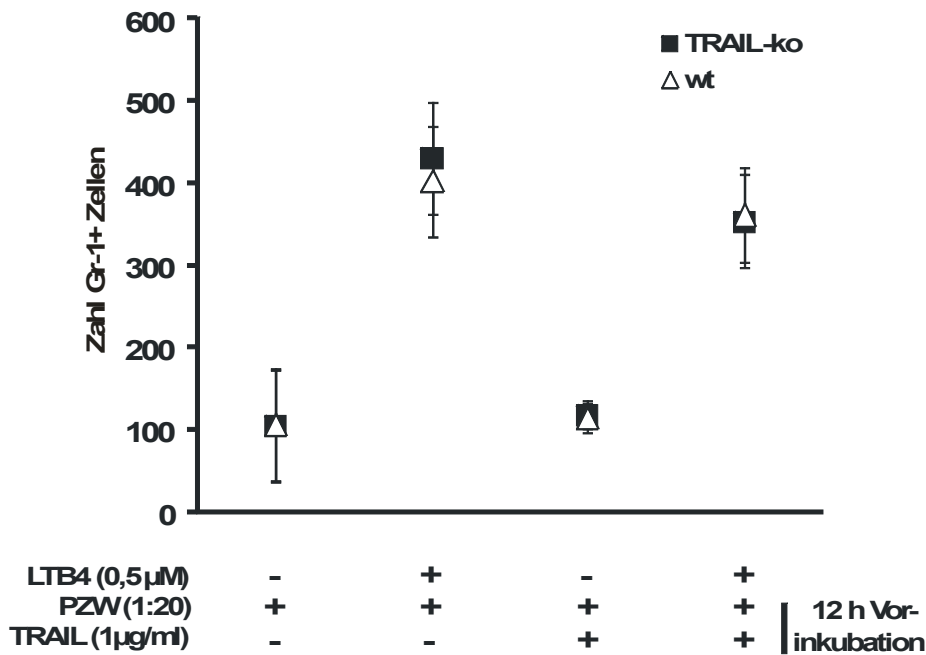


Abb. 16: Migration Gr-1+ Zellen infolge eines LTB4-Gradienten. Zu sehen ist die Gesamtzahl der migrierten Gr-1+ Zellen von TRAIL-defizienten (■) und C57BL/6 Wilttyp (△) Knochenmarkzellen nach Aktivierung (PCW 1:50, 12 h) und Inkubation mit löslichem TRAIL (1 µg/ml; 12 h). Dargestellt sind Mittelwerte (± SD).

4.2 Mechanismen gestörter neuronaler Regeneration und reaktiver Astroglie

4.2.1 Charakterisierung neuronaler Vorläuferzellen

Neurale Stamm- und Vorläuferzellen sind per Definition klonale Zellen mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Spezifikation in allen ZNS-ansässigen Zelllinien (Multipotenz). Zellen mit derartigen Fähigkeiten können sowohl aus dem embryonalen als auch aus dem adulten ZNS isoliert werden. Unter speziellen Bedingungen können diese Zellen zu Neuronen oder Gliazellen differenzieren oder unter proliferativen Bedingungen als Langzeitkulturen in losen Zellverbänden, den sogenannten Neurosphären, kultiviert werden. Diese Zellen stellen daher ein hervorragendes *in vitro*-Modell dar, um beispielsweise neuronale Entwicklungsstudien oder Transplantationstherapien zu untersuchen. Die in dieser Arbeit verwendeten neuronalen Vorläuferzellen wurden, wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, aus dem embryonalen Cortex der Maus präpariert. Diese Vorläuferzellen wurden als klonale Neurosphären kultiviert und behielten unter dem Zusatz von bFGF (10 ng/ml) die klassische Fähigkeit der Stammzellen zur Selbst-

erneuerung. Die Entfernung dieses Mitogens führte zur spontanen Differenzierung in Neurone und Gliazellen. Immunocytochemische Färbungen bestätigten, dass ungefähr 95 % der kultivierten NVZ Nestin, ein Marker für Stamm- und Vorläuferzellen, exprimieren. Die negative immunocytochemische Detektion der linienspezifischen Filamentproteine β -III-Tubulin (Tuj1, Neurone) und GFAP (Astrozyten) deutet auf das undifferenzierte Stadium der kultivierten NVZ. Nestin wurde jedoch im Laufe der Differenzierung, ausgelöst durch Mitogenentzug, vollständig durch die Expression der linienspezifischen Filamentproteine ersetzt.

4.2.2 Einfluss des Redox-Gleichgewichts auf die Eigenschaften NVZ

4.2.2.1 Einfluss auf die Selbsterneuerung von NVZ

Um den Einfluss des intrazellulären Redox-Gleichgewichts auf die Proliferation von NVZ zu untersuchen, wurden diese für zwei Tage unter proliferativen Bedingungen (in Gegenwart von bFGF) kultiviert. Vier Stunden nach Ausplattierung wurde das Redox-Gleichgewicht durch BSO (Buthioninsulfoximin), einem Inhibitor der γ -Glutamyl-Cystein-Synthase, zugunsten der pro-oxidativen Seite verschoben. α -Liponsäure, ein Radikalfänger und starkes Antioxidans, diente dabei zur Herstellung einer reduzierenden Umgebung. Immunocytochemische Färbungen von NVZ zeigen, dass die Koloniebildung Nestin-positiver Zellen (grün) in Gegenwart geringer BSO-Konzentrationen (1 μ M) im Vergleich zu unbehandelten NVZ gehemmt wird (Abb. 17). Diese Beobachtung geht mit einer Reduktion der Gesamtzellzahl, welche durch die Anfärbung des Nukleus mit dem Kernfarbstoff Hoechst 33258 (blau) visualisiert wurde, einher. Eine Verschiebung des Redox-Gleichgewichts zugunsten der reduktiven-Seite besitzt den gegenteiligen Effekt und die Zahl Nestin+ Zellen steigt sichtbar an. Die Anfärbung der Zellen mit dem Zellzyklus Marker Ki67 (rot) verdeutlicht den inhibierenden Effekt von BSO auf die Proliferation der NVZ. Unter BSO-Einfluss ist die Zahl der Ki67+ Zellen drastisch reduziert.

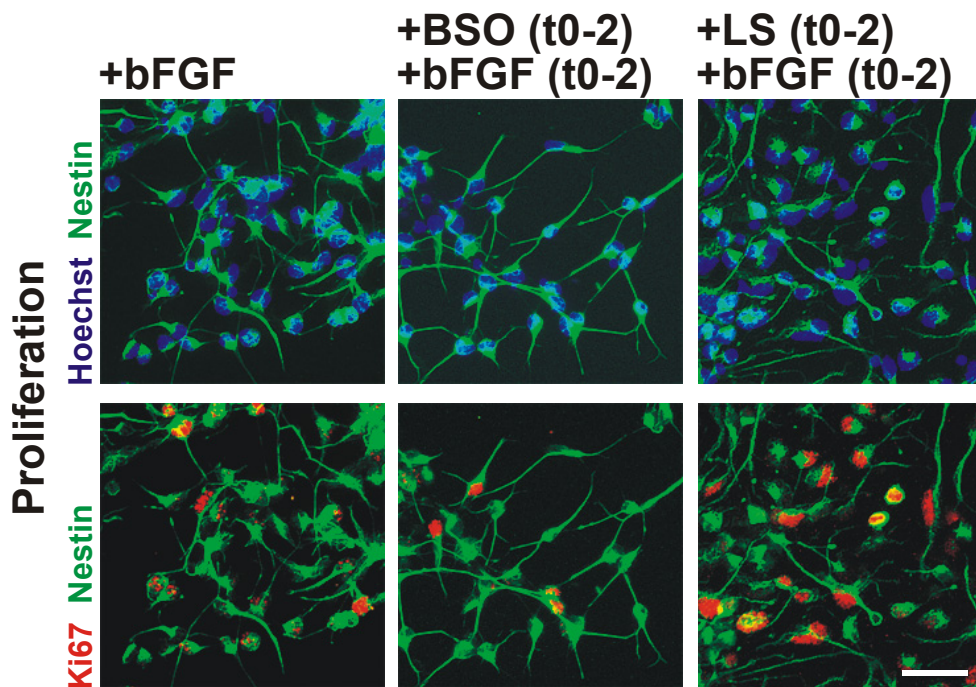


Abb. 17: Immunocytochemische Färbung von NVZ nach Modulation des Redox-Gleichgewichts mit BSO (1 μM) und LS (5 μM) (Tag 0 bis 2) unter proliferativen Bedingungen (+bFGF). Die Nestinfärbung (grün) zeigt undifferenzierte NVZ, deren Zellkerne mit Hoechst 33258 (blau, obere Reihe) oder dem Zellzyklusmarker Ki67 (rot, untere Reihe) angefärbt sind (Größenbalken 20 μm).

Die anschließende Quantifizierung der immunocytochemischen Färbung (Abb. 18) bestätigt die qualitative Beobachtung (Abb. 17). Verglichen mit der Vehikelkontrolle (kontr.) erniedrigt BSO den Anteil Ki67+ Zellen um 30 %. LS besitzt den gegenteiligen Effekt, wodurch der Anteil Ki67+ Zellen um 39 % ansteigt (Abb. 18). Der Einsatz weiterer Redox-aktiver Substanzen führt zum gleichen Ergebnis und untermauert, dass eine intrazelluläre Verschiebung des Redox-Gleichgewichts die Eigenschaft der Selbsterneuerung von NVZ beeinflusst. Während N-Acetyl-Cystein (NAC), eine Vorstufe des Antioxidans Gluthathion, die Proliferation von NVZ fördert, führt Diethyldithiocarbamat (DETC), ein Inhibitor der Superoxiddismutase, zu einer Erniedrigung der Ki67+ Zellen (Abb. 18). Neben dem Zellzyklus Marker Ki67 wurde zusätzlich die Inkorporation von BrdU (Bromdesoxyuridin) als Proliferationsnachweis untersucht (Abb. 18). Identisch zu den vorherigen Beobachtungen zeigt die immunocytochemische Quantifizierung eine verminderte Einlagerung von BrdU unter oxidativen Bedingungen. Reduzierende Bedingungen führen hingegen zu einem Anstieg an BrdU+ Zellen. Als Referenz wurden Vehikel-behandelte NVZ (kontr.) analysiert (Abb. 18).

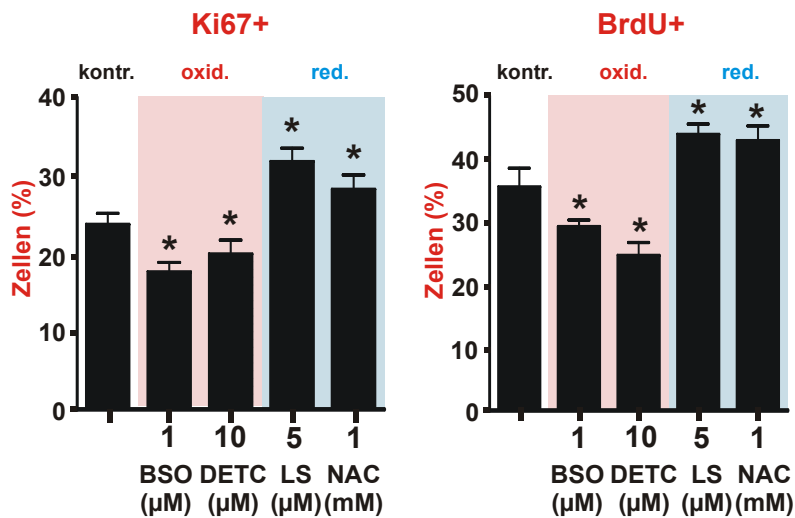


Abb. 18: Immuncytochemische Quantifizierung von Ki67+ und BrdU+ NVZ nach Modulation des Redox-Gleichgewichts mit BSO, DETC, LS, NAC für 2 Tage (+bFGF). Dargestellt sind Mittelwerte (\pm SD). *, $P < 0.05$, verglichen zur Vehikelgruppe (kontr.).

Änderungen des intrazellulären Redox-Gleichgewichts wurden mit dem Redox-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff 2,7-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (H_2DCFDA) visualisiert. 2,7-Dichlorodihydrofluoresceindiacetate wird dabei durch intrazelluläre RSS zum Fluorochrom Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert. Die immuncytochemische Färbung zeigt eine verstärkte Fluoreszenz, somit eine erhöhte intrazelluläre Konzentration an RSS infolge einer BSO Behandlung. Andererseits führt LS zu einer Abschwächung des Fluoreszenzsignals (Abb. 19).

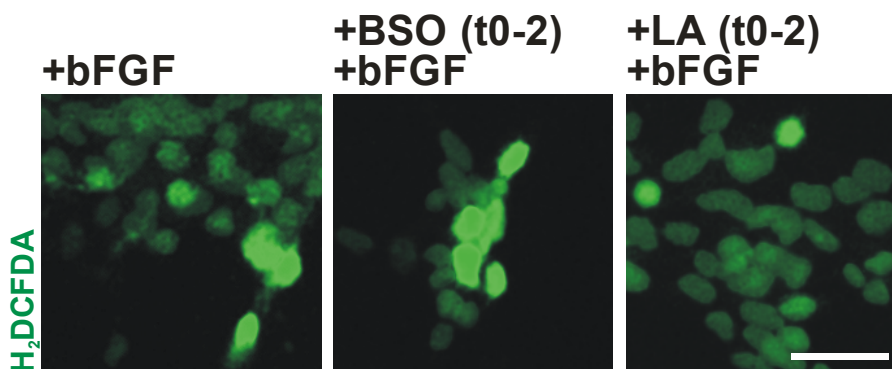


Abb. 19: Immuncytochemische Visualisierung erhöhter RSS-Konzentrationen in NVZ mit dem RSS-sensitiven Farbstoff H_2DCFDA . Inkubation der NVZ für 2 Tage mit BSO (1 μ M) und LS (5 μ M; Größenbalken 20 μ m).

Die verminderte Proliferation der NVZ infolge einer Gleichgewichtsverschiebung zugunsten der oxidativen Seite durch BSO und DETC (Abb. 18) könnte durch einen frühzeitigen Zelltod erklärt werden. Um eine toxische Wirkung dieser Substanzen aufgrund erhöhter

intrazellulärer Konzentrationen an RSS ausschließen zu können, wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test analysiert. Dazu wurden NVZ für 2, 5 und 7 Tage mit den oxidierend wirkenden Substanzen versetzt. Die Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blau-violettes, wasser-unlösliches Formazan erfolgt lediglich im Mitochondrium lebender Zellen. Durch Messung des Farbumschlags konnte somit der Anteil lebender Zellen ermittelt werden. Die eingesetzten Substanzkonzentrationen (1-5 μM BSO, 10 μM DETC) zeigen nach 2, 5 und 7 Tagen keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen (Abb. 20). Erst eine Erhöhung der BSO-Konzentration auf 1 mM führt zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Zellvitalität am zweiten Tag und zieht einen vollständigen Zelltod ab dem fünften Kulturtag mit sich.

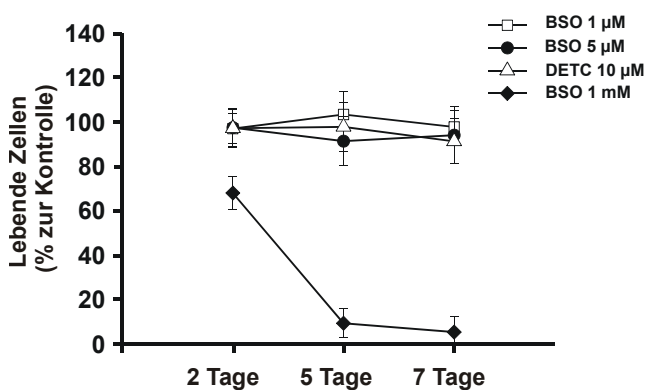


Abb. 20: MTT-Test zur Analyse der Zellvitalität nach Zugabe von BSO (1 μM – 1 mM und DETC 10 μM) für 2, 5 und 7 Tage unter proliferativen Bedingungen (+bFGF). Dargestellt sind Mittelwerte (\pm SD).

4.2.2.2 Einfluss auf die Differenzierung NVZ

Im Gegensatz zu Abschnitt 4.2.2.1 wurden die folgenden Untersuchungen unter Mitogenentzug (-bFGF) durchgeführt. Hierdurch wurde es ermöglicht, den Einfluss des intrazellulären Redox-Gleichgewichts auf die spontane Differenzierung zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten zu untersuchen. Dazu wurden die NVZ in normalem Kulturmedium, in Anwesenheit von bFGF, ausgesät und mit den Redox-Modulatoren versehen. Nach zweitägiger Kultur erfolgte der Austausch gegen bFGF-freies Medium, wobei das Differenzierungsmedium weiterhin mit den Redox-aktiven Substanzen versetzt war. Sieben Tage nach Mitogenentzug wurde die Differenzierung der NVZ durch immunocytochemische Färbung auf die linienspezifischen Marker NeuN (Neurone, rot) und GFAP (Astrozyten, grün) analysiert. Für die spätere Quantifizierung wurde wiederum der Kernfarbstoff Hoechst 33258 (blau) verwendet. Qualitativ zeigt sich unter pro-oxidativen (1 μM BSO) Bedingungen eine stark erhöhte Anzahl an GFAP+ Zellen verglichen zu NVZ,

die sowohl mit 5 μM LS als auch mit normalem Differenzierungsmedium versetzt wurden (Abb. 21). Unter reduzierenden Bedingungen ist ebenfalls eine leichte Erhöhung von Neuronen (NeuN+, rot) erkennbar.

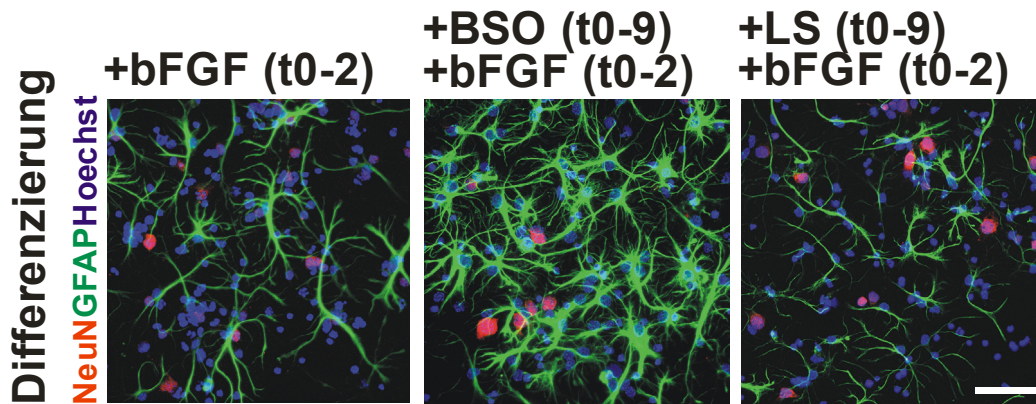


Abb. 21: Immunzytochemische Färbung von NVZ nach Modulation des Redox-Gleichgewichts mit BSO (1 μM) und LS (5 μM) (Tag 0 bis 9) unter Differenzierungsbedingungen (ohne bFGF Tag 3 bis 9). NVZ sind gefärbt mit NeuN (rot), GFAP (grün) und dem Zellkernfarbstoff Hoechst 33258 (blau; Größenbalken 20 μm).

Die Quantifizierung der immunzytochemischen Färbungen (Abb. 21) bestätigt den qualitativen Eindruck. Unter BSO- und DETC-Einfluss (1 μM , 10 mM) ist die Zahl der GFAP+ Zellen (Astrozyten) signifikant um 40 % erhöht, während der Anteil an NeuN+ Zellen (Neurone) in denselben Kulturen drastisch reduziert ist. Unter reduzierenden Bedingungen (LS, 5 μM ; NAC 1mM) zeigt sich der gegensätzliche Effekt: Die Zahl der NeuN+ Zellen ist um 70 % signifikant angestiegen, während der Anteil an GFAP+ Zellen deutlich erniedrigt ist. Als Bezugsgröße (kontr.) wurden unbehandelte NVZ mitgeführt (Abb. 22).

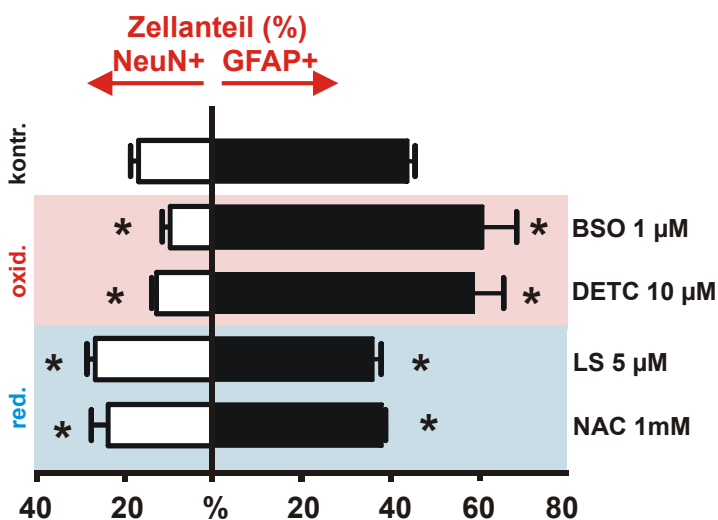


Abb. 22: Immunocytochemische Quantifizierung von NeuN+ und GFAP+ Zellen nach Modulation des Redox-Gleichgewichts in NVZ mit BSO, DETC, LS und NAC (Tag 0 bis 9) unter Differenzierungsbedingungen (-bFGF, Tag 3 bis 9). Dargestellt sind Mittelwerte (\pm SD). *, $P < 0.05$, verglichen zur Vehikelgruppe (kontr.).

4.2.2.3 Einfluss von BSO auf die Eigenschaften von NVZ-Klonen

Um zu überprüfen, ob die Ursache der verminderten neuronalen Differenzierung durch eine eingeschränkte Proliferation oder eher durch eine Einschränkung der Multipotenz zu erklären ist, wurde der Einfluss von BSO auf die Proliferation und Differenzierung einzelner NVZ-Klone untersucht. Für die klonale Analyse wurden einzelne NVZ-Klone aus der Kultur isoliert und getrennt voneinander für 4 Tage in Gegenwart von BSO (1 μ M) oder Vehikel expandiert. Unter diesen Bedingungen bildete sich aus jedem Klon eine Kolonie aus ca. 10-50 Zellen (Abb. 23a), bevor für weitere 7 Tage auf bFGF-freies Medium umgestellt wurde (Abb. 23b). Abschließend wurden die Zellen immunocytochemisch auf die Expression von beta-III-Tubulin (Tuj1, Neurone) und GFAP (Astrozyten) analysiert. Die klonale Analyse zeigt, dass unter BSO die Zahl der aus einem Klon hervorgegangenen Zellen reduziert ist (Abb. 23a). Die Mehrheit der Kolonien (90 %) besteht aus Neuronen (β -III-Tubulin+) und Astrocyten (GFAP+), wodurch es sich bei der Ausgangszelle um einen bipotenten Klon handeln musste. Vereinzelt sind auch reine neuronale sowie astrozytäre Kolonien zu finden. Dies deutet auf einen bereits festgelegten Ausgangsklon (monopotenter Klon) hin (Abb. 23b). Unter BSO-Einfluss zeigt sich lediglich die Koloniegröße und somit die Anzahl der aus einem Klon hervorgegangenen Zellen reduziert (Abb. 23a), der Anteil der bipotenten und monopotenten Klone ist unter BSO nicht beeinflusst (Abb. 23b).

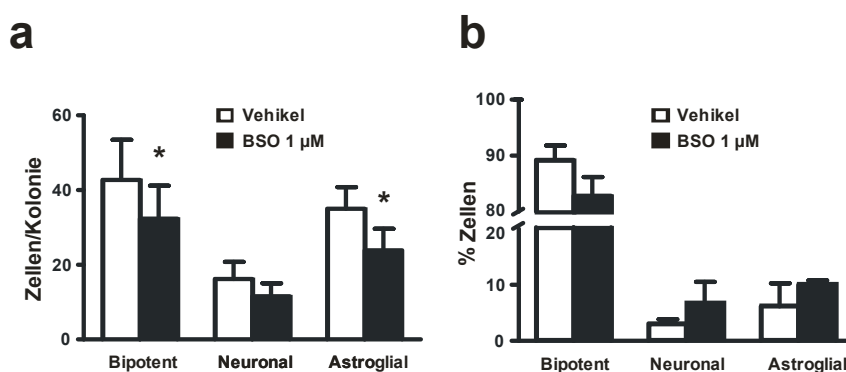


Abb. 23: Klonale Analyse von NVZ unter BSO (1 μ M) Einwirkung. a) Anzahl der Zellen pro Kolonie (+ bFGF von Tag 0-4). b) Prozent der bipotenten und monopotenten Klone (-bFGF von Tag 5-7). Dargestellt sind Mittelwerte (\pm SD). *, $P < 0.05$, verglichen zur Vehikelgruppe

Die Analyse der zellulären Zusammensetzung innerhalb einer Kolonie, hervorgegangen aus einem bipotenten Klon, zeigt eine drastische Veränderung unter BSO-Einwirkung. Pro-

oxidative Bedingungen führen zu einer Verminderung des neuronalen (β -III-tubulin+) Zellanteils um 46 %. Gleichzeitig steigt in denselben Kolonien die Zahl der Astrozyten (GFAP+) um 22 % an (Abb. 24).

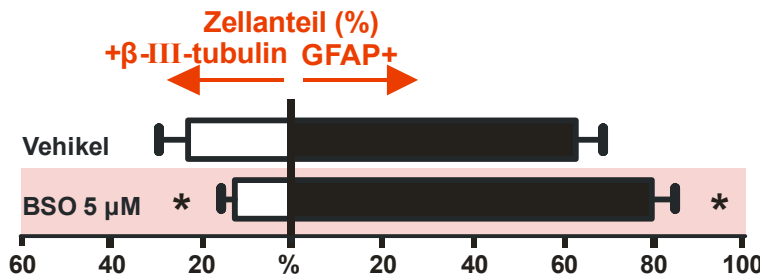


Abb. 24: Quantifizierung der immunocytochemischen Färbung von Kolonien bipotenter Klone unter BSO-Einwirkung (5 μ M). Anteil an β -III-tubulin+ (Neurone) und GFAP+ (Astrozyten) Zellen innerhalb einer Kolonie (-bFGF von Tag 5-7). Dargestellt sind Mittelwerte (\pm SD). *, $P < 0.05$, verglichen zur Vehikelgruppe.

4.2.3 Die Rolle von Sirt1 in NVZ *in vitro*

4.2.3.1 Expression von Sirt1 in NVZ

Um den gegensätzlichen Effekt eines reduzierenden versus oxidativen Milieus auf das Differenzierungsmuster der NVZ zu klären, wurde die Expression neuraler Transkriptionsfaktoren wie NeuroD, Hes1, Hes5, Olig 1, Olig2 und Sirt1 analysiert. Von diesen Transkriptionsfaktoren ist bekannt, dass sie die Entwicklung neuraler Stammzellen beeinflussen. Zur Modulation des intrazellulären Redox-Gleichgewichts wurden, wie schon in den vorangegangenen Kapiteln, BSO (1 μ M) und LS (5 μ M) verwendet. Nach 24-stündiger Modulation des Redox-Gleichgewichts erfolgte die Expressionanalyse mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR). Aus Tabelle 13 geht hervor, dass weder die Expression von NeuroD, Hes1, Hes5 noch Olig1 und Olig2 durch Modulation des intrazellulären Redox-Gleichgewichts beeinflusst wird. BSO ruft jedoch eine verstärkte Expression von Sirt1 in NVZ hervor.

Tabelle 13: qRT-PCR neuraler Transkriptionsfaktoren nach Redox-Modulation in NVZ (+bFGF; BSO/LS für 24h). Dargestellt sind Expressionsunterschiede normalisiert auf Vehikel behandelte NVZ (Mittelwert \pm SD).

Genname	NCBI GenID	BSO 1 μ M	LA 5 μ M
NeuroD	18012	-1.01 \pm 0.16	1.47 \pm 0.23
Hes1	15205	-1.96 \pm 0.34	2.43 \pm 0.40
Hes5	15208	1.27 \pm 0.22	-1.08 \pm 0.19
Olig1	50914	-1.39 \pm 0.16	1.43 \pm 0.18

Olig2	50913	-1.88 ± 0.21	1.36 ± 0.39
Sirt1	93759	6.50 ± 1.36	1.46 ± 0.37

4.2.3.2 Expression von HDACs in NVZ

Aufgrund der stark veränderten Sirt1-Expression wurde die Expression anderer HDACs (HDAC1-3), die ebenfalls durch Modellierung der Chromatinstruktur zur neuronalen Spezifikation beitragen können, untersucht. Die Expressionsanalyse der HDACs erfolgte, wie in Abschnitt 4.2.2, sowohl unter Proliferations- als auch unter Differenzierungsbedingungen. Dabei wurde dem Kulturmedium entweder BSO (1 µM) oder LS (5 µM) zugesetzt. Nach 24-stündiger Redox-Modulation wurde wiederum die Expression mittels qRT-PCR analysiert (Tabelle 14). Bis auf eine sehr geringe Expressionsänderung der HDAC2 und HDAC3 unter BSO-Einfluss (proliferierende NVZ) konnte keine Regulation der HDACs 1 bis 3 detektiert werden. Sirt1 hingegen wird unter oxidativen Bedingungen sowohl in proliferierenden als auch in differenzierenden NVZ stark exprimiert.

Tabelle 14: qRT-PCR von HDACs in NVZ nach Redox-Modulation (24 h; BSO 1 µM oder LS 5 µM). Dargestellt sind Expressionsunterschiede normalisiert auf Vehikel behandelte NVZ (Mittelwert ± SD).

Genname (GeneID)	Proliferation		Differenzierung (24 h nach bFGF-Entzug)	
	BSO 1 µM	LA 5 µM	BSO 1 µM	LA 5 µM
HDAC1 (15181)	1.92 ± 0.01 (0.5531 ± 0.1890)	± 0.09 (0.2913 ± 0.0305)	2.01 ± 0.13 (0.1395 ± 0.0323)	-1.59 ± 0.37 (0.0433 ± 0.0077)
HDAC2 (15182)	-2.35 ± 0.20 (0.0947 ± 0.0092)	1.06 ± 0.06 (0.2362 ± 0.0176)	1.39 ± 0.20 (0.0016 ± 0.0003)	1.03 ± 0.26 (0.0012 ± 0.0002)
HDAC3 (15183)	-2.49 ± 0.44 (0.0368 ± 0.0068)	1.12 ± 0.09 (0.1029 ± 0.0096)	-1.30 ± 0.31 (0.0013 ± 0.0003)	-1.47 ± 0.31 (0.0012 ± 0.0002)
Sirt1 (93759)	4.94 ± 0.03 (0.0690 ± 0.0064)	1.66 ± 0.08 (0.0058 ± 0.0004)	6.34 ± 0.04 (0.0185 ± 0.0039)	1.06 ± 0.21 (0.0031 ± 0.0005)

4.2.3.3 Modulation der Sirt1-Aktivität in NVZ

Um einen Zusammenhang zwischen der BSO-abhängigen Expression von Sirt1 (Abschnitt 4.2.3.1, 4.2.3.2) und der Redox-abhängigen Differenzierung (Abschnitt 4.2.2.2) genauer zu untersuchen, erfolgte die Modulation der enzymatischen Aktivität von Sirt1 durch den Sirt1-Aktivator Resveratrol. Dazu wurden NVZ in Kulturmedium ausplattiert und nach zwei

Tagen auf bFGF-freies Kulturmedium umgestellt. Während der ganzen Kultur waren die Medien mit Resveratrol (5 μM) versetzt. Parallel wurde ein Teil der Zellen vor der Ausplattierung (Tag 0) mit Sirt1 siRNAs transfiziert (Kap. 3.3.1). Die nachfolgenden Schritte erfolgten für alle Bedingungen identisch. Nach siebentägiger Differenzierung (Tag 2-9) wurde immuncytochemisch auf Neurone (NeuN+) und Astrozyten (GFAP+) gefärbt und deren Zellanteil quantifiziert. Aus Abbildung 25 wird ersichtlich, dass NVZ unter Resveratrol verstärkt zu Astrozyten (GFAP+) differenzieren, während gleichzeitig die Zahl der Neurone (NeuN+) signifikant reduziert ist. Zusätzlich ist ein dosisabhängiger Effekt von Resveratrol (1 μM – 5 μM) auf das Differenzierungsverhalten erkennbar. Das Silencing von Sirt1 mittels spezifischer siRNAs hebt hingegen die Wirkung von Resveratrol auf. Sowohl Vehikel-behandelte als auch mit Sirt1 siRNA-behandelte Zellen zeigen ein identisches Differenzierungsmuster und damit identische neuronale und astrozytäre Zellanteile. NVZ, die mit einer nichtkodierenden siRNA (nonsense siRNA) behandelt wurden, sind wiederum für den durch Resveratrol hervorgerufenen Effekt auf die Differenzierung empfänglich.

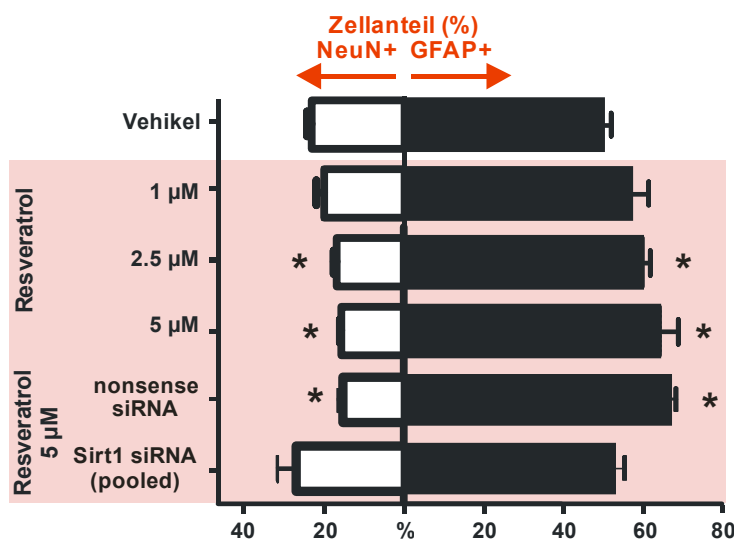


Abb. 25: Immuncytochemische Quantifizierung von NeuN+ und GFAP+ Zellen nach Sirt1-Aktivierung (Resveratrol, Tag 0-9) und Silencing (Sirt1 siRNA, Tag 0) in differenzierenden NVZ (Tag 0-2 +bFGF; Tag 2-9 -bFGF). Dargestellt sind Mittelwerte (\pm SD). *, $P < 0.05$, verglichen zur Vehikelgruppe.

4.2.3.4 Modulation von Sirt1 in NVZ

Die bisher gewonnenen Ergebnisse deuten auf eine entscheidende Rolle von Sirt1 in der Redox-abhängigen Differenzierung von NVZ. Um diese Hypothese zu stärken, wurde nachfolgend die Rolle von Sirt1 in dem BSO-vermittelten Effekt auf die Differenzierung genauer analysiert. Dazu wurde die Expression von Sirt1 mit zwei verschiedenen siRNAs

inhibiert. Die siRNA-Transfektion erfolgte am Tag der Ausplattierung (Tag 0), wobei eine nichtkodierende (nonsense) siRNA als Kontrolle diente. Das Redox-Gleichgewicht wurde wiederum durch BSO-Zugabe vom ersten bis zum neunten Kulturtag auf die pro-oxidative Seite verschoben. Wie schon zuvor (Abschnitt 4.2.3.3) wurde durch Mitogen-Entzug (Tag3-9) die Differenzierung induziert und abschließend immunocytochemisch quantifiziert. Dabei wurde der neuronale und astrozytäre Zellanteil durch Färbung der linienspezifischen Marker β -III-tubulin und GFAP visualisiert. Im Einklang mit den bisherigen Ergebnissen (Abschnitt 4.2.2.2) ist unter oxidativen Bedingungen die Zahl der Astrozyten im Vergleich zum neuronalen Zellanteil erhöht (Abb. 26, nonsense siRNA). Infolge der verringerten Sirt1-Expression, hervorgerufen durch zwei verschiedene siRNAs (Sirt1 siRNA1 und Sirt1 siRNA2), wird der Effekt von BSO auf das Differenzierungsmuster der NVZ aufgehoben. Verglichen zur nonsense-siRNA steigt der neuronale Zellanteil (β -III-tubulin+) signifikant an, während gleichzeitig der astrozytäre Zellanteil (GFAP+) deutlich abnimmt (Abb. 26).

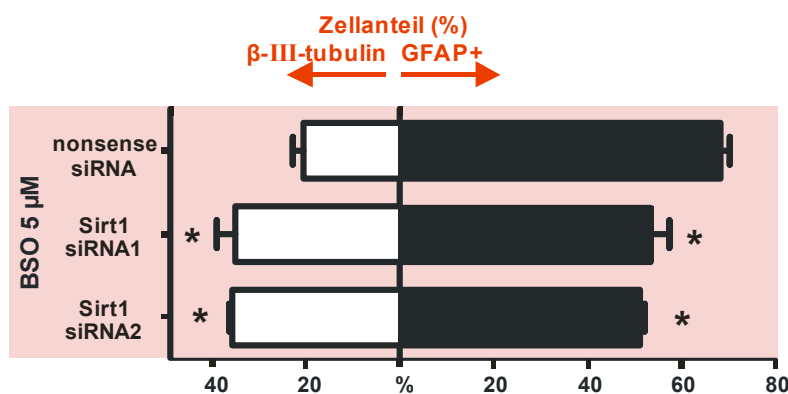


Abb. 26: Immunocytochemische Quantifizierung von β -III-tubulin+ und GFAP+ Zellen nach Sirt1-Silencing in NVZ (Sirt1 siRNA Tag 0; BSO Tag 1-9, +bFGF Tag 0-2; -bFGF Tag 3-9). Dargestellt sind Mittelwerte (\pm SD). *, $P < 0.05$, verglichen zur nonsense siRNA-Gruppe.

4.2.3.5 Sirt1 assoziiert mit Hes1 in NVZ

Bislang konnte gezeigt werden, dass eine Sirt1-Aktivierung den BSO-vermittelten Effekt auf die Differenzierung von NVZ nachahmt (Abschnitt 4.2.3.3) Dabei kommt es zu einer verstärkten Bildung von Astrozyten auf Kosten der Neurogenese. Dieser Effekt zeigt sich durch Inhibierung der Sirt1-Expression (Abschnitt 4.2.3.4) und der Sirt1-Aktivität (Abschnitt 4.2.3.3) reversibel. Da Sirt1 jedoch über keine DNA-Bindungsdomäne verfügt, kann eine inhibitorische Wirkung auf die neuronale Differenzierung nur in Kooperation mit weiteren Transkriptionsfaktoren erfolgen. Zur detaillierteren Aufklärung wurde daher mittels Immunpräzipitation die Assoziation von Sirt1 mit dem bHLH-Transkriptionsfaktor Hes1 untersucht, dessen Repressorrolle in der Regulation pro-neuronaler Gene bekannt

ist. Dazu wurden NVZ für 48 h mit 1 μ M BSO oder Vehikel versetzt und anschließend der Sirt1/Hes1-Komplex mit einem Sirt1-Antikörper präzipitiert (Kap 3.3.7), sodass dieser Komplex anschließend im Western Blot detektiert werden konnte. Aus den Ergebnissen der Immunpräzipitation (Abb. 27) wird deutlich, dass unter BSO-Einwirkung ein verstärktes Hes1-Signal im Sirt1-Immunpräzipitat (Sirt1 IP) detektiert werden kann. Dies deutet auf eine verstärkte Assoziation von Sirt1 und Hes1 unter oxidativen Bedingungen (vgl. IP BSO vs. IP Kontrolle). Zusätzlich sind in Abbildung 27 noch die entsprechenden IgG-Kontrollen und das Zelllysats aufgezeigt.

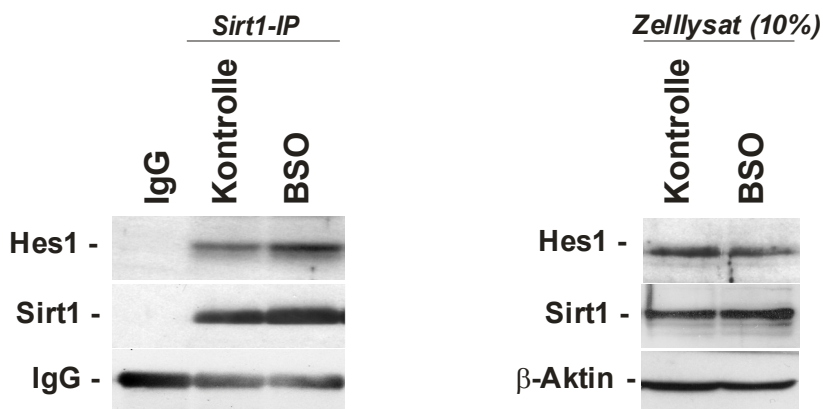


Abb. 27: Sirt1-Immunpräzipitation von NVZ nach 24-stündiger Inkubation mit BSO. Zu sehen ist die Detektion von Sirt1 und Hes1 im Western Blot (links: Sirt1 Immunpräzipitat IP; rechts: Zelllysats (input)).

4.2.3.6 Einfluss von Sirt1 auf die Acetylierung von Chromatin

Sirt1 wird wegen seiner NAD⁺/NADH-gesteuerten Aktivität in die Klasse III der HDAC eingeordnet. Somit könnte sich eine Verschiebung des intrazellulären Redox-Gleichgewichts auf die Aktivität von Sirt1 auswirken und den Acetylierungszustand spezifischer Histonreste beeinflussen. Dies würde zu einer Modifikation der Histonstruktur führen und könnte die Regulation bestimmter Gene beeinflussen. Um den Effekt von BSO auf die Aktivierung von Sirt1 und damit auf den Acetylierungsstatus des Chromatins zu untersuchen, wurden NVZ für 48 h mit BSO behandelt und das Gesamtchromatin isoliert (Kap. 3.3.9.1). Nach elektrophoretischer Aufgetrennung der Chromatinuntereinheiten konnte der Acetylierungszustand von H3, H4 sowie den Sirt1-spezifischen Resten H3K9 und H4K16 im Western Blot detektiert werden (Abb. 28 links). Die densitometrische Vermessung der Bandenintensität erlaubte darüber hinaus eine Quantifizierung des Acetylierungszustands (Abb. 28 rechts). Zur spezifischen Modulation der HDAC-Aktivität wurden NVZ zusätzlich mit dem Sirt1-Inhibitor Splitomicin und dem Histondeacetylase I und II-Inhibitor TSA versetzt. Wie aus der Bandenintensität in Abbildung 28 hervorgeht,

resultiert die Inhibierung der HDAC-Aktivität durch TSA in einer globalen Zunahme der Histonacetylierung von H3 und H4. Eine durch BSO hervorgerufene oxidative Umgebung zieht hingegen keine globale Änderung des Acetylierungsstatus von H3 und H4 mit sich. Die Acetylierung von H3K9, eine spezifische Zielstruktur von Sirt1, ist jedoch unter BSO reduziert und steigt unter gleichzeitiger Gabe des Sirt1-Inhibitors Splitomicin erneut an (Abb. 28 rechts, Quantifizierung Ach3K9/pan-H3). Die Acetylierung einer weiteren Zielstruktur von Sirt1 (H4K16) wird durch BSO nicht beeinflusst, wohingegen Splitomicin eine erhöhte Acetylierung von H4K16 hervorruft (Abb. 28 rechts, Quantifizierung Ach4K16/pan-H4). Somit scheint die Verschiebung des Redox-Gleichgewichts zugunsten der oxidativen Seite zu einer Deacetylierung spezifischer Histonreste wie H3K9 zu führen und könnte Einfluss auf die Regulation bestimmter Gene nehmen.

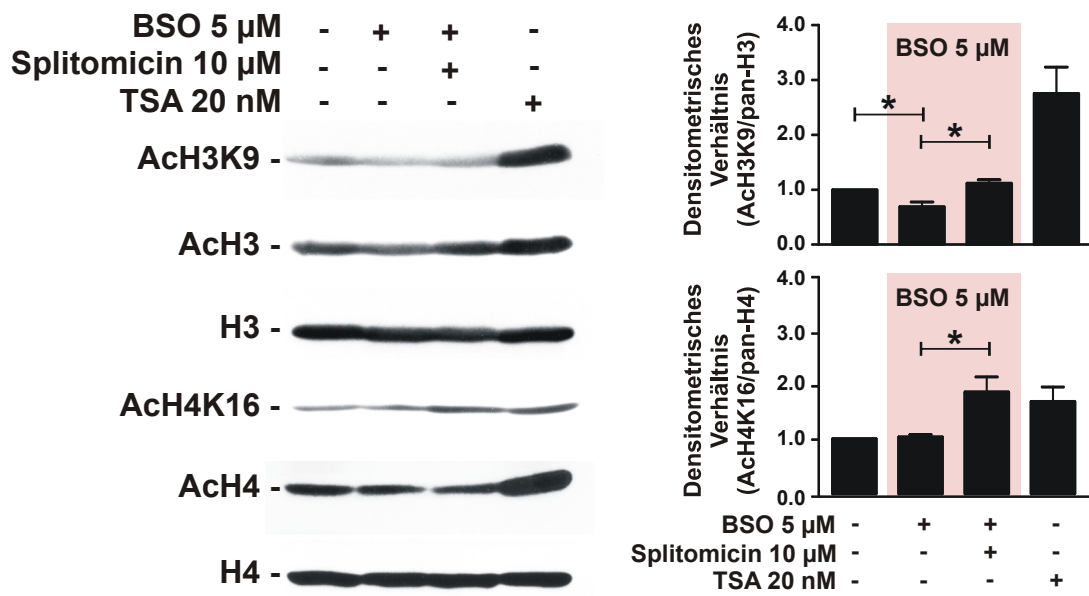


Abb. 28: Links: Western Blot vom gesamten Histonextrakt zur Detektion des Acetylierungsstatus von H3, H4 sowie den spezifischen Sirt1-Zielstrukturen H3K9 und H4K16. Gezeigt wird der Effekt von BSO, Splitomicin und TSA. Rechts: Darstellung des densitometrischen Verhältnisses von Ach3K9 zu pan-H3. Dargestellt sind Mittelwerte (\pm SD). *, $P < 0.05$, verglichen zur unbehandelten (Vehikel) Gruppe.

4.2.3.7 Auswirkung von Sirt1 auf die Mash1-Expression in NVZ

Die bisherigen Ergebnisse deuten auf eine Schlüsselrolle von Sirt1 in der Redox-abhängigen Differenzierung von NVZ. Nach Assoziation mit dem bHLH-Faktor Hes1 könnte der Sirt1-Hes1-Komplex an der Regulation pro-neuraler Gene beteiligt sein. Hierfür spricht: i) die BSO-abhängige Regulation von Sirt1 (Abschnitt 4.2.3.1), ii) die BSO-abhängige Assoziation mit dem bHLH-Transkriptionsfaktor Hes1 (Abschnitt 4.2.3.5), iii) die BSO-abhängige Modifizierung spezifischer Histonreste (Abschnitt 4.2.3.6) und iii) die

Abhängigkeit der BSO-modulierten Differenzierung von der Sirt1-Aktivität sowie dessen Expression (Abschnitt 4.2.3.3 und 4.2.3.4). Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde Sirt1 in NVZ aktiviert und der Effekt auf die Expression des neuronalen Transkriptionsfaktors Mash1 analysiert, der ein Zielmolekül von Hes1 darstellt. Dazu wurden NVZ mit BSO (5 μ M) oder dem Sirt1-Aktivator Resveratrol (5 μ M) versetzt. Als Kontrolle wurden NVZ lediglich mit der Trägersubstanz behandelt. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die Mash1-Expression durch quantitative real-time PCR bestimmt (Abb. 29). Die Analyse der Mash1-Genexpression zeigt sowohl unter proliferativen Bedingungen (+bFGF) als auch unter Mitogenentzug (-bFGF) eine deutliche Expressionsabnahme durch BSO. Die direkte Inhibierung der enzymatischen Aktivität von Sirt1 wirkt ebenso inhibierend auf Mash1. Quantitativ ist kein Unterschied in der Repression der Mash1-Genexpression durch BSO oder Resveratrol erkennbar (Abb. 29).

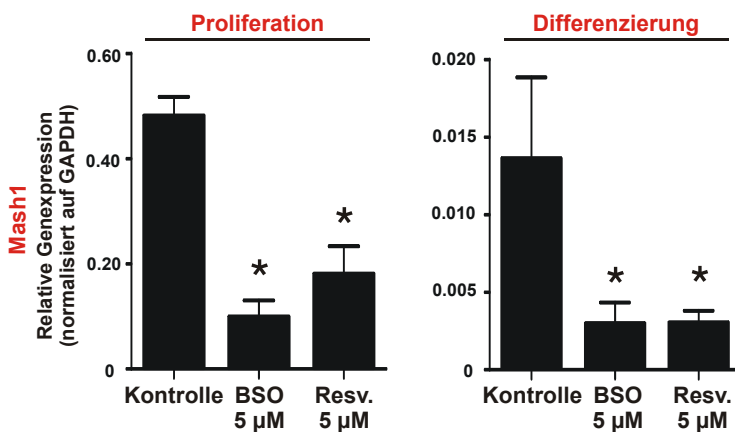


Abb. 29: qRT-PCR zum Einfluss von BSO und Resveratrol auf die Mash1-Genexpression (Proliferation + bFGF; Differenzierung -bFGF; BSO 5 μ M, 24 h; Resveratrol 5 μ M, 24 h). Dargestellt ist die relative Genexpression normalisiert auf GAPDH (Mittelwert \pm SD). *, $P < 0.05$, verglichen zur Kontrollgruppe (Vehikel).

Zur Klärung, ob der unter pro-oxidativen Bedingungen gebildete Sirt1-Hes1-Komplex (Abschnitt 4.2.3.5) für die Inhibierung der Mash1-Genexpression verantwortlich ist, wurden sowohl Sirt1 wie auch Hes1 mittels siRNAs ausgeschaltet und die Mash1-Genexpression analysiert. NVZ wurden dazu in Gegenwart von bFGF für zwei Tage kultiviert und vor der Aussaat (Tag 0) mit zwei verschiedenen Sirt1-siRNAs oder einem Gemisch (pool) zweier Hes1-siRNAs transfiziert. Am dritten Kulturtag erfolgte die Umstellung auf bFGF-freies Kulturmedium. Um eine oxidative Umgebung zu schaffen, wurde während der gesamten Kulturphase ein Teil der Zellen mit BSO (5 μ M) versetzt. Eine nichtkodierende (nonsense) siRNA diente wiederum als Kontrolle, um unspezifische Effekte ausschließen zu können. 24 Stunden nach bFGF Entzug wurde die Mash1-

Geninduktion in Abhängigkeit von der Sirt1 (Abb. 30a) sowie der Hes1-Expression (Abb. 30b) mittels quantitativer real-time PCR analysiert. Wie schon in Abschnitt 4.2.3.1 gezeigt, findet durch BSO eine deutliche Induktion der Sirt1-Genexpression statt. Gleichzeitig zeigt sich unter diesen Bedingungen die Mash1 Expression deutlich inhibiert. Die Ausschaltung der Sirt1-Transkription durch siRNAs führt hingegen auch unter Einfluss von BSO zu einem Anstieg der Mash1-Genexpression auf das Niveau der Kontrollbedingung (nonsense siRNA ohne BSO). Somit ist eine deutliche Korrelation erkennbar: Aus einer erhöhten Sirt1-Expression resultiert eine niedrige Mash1-Expression und vice versa (Abb. 30a). Gleiches ist nach Silencing von Hes1 zu beobachten. Die Inhibierung von Hes1 resultiert in einer drastischen Erhöhung der Mash1-Expression. Unter Einfluss von BSO ist die Mash1-Genexpression wiederum stark reduziert, obwohl sich die Hes1-Geninduktion kaum moduliert zeigt, was für eine Ko-Repressorrolle von Sirt1 im Komplex mit Hes1 spricht. Zudem führt das Silencing von Hes1 zu einem signifikanten Anstieg der Mash1-Genexpression unter BSO-Einfluss, wodurch die Rolle des Komplexes aus Sirt1 und Hes1 in der Redox-abhängigen Regulation des pro-neuronalen Transkriptionsfaktors Mash1 belegt wird (Abb. 30b).

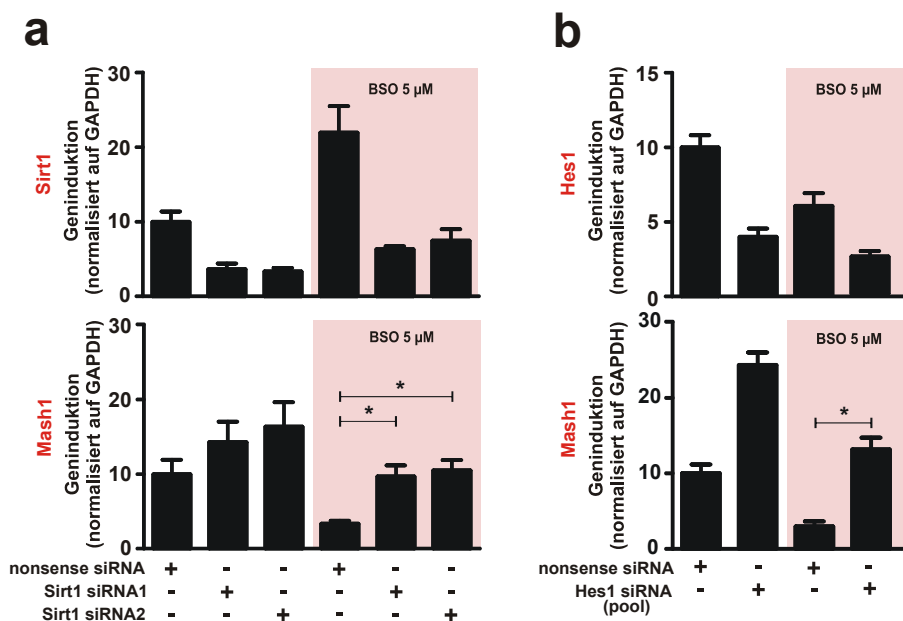


Abb. 30: qRT-PCR zum Einfluss von Sirt1 und Hes1 auf die Mash1-Genexpression. a) Analyse der Sirt1/Mash1-Genexpression nach Sirt1-Silencing (24 h -bFGF) b) Analyse der Hes1/Mash1-Genexpression nach Hes1-Silencing (24 h -bFGF). Dargestellt ist die Geninduktion normalisiert auf GAPDH (Mittelwert \pm SD). *, $P < 0.05$, verglichen zur nonsense siRNA-Gruppe.

Wie soeben gezeigt, kommt es unter oxidativen Bedingungen zu einer Sirt1-abhängigen Regulation des neuronalen Transkriptionsfaktors Mash1. Zur Stärkung dieser Befunde wurden differenzierende NVZ für 24 h mit BSO (5 μ M) oder den Sirt1-Inhibitoren Sirtinol

(5 μM) sowie Splitomicin (10 μM) versetzt. Verglichen mit unbehandelten Zellen kommt es durch BSO wiederum zu einer drastischen Inhibierung der Mash1-Expression (Abb. 30). Dieser Effekt lässt sich nicht nur durch Sirt1-siRNAs, sondern auch durch Inhibierung der enzymatischen Aktivität von Sirt1 antagonisieren. Unter Einwirkung der beiden Sirt1-Inhibitoren ist der BSO-vermittelte Effekt wirkungslos, und die Mash1-Expression steigt wieder auf das Kontrollniveau an.

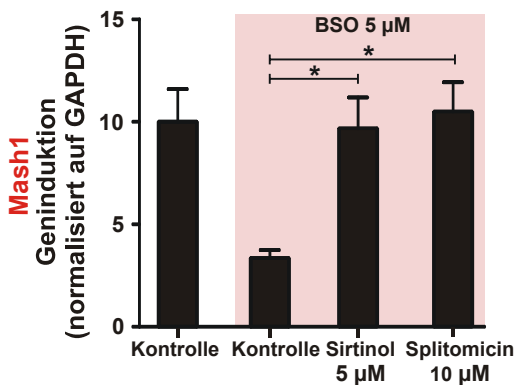


Abb. 31: qRT-PCR zum Einfluss der Sirt1-Inhibitoren auf die Mash1-Genexpression. (-bFGF; BSO 5 μM , 24 h; Sirtinol 5 μM , 24 h; Splitomicin 10 μM , 24 h). Dargestellt ist die Geninduktion normalisiert auf GAPDH (Mittelwert \pm SD). *, $P < 0.05$, verglichen zur Kontrollgruppe (Vehikel).

Die vorangegangenen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass aus einer Verschiebung des Redox-Gleichgewichts, zugunsten der oxidativen Seite, eine Anlagerung von Sirt1 an den Repressor Hes1 erfolgt. Durch die HDAC-Aktivität von Sirt1 kommt es daraufhin zu einer Inhibierung der Mash1-Transkription. Um diese Vermutung zu belegen, wurde eine Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) in differenzierenden NVZ (24 h nach bFGF-Entzug) mit Antikörpern gegen Sirt1, Hes1 und Acetyl-H3K9 durchgeführt (Kap. 3.3.9). Um die Präsenz des Mash1-Promotors in diesen Proben zu untersuchen, wurden PCR-Primer benutzt, die die Hes1-Bindungsstelle (CACGCG (-287 bis -282) und CACGCG (-276 bis -271)) innerhalb des Mash1-Promotors (-268 bis +28 bp vom ATG Startkodon) flankieren. Nach Amplifizierung wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 32). Die ChIP-Analyse zeigt, dass Sirt1 unter oxidativen Bedingungen innerhalb des Mash1-Promotors stark hochreguliert ist (vgl. anti-Sirt1 Kontrolle vs. BSO), während sich Hes1 unverändert zeigt. Zusätzlich ist eine gesteigerte Sirt1 Deacetylase-Aktivität innerhalb des Mash1-Promotors erkennbar, was sich in einer verringerten Bandenintensität widerspiegelt (vgl. Anti-AcH3K9 Kontrolle vs. BSO). Während die Kontrolle eine deutliche Acetylierung von H3K9 hervorbringt, kommt es unter oxidativen Bedingungen zu einer drastischen Abnahme des Acetylierungszustands. Die ChIP-Analyse des Mash1-Promotors bestätigt somit die Vermutung: Unter oxidativen Bedingungen kommt es innerhalb des Mash1-

Promotors zu einer Anlagerung von Sirt1 an den Repressor Hes1. Die HDAC-Aktivität von Sirt1 führt dabei zu einer spezifischen Deacetylierung von H3K9. Zusätzlich sind die entsprechenden Kontrollen aufgeführt (IgG, Sepharose und NTC (NTC non-template-control)).

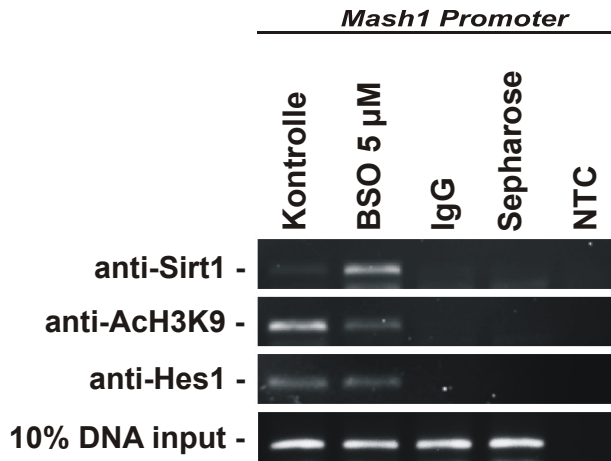


Abb. 32: Chromatin-Immunopräzipitation von NVZ mit anti-Sirt1, anti-Hes1, anti-Acetyl-H3K9 oder Gesamtzelllysate (input) und Primern downstream der Hes1-Bindungsstelle innerhalb des Mash1-Promotors (NTC non-template-control (24 h -bFGF, BSO 5 µM)).

4.2.4 Einfluss der Redox-Modulation auf die Differenzierung NVZ *in vivo*

4.2.4.1 Einfluss von BSO auf die Differenzierung im postnatalen Gehirn

In vitro konnte gezeigt werden, dass unter pro-oxidativen Bedingungen die Neurogenese von NVZ gehemmt ist und im Gegenzug vermehrt Astrozyten gebildet werden. Dieses Phänomen ist mit einer erhöhten Sirt1-Expression und Anlagerung an den bHLH-Transkriptionsfaktor Hes1 verbunden, woraus die Inhibierung des neuronalen Transkriptionsfaktors Mash1 resultiert. Um die Bedeutung dieser Befunde *in vivo* zu untersuchen, wurden Jungmäuse von Tag 5 (P5) bis Tag 9 (P9) nach der Geburt mit BSO oder Vehikel behandelt (siehe Behandlungsschema Kap. 3.4.6). Nach fünftägiger Modulation des Redox-Gleichgewichts folgte die immunhistochemische Analyse auf Sirt1, GFAP (Astrozyten) sowie Mash1. Abbildung 33a zeigt repräsentative Färbungen für Sirt1 (rot), GFAP (grün) sowie für Mash1 (rot) und Sirt1/GFAP doppelpositiver Zellen (gelb) in der SVZ der P10 Tiere. Für die spätere Quantifizierung (Abb. 33b) wurde wiederum der Kernfarbstoff Hoechst 33258 (blau) verwendet. Es lässt sich allgemein feststellen, dass durch eine pro-oxidative Verschiebung des Redox-Gleichgewichts sowohl qualitativ als auch quantitativ die Zahl der Sirt1+ und GFAP+ Zellen in der SVZ von P10 Tieren deutlich erhöht ist. Die Expression von Sirt1 beschränkt sich dabei zum größten Teil auf GFAP+

Zellen (Doppelfärbung Sirt1/GFAP). Die Quantifizierung der Mash1 positiven Zellen (rot) zeigt im Einklang mit den *in vitro* erhaltenen Ergebnissen eine gegenläufige Regulation zur Sirt1-Expression: Während die Zahl der Sirt1+ Zellen nach BSO-Applikation ansteigt, ist die Zahl der Mash+ Zellen signifikant reduziert.

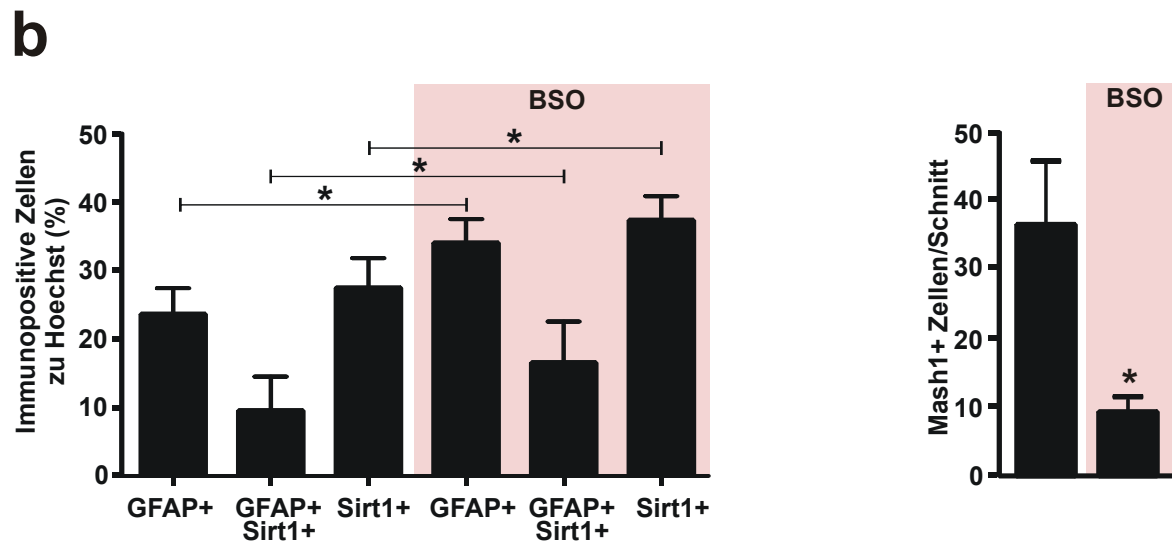
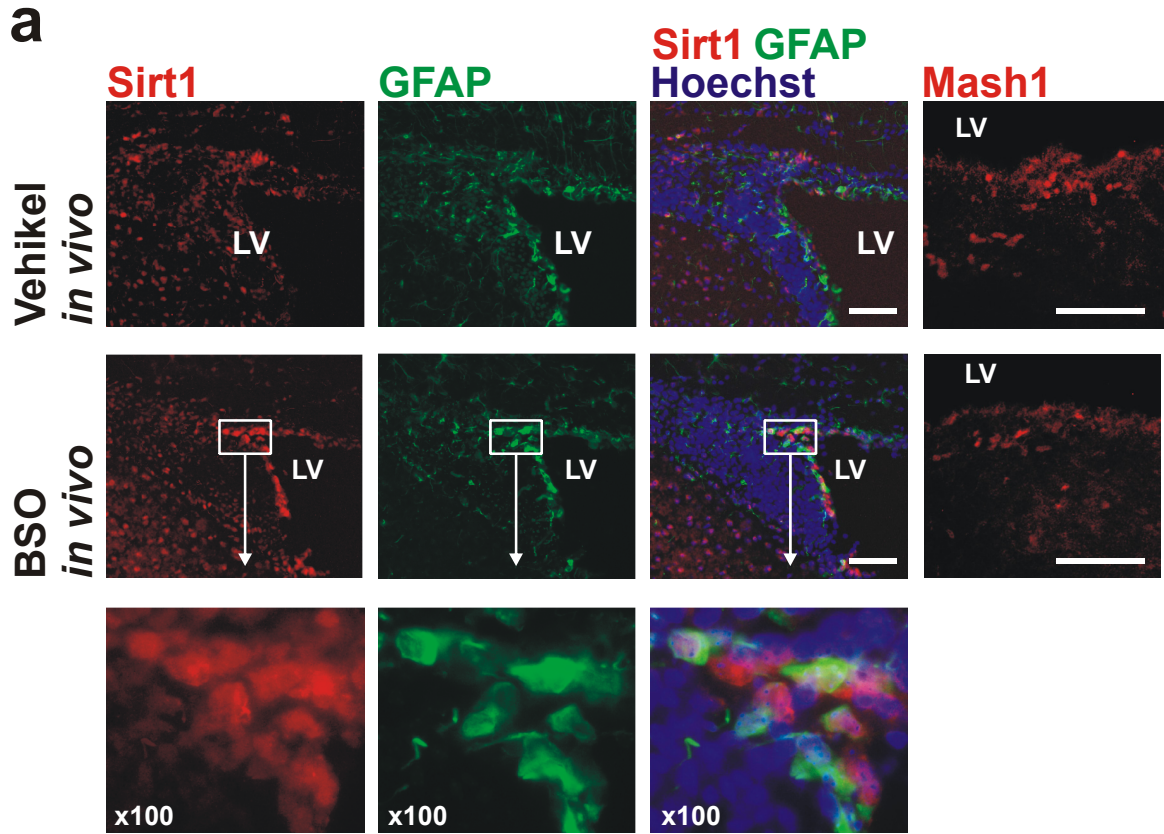


Abb. 33: Analyse der Sirt1-, GFAP- und Mash1-Expression in P10 Tieren nach BSO-Applikation. a) Repräsentative immunocytochemische Färbungen in koronalen Schnitten der SVZ von BSO- und Vehikel-behandelten Tieren (Behandlung P5-P9): die ersten drei Spalten zeigen Einzelfärbungen von Sirt1 (rot), GFAP (grün) sowie deren Doppelfärbung (gelb). Zur Quantifizierung wurde mit Hoechst 33258 (blau) gegen gefärbt. Auf der rechten Seite ist die Färbung von Mash1 (rot) zu sehen. Größenbalken, 50µm; LV, Lateralventrikel (Größenbalken 50 µm). b) Quantifizierung von GFAP+, Sirt1+ und GFAP+/Sirt1+ doppelpositiver Zellen in Relation zur totalen Zellzahl mittels Hoechst-Färbung. Zusätzlich ist die Zahl der Mash1+ Zellen pro Schnitt aufgezeigt. Quantifizierung von BSO- (P5-P9; n=4) und Vehikel-behandelten Mäusen (P5-P9; n=3). Daten sind als Mittelwert (\pm SD) dargestellt. *, $P < 0.05$, verglichen zur Vehikelgruppe.

Zusätzlich wurde der Einfluss des Redox-Gleichgewichts auf die Proliferation SVZ ansässiger Zellen durch Inkorporation von BrdU analysiert. Dazu wurde den Jungtieren an den letzten beiden Tagen der BSO-Applikation (P7-P9) BrdU injiziert (siehe Behandlungsschema Kap. 3.4.6) und immunhistochemisch auf Doublecortin (Dcx, Neuroblasten-Marker) und BrdU gefärbt (Abb. 34). Die Quantifizierung von BrdU+ sowie BrdU/Dcx doppelpositiven Zellen verdeutlicht, dass unter BSO-Einfluss die Zahl der BrdU+ Zellen und damit die Proliferation in der SVZ deutlich verringert ist. Im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe zeigt sich die Zahl der proliferierenden Neuroblasten (BrdU/Dcx doppelpositiven Zellen) signifikant reduziert.

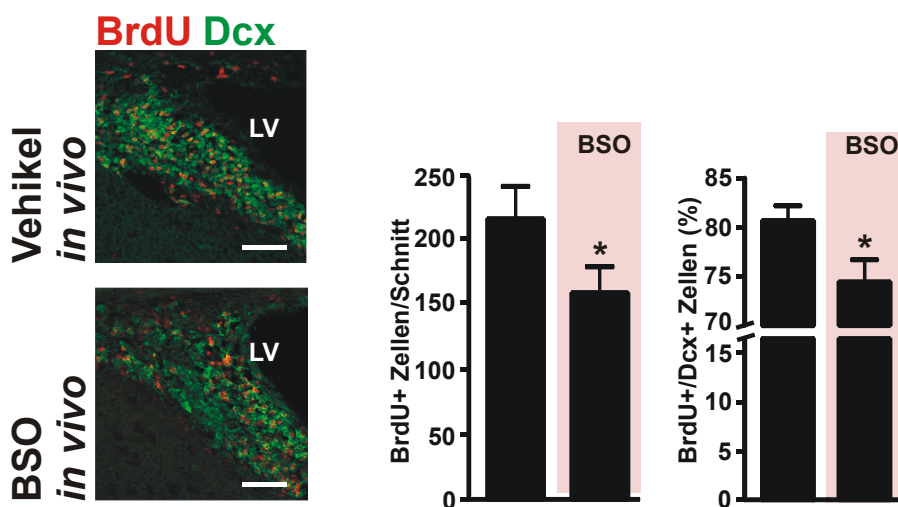


Abb. 34: Proliferationsanalyse in P10 Tieren mittels BrdU Inkorporation nach BSO-Applikation. Repräsentative immunhistochemische Kofärbungen in koronalen Schnitten der SVZ von BrdU (rot) mit Doublecortin (Dcx, grün; Größenbalken 50 µm). Die beiden rechten Diagramme zeigen zum einen die Gesamtzahl BrdU+ Zellen, und zum anderen BrdU+/Dcx+ doppelpositive Zellen in Relation zur Gesamtzahl an BrdU+ Zellen in BSO (P5-P9; n=4) und vehikelbehandelten Mäusen (P5-P9; n=3). Daten sind als Mittelwert (\pm SD) dargestellt. *, $P < 0.05$, verglichen zur Vehikelgruppe.

4.2.4.2 Modulation von Sirt1 und Hes1 *in vivo*

Um eine direkte Beteiligung von Sirt1 und Hes1 an der Redox-abhängigen Differenzierung von NVZ *in vivo* zu untersuchen, wurden die beiden Gene mittels *in utero* Elektroporation ausgeschaltet. Dazu erfolgte die Injektion EGFP tragender Plasmide, die zusätzlich eine shRNA-Sequenz für Sirt1, Hes1 oder eine nonsense Kontrollsequenz beinhalteten, in den lateralen Ventrikel von 17 Tage alten Mausembryos (E17.5). Ein angelegtes elektrisches Feld schleuste diese Plasmide in die SVZ-ansässigen Zellen. Die Modulation des Redox-Gleichgewichts erfolgte wiederum durch BSO von Tag 4 bis Tag 6 nach der Geburt (P4-P6) (siehe Behandlungsschema Kap 3.4.4.1). An Tag 7 (P7) wurden die Tiere perfundiert und die Hirne immunhistochemisch auf Dcx (rot) gefärbt. Durch das EGFP-Signal (grün) konnten positiv transfizierte Zellen (EGFP+) sehr einfach visualisiert und immunhistochemisch genauer analysiert werden. Abbildung 35 zeigt eine Übersicht der SVZ und des RMS in koronaren Schnitten der SVZ nach *in utero* Elektroporation mit einem Sirt1 kodierenden Plasmid und anschließender immunhistochemischer Färbung auf Dcx, EGFP und dem Kernfarbstoff Hoechst 33258 (blau). Des Weiteren ist ein 1,6 μm dicker Z-Schnitt durch eine Dcx/EGFP doppelpositive Zelle in der Vergrößerung aufgezeigt. Für die Quantifizierung wurde der prozentuale Anteil an Dcx/EGFP doppelpositiven Zellen innerhalb der gesamten EGFP+ Zellen ermittelt. Die Quantifizierung verdeutlicht, dass durch den *in vivo* knock-down von Sirt1 und Hes1 die Zahl der Neuroblasten (Dcx+) im RMS signifikant ansteigt. Somit wird eine durch BSO induzierte Reduzierung migrierender Neuroblasten aufgehoben.

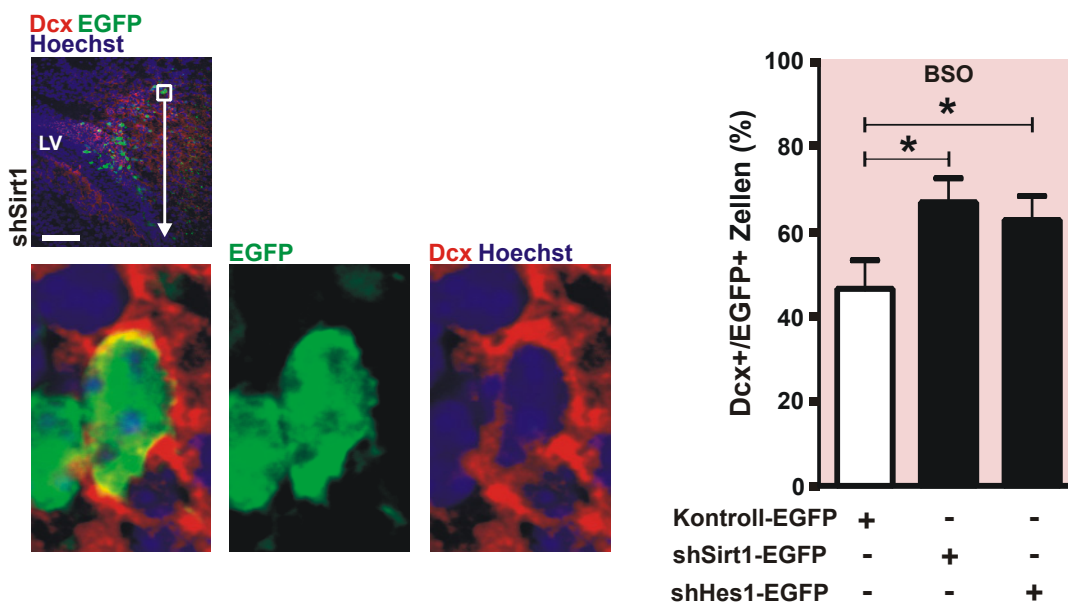


Abb. 35: Immunhistochemische Färbung der RMS auf Dcx+ (rot), EGFP+ (grün) Zellen nach BSO Applikation (P4-P6) und *in vivo* knock-down von Sirt1 oder Hes1 mittels in utero Elektroporation. Quantifizierung Dcx/EGFP doppelpositiver Zellen in Relation zur Gesamtzahl EGFP+ Zellen von BSO behandelten Tieren (P4-P6; n=3). Daten sind als Mittelwert (\pm SD) dargestellt. *, $P < 0.05$, verglichen zur Kontrollgruppe (nonsense shRNA) (Größenbalken, 50 μ m; LV, Lateralventrikel)

4.2.4.3 Einfluss von Sirt1 auf die Mash1-Expression *in vivo*

Eine direkter Einfluss der HDAC Sirt1 auf die Mash1-Expression und damit auf die Differenzierung NVZ *in vivo* wurde, analog zu Kapitel 4.2.4.2, durch Inhibierung der Sirt1-Expression mittels *in utero* Elektroporation untersucht. Um positiv-transfizierte Zellen von nicht-transfizierten Zellen unterscheiden zu können, wurden wiederum EGFP-tragende Plasmide benutzt. Die Elektroporation erfolgte in E15 Embryos mit anschließender Analyse der Mash1-Expression im postnatalen Stadium (P2). Dazu wurde die SVZ immunhistochemisch auf Mash1 gefärbt. Die Quantifizierung in Abbildung 36a belegt, dass die Ausschaltung von Sirt1 in E15 Tieren zu einer signifikanten Erhöhung von Mash1+ Zellen im P2 Stadium führt. Als Kontrolle wurden Zellen mit einem Kontrollplasmid, welches eine nonsense shRNA trug, transfiziert. Wie schon *in vitro* und in Abschnitt 4.2.4.1 aufgezeigt, wird hiermit nochmals die Sirt1-abhängige Regulation des neuronalen Transkriptionsfaktors belegt.

Um ebenfalls die Abhängigkeit der Mash1-Expression von der Sirt1-Aktivierung *in vivo* aufzuzeigen, wurden P5 Tiere für zwei Tage (P5-P7) mit dem Sirt1-Inhibitor Cambinol behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen der SVZ makroskopisch isoliert und die Mash1-Genexpression durch qRT-PCR analysiert. Die Genexpressionanalyse (Abb. 36b) zeigt, dass eine Inhibierung der enzymatischen Aktivität von Sirt1 im postnatalen Stadium ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der Mash1-Genexpression führt.

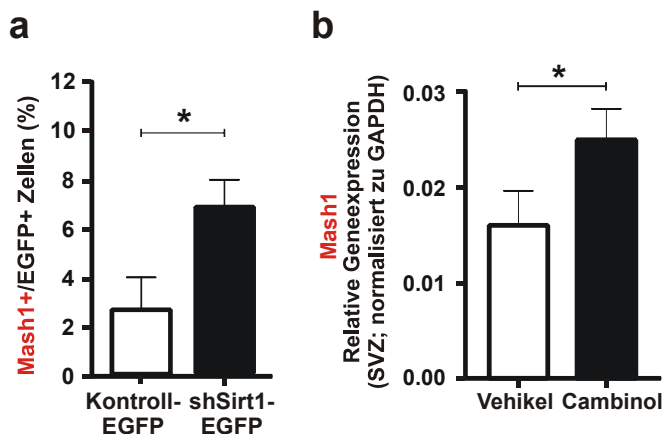


Abb. 36: a) Immunhistochemische Quantifizierung von Mash1 nach Sirt1 knock-down *in vivo* mittels *in utero* Elektroporation (E15). Quantifiziert wurden Mash1+ Zellen innerhalb der positiv transfizierten EGFP+ Zellpopulation der SVZ von P2 Tieren. Daten sind als Mittelwert (\pm S.D.) von drei Tieren pro Gruppe dargestellt. *, $P < 0.05$, verglichen zur Kontrollgruppe. b) qRT-PCR der Mash1 Genexpression in der SVZ nach *in vivo* Inhibierung mittels Sirt1 Inhibitor Cambinol (P6-P7). Daten sind als Mittelwert (\pm SD) von vier Tieren pro Gruppe dargestellt. *, $P < 0.05$, verglichen zur Vehikelgruppe.

4.2.5 Sirt1 in der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis

Allen neuroinflammatorischen Erkrankungen wie beispielsweise der MS ist das Auftreten von oxidativem Stress und deren Reaktionsprodukte (RSS) gemeinsam. Um die Relevanz der bisherigen *in vitro* und *in vivo* Befunde innerhalb eines entzündlichen-neurodegenerativen Krankheitsmodells zu untersuchen, wurde das ZNS von EAE-Tieren auf i) die Expression von Sirt1 und ii) das Ausmaß neu gebildeter astrozytärer Strukturen (Astrogliose) analysiert. Dazu wurde durch den Transfer Myelin-spezifischer T-Zellen in naive SJL-Rezipienten eine EAE induziert (passive EAE). Zum Zeitpunkt des Krankheitshöhepunkts, mit manifestierten klinischen Symptomen, wurde das ZNS dieser Tiere immunhistochemisch auf die Expression von Sirt1 und GFAP, als Marker für neugebildete astrozytäre Strukturen, analysiert. Abbildung 37a zeigt repräsentative Färbungen für Sirt1 (rot), GFAP (grün), Hoechst (blau) sowie der überlagerten Färbung (Merge) in nichtbetroffenen Regionen des ZNS von EAE-Tieren. Gleiches ist in Abbildung 37b für entzündete Regionen dargestellt. Im Gegensatz zu nicht betroffenen Regionen des ZNS, wo Sirt1 kaum exprimiert wird, zeigen entzündete Regionen, mit EAE typischer perivaskulärer Leukozyteninfiltration, sowohl eine stark angestiegene Zahl GFAP+ Zellen als auch eine erhöhte Anzahl Sirt1+ Zellen. Dabei ist das Sirt1-Signal weitestgehend auf GFAP+ Zellen beschränkt und eine deutliche intranukleare Lokalisation erkennbar. Die Quantifizierung dieser Färbung (Abb. 37c) bestätigt die makroskopische Beobachtung. Im Vergleich zu nicht betroffenen Regionen des ZNS steigt die Zahl von Sirt1+, GFAP+ und doppelpositiver (GFAP+/Sirt1+) Zellen in den entzündeten Regionen signifikant an. Die Sirt1-Expression ist dabei hauptsächlich in GFAP+ Zellen detektierbar.

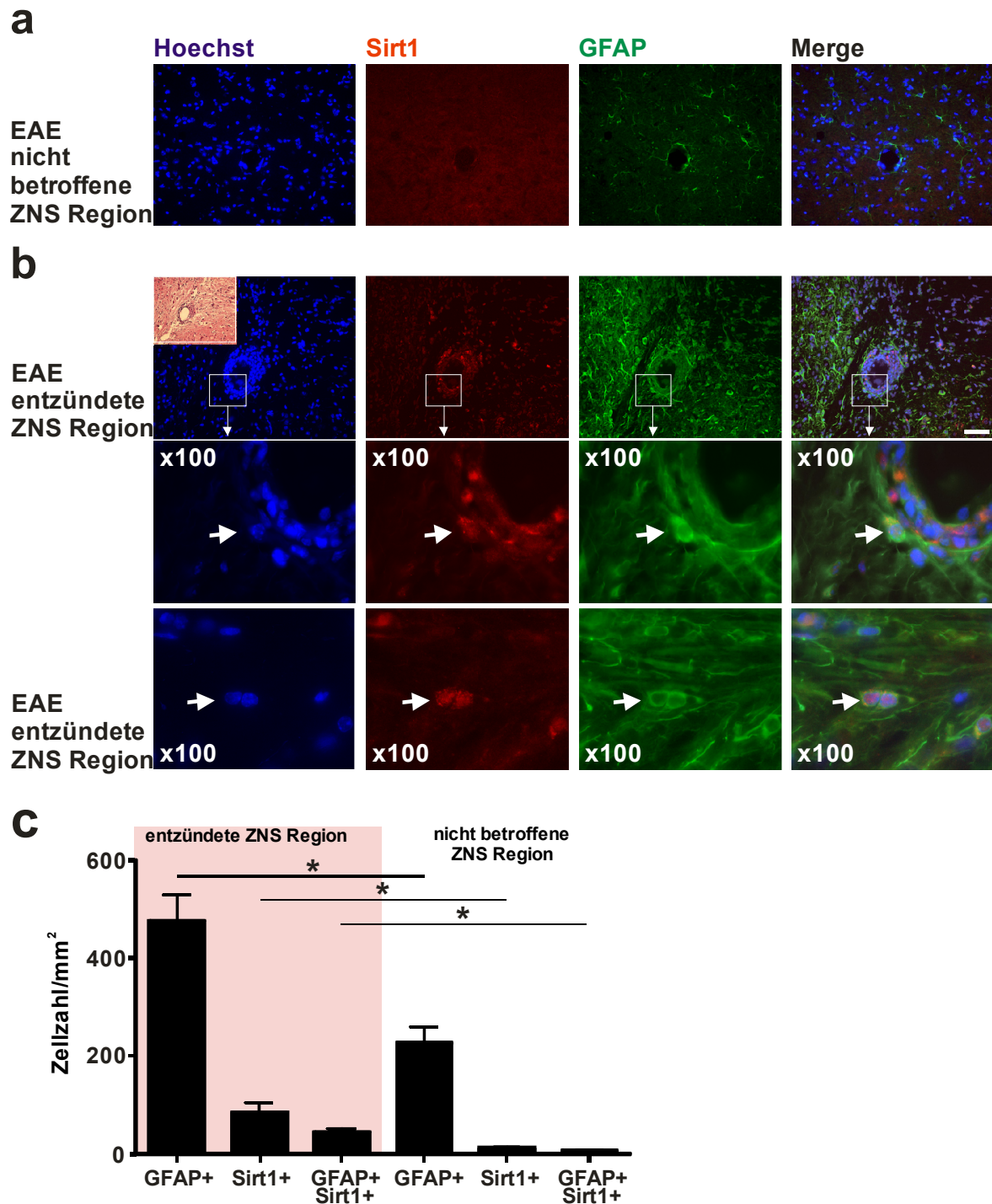


Abb. 37: Immunhistochemische Färbung von Sirt1 und GFAP in EAE-Tieren. a) Färbung von Sirt1 (rot), GFAP (grün) und Hoechst (blau) in nichtbetroffenen EAE-Regionen inkl. Überlagerung der Färbungen (Merge). b) Färbung von entzündeten EAE-Regionen mit Vergrößerungen (Größenbalken, 20 μ m). c) Quantifizierung von Sirt1+, GFAP+ und Sirt+/GFAP+ Zellen in entzündeten und nicht betroffenen Regionen des ZNS von EAE-Tieren. Gezeigt sind Mittelwerte (\pm SD) der Zellzahlen pro mm² von 3 EAE Tieren pro Gruppe. *, $P < 0.05$.

4.2.5.1 Mash1-Expression in der EAE

Zur Analyse der Mash1-Expression innerhalb entzündeter sowie nichtbetroffener Regionen des ZNS wurde Material von an EAE erkrankten Tieren (Abschnitt 4.2.5) immunhistochemisch auf Mash1 (rot, Abb. 38) und Hoechst 33258 (blau) gefärbt. Während in nicht betroffenen ZNS-Regionen Mash1+ Zellen (Abb. 38, Pfeil = Mash1+ Zelle) zu finden sind, ist in entzündeten ZNS-Regionen, mit massiver perivaskulärer Leukozyteninfiltration (Abb. 38, Stern = Gefäß), die Zahl der Mash1+ Zellen reduziert.

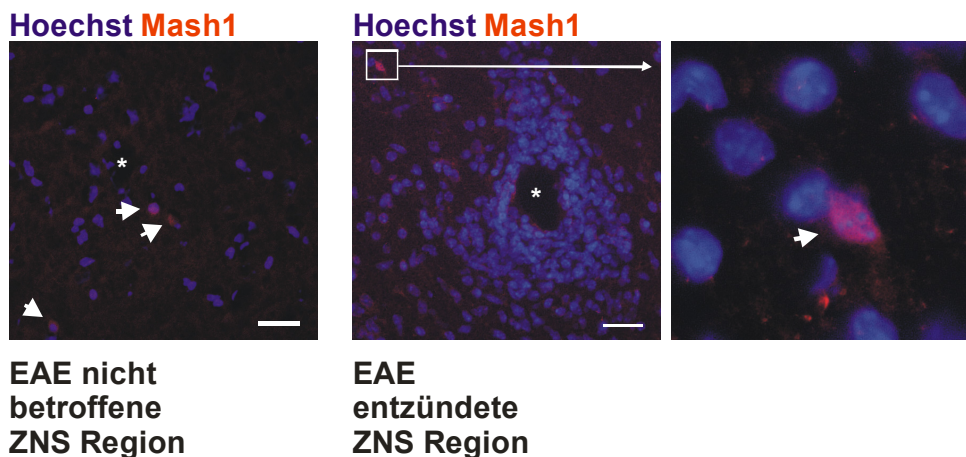


Abb. 38: Immunhistochemische Analyse der Mash1-Expression in EAE. Dargestellt sind Kofärbungen von Mash1 (rot) und Hoechst 33258 (blau) nicht betroffener sowie entzündeter Regionen des ZNS von EAE-Tieren. Pfeile zeigen doppelpositive Zellen, und der Stern markiert das Lumen eines Blutgefäßes (Größenbalken 20 µm).

4.2.5.2 Modulation von Sirt1 in der EAE

Innerhalb vorangegangener EAE-Experimente konnte in entzündeten Regionen des ZNS eine verstärkte Sirt1-Expression mit einem Anstieg astrozytärer Strukturen in Verbindung gebracht werden (Abschnitt 4.2.5). Zudem zeigte sich eine qualitative Reduzierung Mash1+ Zellen (Abschnitt 4.2.5.1). Abschließend wurde daher der Einfluss einer Sirt1-Aktivierung, induziert durch den Sirt1-Aktivator Resveratrol, auf die Ausbildung astrozytärer Strukturen (GFAP+ Zellen) untersucht. Dazu wurde mit dem Myelinepitop PLP139-151 eine aktive EAE in naive SJL-Mäuse induziert (Kap. 3.4.3.1). Die Applikation von Resveratrol oder der Trägersubstanz erfolgte vor dem Krankheitsausbruch (Tag 7) bis zum Krankheitspeak (Tag 12). Um den Einfluss auf die Neubildung astrozytärer Strukturen zu analysieren, wurde an den letzten beiden Behandlungstagen (Tag 11 bis 12) zusätzlich BrdU appliziert. Die Quantifizierung der immunhistochemischen Färbung auf GFAP und BrdU zeigt einen signifikanten Anstieg an GFAP+/BrdU+ Zellen innerhalb der EAE-

Läsionen (Abb. 39). Somit ist eine vermehrte Bildung astrozytärer Strukturen infolge einer enzymatischen Aktivierung von Sirt1 erkennbar.

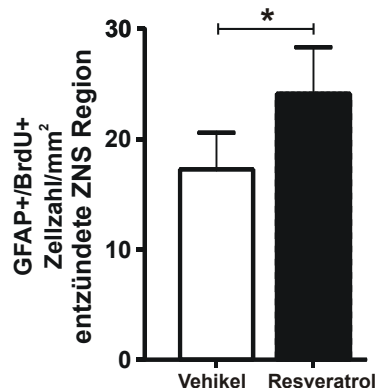


Abb. 39: Immunhistochemische Quantifizierung Sirt1+/BrdU+ Zellen in entzündeten ZNS-Regionen von EAE Tieren nach Behandlung mit dem Sirt1-Aktivator Resveratrol (n=3 pro Gruppe). Gezeigt sind Mittelwerte (\pm SD) von GFAP+/BrdU+ Zellen pro mm². *, $P < 0.05$.

5 Diskussion

Entzündliche Prozesse im Nervensystem treten bei einer Vielzahl von Schadensparadigmen wie beispielsweise der MS, dem ischämischen Schlaganfall oder primär neurodegenerativen Erkrankungen auf. Allgemeine Kennzeichen dieser primär wie auch sekundär entzündlichen neurodegenerativen Erkrankungen sind ein Untergang von Nervenzellen, eine deutlich eingeschränkte Regeneration von Nervenzellen und ein überschießendes Auftreten von Astrozyten sowie erhöhte Konzentrationen an reaktiven Sauerstoff-Spezien (RSS) (Zipp und Aktas, 06); (Ridet et al., 97). Diese sog. reaktive Astrogliose wird für die im ZNS unzureichende neuronale Regeneration verantwortlich gemacht. Bisher ist jedoch nicht bekannt, welche Faktoren für eine frühe neuronale Schädigung verantwortlich sind und welche Faktoren zu einem überschießenden Auftreten von Astrozyten beitragen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine auf das ZNS beschränkte Blockade des Todesliganden TRAIL den Krankheitsverlauf der EAE deutlich abschwächte. Somit scheint der in der Literatur bereits beschriebene immunregulatorische Effekt von TRAIL für die lokalen Schädigungsprozesse im ZNS eine eher untergeordnete Rolle zu spielen, während die Effektorrolle von TRAIL auf T-Zellen durch Transferexperimente untermauert werden konnte: Hier zeigten TRAIL-defiziente T-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Myelin-spezifischen T-Zellen eine deutlich verminderte Enzephalitogenität. Eine therapeutische Modulation des TRAIL-Systems im Nervensystem scheint jedoch nicht allgemein auf andere entzündliche ZNS-Erkrankungen übertragbar: Im Tiermodell der bakteriellen Meningitis zeigte TRAIL eine anti-inflammatorische Rolle auch im ZNS, die vor allem durch die hier aufgezeigte TRAIL-Rezeptor-Expression auf Granulozyten vermittelt wird und wesentlich die Leukozytenkinetik beeinflusst. Eine durch TRAIL modulierte Migration der Effektorzellen konnte in diesem Modell jedoch ausgeschlossen werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte als mögliche Ursache für eine verminderte Regenerationsfähigkeit endogener neuraler Stammzellen bei entzündlichen Krankheitsprozessen ein Mechanismus aufgedeckt werden, der als Antwort auf oxidativen Stress zu einem quantitativen Überwiegen von Astrozyten führt. Dabei zeigte sich, dass subtile, per se nicht toxische Veränderungen des oxidativen Gleichgewichts das Proliferationsvermögen neuraler Stammzellen deutlich hemmten und dazu führten, dass anstelle von Neuronen vornehmlich Astrozyten entstehen. Unter oxidativen Bedingungen konnte sowohl eine Modulation der Expression als auch der Aktivität von Sirt1, einer NAD-abhängigen Histondeacetylase (HDAC), nachgewiesen werden. Durch Bindung dieser

HDAC an den basischen Helix-Loop-Helix-(bHLH) Transkriptionsfaktor *hairy and enhancer of split 1* (Hes1) erfolgte eine direkte Hemmung des pro-neuronalen Transkriptionsfaktors *mammalian achate schute homolog 1* (Mash1). Hierdurch konnte ein direkter Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und einer verminderten Regenerationsfähigkeit neuraler Vorläuferzellen aufgedeckt werden. Die Relevanz dieses epigenetischen Mechanismus konnte nachfolgend *in vivo*, einschließlich des Tiermodells der MS, bestätigt werden und belegt, dass Sirt1 in neuralen Stammzellen als Sensor für das Redox-Potenzial dient. Anscheinend rufen schon geringe metabolische Veränderungen eine direkte Modulation des pro-neuronalen Transkriptionsfaktors Mash1 hervor und verschieben die Differenzierung von neuralen Stammzellen zugunsten der astroglialen Entwicklung.

5.1 Die Rolle von TRAIL in der Neuroinflammation

5.1.1 Todesliganden in der Neuroinflammation

Die MS ist eine chronisch-neuroentzündliche Autoimmunerkrankung des ZNS. Nach dem derzeitigen Modell der MS-Pathogenese entgehen Myelin-spezifische CD4+ T-Zellen körpereigenen Kontrollmechanismen, sodass es in der Peripherie zu einer Aktivierung und Expansion dieser T-Zellen vom Th1- und Th17-Typ kommt. Nach Durchwanderung der Blut-Hirn-Schranke werden diese Zellen im Parenchym durch APZ, die Myelin-Antigene präsentieren, reaktiviert. Es folgt die Sekretion pro-inflammatorischer Mediatoren sowie die Rekrutierung weiterer Immunzellen ins ZNS, woraus letztendlich eine komplexe, gegen das ZNS gerichtete Entzündungsreaktion resultiert. Dies schließt neben der Demyelinisierung auch die Zerstörung neuronaler Strukturen ein. Im Tiermodell der MS, der EAE, wurde gezeigt, dass die Schädigung neuronaler Strukturen schon im frühen Stadium der Erkrankung eine entscheidende Rolle spielt (Bjartmar et al., 01); (Trapp et al., 98), und der neuronale Untergang (Apoptose) einen zentralen Schadensmechanismus im Rahmen der Neuroinflammation einnimmt (Diestel et al., 03); (Pan et al., 97); (Kornek et al., 00); (Peterson et al., 01); (Ferguson et al., 97). In den vergangenen Jahren wurde kontrovers diskutiert, ob die neuronale Apoptose als sekundäre Folgeerscheinung der Neuroinflammation zu sehen sei, oder ob eine primäre neuronale Schädigung auch direkt durch infiltrierende T-Zellen verursacht werden könnte. Hinweise hierfür brachten histologische Untersuchungen, die im ZNS von MS-Patienten eine bemerkenswerte örtliche Korrelation von entzündlichem Infiltrat und axonaler Schädigung aufzeigten (Trapp et al.,

98); (Bitsch et al., 00). Infolgedessen wurde verstärkt nach antigenunabhängigen neurotoxischen Effekten von T-Zellen gesucht, da die MHC-Expression auf Neuronen für eine Wechselwirkung zu gering ist. Es zeigte sich, dass aktivierte T-Helferzellen durch direkte antigenunabhängige Interaktion mit Neuronen neuronalen Schaden verursachen können (Aktas et al., 03) und eine ausgeprägte antigenunabhängige Neurotoxizität besitzen, wobei die Schädigung auf Zell-Zell-Kontakt beruhte und durch spezifische Blockade des Fas/FasL-Systems ausgeschaltet werden konnte (Giuliani et al., 03).

Die zentrale Rolle des Fas/FasL-Systems im Rahmen von Autoimmunerkrankungen durch Vermittlung des AICD konnte durch absichtlich herbeigeführte Mutationen im CD95-Gen der Maus belegt werden. Sowohl *lpr*- (engl.: lymphoproliferative, Mutation im CD95-Gen) als auch *gld*- (engl.: generalized lymphoproliferative disease, Mutation im CD95L-Gen) - Mäuse entwickeln spontane Autoimmunerkrankungen. Dieses Phänomen kann auf eine fehlende immunregulatorische Funktion, die für die Hemmung einer autoantigenspezifischen Immunzellaktivierung verantwortlich ist, zurückgeführt werden (Adachi et al., 93); (Takahashi et al., 94); (Russell et al., 93). In der MS ist der CD95-vermittelte AICD fehlgeleitet, wodurch es zu einem Überleben aktivierter autoreaktiver T-Zellen kommt. Dem CD95-System wird daher eine Effektorfunktion bei der Entwicklung und Progression der Neuroinflammation zugeschrieben (Dowling et al., 96). Die fehlende Regulation ist dabei höchstwahrscheinlich auf einen Anstieg des CD95-Spiegels im Liquor und Blut von MS-Patienten zurückzuführen (Zipp et al., 98). EAE-Studien stützen die entscheidende Rolle des CD95-Systems innerhalb des inflammatorischen Prozesses: CD95- und CD95L-defiziente Mäuse zeigen keine EAE-Suszeptibilität, während MBP-spezifische Zellen von Wildtyp-Mäusen in *gld*-Mäusen eine starke EAE induzieren können, wohingegen *lpr*-Mäuse kaum erkranken (Sabelko-Downes et al., 99). Somit wird die EAE-Suszeptibilität entscheidend von der CD95-Expression im ZNS beeinflusst und könnte für die Progression neuroinflammatorischer Prozesse verantwortlich sein (D'Souza et al., 96). Dementsprechend zeigen *gld*-Mäuse nach adoptiven Transfer eine chronische Verlaufsform mit stark verzögerter Remissionsphase. Die Ursache ist höchst wahrscheinlich eine fehlende Eliminierung von aktivierten infiltrierenden T-Zellen durch den CD95L auf ZNS-ansässigen Zellen (Bechmann et al., 99); (Flügel et al., 00); (Sabelko-Downes et al., 99). Das lässt die Mutmaßung zu, dass dieses System am sogenannten Immunprivileg des ZNS beteiligt ist (Bechmann, 05). Da das CD95-System, ähnlich wie es auch für TNF-alpha der Fall ist (Probert et al., 00), eine wichtige Rolle in der Eliminierung von aktivierten, enzephalitogenen T-Zellen einnimmt, ist es als therapeutischer Angriffspunkt zur Eindämmung neuroinflammatorischer Erkrankungen ungeeignet. Im Gegensatz dazu ist

TRAIL nicht in der Lage, T-Zellen apoptotisch auszuschalten (Wendling et al., 00). Zudem wird es nicht im humanen Gehirn exprimiert, wodurch eine Beteiligung am Immunprivileg des ZNS ausgeschlossen werden kann, und TRAIL eine vielversprechende therapeutische Zielstruktur zur Behandlung neuroinflammatorischer Schädigungen darstellt.

5.1.2 Die duale Rolle von TRAIL in der Neuroinflammation

Der Todesligand TRAIL wurde aufgrund zahlreicher Beobachtungen in diversen Tiermodellen lange Zeit als selektiver Tumor-Zell-Killer angesehen (Ashkenazi et al., 99); (Cretney et al., 02); (Walczak et al., 99). Folgestudien zeigten jedoch eine proliferationshemmende Wirkung auf autoreaktive T-Zellen, und demzufolge einen immunregulatorischen Effekt von TRAIL in der MS. Dieser Befund wird von der Beobachtung untermauert, dass MS-Patienten, die auf eine IFN-beta-Therapie ansprechen, eine erhöhte TRAIL-Expression in Immunzellen aufweisen (Lünemann et al., 02); (Wandinger et al., 03). Diese Arbeiten entsprechen den bislang in der EAE und anderen Autoimmunerkrankungen gemachten Beobachtungen, dass die Blockierung des TRAIL-Signalwegs durch systemische Gabe eines TRAIL-Rezeptors zur Induktion der Erkrankung führte (Lamhamedi-Cherradi et al., 03a); (Song et al., 00); (Hilliard et al., 01). Aufgrund dieser Befunde schien eine therapeutische Modulation von TRAIL zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen vielversprechend. Es stellte sich jedoch heraus, dass TRAIL in nichttransformierten Hepatozyten und in lebenden humanen Hirnschnitten Apoptose auslöst (Matysiak et al., 02); (Nitsch et al., 00); (Jo et al., 00). In Kombination mit der Fähigkeit peripherer Immunzellen, TRAIL nach Aktivierung zu exprimieren, sind somit die Bedingungen für einen T-Zell-vermittelten Schadensprozess im entzündeten ZNS gegeben.

Um im Rahmen dieser Arbeit die Beteiligung von TRAIL an neuroinflammatorischen Schadensprozessen *in vivo* zu untersuchen, erfolgte die therapeutische Modulation dieses Todesliganden in der EAE. Hierzu wurde das TRAIL-System in einer passiven EAE mit einem löslichen TRAIL-R2:Fc-Konstrukt blockiert. Dabei sorgte die intrazisternale Injektion des löslichen Rezeptors für eine auf das ZNS beschränkte Blockierung der TRAIL-abhängigen Apoptose. Im Vergleich zur intrazisternalen Fc-Fragment-Kontrollgruppe zeigte sich ein stark abgeschwächter EAE-Verlauf, wobei die periphere Immunantwort, die sich in diesem Fall auf die Analyse der antigenspezifischen Proliferation beschränkte, nicht beeinträchtigt war. Weiterführende Analysen bestätigten, dass eine systemische Verteilung des löslichen TRAIL-Rezeptor-Fusionsproteins ausgeschlossen werden konnte und eine

intrazisternale Injektion somit keinen Einfluss auf die periphere Immunantwort ausübte (Aktas et al., 05) wie es Hilliard et al. beobachten konnte. Innerhalb ihrer Studien resultierte eine systemische TRAIL-Blockade in einer verstärkten Th1- und Th2-Antwort, wodurch eine Exazerbation der Erkrankung folgte. Eine Verschlechterung des Krankheitsverlaufes konnte auch in weiteren Krankheitsmodellen wie rheumatoider Arthritis und Diabetis beobachtet werden, weshalb TRAIL als potenzieller Schutz vor Autoimmunerkrankungen angesehen wurde (Hilliard et al., 01); (Lamhamedi-Cherradi et al., 03b); (Song et al., 00). Diese Beobachtungen decken sich mit den Erkenntnissen, dass TRAIL durch die Blockade von Kalziumkanälen inhibierend auf die Aktivierung von T-Zellen wirkt und dadurch eine anti-inflammatorische, immunregulierende Wirkung besitzt (Lünemann et al., 02); (Wandinger et al., 03). Eine Ausschaltung des TRAIL-Systems würde daher zu einer verstärkten Aktivierung von T-Zellen führen, wie es auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte: Die intrazisternale DR5:Fc-Injektion resultierte in einem stärkeren Aktivierungszustand pro-inflammatorischer T-Zellen im ZNS. Zudem zeigten T-Zellen aus TRAIL-defizienten Mäusen ebenfalls einen höheren Aktivierungsstatus.

In unserer Publikation konnten wir mittels immunhistochemischer Färbung zeigen, dass sowohl die Anzahl apoptotischer Neurone im Hirnstamm als auch die axonale Schädigung im Rückenmark unter ZNS spezifischer TRAIL-Blockade reduziert ist und fanden TRAIL-positive T-Zellen in direkter Nachbarschaft zu Caspase 3 positiven Neuronen. Histopathologische und durchflusszytometrische Analysen des entzündlichen Infiltrats zeigten sich hingegen unverändert. Dies schließt eine abgeschwächte T-Zell-vermittelte Entzündungsreaktion durch Modulation des TRAIL-Systems aus und legt eine direkte Hemmung neuronaler Schadensprozesse nahe (Aktas et al., 05). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein wichtiger Anhaltspunkt für den direkten Beitrag von TRAIL als Effektormolekül innerhalb der T-Zell-vermittelten Pathogenese aufgezeigt werden. Dies gelang durch Transferexperimente, in denen Myelin-spezifische T-Zellen aus TRAIL-defizienten Mäusen in naive Wildtyp-Rezipienten transferiert wurden. Hier zeigte sich sowohl die Krankheitsinzidenz als auch der Schweregrad im Vergleich zum adoptiven Transfer von Myelin-spezifischen T-Zellen aus Wildtypmäusen stark verringert, was für eine deutlich verminderte Effektoreigenschaft der T-Zellen aufgrund ihrer TRAIL-Defizienz spricht. Diese Hypothese wird durch Ergebnisse anderer Arbeiten untermauert. In einem Kokulturmodell mit organotypischen Hirnschnitten war die apoptotische Wirkung auf neuronale Strukturen von TRAIL-defizienten T-Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen ebenfalls deutlich reduziert (Aktas et al., 05). Somit besitzt TRAIL im Rahmen der neuroentzündlichen Pathologie der EAE eine duale Rolle: Während es einen anti-

inflammatorischen, protektiven Effekt im peripheren Immunsystem ausübt, spielt dieser anti-inflammatorische Effekt im entzündeten ZNS eine untergeordnete Rolle für den Krankheitsverlauf. Dadurch gewinnt TRAIL als Effektormolekül auf T-Zellen an Bedeutung und ist entscheidend an primären Schädigungsprozessen beteiligt. Diese Mutmaßung wird nicht zuletzt durch das Expressionsmuster von TRAIL und dessen Rezeptoren bestärkt. Immunhistochemisch konnte im ZNS eine TRAIL-R2-Expression vornehmlich auf Oligodendrozyten und Neuronen nachgewiesen werden. Die Rezeptorexpression steigt hingegen unter inflammatorischen Bedingungen an und neuronale Strukturen werden somit für die TRAIL-vermittelte Apoptose empfänglich (Dörr et al., 02a). Im Einklang damit zeigte eine intrazisternale Injektion von TRAIL in gesunden Mäuse keine Apoptoseinduktion in Neuronen und Oligodendrozyten. Eine intrazisternale Verabreichung von TRAIL in Tieren mit einer milden EAE rief jedoch eine deutliche Verschlechterung des Krankheitsverlaufes hervor (Aktas et al., 05). Ähnliches ging aus dem Tiermodell der Hepatitis hervor, bei dem lediglich unter entzündlichen Bedingungen ein zytotoxischer Effekt von TRAIL auf Hepatozyten festgestellt werden konnte (Zheng et al., 04). Somit scheint die Expression der todesvermittelnden Liganden unter physiologischen Bedingungen so gering zu sein, dass es zu keinem TRAIL-vermittelten Zelltod kommt. Im Gegensatz zu dem Rezeptor wird TRAIL weder unter physiologischen noch unter entzündlichen Bedingungen im ZNS exprimiert (Dörr et al., 02a). Jedoch zeigen ZNS infiltrierende T-Zellen nach antigenspezifischer Stimulation eine verstärkte Oberflächenexpression (Mariani und Krammer, 98); (Wendling et al., 00); (Martinez-Lorenzo et al., 99).

Nitsch et al. konnten *in vitro* einen neurotoxischen Effekt von TRAIL in lebenden humanen Hirnschnitten nachweisen (Nitsch et al., 00). Dieser Befund deckt sich mit einem neurotoxischen Effekt von T-Zellen auf humane embryonale Neurone (Giuliani et al., 03). Bestätigend haben 2-Photonen-Analysen an lebenden Hirnschnitten gezeigt, dass T-Zellen in direkten Kontakt mit Neuronen treten und TRAIL-defiziente T-Zellen ein geringeres neurotoxisches Potenzial besitzen (Aktas et al., 05). Bei der HIV-Encephalopathie (engl.: human immunodeficiency virus) führt die HIV-Infektion zu einer deutlich induzierten TRAIL-Expression in Makrophagen, wobei diese nach Aktivierung als Hauptquelle löslichen TRAILs angesehen werden (Ehrlich et al., 03). In der HIV-Pathogenese wandern TRAIL exprimierende Makrophagen ins ZNS, rufen dort durch Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten eine diffuse Entzündungsreaktion hervor und scheinen ebenfalls neurotoxisches Potenzial zu besitzen (Miura et al., 03). Eine gezielte Modulation des TRAIL/TRAIL-Rezeptorsystems könnte trotz der dualen Rolle des TRAIL-Signalwegs daher

einen möglichen neuroprotektiven Therapieansatz innerhalb neuropathologischer Schadensmechanismen wie der MS darstellen.

In einem weiteren neuroinflammatorischen Tiermodell, der bakteriellen Meningitis, konnte zum ersten Mal eine anti-inflammatorische Wirkung von TRAIL im ZNS aufgezeigt werden (Hoffmann et al., 07). Ausgelöst wird die Meningitis durch eine bakterielle Infektion des ZNS. Eine schnell fortschreitende Entzündungsreaktion führt zu pathologischen Veränderungen im ZNS, welche ebenfalls neuronale Schädigung einschließt. Dabei erscheint die subarachnoidale Entzündungsreaktion in der akuten Phase als Exsudat vornehmlich aus Granulozyten. Im weiteren Verlauf erfolgt eine Verschiebung der Zusammensetzung, die schließlich aus einem Gemisch aus Lymphozyten, Makrophagen und Granulozyten besteht. Leukozyten stellen dabei die erste Verteidigungsfront infolge der bakteriellen Infektion dar, obwohl sie keine effizienten Bakterienvernichter sind (Ernst et al., 83). Zahlreiche Studien belegen jedoch eine Effektorrolle (im Sinn einer Kollateralschädigung) im Rahmen der bakteriellen Meningitis, da aus einer Inhibierung der Leukozyteninfiltration eine deutlich verminderte Entzündungsreaktion resultierte und zu einer abgeschwächten klinischen Symptomatik führte (Tuomanen et al., 89); (Weber et al., 95); (Saez-Llorens et al., 91). Der verminderte Leukozytenanteil im CSF war zusätzlich mit einer verringerten neuronalen Apoptose und einer gestiegenen Überlebensrate im Tiermodell verbunden. Eine direkte Granulozytendepletion zeigte ebenfalls einen therapeutischen Effekt. Diese führte zu einer Reduzierung der neuronalen Apoptose (Hoffmann et al., 07), wobei innerhalb der Meningitis auch ein leukozytenunabhängiger Mechanismus für den Verlust neuronaler Strukturen verantwortlich ist (Weber und Tuomanen, 07). Die anti-inflammatorische Rolle von TRAIL in der Meningitis zeigte sich durch Applikation von TRAIL in den Subarachnoidalraum erkrankter Mäuse. Hierdurch kam es zu einer deutlichen Reduktion der Entzündung und der hippocampalen Apoptose. TRAIL-defiziente Mäuse zeigten den gegensätzlichen Effekt: eine verstärkte Entzündungsreaktion mit angestiegener Apoptoserate im Hipocampus. Dieser protektive Effekt von TRAIL im Rahmen der Meningitis konnte auf eine veränderte Rekrutierung und Lebensdauer von Leukozyten in der CSF zurückgeführt werden. Im Vergleich zu Wildtypmäusen zeigten TRAIL-defiziente Mäuse eine verlangsamte Rekrutierung von Leukozyten in die CSF. Während der akuten Phase waren deutlich weniger Granulozyten, die normalerweise die erste Inflammationswelle darstellen, im CSF zu finden. Dieser Anteil blieb während der gesamten experimentellen Phase unverändert, obwohl in den Kontrollgruppen der Leukozytenanteil kurz nach Krankheitshöhepunkt auf den

Ausgangswert zurückfiel. Dieses Phänomen spiegelte sich in einer verlängerten Lebenszeit aktivierter Leukozyten im CSF von TRAIL-defizienten Mäusen wider (Hoffmann et al., 07).

Neutrophile Granulozyten wandern als Antwort auf chemotaktische Signale wie TNF-alpha, LTB4 und verschiedener Chemokine zum Ort der Entzündung. Dort entwickeln sie durch einen anti-apoptotischen Stimulus (GM-CSF, LPS, C5a) eine Resistenz gegenüber Fas und TNF-vermittelter Apoptosesignale (Lee et al., 93); (Scheel-Toellner et al., 02) und verlängern dadurch ihre Lebensdauer. Im klaren Gegensatz dazu steht die Suszeptibilität gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose: Während neugebildete Neutrophile sich gegenüber TRAIL resistent zeigen, erlangen sie ihre TRAIL-vermittelte Apoptosesensitivität innerhalb des Alterungsprozesses (Renshaw et al., 03); (Lum et al., 05). Eine Regulation der Lebensdauer über den TRAIL-Signalweg konnte durch die Existenz des TRAIL-R2 auf humanen Neutrophilen belegt werden (Kamohara et al., 04). Dieser Befund steht im Einklang mit der in dieser Arbeit aufgezeigten TRAIL-R2-Expression auf murinen Neutrophilen. Durch dessen Expression lässt sich die Suszeptibilität aktivierter neutrophiler Granulozyten gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose erklären. Bestätigend konnte durch exogenes TRAIL Apoptose in aktivierten Leukozyten aus dem CSF TRAIL-defizienter Mäuse induziert werden (Hoffmann et al., 07). In der Resistenz gegenüber Fas und TNF-alpha vermittelter Apoptose (Lee et al., 93); (Scheel-Toellner et al., 02) findet die allgemein beobachtete Lebenszeitverlängerung aktivierter Granulozyten ihre Erklärung. Der sich unverändert zeigende Anteil an Granulozyten im CSF TRAIL-defizienter Mäuse resultiert daher höchstwahrscheinlich aus einer fehlenden anti-inflammatorischen Regulation durch TRAIL (Hoffmann et al., 07).

Zusätzlich äußerte sich eine TRAIL-Defizienz in einer abgeschwächten Rekrutierung von Granulozyten in das CSF-Kompartiment. Eine mögliche Begründung könnte in einem geänderten Migrationspotenzial gegenüber chemotaktischen Signalen liegen. Frühere Studien beschreiben einen anti-migratorischen Effekt infolge einer durch TRAIL erniedrigten Chemokinproduktion durch Endothelzellen (Secchiero et al., 05). Darüber hinaus konnte eine TRAIL-abhängige Regulation von ICAM (engl.: intercellular adhesion molecules) auf Monozyten und Astrozyten belegt werden (Choi et al., 08). Der inhibierende Effekt auf die Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen wurde bereits ausführlich beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher das Migrationsvermögen aktivierter Granulozyten gegenüber einen LTB4 Gradienten untersucht. Hierbei zeigte sich kein Unterschied in der chemotaktischen Aktivität gegenüber LTB4. Auch exogenes TRAIL hatte keinen Einfluss auf das Migrationsvermögen aktivierter Granulozyten *in vitro*. Im Einklang mit den hier erzielten Ergebnissen wurde ebenfalls keine Änderung in der CD18-

Expression, der einen Marker für die Aktivierung und die Adhäsionskapazität darstellt, auf Granulozyten gefunden (Hoffmann et al., 07). Somit bleibt der zugrundeliegende Mechanismus einer TRAIL-abhängigen Leukozytenkinetik zu klären. Jedoch ist der anti-inflammatorische Effekt, hervorgerufen durch eine limitierte Entzündungsreaktion, infolge TRAIL-vermittelter Apoptose von Effektorzellen in der CSF belegt.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass die periphere immunregulatorische Wirkung des Todesliganden TRAIL in Rahmen von Autoimmunerkrankungen (Lamhamedi-Cherradi et al., 03a); (Song et al., 00); (Lünemann et al., 02); (Wandinger et al., 03) innerhalb der Neuroinflammation zu vernachlässigen ist, und die zytotoxischen Effekte des Todesliganden als Effektormolekül in den Vordergrund treten. Im Rahmen der MS-Pathogenese ist somit folgendes Szenario denkbar: Außerhalb des ZNS entgehen autoreaktive T-Zellen den körpereigenen Kontrollmechanismen, woraus eine unkontrollierte Aktivierung und Expansion dieser Zellen resultiert. Sowohl die Aktivierung in der Peripherie als auch im ZNS-Parenchym, nach Transmigration durch die Blut-Hirnschranke, ruft eine verstärkte TRAIL-Expression auf Th-Zellen hervor. Infolge der induzierten Entzündungsreaktion im ZNS kommt es zu einer erhöhten TRAIL-Rezeptorexpression auf Zielstrukturen wie Neuronen und Oligodendrozyten. Diese weisen hierdurch eine verstärkte Suszeptibilität gegenüber Zell-Zell-Kontakt vermittelter Apoptose über den TRAIL-Signalweg auf. Der T-Zell-vermittelte neurotoxische Effekt wird dabei höchstwahrscheinlich durch lösliches TRAIL verstärkt. Dabei stellen aktivierte Makrophagen eine Hauptquelle des löslichen TRAILs dar (Ehrlich et al., 03); (Miura et al., 03). Somit steht die Bewertung von TRAIL als Effektormolekül Zell-vermittelter Entzündungsreaktionen im Einklang mit Befunden aus anderen Krankheitsmodellen (Schmaltz et al., 02); (Zheng et al., 04); (Sato et al., 06); (Miura et al., 03). Die Pathogenese der Neuroinflammation wird somit entscheidend durch TRAIL mitbestimmt und ermöglicht - trotz der dualen Rolle des TRAIL-Signalwegs - eine therapeutische Modulation dieses Mechanismus. Jedoch scheint TRAIL unter bestimmten Bedingungen auch im entzündeten ZNS eine duale Rolle zu besitzen, wie es aus dem anti-inflammatorischen Effekt im Tiermodell der bakteriellen Meningitis hervorgeht. Hier ist der zugrundeliegende Mechanismus nicht endgültig geklärt, doch der protektive Effekt eindeutig belegt (Hoffmann et al., 07). Allerdings handelt es sich hierbei um einen vorrangig durch Granulozyten ausgelösten Entzündungsprozess, der von einer gezielten T-Zell-vermittelten organspezifischen Immunreaktion zu differenzieren wäre. Ein therapeutischer Eingriff in das TRAIL-System muss daher die spezifische Genese der Entzündungsreaktion berücksichtigen. Daher bedarf es einer weitergehenden Aufklärung

der mechanistischen Wirkung innerhalb der zugrundeliegenden neuroinflammatorischen Pathogenese.

5.2 Mechanismen gestörter neuronaler Regeneration und reaktiver Astrogliose

Neurale Stamm- und Vorläuferzellen sind im adulten ZNS hauptsächlich in zwei Regionen, den sogenannten neurogenen Zonen, zu denen die SVZ und der Hippocampus zählen, angesiedelt (Alvarez-Buylla und Lim, 04). Durch ihre Fähigkeit, über den gesamten Lebenszeitraum Nerven- und Gliazellen hervorzubringen, besitzen diese beiden Keimzonen ein enormes regeneratives Potenzial im Falle von Schädigungen des ZNS (McKay, 97); (Wernig und Brustle, 02). Entzündliche Prozesse im ZNS treten nicht nur bei der MS, sondern auch bei einer Vielzahl weiterer neurodegenerativer Erkrankungen auf (Zipp und Aktas, 06). Es ist bekannt, dass Entzündungsprozesse inhibierend auf die endogene Neurogenese wirken (Monje et al., 03). Sowohl primär als auch sekundär entzündliche neurodegenerative Erkrankungen sind durch übermäßiges Auftreten von Astrozyten gekennzeichnet. Diese reaktive Astrogliose wird für die im zentralen Nervensystem nur unzureichende neuronale Regeneration verantwortlich gemacht (Ridet et al., 97). Aufgrund der unbestrittenen Rolle von Zytokinen in der Pathologie primär-entzündlicher ZNS-Erkrankungen, wie der MS und deren Tiermodell (Steinman, 96); (Frohman et al., 06), wurde ein möglicher Zusammenhang zur verstärkten Astrogliose vermutet. Intrazerebrale Injektionen verschiedener Zytokine, wie beispielsweise Interleukin-1, Interferon-beta sowie TGF-beta, führten zu einer verstärkten Astrogliose, wobei sich die gliale Narbenbildung durch spezifische Blockade reduziert zeigte (Silver und Miller, 04). Die Rolle der Zytokine außerhalb immunologisch vermittelter ZNS-Erkrankungen ist jedoch noch nicht geklärt. Im Gegensatz dazu zeigen eine Vielzahl von Schadensmechanismen im Rahmen entzündlicher, ischämischer, metabolischer oder traumatischer Erkrankungen eine Gemeinsamkeit: das Auftreten von oxidativem Stress und die damit verbundene Freisetzung reaktiver Sauerstoffverbindungen, der sogenannten Radikalen (Zipp und Aktas, 06). Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob milde Veränderungen des oxidativen Gleichgewichts die Eigenschaften neuraler Stammzellen beeinflussen, sich möglicherweise auf die endogene Regenerationsfähigkeit auswirken und in einem quantitativen Überwiegen von Astrozyten äußern.

5.2.1 Einfluss des Redox-Gleichgewichts auf die Eigenschaften NVZ

Neurale Stammzellen können sowohl aus dem embryonalen als aus dem adulten ZNS isoliert werden (Reynolds und Weiss, 92); (Weiss et al., 96); (Gritti et al., 96). *In vitro* gehen durch Proliferation aus diesen Vorläuferzellen rundliche Zellaggregate, sogenannte Neurosphären, hervor, welche sich aus teilenden multipotenten Stamm- und Vorläuferzellen zusammensetzen (McKay, 97). *In vivo* und *in vitro* können diese NVZ durch EGF oder bFGF expandiert werden. Durch eine direkte Mitogeninjektion in den Ventrikel resultierte ebenfalls eine gesteigerte Proliferation SVZ ansässiger Zellen (Craig et al., 96). Aufgrund eines fehlenden einzigartigen Markers für neurale Stammzellen werden diese durch ihre Fähigkeit der Selbsterneuerung, d.h. alle Nachkommen besitzen ebenfalls Stammzeleigenschaften, identifiziert. Ein zusätzliches Kriterium stellt die Multipotenz dar und in dem Fall neuraler Stammzellen ihre Fähigkeit, Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten zu bilden (Loeffler et al., 97). Entzieht man kultivierten Stamm- und Vorläuferzellen das Mitogen, differenzieren sie spontan in Neurone und Gliazellen (Gage et al., 95). Die in dieser Arbeit isolierten Stamm- und Vorläuferzellen konnten *in vitro* mittels bFGF zur Proliferation angeregt werden, wobei dessen Entzug zur spontanen Differenzierung in Neurone und Gliazellen führte und mit der Expression linienspezifischer Marker wie beta-III-Tubulin (nicht vollständig ausdifferenzierte neuronale Zellen) und GFAP (astrozytäre Zelllinie) einherging. Somit zeigten die verwendeten Zellen die klassischen Stammzeleigenschaften der Selbsterneuerung und der Multipotenz. Zusätzlich konnte die Expression von Nestin, ein Marker, der üblicherweise in multipotenten, nicht zweckgebundenen Stammzellen, gefunden wird (McKay, 97), bestätigt werden. Die fehlende immunocytochemische Detektion linienspezifischer Filamentproteine konnte den undifferenzierten Zustand der kultivierten NVZ bestätigen.

Um zu untersuchen, ob eine Verschiebung des Redox-Gleichgewichts einen Einfluss auf die klassischen Stammzeleigenschaften besitzt, wurden Redox-aktive Substanzen zur Modulation des intrazellulären Milieus verwendet. Ein eher oxidatives Milieu wurde durch Buthioninsulfoximin (BSO), einem spezifischer Inhibitor der γ -Glutamyl-Cystein-Synthase, hergestellt. Es konkurriert mit L-Glutamat um die Substratbindungsstelle des Enzyms. Diese synthetische Substanz zeigt im Gegensatz zu anderen Hemmstoffen des Glutathionmetabolismus (auf die hier nicht näher eingegangen werden soll) in den verwendeten Konzentrationsbereichen keine toxischen Nebenreaktionen und findet daher häufig in experimentellen Modellen seine Anwendung, bei denen der Einfluss von oxidativem Stress untersucht werden soll (Griffith und Meister, 79). α -Liponsäure (LS) ist hingegen ein Radikalfänger und starkes Antioxidans und wurde daher zur Verschiebung

des Gleichgewichts zugunsten einer eher reduzierenden Umgebung verwendet. Als Koenzym spielt es vornehmlich bei oxidativen Decarboxylierungen eine Rolle und bildet mit seiner reduzierten Form der Dihydroliponsäure ein biochemisches Redoxsystem. 2,7-Dichlorodihydrofluorescein-diacetate (H₂DCFDA) diente dabei zur Visualisierung des geänderten Redox-Gleichgewichts in der Zelle. Nach der Aufnahme wird die Acetatgruppe durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert. Das nicht fluoreszierende Dichlorodihydrofluorescein (H-DCF) wird durch RSS zum Fluorochrom Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert (Hempel et al., 99). Wie in Kapitel 4.2.2 aufgezeigt, führte der Einsatz von BSO zu einem verstärkten Fluoreszenzsignal in NVZ, während der Einsatz von LS selbiges abschwächte. Somit ließ sich durch Redox-aktive Substanzen die Konzentration an RSS in den NVZ modulieren und das Redox-Gleichgewicht nach Wunsch variieren. Dadurch konnte eine substantielle Abhängigkeit der typischen Stammzeleigenschaften vom intrazellulären Redox-Gleichgewicht aufgedeckt werden (Kap. 4.2.2). Unter pro-oxidativen Bedingungen zeigte sich die Proliferation NVZ gehemmt, während eine reduktive Umgebung den gegensätzlichen Effekt hervorrief. Die Wirkung auf die Multipotenz wurde unter Mitogenentzug untersucht, hierzu wurden die NVZ ohne bFGF für sieben Tage unter Einfluss der Redox-Modulatoren kultiviert und immunocytochemisch auf linienspezifische Marker für Neurone (NeuN) oder Astrozyten (GFAP) gefärbt. Oxidative Bedingungen resultierten in einer drastischen Zunahme von Astrozyten, während sich der neuronale Zellanteil deutlich verringert zeigte. Der Einsatz von Antioxidantien rief wiederum den gegensätzlichen Effekt hervor und führte zu einer deutlichen Induktion der Neurogenese. Die angeschlossene klonale Analyse bestätigte und verdeutlichte den anti-proliferativen Effekt unter pro-oxidativen Bedingungen. Unter BSO-Einfluss zeigte sich lediglich die Größe der aus einem Klon hervorgegangenen Kolonie reduziert, während die Zahl bipotenter Ausgangsklone nicht beeinflusst war. Wiederum konnte innerhalb dieser gemischten Kolonien eine deutliche Erhöhung des astrozytären Zellanteils belegt werden (Prozorovski et al., 08). Somit führen bereits subtile, nicht toxische Veränderungen des oxidativen Gleichgewichts zu einer Hemmung des Proliferationsvermögens von neuronalen Stammzellen und bewirken, dass anstelle von Neuronen vornehmlich Astrozyten entstehen. Dabei ist die aktive Astrogliose weder durch eine verstärkte Proliferation von astrozytären Vorläuferzellen, noch durch eine Einschränkung in der Multipotenz erklärbar. Vielmehr scheint das intrazelluläre Milieu das Entwicklungsprogramm nicht festgelegter NVZ zugunsten der astroglialen Differenzierung zu beeinflussen.

Studien an Oligodendrozyten-Typ-2-Astrozyten-Vorläuferzellen (O-2A) von Smith et al. (Smith et al., 00) zeigten ebenfalls eine Abhängigkeit der Selbsterneuerung vom intrazellulären Redox-Gleichgewicht: O-2A Klone mit einem niedrigen intrazellulären Anteil

an Oxidantien besaßen im Gegensatz zu Klonen mit einem endogen erhöhten Oxidationspotenzial ein verstärktes Proliferationsvermögen. Eine exogene Verschiebung des intrazellulären Redox-Gleichgewichts durch BSO äußerte sich in einer verminderten Proliferationsaktivität von O-2A Zellen. Anti-oxidative Substanzen führten hingegen zu einer Steigerung der Proliferation. Zusätzlich schien die Entscheidung zur Selbsterneuerung oder Differenzierung in O-2A Zellen vom intrazellulären Redox-Gleichgewicht beeinflusst: Dabei begünstigten pro-oxidative Bedingungen die Differenzierung der O-2A Vorläuferzellen auf Kosten der Selbsterneuerung (Smith et al., 00). Somit steht die hier beobachtete Redox-abhängige Selbsterneuerung von NVZ im Einklang mit den Ergebnissen von Smith et al. Unter Mitogenentzug zeigten NVZ jedoch keine Tendenz zur Proliferation und differenzierten vollständig zu Neuronen und Gliazellen. In diesem Prozess wurde Nestin komplett durch die Expression linienspezifischer Filamentproteine ersetzt. Diese Entwicklung war ebenso unter BSO wie unter LS zu beobachten und deutet auf einen fundamentalen Verlust der Selbsterneuerung hin. Eine Verschiebung der Balance zwischen Proliferation und Differenzierung von NVZ kann daher ausgeschlossen werden, wodurch sich NVZ von O-2A Zellen deutlich unterscheiden. Vielmehr zeigte sich eine Redox-abhängige Modulation des Differenzierungsprogramms zugunsten der astrozytären Linie auf Kosten der Neurogenese. Dabei wirkt sich eine Gleichgewichtsverschiebung in NVZ nicht auf den Anteil an Oligodendrozyten aus (Prozorovski et al., 08). Die in dieser Arbeit aufgezeigte Redox-abhängige Differenzierung von NVZ wird von Covacu et al. gestützt (Covacu et al., 06). In ihren Studien wirkte Stickstoffmonoxid (NO) inhibierend auf die neuronale Differenzierung von NVZ, während sich die Entwicklung der astrozytären Zelllinie nicht betroffen zeigte. Für NO ist bekannt, dass es zu fundamentalen Gewebeerstörungen führt und den Zelltod von NVZ, Oligodendrozyten sowie Neuronen induziert. Dessen Auftreten ist ebenfalls unbestreitbar mit zahlreichen neuroinflammatorischen Erkrankungen verbunden und wirkt sich auf das intrazelluläre Redox-Gleichgewicht aus (Cheng et al., 01); (Brown, 07); (Zipp und Aktas, 06). Der zugrundeliegende Mechanismus, der für die inhibierte Neurogenese verantwortlich ist, konnte jedoch nicht aufgezeigt werden.

5.2.2 Sirt1 als spezifischer Redox-Sensor in NVZ

Um den Mechanismus aufzuklären, der für eine übermäßige Astrozytenbildung auf Kosten der Neurogenese verantwortlich ist, wurden zahlreiche Transkriptionsfaktoren untersucht, von denen bekannt ist, dass sie die Entwicklung neuraler Stammzellen beeinflussen (Bertrand et al., 02). Dabei zeigte sich lediglich die Expression von Sirt1, einer NAD-

abhängigen HDAC, unter oxidativen Bedingungen stark erhöht. Nachfolgende Untersuchungen erbrachten den Beweis, dass Änderungen des Redox-Gleichgewichts ein Sirt1-abhängiges Differenzierungsprogramm in NVZ auslöst: Eine Behandlung von NVZ mit dem Sirt1-Aktivator Resveratrol ahmte dabei den Effekt einer Gleichgewichtsverschiebung zugunsten des oxidativen Milieus nach, woraus eine verstärkte Bildung von Astrozyten resultierte. Dieser Effekt zeigte sich durch eine siRNA vermittelte Inhibierung von Sirt1 reversibel und selbst unter oxidativen Bedingungen wurde nach Inhibierung der Sirt1-Expression die Neurogenese begünstigt (Kap. 4.2.3).

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass Sirt1 als Redox-Sensor das Differenzierungsprogramm NVZ steuert. Allerdings kann Sirt1 aufgrund seiner Struktur nicht direkt an DNA binden (Rosenberg und Parkhurst, 02), sondern ist hierzu auf weitere Faktoren angewiesen. Ein möglicher Kandidat ist der bHLH-Transkriptionsfaktor Hes1, dessen Repressorrolle auf pro-neuronale Gene bekannt ist (Kageyama et al., 05), was eine Beeinflussung der Differenzierung erklären könnte. Um dieser Vermutung nachzugehen, erfolgte eine Bindungsanalyse zu Hes1. Mittels Immunpräzipitation konnte eine oxidativ herbeigeführte Komplexbildung mit dem transkriptionalen Repressor Hes1 belegt werden. Die angeschlossene Analyse der Histondeacetylaseaktivität von Sirt1 gegenüber spezifischen Substraten wie H3K9 und H4K16 (Vaquero et al., 07) offenbarte eine oxidativ hervorgerufene Deacetylierung des Histon-Lysinrestes H3K9. Interessanterweise wirkte Splitomicin, ein Sirt1-Inhibitor, blockierend auf die Deacetylierung von H3K9. Die Acetylierung des Histon-Lysinrest H4K16 zeigte sich hingegen unverändert. Des Weiteren wurde beobachtet, dass eine durch BSO-induzierte Oxidation anscheinend nur spezifische Histonreste modifiziert und keine globale Histondeacetylierung hervorruft, da der Acetylierungsstatus von H3 und H4 nicht betroffen war. Solch eine globale Änderung konnte durch Trichostatin A, einem HDAC I – II Inhibitor, aufgezeigt werden. Als Antwort auf eine Verschiebung des Redox-Gleichgewichts zugunsten der oxidativen Seite kommt es somit zu einer Anlagerung von Sirt1 an den bHLH-Transkriptionsfaktor Hes1. Dies führt zu einer gesteigerten Histondeacetylaseaktivität gegenüber spezifischer Histonreste wie H3K9. Daraus ergab sich zwangsläufig die Frage, welche Rolle Sirt1 bei der Regulation von Genen, die für die neuronale Entwicklung zuständig sind, spielt. Hierbei richtete sich das Augenmerk auf den pro-neuronalen Transkriptionsfaktor Mash1. Neben der Repressorwirkung von Hes1 auf die Mash1-Expression (Kap. 1.7) konnte bereits in früheren Arbeiten eine Inhibierung der Mash1-Genexpression infolge einer verringerten Histon H3K9-Acetylierung belegt werden (Williams et al., 06).

Im Einklang mit der verminderten neuronalen Differenzierung zeigte eine oxidative Umgebung einen inhibierenden Effekt auf die Mash1-Genexpression. Selbiges konnte durch den Sirt1-Aktivator Resveratrol hervorgerufen werden, wobei die Blockade der Sirt1-Aktivität mittels spezifischer Sirt1-Inhibitoren den BSO-vermittelten Effekt aufhob. Dabei zeigte sich, dass die BSO vermittelte Unterdrückung der Mash1-Expression auf einem Zusammenspiel von Sirt1 und Hes1 beruht und eine Blockade dieser beiden Gene die Mash1-Genexpression wieder herstellte. Dieser Befund konnte durch die Untersuchung des Mash1-Promotors weiter aufgeklärt werden: Oxidative Bedingungen führten zu einer deutlichen Hochregulation von Sirt1 innerhalb des Mash1-Promotors, während sich Hes1 unverändert zeigte. Dies ging mit einer gestiegenen Sirt1-Aktivität innerhalb des Mash1-Promotors einher und äußerte sich in einem erniedrigten Acetylierungsstatus von H3K9 (Kap. 4.2.3.7). Somit führt die Verschiebung des intrazellulären Redox-Gleichgewichts zugunsten des oxidativen Milieus zu einer verstärkten Anlagerung von Sirt1 an Hes1 innerhalb des Mash1-Promotors. Hieraus resultiert eine gesteigerte Deacetylierung von H3K9 innerhalb dieser Region. Daraus kann eine Modifikation der Histonkonformation gefolgert werden, die sich letztendlich inhibierend auf die Mash1-Gentranskription auswirkt. Somit scheint Sirt1 *in vitro* als Redox-Sensor für das Schicksal NVZ verantwortlich zu sein und aktiv das Differenzierungsprogramm zu steuern (Prozorovski et al., 08).

Hierfür spricht allein schon die Tatsache, dass die Sirtuine eine von NAD⁺ abhängige Aktivität zeigen (Imai et al., 00). Daher sind sie eng mit dem Energiehaushalt der Zelle verbunden und besitzen somit eine besondere Sensitivität gegenüber metabolischen Schwankungen (Blander und Guarente, 04); (Leibiger und Berggren, 06); (Jackson et al., 03); (Zhang et al., 06). Diese Sensitivität bedingt, dass Sirt1 ebenfalls an der Regulation verschiedener Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel-Mechanismen beteiligt ist. Beispielsweise fördert Sirt1 die Mobilisierung von Fett in weißen Adipozyten durch Regulation des PPAR- γ (Peroxisom Proliferations-aktivierter Rezeptor- γ) ((Picard et al., 04) und ist in der Aktivierung verschiedener glykolytischer Gene involviert (Rodgers et al., 05). Zudem konnte kürzlich gezeigt werden, dass Sirt1 nicht nur für die Histondeacetylierung verantwortlich ist, sondern auch eine Aktivität gegenüber Proteinen, wie dem Tumorsuppressor p53, besitzt. Durch direkte Bindung an p53 kommt es zur Unterdrückung der p53-induzierten Apoptose (Luo et al., 01). Zusätzlich trägt die Deacetylierung von Stress-Mediatoren wie FOXO zur Stressresistenz und zum Überleben von Zellen bei: Als Antwort auf oxidativen Stress konnte eine Komplexierung von Sirt1 mit dem Transkriptionsfaktor FOXO3 nachgewiesen werden. Dies führt zu einer Deacetylierung von FOXO3, wodurch zum einen der Zellzyklus gestoppt und eine gewisse

Stressresistenz hervorgerufen wird, und zum anderen der FOXO induzierte Zelltod unterbunden wird. Hierdurch nimmt Sirt1 Einfluss auf den Zellzyklus, Proliferation und Differenzierung in Abhängigkeit von metabolischen Veränderungen (Chua et al., 05); (Brunet et al., 04); (Fulco et al., 03); (Leibiger und Berggren, 06). Um jedoch in irgendeiner Weise die Expression von Genen regulieren zu können, muss Sirt1, aufgrund seiner fehlenden DNA-Bindungsdomäne, an spezifische Transkriptionsfaktoren binden. Dabei kann die Deacetylierung eine direkte funktionale Inhibierung hervorrufen. Oftmals kommt es dabei zur Bildung von Multiprotein-Komplexen (Parsons et al., 03); (Furuyama et al., 04). Die transkriptionelle Aktivität von HDAC1, einer HDAC der Klasse I, wird beispielsweise durch die Rekrutierung von Sirt1 an den Transkriptionskomplex RBP1/mSIN3A/HDAC1 inhibiert (Binda et al., 08). Die Histondeacetylaseaktivität von Sirt1 kann jedoch auch zu einer Modifikation der Chromatinstruktur führen und auf diesem Wege die Transkription verschiedener Gene regulieren (Rosenberg und Parkhurst, 02). Eine umfassende Genom-Analyse des Chromatinprofils von Hes1-Zielgenen in *Drosophila* identifizierte eine starke Überlappung der bindenden Seiten für *Hairy* (Hes1 Homolog von *Drosophila*) und dSir2 (Sirt1 Homolog von *Drosophila*, (Bianchi-Frias et al., 04). Dies deutet möglicherweise auf eine Involvierung von Sirt1 in der Regulation verschiedenster Hes1-abhängiger Gene. Sowohl in *Drosophila* als auch in Säugetierzellen konnte die Existenz eines Komplexes, bestehend aus Sirt1 und Hes1, nachgewiesen werden. Dabei fungiert Sirt1 als co-Repressor und ist für die volle Repressoraktivität von Hes1 notwendig. Durch den genetischen Verlust von dSir2 während der Entwicklung wird die Repressor-Aktivität von *Hairy* deutlich reduziert (Rosenberg und Parkhurst, 02); (Takata und Ishikawa, 03). Wie schon in der Einleitung dargestellt, erfolgt die Regulation von Mash1 über den bHLH-Repressor Hes1 (Kap. 1.7), und diese Interaktion verhindert während der neuronalen Entwicklung eine frühzeitige und übermäßige Reifung von Neuronen (Ishibashi et al., 95).

Im Einklang mit den derzeit existierenden Forschungsergebnissen zeigen die bisherigen *in vitro* Ergebnisse, dass nicht-toxische Veränderungen des intrazellulären Redox-Gleichgewichts sich deutlich auf die fundamentalen Eigenschaften NVZ auswirken: Durch eine oxidative Verschiebung des Gleichgewichts wird das Proliferationsvermögen deutlich gehemmt, was dazu führt, dass anstelle von Neuronen vornehmlich Astrozyten entstehen. Die HDAC Sirt1 fungiert in diesem Prozess als Sensor für das Redox-Potenzial in neuronalen Stammzellen. Unter oxidativen Bedingungen kommt es innerhalb des Mash1-Promotors zu einer Anlagerung von Sirt1 an den bHLH-Transkriptionsfaktor Hes1 und zur Entfaltung der Deacetylaseaktivität. Über die spezifische Deacetylierung von H3K9 wird die Chromatinstruktur so modifiziert, dass es zur Inhibierung des neuronalen

Transkriptionsfaktors Mash1 kommt und der Differenzierungsprozess der NVZ direkt beeinflusst wird.

Weitere Studien konnten belegen, dass die oxidativ induzierte Deacetylierungsaktivität innerhalb des Mash1-Promotors kein generelles Phänomen von Sirt1 ist, sondern eine spezifische Reaktion auf Änderungen des Redox-Potenzials darstellt. In diesen Untersuchungen zeigten sich weitere Redox-abhängige Zielstrukturen von Sirt1 wie UCP2 (engl.: uncoupling protein 2, (Bordone et al., 06) und cIAP2 (engl.: cellular inhibitor of apoptosis 2, (Yeung et al., 04) durch Oxidation leicht erhöht. Die Analyse der Promotorregion brachte allerdings weder eine erhöhte Assoziation von Sirt1, noch eine Änderung des Acetylierungszustands von H3K9 hervor (Prozorovski et al., 08). Darüber hinaus wurde durch PDGF (engl.: platelet-derived growth factor) eine stabile Mash1-Expression induziert (Ju et al., 04), wodurch eine genaue Analyse der Mash1-Promotorregion ermöglicht wurde. Unter oxidativen Bedingungen konnte eine Komplexierung von Sirt1 und Hes1 innerhalb des Mash1-Promotors bestätigt werden, wodurch weitere co-Repressor-Moleküle wie TLE1 rekrutiert werden, und die Inhibierung der Mash1 Genexpression folgt. Innerhalb des Mash1-Promotors zeigte sich die Bindung von Hes1 auch unter Redox-Verschiebung unverändert. Eine reduzierend wirkende Umgebung führte jedoch zum Austausch der co-Faktoren: Es konnte keine Bindung von Sirt1 beobachtet werden, stattdessen wurde der co-Aktivator CBP (CREB-Bindungsprotein) rekrutiert und die Mash1-Expression initialisiert (Prozorovski et al., 08); (Ju et al., 04).

5.2.3 Sirt1 als spezifischer Redox-Sensor *in vivo*

Um die Relevanz der bisherigen Ergebnisse *in vivo* zu untersuchen, wurde in postnatalen Mäusen eine BSO-induzierte pro-oxidative Umgebung geschaffen. Bestätigend zu den *in vitro* Beobachtungen führte eine Verschiebung des Redox-Gleichgewichts zu einer erhöhten Sirt1-Expression in der SVZ. Zusätzlich war ein Anstieg der Zahl neu differenzierter Astrozyten zu finden. In diesem Rahmen beschränkte sich das Sirt1-Signal vornehmlich auf GFAP+ Strukturen, wodurch die Rolle von Sirt1 in der astrozytären Differenzierung belegt wird. Ebenso zeigte sich die divergente Regulation von Sirt1 und Mash1 *in vivo*: Neben einem deutlichen Anstieg Sirt1+ Zellen war eine Reduzierung Mash1+ und somit pro-neuronaler Zellen in der SVZ zu verzeichnen. Wessentlich des Migrationsverhaltens von NVZ aus der SVZ über den RMS zum OB offenbarte die Analyse des RMS mit dem Neuroblastenmarker Dcx eine deutliche Erniedrigung proliferierender Neuroblasten. Diese *in vivo* Resultate bestätigen, dass eine pro-oxidative Verschiebung des Redox-Gleichgewichts ebenfalls zu einer Induktion des Redox-Sensors Sirt1 führt. Die

verminderte Neurogenese in Verbindung mit dem Anstieg astrozytärer Strukturen deutet wiederum auf eine Modulation des pro-neuronalen Transkriptionsfaktors Mash1 hin (Kap. 4.2.4).

Aufgrund der bekannten Letalität von Hes1 oder Sirt1 defizienten Mäuse konnte eine postnatale Analyse der SVZ in diesen Stämmen nicht durchgeführt werden (Ishibashi et al., 95); (McBurney et al., 03). Um jedoch die genaue Rolle von Sirt1 und Hes1 innerhalb des oxidativ geänderten Differenzierungsverhaltens *in vivo* zu untersuchen, wurden Sirt1 und Hes1 durch *in utero* Elektroporation mit EGFP-markierten shRNA Konstrukten ausgeschaltet. Diese Methode erlaubt die transiente Stilllegung von Genen innerhalb SVZ-ansässiger Zellen, wobei das umliegende ZNS-Gewebe unbeeinträchtigt bleibt. Zusätzlich konnten die transfizierten Zellen aufgrund ihres EGFP-Signals bis zu sieben Tage nach Transfektion immunhistochemisch detektiert und analysiert werden. Wie es die vorausgegangenen *in vitro* Ergebnisse vermuten ließen, resultierte die Ausschaltung beider Gene in einem Anstieg an Neuroblasten und damit in einer verstärkten Neurogenese trotz anhaltender oxidativer Umgebung. Im Einklang mit diesem Befund erhöhte die Ausschaltung von Sirt1 mittels EGFP/shRNA-Konstrukt die Zahl Mash1 positiver Zellen in der SVZ von P2 Tieren. Ebenso resultierte die postnatale Blockade der enzymatischen Aktivität von Sirt1 mit dem Sirt1-Inhibitor Cambinol in einem Anstieg der Mash1-Genexpression in der SVZ (Kap. 4.2.4). In Übereinstimmung mit den *in vitro* Befunden zeigte sich, dass die Regulation des pro-neuronalen Transkriptionsfaktors Mash1 vom intrazellulären Redox-Gleichgewicht abhängig ist. Darüber hinaus scheint auch *in vivo* die oxidative Induktion von Sirt1 für die Suppression von Mash1 verantwortlich zu sein und eine wichtige Rolle in der postnatalen Entwicklung SVZ ansässiger Zellen zu spielen.

Um die bisherigen Erkenntnisse auf ein entzündliches neurodegeneratives Krankheitsmodell zu übertragen, wurde abschließend die Regulation von Sirt1 im Tiermodell der MS untersucht. Es ist bekannt, dass es im Rahmen dieser entzündlichen Autoimmunerkrankung zu einem Anstieg stressinduzierender RSS kommt (Zipp und Aktas, 06), und eine übermäßige Narbenbildung durch reaktive Astroglie ein allgemeines neuropathologisches Phänomen darstellt. Die Krankheitsinduktion erfolgte durch den Transfer encephalitogener Myelin-spezifischer T-Zellen in naive Rezipienten. Histologische Analysen von ZNS-Material zum Zeitpunkt des Krankheitshöhepunkts zeigten eine kaum detektierbare Sirt1-Expression in nicht betroffenen Hirnregionen, während entzündete Regionen, gekennzeichnet durch massive perivaskuläre Infiltrate und stark erhöhter Astroglie, eine deutlich gestiegene Zahl Sirt1 positiver Zellen offenbarte. Hierbei war wiederum eine Beschränkung von Sirt1 auf Zellen mit astrozytärer Morphologie zu

beobachten. Die intranukleare Lokalisation des Sirt1-Signals deutet dabei auf dessen Rolle in der Chromatinmodulation, wodurch es regulatorisch auf die Gentranskription wirkt. Zusätzlich führte die enzymatische Aktivierung von Sirt1 durch Resveratrol zu einem Anstieg astrozytärer Vorläuferzellen innerhalb entzündeter ZNS-Regionen. Aufgrund der unterschiedlichen Rolle von Sirt1 und Mash1 in der neuronalen Entwicklung verwundert es nicht, dass in Regionen mit erhöhter Sirt1 Expression kaum pro-neuronale Genexpression zu finden ist. Dies zeigte sich auch im Rahmen der EAE. In entzündeten Regionen mit erhöhter Sirt1-Expression waren kaum Mash1 positive Zellen detektierbar, während in nicht betroffenen ZNS-Regionen vermehrt Mash1 positive Zellen auftraten (Kap. 4.2.5). Diese Befunde sprechen für eine möglicherweise weitergehende Übertragbarkeit der bisherigen Ergebnisse auf entzündliche Prozesse im ZNS generell. In diesem Zusammenhang kann Sirt1 mit einer übermäßige Bildung astrozytärer Strukturen in Verbindung gebracht werden, während die neuronale Differenzierung unterdrückt wird.

In der Literatur existieren mehrere Hinweise für die wichtige Rolle von Sirt1 innerhalb neurobiologischer Prozesse. Immunhistologische Studien ergaben, dass das ZNS und das Herz Orte einer erhöhten Expression von murinem Sirt1 darstellen. In diesen Orten findet die Sirt1-Expression durchgehend von der Embryogenese bis hin zum Erwachsenenalter statt (Sakamoto et al., 04). Erst kürzlich wurde über die Expression von Sirt1 in Ependymzellen berichtet (Tanno et al., 07). Wie bereits in der Einleitung dargestellt, gehen aus ihnen durch asymmetrische Teilung gliale und neurale Vorläuferzellen hervor. Untersuchungen des murinen Gehirns im Stadium P2 zeigten eine deutliche Sirt1-Expression in der SVZ und entlang des RMS. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich das ZNS noch in der Entwicklung, und es werden fortlaufend neuronale und gliale Strukturen gebildet. Daher konnte ebenfalls eine starke Expression des bHLH-Transkriptionsfaktors Mash 1 in der SVZ und des RMS gefunden werden (Prozorovski et al., 08).

In *Wallerian degenerated slow (wld)*-Mäusen wurde die Überexpression von *wld*-Proteinen, die zu einer verzögerten axonalen Degeneration führen, mit einer erhöhten Aktivität von Sirt1 in Verbindung gebracht: Die Aktivierung von *wld*-Proteinen war dabei für eine erhöhte Biosynthese nuklearem NAD verantwortlich, welches wiederum die Aktivierung der NAD-abhängigen HDAC Sirt1 hervorrief und die axonale Degeneration verlangsamte. Die Modulation der Sirt1-Aktivität mittels Sirtinol und Resveratrol bestätigten diese Beobachtung (Araki et al., 04). Im Einklang mit diesen Ergebnissen zeigte die enzymatische Aktivierung von Sirt1 durch Resveratrol in einem *in vitro* Modell der cerebralen Ischämie ebenfalls eine neuroprotektive Wirkung (Raval et al., 06). Über die Funktion von Sirt1 in neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen ist bislang jedoch wenig

bekannt. Neben der Zellproliferation stellt die Apoptose ebenfalls eine wichtige Komponente in der Kardiogenese und Neurogenese dar (Kuan et al., 00). Durch den anti-apoptotischen Effekt von Sirt1 (Luo et al., 01); (Vaziri et al., 01) scheint dieser HDAC eine wichtige Rolle in der Organentwicklung zuzukommen (Sakamoto et al., 04). Dafür spricht unter anderem die Letalität der Sirt1 defizienten Mäuse. Unabhängige Arbeitsgruppen berichteten in diesem Zusammenhang von auffälligen neuropathologischen Phänotyp dieser Mäuse, der sich in einer ausgeprägten Enzephalie (McBurney et al., 03) und gestörter morphologischer Entwicklung der Retina äußerte (Cheng et al., 03).

Mash1 gehört zu einem der wichtigsten pro-neuronalen Genen der Embryonalentwicklung, wo es für die Entwicklung neuronaler Vorläuferzellen verantwortlich ist (Casarosa et al., 99). Es konnte jedoch auch eine Expression von Mash1 in der postnatalen SVZ bis hin zum adulten Stadium festgestellt werden, wodurch die SVZ wahrscheinlich über die gesamte Lebensphase Vorläuferzellen produzieren kann, die schließlich zu neuronalen und glialen Zellstrukturen ausreifen können (Parras et al., 04). Anhaltspunkte für die essentielle Rolle von Mash1 innerhalb der neuronalen Differenzierung stammen aus Untersuchungen der Mash defizienten Maus. Hier zeigte sich, dass multipotente Stammzellen in neurale Vorläuferzellen differenzieren können, aber ihre weitere Spezifikation in ausgereifte Neurone unterbunden ist. Weiterreichende Untersuchungen konnten aufgrund der Letalität nicht angestellt werden (Guillemot et al., 93); (Sommer et al., 95); (Blaugrund et al., 96). Wie bereits zu Beginn dieser Arbeit erläutert, besitzt Hes1 eine antagonisierende Wirkung auf die Mash1-Transkription sowie dessen Aktivität (Kap. 1.7) und wirkt daher als Repressor auf die neuronale Differenzierung. Die Hes1-Expression beschränkt sich während des Entwicklungsstadiums des ZNS auf SVZ ansässige Stammzellen, wobei die Expression während des Differenzierungsprozesses abnimmt und ausgereifte Neurone eine Hes1-Defizienz aufweisen. Die Überexpression von Hes1 unterbindet dabei die Migration NVZ aus der SVZ wie auch deren Differenzierung zu Neuronen (Ishibashi et al., 94). Hes1 defiziente Mäuse zeigen hingegen schon während der Embryogenese eine ausgeprägte Anecephalie. Dabei wird die unterbliebene Schließung des Neuralrohrs durch eine überschießende neuronale Differenzierung in unreife Neurone erklärt. Durch die Unterdrückung einer vorzeitigen neuronalen Differenzierung ist Hes1 somit für die Regulation der Hirnmorphogenese verantwortlich (Ishibashi et al., 95); (Tomita et al., 96). Die im vorangegangenen Abschnitt diskutierte Bindung von Sirt1 an den Hes1-Repressor offenbart die unterschiedliche Rolle von Sirt1 und Mash1 in der Festlegung und Differenzierung von NVZ. Gestützt wird diese

Vermutung durch immunhistologische Expressionsanalysen im postnatalen Gehirn. Trotz zahlreicher Sirt1 und Mash1 positiver Zellen im Bereich der SVZ und des RMS konnten kaum Mash1 und Sirt1 doppelpositive Zellen gefunden werden (Prozorovski et al., 08).

Unter neuroinflammatorischen Bedingungen wurde gezeigt, dass NVZ aktiviert werden und zu Orten mit ausgeprägten Entzündungserscheinungen wandern, wo sie schließlich ausdifferenzieren (Brundin et al., 03); (Picard-Riera et al., 02). Im Tiermodell der MS, der EAE, wurden NVZ in typischen EAE-Läsionen gefunden, wo sie hauptsächlich zu Oligodendrozyten und Astrozyten ausdifferenzierten (Picard-Riera et al., 02). Von einer Verschiebung des Differenzierungsgleichgewichts NVZ zugunsten der glialen Zelllinie wurde ebenfalls im Zusammenhang von Hirnverletzungen berichtet (Holmin et al., 97); (Weinstein et al., 96). Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass entzündliche Prozesse im ZNS inhibierend auf die Neurogenese wirken (Monje et al., 02); (Monje et al., 03). Dieses Phänomen wurde besonders durch eine entzündliche Mikrogliaaktivierung vermittelt, wie es in einer Vielzahl neuroinflammatorischer Erkrankungen der Fall ist (Ekdahl et al., 03), (Monje et al., 02).

Die Entdeckung neuraler Stamm- und Vorläuferzellen im adulten humanen Gehirn eröffnet prinzipiell völlig neue Behandlungsmöglichkeiten im Rahmen entzündlicher neurodegenerativer Erkrankungen. Die therapeutische Modulation endogener Stammzeleigenschaften wie Proliferation und Differenzierung könnten helfen, beschädigte und verloren gegangene neuronale Strukturen zu regenerieren, wie es bereits im Tiermodell der Huntingtonschen Erkrankung gelungen ist (Chmielnicki et al., 04); (Cho et al., 07). Gleichmaßen besitzt die Mobilisierung glialer Vorläuferzellen eine bedeutende Rolle in Remyelinisierungsprozessen innerhalb demyelinisierender Erkrankungen wie beispielsweise der MS (Keyoung und Goldman, 07). Die therapeutische Einwirkung auf die fehlgeleitete Differenzierung von adulten neuralen Stammzellen, die ubiquitär im ZNS anzutreffen sind (McKay, 97) und zum quantitativen Überwiegen von Astrozyten führen, spielt jedoch in allen neuroinflammatorischen Erkrankungen eine große Rolle. Die Modulation dieser Vorläuferzellen könnte dabei helfen, die reaktive Astroglie zu unterdrücken, damit die gliale Narbenbildung zu minimieren und die endogenen Regenerationsprozesse zu fördern. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse weisen auf einen Mechanismus hin, der für die fehlgeleitete Differenzierung neuraler Stammzellen verantwortlich ist und dazu führt, dass anstelle von Neuronen vornehmlich Astrozyten entstehen. Dieses veränderte Differenzierungsvermögen ließ sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* experimentell nachvollziehen und zeigt, dass die HDAC Sirt1 in neuralen Stammzellen als Sensor für das Redox-Potenzial dient. Schon durch geringe metabolische Schwankungen, die zu einem Anstieg RSS innerhalb der Zelle führen, kommt es innerhalb

des Mash1-Promotors zu einer Assoziation von Sirt1 an den bHLH Transkriptionsfaktoren Hes1. Die HDAC-Aktivität von Sirt1 führt zur Deacetylierung von Histon H3, bzw. dessen Lysinrest H3K9, wodurch eine Modulation der Chromatinstruktur hervorgerufen wird, die zur Inhibierung des neuronalen Transkriptionsfaktors Mash1 beiträgt. Durch Inhibierung der pro-neuronalen Gentranskription wird die Differenzierung der Stammzellen zugunsten der astrozytären Differenzierung beeinflusst (Abb. 40:). Die Aufklärung dieses molekularen Mechanismus stellt somit eine neue therapeutische Interventionsmöglichkeit dar, um intrinsische Regenerationsprozesse nach Schädigung des ZNS zu stärken.

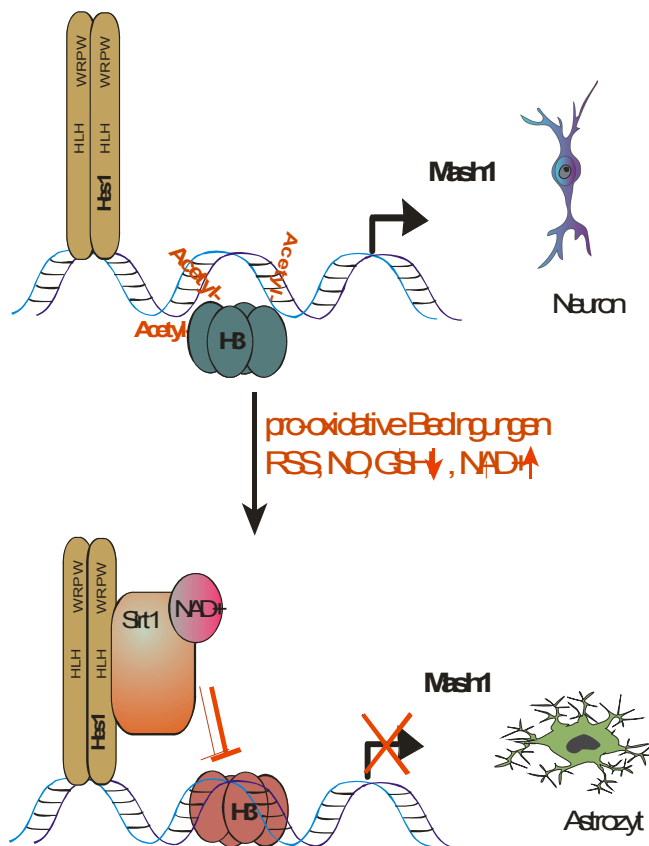


Abb. 40: Schematische Präsentation der Verknüpfung von Sirt1, Hes1 und Mash1 unter pro-oxidativen Milieu. Unter pro-oxidativen Bedingungen kommt es innerhalb des Mash1-Promotors zur Anlagerung von Sirt1 an den bHLH-Transkriptionsfaktor Hes1. Die Deacetylierung spezifischer Histonreste führt zur Konformationsänderung des Chromatins, wodurch die Mash1-Genexpression inhibiert wird.

6 Zusammenfassung

Schädigungen im zentralen Nervensystem treten nicht nur bei der Multiplen Sklerose (MS), sondern auch bei einer Vielzahl weiterer entzündlicher Schadensparadigmen auf. Allgemeines Kennzeichen dieser primär wie auch sekundär entzündlichen neurodegenerativen Erkrankungen ist das Auftreten von oxidativem Stress in Verbindung mit einer eingeschränkten Regeneration von Nervenzellen und einem übermäßiges Auftreten von Astrozyten. Allerdings ist bislang nicht bekannt, welche Faktoren für eine frühe neuronale Schädigung verantwortlich sind, und welche Faktoren zu einem übermäßigen Auftreten von Astrozyten beitragen. Vorarbeiten belegten, dass Apoptose-regulierende Systeme, wie z.B. der TRAIL-Signalweg, sowohl an der Immunregulation als auch an Schädigungsprozessen im Gehirn beteiligt sein können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine auf das ZNS beschränkte Blockade des TRAIL-Signalwegs in der EAE, dem Tiermodell der MS, zu einer signifikanten Verminderung des Erkrankungsgrades führte. Darüber hinaus wurde eine reduzierte Enzephalitogenität von TRAIL-defiziente Myelin-spezifischen Lymphozyten belegt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der TRAIL-vermittelte Schädigungsmechanismus die Pathogenese der Neuroinflammation entscheidend mitbestimmt und die immunregulatorische Wirkung eine eher untergeordnete Rolle spielt. Dagegen stellte sich im Tiermodell der bakteriellen Meningitis heraus, dass TRAIL hier eine anti-inflammatorische Rolle im ZNS spielt, die vor allem durch eine TRAIL-R-abhängige apoptotische Minderung der Entzündungsreaktion vermittelt wird. Eine Beeinflussung der Migration von Effektorzellen durch TRAIL konnte in diesem Modell ausgeschlossen werden. Anscheinend hängt die therapeutische Modulation des TRAIL-Systems entscheidend von der jeweils zu Grunde liegenden Ätiopathogenese ab und kann nicht allgemein auf entzündliche ZNS-Erkrankungen übertragen werden.

Als mögliche Ursache für eine verminderte Regenerationsfähigkeit endogener Stammzellen konnte hier ein endogener Mechanismus aufgedeckt werden, der als Antwort auf oxidativen Stress zu einem quantitativen Überwiegen von Astrozyten führt. Dabei zeigte sich, dass nicht toxische oxidative Bedingungen das Proliferationsvermögen von neuronalen Stammzellen deutlich hemmten und dazu führten, dass anstelle von Neuronen vornehmlich Astrozyten entstehen. Dieses veränderte Differenzierungsvermögen ließ sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* experimentell nachvollziehen und wies darauf hin, dass durch milde Entzündungsprozesse hervorgerufene basale metabolische Veränderungen die neuronale und astrogliale Entwicklung aus neuronalen Stammzellen reziprok reguliert wird. In weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, dass die Histondeacetylase Sirt1 in

neuronalen Stammzellen als Sensor für das Redox-Potenzial dient. Schon geringe metabolische Änderungen induzierten die Bindung an den bHLH-Transkriptionsfaktor Hes1, die zu einer direkten Modulation des pro-neuronalen Transkriptionsfaktors Mash1 führten und die Differenzierung von neuronalen Stammzellen zugunsten der astroglialen Entwicklung beeinflussten. Die Aufklärung dieses Mechanismus könnte somit zukünftig helfen, intrinsische Regenerationsprozesse nach Schädigung des ZNS zu verstärken und damit neue therapeutische Perspektiven bei neurologischen Erkrankungen zu öffnen.

Literaturverzeichnis

- Adachi, M.; Watanabe-Fukunaga, R. und Nagata, S. (1993): Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 90), Nr. 5, Seite 1756-1760. URL: PM:7680478
- Akazawa, C.; Sasai, Y.; Nakanishi, S. und Kageyama, R. (1992): Molecular characterization of a rat negative regulator with a basic helix-loop-helix structure predominantly expressed in the developing nervous system, *J.Biol.Chem.* (Band 267), Nr. 30, Seite 21879-21885. URL: PM:1400497
- Aktas, O.; Prozorovski, T. und Zipp, F. (2006): Death ligands and autoimmune demyelination, *Neuroscientist* (Band 12), Seite 305-316.
- Aktas, O.; Smorodchenko, A.; Brocke, S.; Infante-Duarte, C.; Topphoff, U. S.; Vogt, J.; Prozorovski, T.; Meier, S.; Osmanova, V.; Pohl, E.; Bechmann, I.; Nitsch, R. und Zipp, F. (2005): Neuronal Damage in Autoimmune Neuroinflammation Mediated by the Death Ligand TRAIL, *Neuron* (Band 46), Nr. 3, Seite 421-432. URL: PM:15882642
- Aktas, O.; Waiczies, S.; Smorodchenko, A.; Dorr, J.; Seeger, B.; Prozorovski, T.; Sallach, S.; Endres, M.; Brocke, S.; Nitsch, R. und Zipp, F. (2003): Treatment of relapsing paralysis in experimental encephalomyelitis by targeting Th1 cells through atorvastatin, *Journal of Experimental Medicine* (Band 197), Nr. 6, Seite 725-733. URL: PM:12629065
- Alam, Z. I.; Daniel, S. E.; Lees, A. J.; Marsden, D. C.; Jenner, P. und Halliwell, B. (1997): A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease, *J.Neurochem.* (Band 69), Nr. 3, Seite 1326-1329. URL: PM:9282961
- Allen, T. und Lobe, C. G. (1999): A comparison of Notch, Hes and Grg expression during murine embryonic and post-natal development, *Cell Mol.Biol.(Noisy-le-grand)* (Band 45), Nr. 5, Seite 687-708. URL: PM:10512199
- ALLFREY, V. G.; FAULKNER, R. und MIRSKY, A. E. (1964): ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 51), Seite 786-794. URL: PM:14172992
- Altman, J. und Das, G. D. (1965): Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats, *J.Comp Neurol* (Band 124), Nr. 3, Seite 319-335. URL: PM:5861717
- Alvarez-Buylla, A.; Garcia-Verdugo, J. M. und Tramontin, A. D. (2001): A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells, *Nat.Rev.Neurosci.* (Band 2), Nr. 4, Seite 287-293. URL: PM:11283751
- Alvarez-Buylla, A. und Lim, D. A. (2004): For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain, *Neuron* (Band 41), Nr. 5, Seite 683-686. URL: PM:15003168
- Angelov, D.; Vitolo, J. M.; Mutskov, V.; Dimitrov, S. und Hayes, J. J. (2001): Preferential interaction of the core histone tail domains with linker DNA, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 98), Nr. 12, Seite 6599-6604. URL: PM:11381129
- Araki, T.; Sasaki, Y. und Milbrandt, J. (2004): Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration, *Science* (Band 305), Nr. 5686, Seite 1010-1013. URL: PM:15310905
- Ashkenazi, A. und Dixit, V. M. (1999): Apoptosis control by death and decoy receptors, *Curr.Opin.Cell Biol.* (Band 11), Seite 255-260.
- Ashkenazi, A.; Pai, R. C.; Fong, S.; Leung, S.; Lawrence, D. A.; Marsters, S. A.; Blackie, C.; Chang, L.; McMurtrey, A. E.; Hebert, A.; DeForge, L.; Koumenis, I. L.; Lewis, D.; Harris, L.; Bussiere, J.; Koeppen, H.; Shahrokh, Z. und Schwall, R. H. (1999): Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand, *J.Clin.Invest* (Band 104), Nr. 2, Seite 155-162. URL: PM:10411544
- Bechmann, I. (2005): Failed central nervous system regeneration: a downside of immune privilege?, *Neuromolecular.Med.* (Band 7), Nr. 3, Seite 217-228. URL: PM:16247182
- Bechmann, I.; Galea, I. und Perry, V. H. (2007): What is the blood-brain barrier (not)?, *Trends in Immunology* (Band 28), Nr. 1, Seite 5-11. URL: PM:17140851

Bechmann, I.; Mor, G.; Nilsen, J.; Eliza, M.; Nitsch, R. und Naftolin, F. (1999): FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier, *Glia* (Band 27), Seite 62-74.

Bertrand, N.; Castro, D. S. und Guillemot, F. (2002): Proneural genes and the specification of neural cell types, *Nat.Rev.Neurosci* (Band 3), Nr. 7, Seite 517-530. URL: PM:12094208

Bianchi-Frias, D.; Orian, A.; Delrow, J. J.; Vazquez, J.; Rosales-Nieves, A. E. und Parkhurst, S. M. (2004): Hairy transcriptional repression targets and cofactor recruitment in *Drosophila*, *PLoS.Biol.* (Band 2), Nr. 7, Seite E178. URL: PM:15252443

Binda, O.; Nassif, C. und Branton, P. E. (2008): SIRT1 negatively regulates HDAC1-dependent transcriptional repression by the RBP1 family of proteins, *Oncogene*. URL: PM:18193082

Bitsch, A.; Schuchardt, J.; Bunkowski, S.; Kuhlmann, T. und Brück, W. (2000): Acute axonal injury in multiple sclerosis: correlation with demyelination and inflammation, *Brain* (Band 123), Seite 1174-1183.

Bjartmar, C.; Kidd, G.; Mork, S.; Rudick, R. und Trapp, B. D. (2000): Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients, *Ann.Neurol.* (Band 48), Nr. 6, Seite 893-901. URL: PM:11117546

Bjartmar, C.; Kinkel, R. P.; Kidd, G.; Rudick, R. A. und Trapp, B. D. (2001): Axonal loss in normal-appearing white matter in a patient with acute MS, *Neurology* (Band 57), Nr. 7, Seite 1248-1252. URL: PM:11591844

Blander, G. und Guarente, L. (2004): The Sir2 family of protein deacetylases, *Annu.Rev.Biochem.* (Band 73), Seite 417-435. URL: PM:15189148

Blaugrund, E.; Pham, T. D.; Tennyson, V. M.; Lo, L.; Sommer, L.; Anderson, D. J. und Gershon, M. D. (1996): Distinct subpopulations of enteric neuronal progenitors defined by time of development, sympathoadrenal lineage markers and Mash-1-dependence, *Development* (Band 122), Nr. 1, Seite 309-320. URL: PM:8565843

Bordone, L.; Motta, M. C.; Picard, F.; Robinson, A.; Jhala, U. S.; Apfeld, J.; McDonagh, T.; Lemieux, M.; McBurney, M.; Szilvasi, A.; Easlson, E. J.; Lin, S. J. und Guarente, L. (2006): Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells, *PLoS.Biol.* (Band 4), Nr. 2, Seite e31. URL: PM:16366736

Bradbury, E. M. (1992): Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle, *Bioessays* (Band 14), Nr. 1, Seite 9-16. URL: PM:1312335

Brown, G. C. (2007): Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase, *Biochem.Soc.Trans.* (Band 35), Nr. Pt 5, Seite 1119-1121. URL: PM:17956292

Brundin, L.; Brismar, H.; Danilov, A. I.; Olsson, T. und Johansson, C. B. (2003): Neural stem cells: a potential source for remyelination in neuroinflammatory disease, *Brain Pathology* (Band 13), Nr. 3, Seite 322-328. URL: PM:12946021

Brunet, A.; Sweeney, L. B.; Sturgill, J. F.; Chua, K. F.; Greer, P. L.; Lin, Y.; Tran, H.; Ross, S. E.; Mostoslavsky, R.; Cohen, H. Y.; Hu, L. S.; Cheng, H. L.; Jedrychowski, M. P.; Gygi, S. P.; Sinclair, D. A.; Alt, F. W. und Greenberg, M. E. (2004): Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase, *Science* (Band 303), Nr. 5666, Seite 2011-2015. URL: PM:14976264

Butcher, E. C. und Picker, L. J. (1996): Lymphocyte homing and homeostasis, *Science* (Band 272), Nr. 5258, Seite 60-66. URL: PM:8600538

Butterfield, D. A. und Boyd-Kimball, D. (2004): Amyloid beta-peptide(1-42) contributes to the oxidative stress and neurodegeneration found in Alzheimer disease brain, *Brain Pathology* (Band 14), Nr. 4, Seite 426-432. URL: PM:15605990

Carleton, A.; Petreanu, L. T.; Lansford, R.; varez-Buylla, A. und Lledo, P. M. (2003): Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb, *Nat.Neurosci.* (Band 6), Nr. 5, Seite 507-518. URL: PM:12704391

Casarosa, S.; Fode, C. und Guillemot, F. (1999): Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon, *Development* (Band 126), Nr. 3, Seite 525-534. URL: PM:9876181

Charcot, M. (1868): Histologie de la sclérose en plaques, *Gazette des Hôpitaux* (Band 141), Seite 554-555.

Chen, H.; Thiagalingam, A.; Chopra, H.; Borges, M. W.; Feder, J. N.; Nelkin, B. D.; Baylin, S. B. und Ball, D. W. (1997): Conservation of the Drosophila lateral inhibition pathway in human lung cancer: a hairy-related protein (HES-1) directly represses achaete-scute homolog-1 expression, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 94), Nr. 10, Seite 5355-5360. URL: PM:9144241

Cheng, A.; Chan, S. L.; Milhavet, O.; Wang, S. und Mattson, M. P. (2001): p38 MAP kinase mediates nitric oxide-induced apoptosis of neural progenitor cells, *J.Biol.Chem.* (Band 276), Nr. 46, Seite 43320-43327. URL: PM:11555660

Cheng, H. L.; Mostoslavsky, R.; Saito, S.; Manis, J. P.; Gu, Y.; Patel, P.; Bronson, R.; Appella, E.; Alt, F. W. und Chua, K. F. (2003): Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 100), Nr. 19, Seite 10794-10799. URL: PM:12960381

Chmielnicki, E.; Benraiss, A.; Economides, A. N. und Goldman, S. A. (2004): Adenovirally expressed noggin and brain-derived neurotrophic factor cooperate to induce new medium spiny neurons from resident progenitor cells in the adult striatal ventricular zone, *Journal of Neuroscience* (Band 24), Nr. 9, Seite 2133-2142. URL: PM:14999064

Cho, S. R.; Benraiss, A.; Chmielnicki, E.; Samdani, A.; Economides, A. und Goldman, S. A. (2007): Induction of neostriatal neurogenesis slows disease progression in a transgenic murine model of Huntington disease, *J.Clin.Invest* (Band 117), Nr. 10, Seite 2889-2902. URL: PM:17885687

Choi, K.; Song, S. und Choi, C. (2008): Requirement of caspases and p38 MAPK for TRAIL-mediated ICAM-1 expression by human astroglial cells, *Immunol.Lett.* (Band 117), Nr. 2, Seite 168-173. URL: PM:18339430

Chua, K. F.; Mostoslavsky, R.; Lombard, D. B.; Pang, W. W.; Saito, S.; Franco, S.; Kaushal, D.; Cheng, H. L.; Fischer, M. R.; Stokes, N.; Murphy, M. M.; Appella, E. und Alt, F. W. (2005): Mammalian SIRT1 limits replicative life span in response to chronic genotoxic stress, *Cell Metab* (Band 2), Nr. 1, Seite 67-76. URL: PM:16054100

Covacu, R.; Danilov, A. I.; Rasmussen, B. S.; Hallen, K.; Moe, M. C.; Lobell, A.; Johansson, C. B.; Svensson, M. A.; Olsson, T. und Brundin, L. (2006): Nitric oxide exposure diverts neural stem cell fate from neurogenesis towards astroglialogenesis, *Stem Cells* (Band 24), Nr. 12, Seite 2792-2800. URL: PM:16916924

Craig, C. G.; Tropepe, V.; Morshead, C. M.; Reynolds, B. A.; Weiss, S. und van der, Kooy D. (1996): In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain, *Journal of Neuroscience* (Band 16), Nr. 8, Seite 2649-2658. URL: PM:8786441

Cretney, E.; Takeda, K.; Yagita, H.; Glaccum, M. B.; Peschon, J. J. und Smyth, M. J. (2002): Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice, *J.Immunol.* (Band 168), Seite 1356-1361.

D'Erasmus, E.; Acca, M.; Medici, F. und Pisani, D. (1993): Clinical aspects of early increase in serum gamma-glutamyl transferase in cerebral infarction, *Biomed.Pharmacother.* (Band 47), Nr. 2-3, Seite 89-92. URL: PM:8105994

D'Souza, S. D.; Bonetti, B.; Balasingam, V.; Cashman, N. R.; Barker, P. A.; Troutt, A. B.; Raine, C. S. und Antel, J. P. (1996): Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death, *Journal of Experimental Medicine* (Band 184), Nr. 6, Seite 2361-2370. URL: PM:8976190

Dauer, W. und Przedborski, S. (2003): Parkinson's disease: mechanisms and models, *Neuron* (Band 39), Nr. 6, Seite 889-909. URL: PM:12971891

Davie, J. R. und Delcuve, G. P. (1991): Characterization and chromatin distribution of the H1 histones and high-mobility-group non-histone chromosomal proteins of trout liver and hepatocellular carcinoma, *Biochem.J.* (Band 280 (Pt 2)), Seite 491-497. URL: PM:1747124

Degli-Esposti, M. A.; Dougall, W. C.; Smolak, P. J.; Waugh, J. Y.; Smith, C. A. und Goodwin, R. (1997a): The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain, *Immunity* (Band 7), Seite 813-820.

Degli-Esposti, M. A.; Smolak, P. J.; Walczak, H.; Waugh, J. Y.; Huang, C. P.; DuBose, R. F.; Goodwin, R. und Smith, C. A. (1997b): Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family, *Journal of Experimental Medicine* (Band 186), Seite 1165-1170.

- Dexter, D. T.; Carter, C. J.; Wells, F. R.; Javoy-Agid, F.; Agid, Y.; Lees, A.; Jenner, P. und Marsden, C. D. (1989): Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease, *J.Neurochem.* (Band 52), Nr. 2, Seite 381-389. URL: PM:2911023
- Dexter, D. T.; Holley, A. E.; Flitter, W. D.; Slater, T. F.; Wells, F. R.; Daniel, S. E.; Lees, A. J.; Jenner, P. und Marsden, C. D. (1994): Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: an HPLC and ESR study, *Mov Disord.* (Band 9), Nr. 1, Seite 92-97. URL: PM:8139611
- Diestel, A.; Aktas, O.; Hackel, D.; Hake, I.; Meier, S.; Raine, C. S.; Nitsch, R.; Zipp, F. und Ullrich, O. (2003): Activation of microglial poly(ADP-ribose)-polymerase-1 by cholesterol breakdown products during neuroinflammation: a link between demyelination and neuronal damage, *Journal of Experimental Medicine* (Band 198), Nr. 11, Seite 1729-1740. URL: PM:14657223
- Doetsch, F.; Caille, I.; Lim, D. A.; Garcia-Verdugo, J. M. und varez-Buylla, A. (1999): Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain, *Cell* (Band 97), Nr. 6, Seite 703-716. URL: PM:10380923
- Doetsch, F.; Garcia-Verdugo, J. M. und varez-Buylla, A. (1997): Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain, *Journal of Neuroscience* (Band 17), Nr. 13, Seite 5046-5061. URL: PM:9185542
- Dörr, J.; Bechmann, I.; Waiczies, S.; Aktas, O.; Walczak, H.; Krammer, P. H.; Nitsch, R. und Zipp, F. (2002a): Lack of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand but presence of its receptors in the human brain, *Journal of Neuroscience* (Band 22), Nr. 4, Seite RC209. URL: PM:11844843
- Dörr, J.; Waiczies, S.; Wendling, U.; Seeger, B. und Zipp, F. (2002b): Induction of TRAIL-mediated glioma cell death by human T cells, *Journal of Neuroimmunology* (Band 122), Seite 117-124.
- Dowling, P.; Shang, G.; Raval, S.; Menonna, J.; Cook, S. und Husar, W. (1996): Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in multiple sclerosis brain, *Journal of Experimental Medicine* (Band 184), Seite 1513-1518.
- Ehrlich, S.; Infante-Duarte, C.; Seeger, B. und Zipp, F. (2003): Regulation of soluble and surface-bound TRAIL in human T cells, B cells, and monocytes, *Cytokine* (Band 24), Nr. 6, Seite 244-253. URL: PM:14609566
- Ekdahl, C. T.; Claasen, J. H.; Bonde, S.; Kokaia, Z. und Lindvall, O. (2003): Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 100), Nr. 23, Seite 13632-13637. URL: PM:14581618
- Emery, J. G.; McDonnell, P.; Burke, M. B.; Deen, K. C.; Lyn, S.; Silverman, C.; Dul, E.; Appelbaum, E. R.; Eichman, C.; DiPrinzio, R.; Dodds, R. A.; James, I. E.; Rosenberg, M.; Lee, J. C. und Young, P. R. (1998): Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL, *J.Biol.Chem.* (Band 273), Seite 14363-14367.
- Emsley, J. G.; Mitchell, B. D.; Kempermann, G. und Macklis, J. D. (2005): Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells, *Prog.Neurobiol.* (Band 75), Nr. 5, Seite 321-341. URL: PM:15913880
- Ernst, J. D.; Decazes, J. M. und Sande, M. A. (1983): Experimental pneumococcal meningitis: role of leukocytes in pathogenesis, *Infect.Immun.* (Band 41), Nr. 1, Seite 275-279. URL: PM:6862627
- Ferguson, B.; Matyszak, M. K.; Esiri, M. M. und Perry, V. H. (1997): Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions, *Brain* (Band 120), Seite 393-399.
- Flügel, A.; Berkowicz, T.; Ritter, T.; Labeur, M.; Jenne, D. E.; Li, Z.; Ellwart, J. W.; Willem, M.; Lassmann, H. und Wekerle, H. (2001): Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis, *Immunity* (Band 14), Nr. 5, Seite 547-560. URL: PM:11371357
- Flügel, A.; Schwaiger, F. W.; Neumann, H.; Medana, I.; Willem, M.; Wekerle, H.; Kreutzberg, G. W. und Graeber, M. B. (2000): Neuronal FasL induces cell death of encephalitogenic T lymphocytes, *Brain Pathology* (Band 10), Nr. 3, Seite 353-364. URL: PM:10885654
- Flügel, A.; Schwaiger, F. W.; Neumann, H.; Medana, I.; Willem, M.; Wekerle, H.; Kreutzberg, G. W. und Graeber, M. B. (2000): Neuronal FasL induces cell death of encephalitogenic T lymphocytes, *Brain Pathology* (Band 10), Nr. 3, Seite 353-364. URL: PM:10885654

- Fowlkes, B. J.; Schwartz, R. H. und Pardoll, D. M. (1988): Deletion of self-reactive thymocytes occurs at a CD4+8+ precursor stage, *Nature* (Band 334), Nr. 6183, Seite 620-623. URL: PM:3261392
- Frank, S.; Kohler, U.; Schackert, G. und Schackert, H. K. (1999): Expression of TRAIL and its receptors in human brain tumors, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* (Band 257), Nr. 2, Seite 454-459. URL: PM:10198234
- Frohman, E. M.; Racke, M. K. und Raine, C. S. (2006): Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis, *New England Journal of Medicine* (Band 354), Nr. 9, Seite 942-955. URL: PM:16510748
- Fukuda, S.; Kondo, T.; Takebayashi, H. und Taga, T. (2004): Negative regulatory effect of an oligodendrocytic bHLH factor OLIG2 on the astrocytic differentiation pathway, *Cell Death.Differ.* (Band 11), Nr. 2, Seite 196-202. URL: PM:14576772
- Fukuda, S. und Taga, T. (2005): Cell fate determination regulated by a transcriptional signal network in the developing mouse brain, *Anat.Sci.Int.* (Band 80), Nr. 1, Seite 12-18. URL: PM:15794126
- Fulco, M.; Schiltz, R. L.; Iezzi, S.; King, M. T.; Zhao, P.; Kashiwaya, Y.; Hoffman, E.; Veech, R. L. und Sartorelli, V. (2003): Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state, *Mol.Cell* (Band 12), Nr. 1, Seite 51-62. URL: PM:12887892
- Fulda, S.; Wick, W.; Weller, M. und Debatin, K.-M. (2002): Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo, *Nat.Med.* (Band 8), Seite 808-815.
- Furuyama, T.; Banerjee, R.; Breen, T. R. und Harte, P. J. (2004): SIR2 is required for polycomb silencing and is associated with an E(Z) histone methyltransferase complex, *Curr.Biol.* (Band 14), Nr. 20, Seite 1812-1821. URL: PM:15498488
- Gage, F. H.; Ray, J. und Fisher, L. J. (1995): Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS, *Annu.Rev.Neurosci.* (Band 18), Seite 159-192. URL: PM:7605059
- Genc, S.; Kizildag, S.; Genc, K.; Ates, H. und Atabey, N. (2003): Interferon gamma and lipopolysaccharide upregulate TNF-related apoptosis-inducing ligand expression in murine microglia, *Immunol.Lett.* (Band 85), Nr. 3, Seite 271-274. URL: PM:12663142
- Giuliani, F.; Goodyer, C. G.; Antel, J. P. und Yong, V. W. (2003): Vulnerability of human neurons to T cell-mediated cytotoxicity, *J.Immunol.* (Band 171), Nr. 1, Seite 368-379. URL: PM:12817020
- Grbavec, D. und Stifani, S. (1996): Molecular interaction between TLE1 and the carboxyl-terminal domain of HES-1 containing the WRPW motif, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* (Band 223), Nr. 3, Seite 701-705. URL: PM:8687460
- Greter, M.; Heppner, F. L.; Lemos, M. P.; Odermatt, B. M.; Goebels, N.; Laufer, T.; Noelle, R. J. und Becher, B. (2005): Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis, *Nat.Med.* (Band 11), Nr. 3, Seite 328-334. URL: PM:15735653
- Griffith, O. W. und Meister, A. (1979): Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine), *J.Biol.Chem.* (Band 254), Nr. 16, Seite 7558-7560. URL: PM:38242
- Gritti, A.; Parati, E. A.; Cova, L.; Frolichsthal, P.; Galli, R.; Wanke, E.; Faravelli, L.; Morassutti, D. J.; Roisen, F.; Nickel, D. D. und Vescovi, A. L. (1996): Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor, *Journal of Neuroscience* (Band 16), Nr. 3, Seite 1091-1100. URL: PM:8558238
- Grozinger, C. M. und Schreiber, S. L. (2002): Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors, *Chem.Biol.* (Band 9), Nr. 1, Seite 3-16. URL: PM:11841934
- Grunstein, M. (1997): Histone acetylation in chromatin structure and transcription, *Nature* (Band 389), Nr. 6649, Seite 349-352. URL: PM:9311776
- Guillemot, F.; Lo, L. C.; Johnson, J. E.; Auerbach, A.; Anderson, D. J. und Joyner, A. L. (1993): Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons, *Cell* (Band 75), Nr. 3, Seite 463-476. URL: PM:8221886
- Halliwell, B. (1999): Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning), *Free Radic.Res.* (Band 31), Nr. 4, Seite 261-272. URL: PM:10517532

- Halliwell, B. (2001): Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment, *Drugs Aging* (Band 18), Nr. 9, Seite 685-716. URL: PM:11599635
- Hatakeyama, J.; Bessho, Y.; Katoh, K.; Ookawara, S.; Fujioka, M.; Guillemot, F. und Kageyama, R. (2004): Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation, *Development* (Band 131), Nr. 22, Seite 5539-5550. URL: PM:15496443
- Hempel, S. L.; Buettner, G. R.; O'Malley, Y. Q.; Wessels, D. A. und Flaherty, D. M. (1999): Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123, *Free Radic.Biol.Med.* (Band 27), Nr. 1-2, Seite 146-159. URL: PM:10443931
- Heppner, F. L.; Greter, M.; Marino, D.; Falsig, J.; Raivich, G.; Hovelmeyer, N.; Waisman, A.; Rulicke, T.; Prinz, M.; Priller, J.; Becher, B. und Aguzzi, A. (2005): Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis, *Nat.Med.* (Band 11), Nr. 2, Seite 146-152. URL: PM:15665833
- Hilliard, B.; Wilmen, A.; Seidel, C.; Liu, T.-S. L.; Göke, R. und Chen, Y (2001): Roles of TNF-related apoptosis-inducing ligand in experimental autoimmune encephalomyelitis, *J.Immunol.* (Band 166), Seite 1314-1319.
- Hirata, H.; Ohtsuka, T.; Bessho, Y. und Kageyama, R. (2000): Generation of structurally and functionally distinct factors from the basic helix-loop-helix gene Hes3 by alternative first exons, *J.Biol.Chem.* (Band 275), Nr. 25, Seite 19083-19089. URL: PM:10858455
- Hoffmann, O.; Priller, J.; Prozorovski, T.; Schulze-Topphoff, U.; Baeva, N.; Lunemann, J. D.; Aktas, O.; Mahrhofer, C.; Stricker, S.; Zipp, F. und Weber, J. R. (2007): TRAIL limits excessive host immune responses in bacterial meningitis, *J.Clin.Invest* (Band 117), Nr. 7, Seite 2004-2013. URL: PM:17571163
- Hohlfeld, R. und Wekerle, H. (2004): Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: From pipe dreams to (therapeutic) pipelines, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* (Band 101 Suppl 2), Seite 14599-14606. URL: PM:15306684
- Holmin, S.; Almqvist, P.; Lendahl, U. und Mathiesen, T. (1997): Adult nestin-expressing subependymal cells differentiate to astrocytes in response to brain injury, *Eur.J.Neurosci.* (Band 9), Nr. 1, Seite 65-75. URL: PM:9042570
- Imai, S.; Armstrong, C. M.; Kaeberlein, M. und Guarente, L. (2000): Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase, *Nature* (Band 403), Nr. 6771, Seite 795-800. URL: PM:10693811
- Ishibashi, M.; Ang, S. L.; Shiota, K.; Nakanishi, S.; Kageyama, R. und Guillemot, F. (1995): Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects, *Genes Dev.* (Band 9), Nr. 24, Seite 3136-3148. URL: PM:8543157
- Ishibashi, M.; Moriyoshi, K.; Sasai, Y.; Shiota, K.; Nakanishi, S. und Kageyama, R. (1994): Persistent expression of helix-loop-helix factor HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system, *EMBO J.* (Band 13), Nr. 8, Seite 1799-1805. URL: PM:7909512
- Itoh, N. und Nagata, S. (1993): A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen, *J.Biol.Chem.* (Band 268), Seite 10932-10937.
- Jackson, M. D.; Schmidt, M. T.; Oppenheimer, N. J. und Denu, J. M. (2003): Mechanism of nicotinamide inhibition and transglycosidation by Sir2 histone/protein deacetylases, *J.Biol.Chem.* (Band 278), Nr. 51, Seite 50985-50998. URL: PM:14522996
- Jenner, P. und Olanow, C. W. (1998): Understanding cell death in Parkinson's disease, *Ann.Neurol.* (Band 44), Nr. 3 Suppl 1, Seite S72-S84. URL: PM:9749577
- Jo, M.; Kim, T.-H.; Seol, D.-W.; Esplen, J. E.; Dorko, K.; Billiar, T. R. und Strom, S. C. (2000): Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, *Nat.Med.* (Band 45), Seite 564-567.
- Ju, B. G.; Solum, D.; Song, E. J.; Lee, K. J.; Rose, D. W.; Glass, C. K. und Rosenfeld, M. G. (2004): Activating the PARP-1 sensor component of the groucho/ TLE1 corepressor complex mediates a

- CaMKinase IIdelta-dependent neurogenic gene activation pathway, *Cell* (Band 119), Nr. 6, Seite 815-829. URL: PM:15607978
- Kabat, E. A.; GLUSMAN, M. und KNAUB, V. (1948): Immunochemical estimation of albumin and gamma globulin in normal and pathological cerebrospinal fluid, *Trans.Am.Neurol.Assoc.* (Band 73), Nr. 73 Annual Meet., Seite 93. URL: PM:18111263
- Kageyama, R.; Ohtsuka, T.; Hatakeyama, J. und Ohsawa, R. (2005): Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation, *Exp.Cell Res.* (Band 306), Nr. 2, Seite 343-348. URL: PM:15925590
- Kamohara, H.; Matsuyama, W.; Shimozato, O.; Abe, K.; Galligan, C.; Hashimoto, S.; Matsushima, K. und Yoshimura, T. (2004): Regulation of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptor expression in human neutrophils, *Immunology* (Band 111), Nr. 2, Seite 186-194. URL: PM:15027904
- Kaplan, M. S. und Hinds, J. W. (1977): Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs, *Science* (Band 197), Nr. 4308, Seite 1092-1094. URL: PM:887941
- Keyoung, H. M. und Goldman, S. A. (2007): Glial progenitor-based repair of demyelinating neurological diseases, *Neurosurg.Clin.N.Am.* (Band 18), Nr. 1, Seite 93-104, x. URL: PM:17244557
- Kikuchi, A.; Takeda, A.; Onodera, H.; Kimpara, T.; Hisanaga, K.; Sato, N.; Nunomura, A.; Castellani, R. J.; Perry, G.; Smith, M. A. und Itoyama, Y. (2002): Systemic increase of oxidative nucleic acid damage in Parkinson's disease and multiple system atrophy, *Neurobiol.Dis.* (Band 9), Nr. 2, Seite 244-248. URL: PM:11895375
- Kivisakk, P.; Trebst, C.; Eckstein, D. J.; Kerza-Kwiatecki, A. P. und Ransohoff, R. M. (2001): Chemokine-based therapies for MS: how do we get there from here?, *Trends in Immunology* (Band 22), Seite 591-593.
- Kornek, B. und Lassmann, H. (1999): Axonal pathology in multiple sclerosis. A historical note, *Brain Pathology* (Band 9), Nr. 4, Seite 651-656. URL: PM:10517504
- Kornek, B.; Storch, M. K.; Weissert, R.; Wallstroem, E.; Stefferl, A.; Olsson, T.; Linington, C.; Schmidbauer, M. und Lassmann, H. (2000): Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions, *American Journal of Pathology* (Band 157), Nr. 1, Seite 267-276. URL: PM:10880396
- Krieg, A.; Krieg, T.; Wenzel, M.; Schmitt, M.; Ramp, U.; Fang, B.; Gabbert, H. E.; Gerharz, C. D. und Mahotka, C. (2003): TRAIL-beta and TRAIL-gamma: two novel splice variants of the human TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) without apoptotic potential, *Br.J.Cancer* (Band 88), Nr. 6, Seite 918-927. URL: PM:12644830
- Kuan, C. Y.; Roth, K. A.; Flavell, R. A. und Rakic, P. (2000): Mechanisms of programmed cell death in the developing brain, *Trends in neurosciences* (Band 23), Nr. 7, Seite 291-297. URL: PM:10856938
- Kuchroo, V. K.; Anderson, A. C.; Waldner, H.; Munder, M.; Bettelli, E. und Nicholson, L. B. (2002): T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire, *Annual Review of Immunology* (Band 20), Seite 101-120.
- Kurtzke, J. F. (2000): Multiple sclerosis in time and space--geographic clues to cause, *J.Neurovirol.* (Band 6 Suppl 2), Seite S134-S140. URL: PM:10871801
- Kurtzke, J. F.; Beebe, G. W. und Norman, J. E., Jr. (1985): Epidemiology of multiple sclerosis in US veterans: III. Migration and the risk of MS, *Neurology* (Band 35), Nr. 5, Seite 672-678. URL: PM:3873023
- Lamhamedi-Cherradi, S. E.; Zheng, S.; Tisch, R. M. und Chen, Y. H. (2003a): Critical roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in type 1 diabetes, *Diabetes* (Band 52), Nr. 9, Seite 2274-2278. URL: PM:12941766
- Lamhamedi-Cherradi, S. E.; Zheng, S. J.; Maguschak, K. A.; Peschon, J. und Chen, Y. H. (2003b): Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL(-/-) mice, *Nat.Immunol.* (Band 4), Nr. 3, Seite 255-260. URL: PM:12577054
- Langrish, C. L.; Chen, Y.; Blumenschein, W. M.; Mattson, J.; Basham, B.; Sedgwick, J. D.; McClanahan, T.; Kastelein, R. A. und Cua, D. J. (2005): IL-23 drives a pathogenic T cell population

that induces autoimmune inflammation, *Journal of Experimental Medicine* (Band 201), Nr. 2, Seite 233-240. URL: PM:15657292

Lassmann, H. (2005): Multiple sclerosis pathology: evolution of pathogenetic concepts, *Brain Pathology* (Band 15), Nr. 3, Seite 217-222. URL: PM:16196388

Lee, A.; Whyte, M. K. und Haslett, C. (1993): Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators, *J.Leukoc.Biol.* (Band 54), Nr. 4, Seite 283-288. URL: PM:8409750

Lee, J.; Shin, J. S.; Park, J. Y.; Kwon, D.; Choi, S. J.; Kim, S. J. und Choi, I. H. (2003): p38 mitogen-activated protein kinase modulates expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induced by interferon-gamma in fetal brain astrocytes, *J.Neurosci.Res.* (Band 74), Nr. 6, Seite 884-890. URL: PM:14648593

Leibiger, I. B. und Berggren, P. O. (2006): Sirt1: a metabolic master switch that modulates lifespan, *Nat.Med.* (Band 12), Seite 34-36.

Lenardo, M. J.; Chan, F. K.; Hornung, F.; McFarland, H. F.; Siegel, R.; Wang, J. und Zheng, L. (1999): Mature T lymphocyte apoptosis - Immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment, *Annual Review of Immunology* (Band 17), Seite 221-253.

Lock, C.; Hermans, G.; Pedotti, R.; Brendolan, A.; Schadt, E.; Garren, H.; Langer-Gould, A.; Strober, S.; Cannella, B.; Allard, J.; Klonowski, P.; Austin, A.; Lad, N.; Kaminski, N.; Galli, S. J.; Oksenberg, J. R.; Raine, C. S.; Heller, R. und Steinman, L. (2002): Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis, *Nat.Med.* (Band 8), Nr. 5, Seite 500-508. URL: PM:11984595

Loeffler, M.; Bratke, T.; Paulus, U.; Li, Y. Q. und Potten, C. S. (1997): Clonality and life cycles of intestinal crypts explained by a state dependent stochastic model of epithelial stem cell organization, *J.Theor.Biol.* (Band 186), Nr. 1, Seite 41-54. URL: PM:9176636

Lois, C.; Garcia-Verdugo, J. M. und varez-Buylla, A. (1996): Chain migration of neuronal precursors, *Science* (Band 271), Nr. 5251, Seite 978-981. URL: PM:8584933

Lum, J. J.; Bren, G.; McClure, R. und Badley, A. D. (2005): Elimination of senescent neutrophils by TNF-related apoptosis-inducing [corrected] ligand, *J.Immunol.* (Band 175), Nr. 2, Seite 1232-1238. URL: PM:16002727

Lünemann, J. D.; Waiczies, S.; Ehrlich, S.; Wendling, U.; Seeger, B.; Kamradt, T. und Zipp, F. (2002): Death ligand TRAIL induces no apoptosis but inhibits activation of human (auto)antigen-specific T cells, *J.Immunol.* (Band 168), Seite 4881-4888.

Luo, J.; Nikolaev, A. Y.; Imai, S.; Chen, D.; Su, F.; Shiloh, A.; Guarente, L. und Gu, W. (2001): Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress, *Cell* (Band 107), Nr. 2, Seite 137-148. URL: PM:11672522

Mariani, S. M. und Krammer, P. H. (1998): Surface expression of TRAIL/Apo-2 ligand in activated mouse T and B cells, *Eur.J.Immunol.* (Band 28), Seite 1492-1498.

Markakis, E. A. und Gage, F. H. (1999): Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles, *J.Comp Neurol.* (Band 406), Nr. 4, Seite 449-460. URL: PM:10205022

Martin, R. und McFarland, H. F. (1995): Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis, *Crit.Rev.Clin.Lab.Sci.* (Band 32), Seite 121-182.

Martin, R.; McFarland, H. F. und McFarlin, D. E. (1992): Immunological aspects of demyelinating diseases, *Annual Review of Immunology* (Band 10), Seite 153-187.

Martinez-Lorenzo, M. J.; Anel, A.; Gamen, S.; Monleon, I.; Lasierra, P.; Larrad, L.; Pineiro, A.; Alava, M. A. und Naval, J. (1999): Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles, *J.Immunol.* (Band 163), Seite 1274-1281.

Matysiak, M.; Jurewicz, A.; Jaskolski, D. und Selmaj, K. (2002): TRAIL induces death of human oligodendrocytes isolated from adult brain, *Brain* (Band 125), Nr. Pt 11, Seite 2469-2480. URL: PM:12390973

McBurney, M. W.; Yang, X.; Jardine, K.; Hixon, M.; Boekelheide, K.; Webb, J. R.; Lansdorp, P. M. und Lemieux, M. (2003): The mammalian SIR2alpha protein has a role in embryogenesis and gametogenesis, *Mol.Cell Biol.* (Band 23), Nr. 1, Seite 38-54. URL: PM:12482959

- McKay, R. (1997): Stem cells in the central nervous system, *Science* (Band 276), Nr. 5309, Seite 66-71. URL: PM:9082987
- Miura, Y.; Misawa, N.; Kawano, Y.; Okada, H.; Inagaki, Y.; Yamamoto, N.; Ito, M.; Yagita, H.; Okumura, K.; Mizusawa, H. und Koyanagi, Y. (2003): Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces neuronal death in a murine model of HIV central nervous system infection, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 100), Nr. 5, Seite 2777-2782. URL: PM:12601160
- Mohamed, A.; Shoker, A.; Bendjelloul, F.; Mare, A.; Alzrigh, M.; Benghuzzi, H. und Desin, T. (2003): Improvement of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) by thymoquinone; an oxidative stress inhibitor, *Biomed.Sci.Instrum.* (Band 39), Seite 440-445. URL: PM:12724933
- Monje, M. L.; Mizumatsu, S.; Fike, J. R. und Palmer, T. D. (2002): Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction, *Nat.Med.* (Band 8), Nr. 9, Seite 955-962. URL: PM:12161748
- Monje, M. L.; Toda, H. und Palmer, T. D. (2003): Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis, *Science* (Band 302), Nr. 5651, Seite 1760-1765. URL: PM:14615545
- Murre, C.; McCaw, P. S.; Vaessin, H.; Caudy, M.; Jan, L. Y.; Jan, Y. N.; Cabrera, C. V.; Buskin, J. N.; Hauschka, S. D.; Lassar, A. B. und . (1989): Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence, *Cell* (Band 58), Nr. 3, Seite 537-544. URL: PM:2503252
- Nightingale, K. P. und Becker, P. B. (1998): Structural and functional analysis of chromatin assembled from defined histones, *Methods* (Band 15), Nr. 4, Seite 343-353. URL: PM:9740722
- Nightingale, K. P.; Wellinger, R. E.; Sogo, J. M. und Becker, P. B. (1998): Histone acetylation facilitates RNA polymerase II transcription of the *Drosophila* hsp26 gene in chromatin, *EMBO J.* (Band 17), Nr. 10, Seite 2865-2876. URL: PM:9582280
- Nitsch, R.; Bechmann, I.; Deisz, R. A.; Haas, D.; Lehmann, T. N.; Wendling, U. und Zipp, F. (2000): Human brain-cell death induced by tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), *Lancet* (Band 356), Seite 827-828.
- Norton, V. G.; Imai, B. S.; Yau, P. und Bradbury, E. M. (1989): Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change, *Cell* (Band 57), Nr. 3, Seite 449-457. URL: PM:2541913
- Nossal, G. J. (1994): Negative selection of lymphocytes, *Cell* (Band 76), Nr. 2, Seite 229-239. URL: PM:8293461
- Ohsako, S.; Hyer, J.; Panganiban, G.; Oliver, I. und Caudy, M. (1994): Hairy function as a DNA-binding helix-loop-helix repressor of *Drosophila* sensory organ formation, *Genes Dev.* (Band 8), Nr. 22, Seite 2743-2755. URL: PM:7958930
- Ohtsuka, T.; Sakamoto, M.; Guillemot, F. und Kageyama, R. (2001): Roles of the basic helix-loop-helix genes *Hes1* and *Hes5* in expansion of neural stem cells of the developing brain, *J.Biol.Chem.* (Band 276), Nr. 32, Seite 30467-30474. URL: PM:11399758
- Olsson, T.; Sun, J.; Hillert, J.; Hojeberg, B.; Ekre, H. P.; Andersson, G.; Olerup, O. und Link, H. (1992): Increased numbers of T cells recognizing multiple myelin basic protein epitopes in multiple sclerosis, *Eur.J.Immunol.* (Band 22), Seite 1083-1087.
- Pan, G.; O'Rourke, K.; Chinnaiyan, A. M.; Gentz, R.; Ebner, R.; Ni, J. und Dixit, V. M. (1997): The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL, *Science* (Band 276), Seite 111-113.
- Paroush, Z.; Finley, R. L., Jr.; Kidd, T.; Wainwright, S. M.; Ingham, P. W.; Brent, R. und Ish-Horowicz, D. (1994): Groucho is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins, *Cell* (Band 79), Nr. 5, Seite 805-815. URL: PM:8001118
- Parras, C. M.; Galli, R.; Britz, O.; Soares, S.; Galichet, C.; Battiste, J.; Johnson, J. E.; Nakafuku, M.; Vescovi, A. und Guillemot, F. (2004): *Mash1* specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain, *EMBO J.* (Band 23), Nr. 22, Seite 4495-4505. URL: PM:15496983
- Parsons, X. H.; Garcia, S. N.; Pillus, L. und Kadonaga, J. T. (2003): Histone deacetylation by Sir2 generates a transcriptionally repressed nucleoprotein complex, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 100), Nr. 4, Seite 1609-1614. URL: PM:12571358
- Pearce, R. K.; Owen, A.; Daniel, S.; Jenner, P. und Marsden, C. D. (1997): Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease, *J.Neural Transm.* (Band 104), Nr. 6-7, Seite 661-677. URL: PM:9444566

- Pender, M. P. (1998): Genetically determined failure of activation-induced apoptosis of autoreactive T cells as a cause of multiple sclerosis, *Lancet* (Band 351), Nr. 9107, Seite 978-981.
- Peterson, J. W.; Bo, L.; Mork, S.; Chang, A. und Trapp, B. D. (2001): Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions, *Ann.Neurol.* (Band 50), Seite 389-400.
- Phillips, T. A.; Ni, J.; Pan, G; Ruben, S. M.; Wei, Y. F.; Pace, J. L. und Hunt, J. S. (1999): TRAIL (Apo-2L) and TRAIL receptors in human placentas: implications for immune privilege, *J.Immunol.* (Band 162), Seite 6053-6059.
- Picard, F.; Kurtev, M.; Chung, N.; Topark-Ngarm, A.; Senawong, T.; hado De, Oliveira R.; Leid, M.; McBurney, M. W. und Guarente, L. (2004): Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma, *Nature* (Band 429), Nr. 6993, Seite 771-776. URL: PM:15175761
- Picard-Riera, N.; Decker, L.; Delarasse, C.; Goude, K.; Nait-Oumesmar, B.; Liblau, R.; Pham-Dinh, D. und Evercooren, A. B. (2002): Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilizes neural progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in adult mice, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 99), Nr. 20, Seite 13211-13216. URL: PM:12235363
- Pitti, R. M.; Marsters, S. A.; Ruppert, S.; Donahue, C. J.; Moore, A. und Ashkenazi, A. (1996): Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family, *J.Biol.Chem.* (Band 271), Seite 12687-12690.
- Probert, L.; Eugster, H. P.; Akassoglou, K.; Bauer, J.; Frei, K.; Lassmann, H. und Fontana, A. (2000): TNFR1 signalling is critical for the development of demyelination and the limitation of T-cell responses during immune-mediated CNS disease, *Brain* (Band 123 (Pt 10)), Seite 2005-2019. URL: PM:11004118
- Prozorovski, T.; Schulze-Topphoff, U.; Glumm, R.; Baumgart, J.; Schroter, F.; Ninnemann, O.; Siegert, E.; Bendix, I.; Brustle, O.; Nitsch, R.; Zipp, F. und Aktas, O. (2008): Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors, *Nat.Cell Biol.* URL: PM:18344989
- Rakic, P. (2002): Neurogenesis in adult primates, *Prog.Brain Res.* (Band 138), Seite 3-14. URL: PM:12432759
- Raval, A. P.; Dave, K. R. und Perez-Pinzon, M. A. (2006): Resveratrol mimics ischemic preconditioning in the brain, *J.Cereb.Blood Flow Metab* (Band 26), Nr. 9, Seite 1141-1147. URL: PM:16395277
- Renshaw, S. A.; Parmar, J. S.; Singleton, V.; Rowe, S. J.; Dockrell, D. H.; Dower, S. K.; Bingle, C. D.; Chilvers, E. R. und Whyte, M. K. (2003): Acceleration of human neutrophil apoptosis by TRAIL, *J.Immunol.* (Band 170), Nr. 2, Seite 1027-1033. URL: PM:12517970
- Reynolds, B. A. und Weiss, S. (1992): Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system, *Science* (Band 255), Nr. 5052, Seite 1707-1710. URL: PM:1553558
- Reynolds, B. A. und Weiss, S. (1996): Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell, *Dev.Biol.* (Band 175), Nr. 1, Seite 1-13. URL: PM:8608856
- Rice, J. C. und Allis, C. D. (2001): Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation, *Curr.Opin.Cell Biol.* (Band 13), Nr. 3, Seite 263-273. URL: PM:11343896
- Ridet, J. L.; Malhotra, S. K.; Privat, A. und Gage, F. H. (1997): Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function, *Trends in neurosciences* (Band 20), Nr. 12, Seite 570-577. URL: PM:9416670
- Rodgers, J. T.; Lerin, C.; Haas, W.; Gygi, S. P.; Spiegelman, B. M. und Puigserver, P. (2005): Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1, *Nature* (Band 434), Nr. 7029, Seite 113-118. URL: PM:15744310
- Rosenberg, M. I. und Parkhurst, S. M. (2002): Drosophila Sir2 is required for heterochromatic silencing and by euchromatic Hairy/E(Spl) bHLH repressors in segmentation and sex determination, *Cell* (Band 109), Nr. 4, Seite 447-458. URL: PM:12086602
- Ross, S. E.; Greenberg, M. E. und Stiles, C. D. (2003): Basic helix-loop-helix factors in cortical development, *Neuron* (Band 39), Nr. 1, Seite 13-25. URL: PM:12848929
- Roth, W.; Isenmann, S.; Naumann, U.; Kugler, S.; Bahr, M.; Dichgans, J.; Ashkenazi, A. und Weller, M. (1999): Locoregional Apo2L/TRAIL eradicates intracranial human malignant glioma xenografts in

athymic mice in the absence of neurotoxicity, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* (Band 265), Nr. 2, Seite 479-483. URL: PM:10558893

Russell, J. H.; Rush, B.; Weaver, C. und Wang, R. (1993): Mature T cells of autoimmune lpr/lpr mice have a defect in antigen-stimulated suicide, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 90), Nr. 10, Seite 4409-4413. URL: PM:8506280

Sabelko-Downes, K. A.; Cross, A. H. und Russell, J. H. (1999): Dual role for Fas ligand in the initiation of and recovery from experimental allergic encephalomyelitis, *Journal of Experimental Medicine* (Band 189), Seite 1195-1205.

Saez-Llorens, X.; Jafari, H. S.; Severien, C.; Parras, F.; Olsen, K. D.; Hansen, E. J.; Singer, I. I. und McCracken, G. H., Jr. (1991): Enhanced attenuation of meningeal inflammation and brain edema by concomitant administration of anti-CD18 monoclonal antibodies and dexamethasone in experimental *Haemophilus meningitis*, *J.Clin.Invest* (Band 88), Nr. 6, Seite 2003-2011. URL: PM:1684364

Sakamoto, J.; Miura, T.; Shimamoto, K. und Horio, Y. (2004): Predominant expression of Sir2alpha, an NAD-dependent histone deacetylase, in the embryonic mouse heart and brain, *FEBS Lett.* (Band 556), Nr. 1-3, Seite 281-286. URL: PM:14706864

Sasai, Y.; Kageyama, R.; Tagawa, Y.; Shigemoto, R. und Nakanishi, S. (1992): Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophila hairy* and Enhancer of split, *Genes Dev.* (Band 6), Nr. 12B, Seite 2620-2634. URL: PM:1340473

Sato, K.; Niessner, A.; Kopecky, S. L.; Frye, R. L.; Goronzy, J. J. und Weyand, C. M. (2006): TRAIL-expressing T cells induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in the atherosclerotic plaque, *Journal of Experimental Medicine* (Band 203), Nr. 1, Seite 239-250. URL: PM:16418392

Scheel-Toellner, D.; Wang, K.; Henriquez, N. V.; Webb, P. R.; Craddock, R.; Pilling, D.; Akbar, A. N.; Salmon, M. und Lord, J. M. (2002): Cytokine-mediated inhibition of apoptosis in non-transformed T cells and neutrophils can be dissociated from protein kinase B activation, *Eur.J.Immunol.* (Band 32), Nr. 2, Seite 486-493. URL: PM:11828365

Schmaltz, C.; Alpdogan, O.; Kappel, B. J.; Muriglan, S. J.; Rotolo, J. A.; Ongchin, J.; Willis, L. M.; Greenberg, A. S.; Eng, J. M.; Crawford, J. M.; Murphy, G. F.; Yagita, H.; Walczak, H.; Peschon, J. J. und van den Brink, M. R. (2002): T cells require TRAIL for optimal graft-versus-tumor activity, *Nat.Med.* (Band 8), Nr. 12, Seite 1433-1437. URL: PM:12426560

Secchiero, P.; Corallini, F.; di Iasio, M. G.; Gonelli, A.; Barbarotto, E. und Zauli, G. (2005): TRAIL counteracts the proadhesive activity of inflammatory cytokines in endothelial cells by down-modulating CCL8 and CXCL10 chemokine expression and release, *Blood* (Band 105), Nr. 9, Seite 3413-3419. URL: PM:15644410

Seki, T. und Arai, Y. (1999): Temporal and spacial relationships between PSA-NCAM-expressing, newly generated granule cells, and radial glia-like cells in the adult dentate gyrus, *J.Comp Neurol.* (Band 410), Nr. 3, Seite 503-513. URL: PM:10404415

Shapiro, L. A. und Ribak, C. E. (2005): Integration of newly born dentate granule cells into adult brains: hypotheses based on normal and epileptic rodents, *Brain Res.Brain Res.Rev.* (Band 48), Nr. 1, Seite 43-56. URL: PM:15708627

Sian, J.; Dexter, D. T.; Lees, A. J.; Daniel, S.; Agid, Y.; Javoy-Agid, F.; Jenner, P. und Marsden, C. D. (1994a): Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia, *Ann.Neurol.* (Band 36), Nr. 3, Seite 348-355. URL: PM:8080242

Sian, J.; Dexter, D. T.; Lees, A. J.; Daniel, S.; Jenner, P. und Marsden, C. D. (1994b): Glutathione-related enzymes in brain in Parkinson's disease, *Ann.Neurol.* (Band 36), Nr. 3, Seite 356-361. URL: PM:8080243

Silver, J. und Miller, J. H. (2004): Regeneration beyond the glial scar, *Nat.Rev.Neurosci* (Band 5), Nr. 2, Seite 146-156. URL: PM:14735117

Smith, J.; Ladi, E.; Mayer-Proschel, M. und Noble, M. (2000): Redox state is a central modulator of the balance between self-renewal and differentiation in a dividing glial precursor cell, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 97), Nr. 18, Seite 10032-10037. URL: PM:10944195

Sommer, L.; Shah, N.; Rao, M. und Anderson, D. J. (1995): The cellular function of MASH1 in autonomic neurogenesis, *Neuron* (Band 15), Nr. 6, Seite 1245-1258. URL: PM:8845150

- Song, K.; Chen, Y; Göke, R.; Wilmen, A.; Seidel, C.; Göke, A. und Hilliard, B. (2000): Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression, *Journal of Experimental Medicine* (Band 191), Seite 1095-1103.
- Sospedra, M. und Martin, R. (2005): Immunology of multiple sclerosis, *Annual Review of Immunology* (Band 23), Seite 683-747. URL: PM:15771584
- Sotgiu, S.; Pugliatti, M.; Fois, M. L.; Arru, G.; Sanna, A.; Sotgiu, M. A. und Rosati, G. (2004): Genes, environment, and susceptibility to multiple sclerosis, *Neurobiol.Dis.* (Band 17), Nr. 2, Seite 131-143. URL: PM:15474351
- Steinman, L. (1996): Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system, *Cell* (Band 85), Nr. 3, Seite 299-302. URL: PM:8616884
- Strahl, B. D. und Allis, C. D. (2000): The language of covalent histone modifications, *Nature* (Band 403), Nr. 6765, Seite 41-45. URL: PM:10638745
- Takahashi, T.; Tanaka, M.; Brannan, C. I.; Jenkins, N. A.; Copeland, N. G.; Suda, T. und Nagata, S. (1994): Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand, *Cell* (Band 76), Nr. 6, Seite 969-976. URL: PM:7511063
- Takata, T. und Ishikawa, F. (2003): Human Sir2-related protein SIRT1 associates with the bHLH repressors HES1 and HEY2 and is involved in HES1- and HEY2-mediated transcriptional repression, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* (Band 301), Nr. 1, Seite 250-257. URL: PM:12535671
- Tanno, M.; Sakamoto, J.; Miura, T.; Shimamoto, K. und Horio, Y. (2007): Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1, *J.Biol.Chem.* (Band 282), Nr. 9, Seite 6823-6832. URL: PM:17197703
- Tomita, K.; Ishibashi, M.; Nakahara, K.; Ang, S. L.; Nakanishi, S.; Guillemot, F. und Kageyama, R. (1996): Mammalian hairy and Enhancer of split homolog 1 regulates differentiation of retinal neurons and is essential for eye morphogenesis, *Neuron* (Band 16), Nr. 4, Seite 723-734. URL: PM:8607991
- Trapp, B. D.; Peterson, J.; Ransohoff, R. M.; Rudick, R. A.; Mork, S. und Bo, L. (1998): Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis, *New England Journal of Medicine* (Band 338), Seite 278-285.
- Tuomanen, E. I.; Saukkonen, K.; Sande, S.; Cioffe, C. und Wright, S. D. (1989): Reduction of inflammation, tissue damage, and mortality in bacterial meningitis in rabbits treated with monoclonal antibodies against adhesion-promoting receptors of leukocytes, *Journal of Experimental Medicine* (Band 170), Nr. 3, Seite 959-969. URL: PM:2570120
- Turner, B. M. (2002): Cellular memory and the histone code, *Cell* (Band 111), Nr. 3, Seite 285-291. URL: PM:12419240
- Uberti, D.; Cantarella, G.; Facchetti, F.; Cafici, A.; Grasso, G.; Bernardini, R. und Memo, M. (2004): TRAIL is expressed in the brain cells of Alzheimer's disease patients, *NeuroReport* (Band 15), Nr. 4, Seite 579-581. URL: PM:15094456
- van, Praag H.; Kempermann, G. und Gage, F. H. (1999): Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus, *Nat.Neurosci.* (Band 2), Nr. 3, Seite 266-270. URL: PM:10195220
- van, Praag H.; Schinder, A. F.; Christie, B. R.; Toni, N.; Palmer, T. D. und Gage, F. H. (2002): Functional neurogenesis in the adult hippocampus, *Nature* (Band 415), Nr. 6875, Seite 1030-1034. URL: PM:11875571
- Vaquero, A.; Sternglanz, R. und Reinberg, D. (2007): NAD⁺-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs, *Oncogene* (Band 26), Nr. 37, Seite 5505-5520. URL: PM:17694090
- Vaziri, H.; Dessain, S. K.; Ng, Eaton E.; Imai, S. I.; Frye, R. A.; Pandita, T. K.; Guarente, L. und Weinberg, R. A. (2001): hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase, *Cell* (Band 107), Nr. 2, Seite 149-159. URL: PM:11672523
- Wade, P. A.; Pruss, D. und Wolffe, A. P. (1997): Histone acetylation: chromatin in action, *Trends Biochem.Sci.* (Band 22), Nr. 4, Seite 128-132. URL: PM:9149532
- Walczak, H.; Degli-Esposti, M. A.; Johnson, R. S.; Smolak, P. J.; Waugh, J. Y.; Boiani, N.; Timour, M. S.; Gerhart, M. J.; Schooley, K. A.; Smith, C. A.; Goodwin, R. und Rauch, C. (1997): TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL, *EMBO J.* (Band 16), Seite 5386-5397.

- Walczak, H.; Miller, R. E.; Ariail, K.; Gliniak, B.; Griffith, T. S.; Kubin, M.; Chin, W.; Jones, J.; Woodward, A.; Le, T.; Smith, C.; Smolak, P.; Goodwin, R. G.; Rauch, C. T.; Schuh, J. C. und Lynch, D. H. (1999): Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo, *Nat.Med.* (Band 5), Seite 157-163.
- Wandinger, K. P.; Lunemann, J. D.; Wengert, O.; Bellmann-Strobl, J.; Aktas, O.; Weber, A.; Grundstrom, E.; Ehrlich, S.; Wernecke, K. D.; Volk, H. D. und Zipp, F. (2003): TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis, *Lancet* (Band 361), Nr. 9374, Seite 2036-2043. URL: PM:12814715
- Weber, J. R.; Angstwurm, K.; Burger, W.; Einhaupl, K. M. und Dirnagl, U. (1995): Anti ICAM-1 (CD 54) monoclonal antibody reduces inflammatory changes in experimental bacterial meningitis, *Journal of Neuroimmunology* (Band 63), Nr. 1, Seite 63-68. URL: PM:8557826
- Weber, J. R. und Tuomanen, E. I. (2007): Cellular damage in bacterial meningitis: an interplay of bacterial and host driven toxicity, *Journal of Neuroimmunology* (Band 184), Nr. 1-2, Seite 45-52. URL: PM:17210186
- Weinstein, D. E.; Burrola, P. und Kilpatrick, T. J. (1996): Increased proliferation of precursor cells in the adult rat brain after targeted lesioning, *Brain Res.* (Band 743), Nr. 1-2, Seite 11-16. URL: PM:9017224
- Weiss, S.; Dunne, C.; Hewson, J.; Wohl, C.; Wheatley, M.; Peterson, A. C. und Reynolds, B. A. (1996): Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis, *Journal of Neuroscience* (Band 16), Nr. 23, Seite 7599-7609. URL: PM:8922416
- Wekerle, H.; Kojima, K.; Lannes-Vieira, J.; Lassmann, H. und Linington, C. (1994): Animal models, *Ann.Neurol.* (Band 36), Seite S47-S53.
- Wekerle, H.; Linington, C.; Lassmann, H. und Meyermann, R. (1986): Cellular immune reactivity within the CNS, *Trends in neurosciences* (Band 9), Seite 271-277.
- Wendling, U.; Walczak, H.; Dörr, J.; Jacobi, C.; Weller, M.; Krammer, P. H. und Zipp, F. (2000): Expression of TRAIL receptors in human autoreactive and foreign antigen-specific T cells, *Cell Death and Differentiation* (Band 7), Seite 637-644.
- Wernig, M. und Brustle, O. (2002): Fifty ways to make a neuron: shifts in stem cell hierarchy and their implications for neuropathology and CNS repair, *J.Neuropathol.Exp.Neurol* (Band 61), Nr. 2, Seite 101-110. URL: PM:11853015
- Wiley, S. R.; Schooley, K.; Smolak, P. J.; Din, W. S.; Huang, C. P.; Nicholl, J. K.; Sutherland, G. R.; Smith, T. D.; Rauch, C.; Smith, C. A. und Goodwin, R. G. (1995): Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis, *Immunity* (Band 3), Seite 673-682.
- Williams, R. E.; Azuara, V.; Perry, P.; Sauer, S.; Dvorkina, M.; Jorgensen, H.; Roix, J.; McQueen, P.; Misteli, T.; Merkenschlager, M. und Fischer, A. G. (2006): Neural induction promotes large-scale chromatin reorganisation of the Mash1 locus, *J.Cell Sci.* (Band 119), Seite 132-140.
- Wu, G. S.; Burns, T. F.; Zhan, Y.; Alnemri, E. S. und El-Deiry, W. S. (1999): Molecular cloning and functional analysis of the mouse homologue of the KILLER/DR5 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor, *Cancer Res.* (Band 59), Seite 2770-2775.
- Wytenbach, A.; Sauvageot, O.; Carmichael, J.; az-Latoud, C.; Arrigo, A. P. und Rubinsztein, D. C. (2002): Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin, *Hum.Mol.Genet.* (Band 11), Nr. 9, Seite 1137-1151. URL: PM:11978772
- Yeung, F.; Hoberg, J. E.; Ramsey, C. S.; Keller, M. D.; Jones, D. R.; Frye, R. A. und Mayo, M. W. (2004): Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase, *EMBO J.* (Band 23), Nr. 12, Seite 2369-2380. URL: PM:15152190
- Zamvil, S. S. und Steinman, L. (1990): The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis, *Annual Review of Immunology* (Band 8), Seite 579-621.
- Zhang, J.; Markovic-Plese, S.; Lacet, B.; Raus, J.; Weiner, H. L. und Hafler, D. A. (1994): Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis, *Journal of Experimental Medicine* (Band 179), Seite 973-984.

- Zhang, Q.; Wang, S. Y.; Nottke, A. C.; Rocheleau, J. V.; Piston, D. W. und Goodman, R. H. (2006): Redox sensor CtBP mediates hypoxia-induced tumor cell migration, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A (Band 103), Nr. 24, Seite 9029-9033. URL: PM:16740659
- Zheng, S. J.; Wang, P.; Tsabary, G. und Chen, Y. H. (2004): Critical roles of TRAIL in hepatic cell death and hepatic inflammation, J.Clin.Invest. (Band 113), Nr. 1, Seite 58-64. URL: PM:14702109
- Zipp, F. und Aktas, O. (2006): The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases, Trends Neurosci (Band 29), Nr. 9, Seite 518-527. URL: PM:16879881
- Zipp, F.; Sommer, N.; Rösener, M.; Dichgans, J. und Martin, R. (1997): Multiple Sklerose. Neue therapeutische Strategien im experimentellen Stadium, Der Nervenarzt (Band 68), Seite 94-101.
- Zipp, F.; Weber, F.; Huber, S.; Sotgiu, S.; Czlankowska, A.; Holler, E.; Albert, E.; Weiss, E. H.; Wekerle, H. und Hohlfeld, R. (1995): Genetic control of multiple sclerosis: increased production of lymphotoxin and tumor necrosis factor-alpha by HLA-DR2+ T cells, Ann.Neurol. (Band 38), Nr. 5, Seite 723-730. URL: PM:7486863
- Zipp, F.; Weller, M.; Calabresi, P. A.; Frank, J. A.; Bash, C. N.; Dichgans, J.; McFarland, H. F. und Martin, R. (1998): Increased serum levels of soluble CD95 (APO-1/Fas) in relapsing remitting multiple sclerosis, Ann.Neurol. (Band 43), Seite 116-120.

Publikationen (* gleichberechtigte Erstautoren)

Teil der vorliegenden Arbeit:

Prozorovski T*, **Schulze-Topp hoff U***, Glumm R, Baumgart J, Schröter F, Ninnemann O, Siegert E, Bendix I, Brüstle O, Nitsch R, Zipp F and Aktas O: Sirt1 critically contributes to the redox-dependent fate of neural progenitors. Nat. Cell Biol. 2008; in press

Hoffmann O, Priller J, Prozorovski T, **Schulze-Topp hoff U**, Baeva N, Lunemann JD, Aktas O, Mahrhofer C, Stricker S, Zipp F, Weber JR: TRAIL limits excessive host immune responses in bacterial meningitis. J Clin Invest 2007;117:2004-2013.

Aktas O, Smorodchenko A, Brocke S, Infante-Duarte C, **Schulze-Topp hoff U**, Vogt J, Prozorovski T, Meier S, Osmanova V, Pohl E, Bechmann I, Nitsch R, Zipp F: Neuronal Damage in Autoimmune Neuroinflammation Mediated by the Death Ligand TRAIL. Neuron 2005, 46:421-432

Nicht Teil der Doktorarbeit:

Aktas O, **Schulze-Topp hoff U**, Zipp F: The role of TRAIL/TRAIL receptors in central nervous system pathology. Front Biosci 2007;12:2912-2921.

Schulze-Topp hoff U, Prat A, Bader M, Zipp F, Aktas O: Roles of the kallikrein/kinin system in the adaptive immune system. Int Immunopharmacol 2008;8:155-160.

Zeni P, Doepker E, **Schulze-Topp hoff U**, Huewel S, Tenenbaum T, Galla HJ: MMPs contribute to TNF-alpha-induced alteration of the blood-cerebrospinal fluid barrier in vitro. Am J Physiol Cell Physiol 2007;293:C855-C864.

Niesner U, Albrecht I, Janke M, Doebis C, Eulenburg K, Chang H, Kreher S, Koeck J, Baumgrass R, Bonhagen K, Kamradt T, Enghard P, Humrich J, Rutz S, **Schulze-Topp hoff U**, Aktas O, Bartfeld S, Radbruch H, Baumgart D, Duchmann R, Rudwaleit M, Haeupl T, Gitelman I, Krenn V, Gruen J, Siepe J, Zeitz M, Wiedenmann B, Zipp F, Hamann A, Janitz M, Scheffold A, Burmester G, Radbruch A: Autoregulation of Th1-mediated inflammation by *twist1*. J Exp Med 2008; in press

Manuskript eingereicht:

Schulze-Topp hoff U, Prat A, Prozorovski T, Schadock I, Tran E, Siffrin V, Bader M, Zipp F and Aktas O: Activation of bradykinin receptor 1 limits encephalitogenic T lymphocyte homing in autoimmune inflammation of the brain.

Siffrin V, Brandt A, Radbruch H, Herz J, Boldakowa N, Hahner A, **Schulze-Topp hoff U**, Nitsch R, Zipp F: Lymphocyte in vivo imaging in the brain reveals entrapment by CXCR4.

Tysiak E, Smyth M, Schellenberger E, Prozorowski T, Aktas O, **Schulze-Topp hoff U**, Schnorr J, Wagner S, Taupitz M, Zipp F, Wuerfel J: Very Small Superparamagnetic Iron Oxide Particles facilitate T cell labeling.

Bendix I, Pfüller CF, Leuenberger T, Luenstedt S, Siffrin V, **Schulze-Topp hoff U**, Zipp F, Waiczies S: Extracellular related kinase 1 regulates inflammation but supports CNS injury: Janus in neuroinflammation. Manuskript in Vorbereitung

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze keinen entsprechenden Doktorgrad.

Mir ist die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung bekannt.

Berlin, 18.06.2008